

Université du Québec
INRS-Eau

**LA TOXICITÉ DE MÉLANGES DE MÉTAUX (AL, ZN),
EN CONDITIONS ACIDES
VIS-À-VIS DU SAUMON DE L'ATLANTIQUE *SALMO SALAR***

Par
Robert L. Roy

Thèse
présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiæ doctor (Ph.D.)
en Sciences de l'eau

31 mars 1997

AVANT-PROPOS

I dedicate this thesis to my wife Line, who supported me throughout this long process with love and patience. I also dedicate this work to my son and daughter, Nicolas and Julie, for trying to understand when their father was too busy or too tired to give them the attention that they deserved. This thesis is as much yours as mine because of the sacrifices you have made so a husband and a father could put some letters after his name. I love you all very much.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont collaboré à la réalisation de cette étude.

De simples mots ne suffisent pas à exprimer la contribution que mon directeur de thèse, monsieur Peter G.C. Campbell, a apportée à mon développement intellectuel. Ce fut un privilège de travailler sous sa direction judicieuse.

Je remercie en particulier les membres de mon comité d'encadrement, messieurs Neil Hutchinson et Gilles Lacroix pour le temps et l'effort dévoué à cette responsabilité. Les discussions avec M. Landis Hare, M. André Tessier et M. J-C. Auclair ont contribué à l'évolution de ma pensée comme chercheur et comme être humain. La rédaction de la thèse a été facilitée par des commentaires utiles qui m'ont été fournis sur un ou plusieurs chapitres par: M. L. Hare, M. N. Hutchinson, M. G. Lacroix et M. C. Exley. La synthèse a été traduite par Mme Line McLaughlin - la clarté du résultat est due à son habileté et à son dévouement; les difficultés sont la responsabilité de l'auteur.

Le laboratoire de l'INRS-Eau est renommé pour la qualité de ses travaux de recherche. Une grande partie de ce succès est due au personnel technique, qui malgré leurs autres responsabilités, ont toujours été disponibles pour aider un biologiste dans un laboratoire de chimie. Je veux remercier Stéphane Prémont, Paul Boisvert, Michelle Bordeleau, Pauline Fournier, René Rodrigue, Sylvie St-Pierre et Bernard Veilleux de leur aide de temps à autre, et surtout de leur amitié. Vous êtes à la base de la force de la science.

Je veux aussi remercier les assistants de recherche, les étudiants d'été, et les stagiaires qui ont contribué à cette oeuvre. Line McLaughlin, Joël Gauthier, Eric Fortin et Nathalie Savard m'ont aidé à compléter les expériences et les analyses décrites dans cette étude. La valeur de leurs contributions ne peut qu'être trop faiblement annoncée ici.

Un avantage important de la vie étudiante est l'amitié des autres étudiants. Je me trouve chanceux d'avoir eu l'opportunité de rencontrer et de partager ma vie étudiante avec Albert Craig, Michael Twiss, Kevin Wilkinson, Yves Couillard, Joël Gauthier, Catherine Munger, et Miguel Heurta-Diaz.

Cette étude a été réalisée grâce au soutien financier de Pêches et Océans Canada, du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et du Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). Nos remerciements s'adressent aussi au ministère du Loisir, de la Chasse et de la Pêche du Québec (MLCP) qui a fourni les saumons pour certaines expériences.

RÉSUMÉ

Le modèle de l'ion libre (MIL) suggère que la toxicité d'un métal est déterminée par la concentration de l'ion libre $M(H_2O)_n^{z+}$ ou pour plus de simplicité, M^{z+} (Pagenkopf, 1983; Morel et Hering, 1993; Campbell, 1995). Le MIL attribue les effets biologiques d'un métal à ses interactions avec un ligand cellulaire (L) localisé à la surface biologique (par exemple la membrane branchiale) pour former un complexe M^{z+} -L-cellule. La réponse biologique, par exemple la toxicité, est supposée proportionnelle à la concentration de ce complexe de surface, elle-même proportionnelle à la concentration de l'ion libre dans le milieu.

Le but de ce travail a été de déterminer si la concentration de l'ion libre Al^{3+} détermine la toxicité de ce métal dans les conditions suivantes: à trois concentrations du proton: pH 4.5, pH 4.8 et pH 5.2; en présence de concentrations sous-létales de Zn, à ces mêmes pH; et en présence de matière organique dissoute (MOD) naturelle, à pH 5.0.

Les hypothèses ont été examinées dans des conditions représentatives de celles observées à la période de la fonte des neiges dans les eaux des rivières de la Côte-Nord du Québec. L'approche expérimentale a consisté à exposer des juvéniles de saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) à des eaux douces reconstituées, à des pH acides dans la gamme de 4.5 à 5.2. Les solutions d'exposition inorganiques ont été préparées par ajout de concentrations létales d'Al et sous-létales de Zn. Les solutions organiques ont été préparées avec des concentrations d'Al et un acide fulvique naturel.

Comme démontré par d'autres études, il a été observé ici que la toxicité de l'aluminium inorganique diminue à mesure que le pH diminue. Cependant, la présente étude révèle que la seule connaissance de la concentration de l'ion libre ne permet pas de prédire les effets biologiques de l'aluminium. Tout d'abord, les CL-50 déterminées à trois niveaux de pH sont différentes, même lorsqu'elles sont exprimées en termes de l'ion Al^{3+} . De plus, même si l'on tient compte du degré d'ionisation des sites branchiaux, le produit de la concentration de l'ion libre avec la proportion de sites L-branchie_{libre} n'est pas constant pour l'éventail des pH expérimentaux. Le produit démontre une dépendance marquée du pH, même en tenant compte des effets du pH sur l'ionisation des groupements fonctionnels présents à la surface branchiale. On peut donc conclure que le modèle d'ion libre, 'modifié' pour tenir compte de la compétition entre le proton H^+ et l'ion libre Al^{3+} à la surface branchiale, n'explique qu'une partie de la dépendance des valeurs CL-50(Al^{3+}) envers le pH.

Cette étude démontre également que les concentrations faibles de zinc caractéristiques du milieu naturel causent une toxicité supplémentaire en présence d'aluminium et à faible pH. Cet effet n'est pas mis en évidence par les données de CL-50(Al^{3+}), qui n'indiquent pas de différences significatives entre l'exposition à l'aluminium et l'exposition aux deux métaux. Cependant, les résultats d'une analyse stratifiée des temps de survie ont démontré un effet significativement négatif du zinc sur les poissons exposés au mélange Al-Zn. Nous pouvons donc conclure que la présence de zinc n'atténue pas la toxicité de l'aluminium dans ces conditions, mais entraîne plutôt une diminution des temps de survie pour les poissons exposés aux deux métaux. La modélisation

des temps de survie est un outil puissant pour prédire les effets des mélanges de métaux sur les populations à risque.

L'hypothèse d'une toxicité additive pour l'Al et le Zn est confirmée par le fait que l'accumulation de Zn dans les branchies a été indépendante de la concentration d'Al lors d'expositions conjointes, à pH 4.8. Il se peut que ces deux métaux agissent à des sites différents sur la membrane branchiale. Une portion appréciable du Zn a été liée par le mucus, quoique cette portion ait été moins élevée que celle observée pour l'Al dans des études comparables. Ces résultats soulignent l'importance du mucus dans l'accumulation de métaux dans les branchies et peuvent expliquer partiellement la toxicité accrue observée pour les mélanges des deux métaux à faible pH.

La présente étude démontre également que, contrairement à ce que prédit le modèle de l'ion libre, l'aluminium inorganique est moins toxique lorsqu'il est incorporé à des solutions d'acide fulvique. En présence d'AF, la CL-50, exprimée en μM d'Al inorganique, diffère significativement de la CL-50 en conditions inorganiques ($p < 0.05$), étant de deux à trois fois plus élevée que celle-ci, à pH 5.0. La même observation peut être faite lorsque la CL-50 est exprimée en Al dialysable mesuré dans les bassins d'exposition à l'AF. Les effets biologiques de l'acide fulvique, qui semble offrir une protection contre la toxicité des métaux au niveau de la membrane des branchies, doivent être pris en considération dans les études de la toxicologie des métaux en présence de matière organique dissoute.

Ces conclusions peuvent avoir des applications sur le terrain. À la fonte des neiges, les populations de poisson peuvent être exposées à des augmentations soudaines et extrêmes de l'acidité et de la concentration en aluminium d'une durée de plusieurs jours (Campbell *et al.*, 1992). La présence de faibles quantités d'autres métaux comme le zinc peut réduire le temps de survie et par conséquent causer une mortalité accrue durant de tels épisodes. Par ailleurs, la matière organique dissoute naturelle, comme l'acide fulvique, peut offrir une protection contre la toxicité des métaux meilleure que celle résultant d'une simple diminution de la concentration de l'ion libre.

ABSTRACT

The free ion activity model (FIAM) suggests that the toxicity of a metal is determined by the concentration of the free or aquo ion $-M(H_2O)^{Z+}$ or M^{Z+} for simplicity (Pagenkopf, 1983; Morel and Hering, 1993; Campbell, 1995). To cause a biological effect, the metal must interact with a ligand on the cell membrane (L-cell) to form a complex (M^{Z+} -L-cell). The biological response is predicted to be proportional to the concentration of the surface complex $[M-L-cell^{(z-n)+}]$ which is in turn determined by the $[M^{Z+}]$ in solution.

The objective of this study was thus to determine if the concentration of the free ion Al^{3+} determines the toxicity of the metal under the following conditions: at three pH levels, pH 4.5, pH 4.8 and pH 5.2; in the presence of sub-lethal concentrations of Zn; and in the presence of dissolved organic matter (DOM) at pH 5.0.

These hypotheses were examined under conditions representative of those encountered during snowmelt in the soft waters of the rivers of Québec's North Shore. The experimental approach involved the exposure of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) to a reconstituted acidic soft water, in the range pH 4.5 - pH 5.2. Inorganic exposure solutions were prepared by the addition of lethal concentrations of Al and sub-lethal concentrations of Zn. Organic exposure solutions were prepared with a natural fulvic acid and additions of Al.

As has been previously reported, the toxicity of inorganic Al decreased as the pH decreased. Even when expressed in terms of the free Al^{3+} ion, to take into account pH-induced changes in Al speciation in solution, LC-50(Al^{3+}) values increased 45-fold in less than a single pH decade, from 0.15 μM at pH 5.3 to 6.8 μM at pH 4.4. Knowledge of the free-ion concentration alone is clearly not sufficient to predict the biological effects of Al. In addition, even when the proportion of ionized gill sites is taken into account, the product of the free Al^{3+} concentration and the proportion of free L-gill sites is not constant over the range of experimental pH values; the product still shows a marked pH dependence even after the effect of pH on the gill surface is taken into account. It can be concluded that the "modified" FIAM, involving competition between the proton, H^+ , and the free Al ion, Al^{3+} , at the gill surface, can explain part of the pH dependence of the LC-50 (Al^{3+}) values, but that there remains some residual pH dependence, as yet unexplained.

This study also revealed that environmentally realistic concentrations of Zn cause additional toxicity in the presence of Al at low pH. The results of a stratified survival time analysis show a highly significant negative effect of Zn on fish exposed to the Al + Zn mixture. The conclusion is that Zn does not attenuate the toxicity of Al under these conditions, but rather decreases survival times of individuals exposed to both metals. This effect was not generally apparent in the LC-50 data, where few significant differences in toxicity were detected between the single metal and metal-mixture exposures. Survival time modeling offers a powerful tool to predict the effects of such mixtures on the populations at risk.

The hypothesis of an additive toxicity for Al and Zn was supported by results indicating that the gill accumulation of Zn was independent of Al concentration in joint exposures at pH 4.8. A significant proportion of Zn appeared to be bound by mucus, though this proportion was less than mucus-bound Al determined in similar studies. It is possible that the two metals bind to different sites on the gill, or that the number of gill sites is not limited, permitting independent binding and an additive toxicity. These results emphasize the importance of mucus in the gill accumulation of metals and they can partially explain the increased toxicity observed in mixtures of the two metals at low pH.

This study demonstrated that inorganic Al was less toxic in fulvic acid solutions than in the standard reconstituted soft water at pH 5.0. In the presence of a natural fulvic acid (FA), the LC-50, expressed as μM of inorganic Al, is significantly different than the LC-50 determined under inorganic conditions ($p < 0.05$), i.e., approximately two to three times greater than for inorganic conditions at the same pH. A similar pattern was observed when the LC-50 is expressed as dialysable Al measured in the FA exposure tanks. This suggests that the biological effects of fulvic acid, which may provide protection against toxicity at the level of the gill membrane, should be considered in future studies of metal toxicity in acidic natural waters.

These findings may be relevant to situations in the field. For example, during snow melt fish can be exposed to an acid-aluminum pulse lasting several days. The presence of low levels of other metals, such as Zn, may reduce the survival time, thereby causing increased mortality during such episodes. In contrast, the presence of dissolved organic matter may offer a degree of protection against Al, greater than that simply provided by a reduction in the concentration of the free ion.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	i
REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	v
SYNTHÈSE	1
1.0. PRÉFACE/ INTRODUCTION	1
1.1. L'acidification et les métaux	3
1.2. La toxicité des mélanges de métaux	4
1.3. Le rôle de la matière organique dissoute	5
1.4. Le modèle de l'ion libre	6
1.5. Le modèle de l'ion libre et la toxicité de l'Al à faible pH	7
1.6. Le modèle de l'ion libre et la toxicité de mélanges d'Al et de Zn:	8
1.7. Le modèle de l'ion libre et la biodisponibilité des métaux en présence de MOD	9
2.0. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE ET HYPOTHÈSES	12
3.0. MATÉRIEL ET MÉTHODES	15
3.1. Organisme cible - le saumon de l'Atlantique	15
3.2. Eau douce reconstituée (EDR): préparation et stabilisation	15
3.3. Acclimatation et maintien des organismes	16
3.4. Solutions d'exposition	16
3.5. Bioessais en continu	17
3.5.1. Bioessais avec les mélanges Al-Zn: toxicité	17
3.5.2. Essais avec les solutions Al-AF et Al-EDR	18
3.6. Bioessais en conditions statiques	19
3.6.1. Essais avec les mélanges Al-Zn: accumulation de Zn dans les branchies	19
3.6.2. Exposition aux solutions d'EDR ou d'AF à pH 5.0	20
3.7. Calcul des CL-50	21
3.8. Analyse des métaux	22
3.8.1. Al	22
3.8.2. Zn	23
3.9. Mesure du carbone organique total (COT)	23
3.10. Calcul de la spéciation chimique de l'Al par modélisation de l'équilibre chimique	24
3.11. Traitement des branchies et évaluation du Zn total et lié: traitement à l'EDTA et technique d'épongeage	24
4.0. RÉSULTATS ET DISCUSSION	28
4.1. Toxicité de l'Al à faible pH	28
4.2. La toxicité du Zn à faible pH	30
4.3. Toxicité des mélanges d'Al et de Zn	31
4.3.1. Modélisation des temps de survie - approche	32
4.3.2. Modélisation des temps de survie - résultats	34
4.4. Accumulation de Zn dans les branchies en présence d'Al	36

4.4.1. Variation des comptes de Zn.....	36
4.4.2. Zn branchial - expérience 7.....	37
4.4.3. Zn branchial et Zn lié - expériences 8 et 9.....	38
4.4.4. Le rôle du mucus.....	39
4.4.5. L'accumulation de Zn sur les branchies.....	41
4.5. Toxicité de l'Al en présence de l'acide fulvique.....	43
4.5.1. Conditions dans les bassins d'exposition Al-AF.....	43
4.5.2. Toxicité des solutions Al-AF et Al-EDR.....	44
4.5.3. Pré-exposition à l'AF sans Al.....	46
4.5.4. Modèles de régression pour l'exposition à Al-AF et Al-EDR à pH 5.0.....	46
4.5.5. Comparaison avec la littérature.....	47
4.5.6. Implications environnementales.....	49
5.0. CONCLUSION.....	51
5.1. Hypothèses et résultats.....	51
5.2. Le modèle de l'ion libre et la toxicité de l'Al à faible pH.....	52
5.3. Le modèle de l'ion libre et la toxicité du Zn à faible pH.....	56
5.4. Le modèle de l'ion libre et la toxicité de mélanges d'Al et de Zn:.....	57
5.5. Le modèle de l'ion libre et la toxicité de l'Al en présence de matière organique dissoute naturelle (MOD).....	58
6.0. PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	61
BIBLIOGRAPHIE.....	62
CHAPITRE 1.....	100
CHAPITRE 2.....	139
CHAPITRE 3.....	165
ANNEXES.....	195
ANNEXE 1.....	196
ANNEXE 2.....	213
ANNEXE 3.....	216
ANNEXE 4.....	222
ANNEXE 5.....	239
ANNEXE 6.....	247

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 A. Sommaire d'études de laboratoire sélectionnées sur la toxicité de mélanges de métaux pour les poissons.	77
Tableau 1 B. Sommaire d'études de laboratoire sélectionnées sur la toxicité de mélanges de métaux pour les poissons.	78
Tableau 2. La toxicité des métaux en présence de matière organique naturelle: exceptions possibles au modèle de l'ion libre (adapté de Campbell, 1995).	79
Tableau 3. Description des expériences.	80
Tableau 4. Mesures moyennes du pH et des concentrations de Zn dans les bassins expérimentaux (ÉT; n).	81
Tableau 5. Conditions expérimentales moyennes (pH et carbone organique total) dans les bassins d'exposition à l'Al (solutions EDR et AF).	82
Tableau 6. Conditions expérimentales dans les expositions au ⁶⁵ Zn et à des concentrations en Al.	83
Tableau 7. Conditions expérimentales moyennes (pH, oxygène dissous, OD, et carbone organique total, COT; (ÉT, n)) dans les bassins de pré-exposition (solutions EDR et AF).	84
Tableau 8. Valeurs CL-50 (limites de confiance à 95%) en µM Al calculées pour les bioessais avec l'Al ou un mélange Al et Zn.	85
Tableau 9. Valeurs CL-50 (tableau 10) exprimées comme l'ion libre, Al ³⁺ (µM).	86
Tableau 10. Le dépendance de la toxicité de l'Al envers le pH.	87
Tableau 11. Dépendance de la toxicité du Zn vis-à-vis du pH.	88
Tableau 12. Valeurs log-vraisemblance et paramètres estimés (valeurs β) avec les termes des différentes covariables d'après la modélisation des temps de survie pour les bioessais au pH 4.5, selon le modèle de hasard proportionnel de Cox.	89
Tableau 13. Valeurs log-vraisemblance et paramètres estimés (valeurs β) avec les termes des différentes covariables d'après la modélisation des temps de survie pour les bioessais au pH 4.8, selon le modèle de hasard proportionnel de Cox.	90
Tableau 14. Valeurs log-vraisemblance et paramètres estimés (valeurs β) avec les termes des différentes covariables d'après la modélisation des temps de survie pour les bioessais au pH 5.2, selon le modèle de hasard proportionnel de Cox.	91
Tableau 15. Accumulation de Zn (⁶⁵ Zn: comptes moyens·min. ⁻¹ · g ⁻¹ tissu branchial (ÉT); Zn total: µg g ⁻¹ tissu branchial (ÉT)) sur les branchies de saumon après une exposition à 1.6 µM Zn et à des concentrations en Al dans l'expérience 7.	92
Tableau 16. Comptes de ⁶⁵ Zn (comptes moyens·min. ⁻¹ · g ⁻¹ tissu branchial (ÉT), bruit de fond soustrait, n = 12) des branchies de saumon après une exposition à 1.0 µM Zn et à des concentrations en Al dans l'expérience 8.	93
Tableau 17. Comptes de ⁶⁵ Zn (comptes moyens·min. ⁻¹ · g ⁻¹ tissu branchial (ÉT), bruit de fond soustrait, n = 12) des branchies de saumon après une exposition à 1.0 µM Zn et à des concentrations en Al dans l'expérience 9.	94
Tableau 18. Zn total et Zn lié (µg Zn·g ⁻¹ tissu branchial, n = 12) sur les branchies de saumon exposées à 1.0 µM de Zn et à des concentrations en Al, dans les expériences 8 et 9. L'accumulation de Zn a été calculée d'après les valeurs moyennes des comptes de Zn sur les branchies.	95
Tableau 19. Concentrations moyennes en Al (µM, ± ÉT) dans les expériences avec AF (expériences 10 et 11).	96

Tableau 20. Valeurs CL-50 en $\mu\text{M Al}_p$ (limites de confiance à 95%) déterminées après les essais avec l'EDR et l'AF.	97
Tableau 21. Les relations entre la mortalité (proportion, arc sinus, $n = 18$) et les variables conjointes COT ($\text{mg C}\cdot\text{L}^{-1}$) et concentration en Al (μM).	98
Table A1-1. Means (\pm S.D.) of log K_C and CC values determined from Langmuir plots of Al-FA titration data.	207
Table A1-2. Recalculated log K_C values obtained using estimates of $[\text{Al}^{3+}]$ for Al_{free}	208
Table A1-3. Inorganic Al concentrations at pH 4.5 and a $[\text{FA}]$ of $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Values for $[\text{Al}_i]$ were either calculated directly from the Langmuir equation ("equation") or obtained by using the MINEQL ⁺ chemical equilibrium program with the constants from Table A1-1 (CC values) and Table A1-2 ("corrected" Log K_C values).	209
Table A1-4. Inorganic Al concentrations at pH 5.0 and $[\text{FA}]$ concentrations of 5, 10 and $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Values of $[\text{Al}_i]$ (μM) were either calculated directly from the Langmuir equation ("equation") or obtained by using the MINEQL ⁺ chemical equilibrium program with the constants from Table A1-1 (CC values) and Table A1-2 ("corrected" Log K_C values).	210
Tableau A3-1. Les mesures de COT et d'absorbance à 400 nm et les concentrations d'acide fulvique.	219
Tableau A3-2. Relation entre la concentration en acide fulvique, le COT, et l'absorbance à 400 nm.	220
Tableau A4-1. Concentrations en Al (μM) mesurées dans les solutions et à l'intérieur des sacs à dialyse (1000 MWCO) après 24 heures.	229
Tableau A4-2. Concentrations en Al (μM) mesurées dans la solution EDR-AF dans l'expérience 1. Les moyennes ont été calculées avec les mesures de 24, 48 et 96 h.	230
Tableau A4-3. Concentrations en Al (μM) mesurées dans la solution EDR dans l'expérience 1.	231
Tableau A4-4. Concentrations en Al mesurées dans la solution EDR-FA dans l'expérience 2. Les mesures de l'Al total (réactif à l'acide) ont été corrigées pour l'absorbance de l'acide fulvique sans Al (un blanc de $0.7 \mu\text{M "Al"}$).	232
Tableau A4-5. Concentrations moyennes (ET) en Al (μM) mesurées à l'intérieur des sacs à dialyse dans la solution EDR-AF dans l'expérience 2 ($n = 3$).	233
Tableau A4-6. Concentrations en Al (μM) mesurées dans la solution EDR dans l'expérience 2.	234
Tableau A4-7. Concentrations de carbone organique total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) dans les solutions et à l'intérieur des sacs à dialyse dans l'expérience 2.	235
Tableau A5-1. Les concentrations en Zn (μM) mesurées à l'intérieur (int) et à l'extérieur (ext) des sacs à dialyse après 32 h.	244
TABLEAU A5-2. Concentrations en Al (μM) mesurées en solution et à l'intérieur des sacs à dialyse après 32 h.	245
Tableau A5-3. Concentrations en Zn ($n = 1$) mesurées dans les solutions collectées après un passage par les colonnes d'échange ionique.	246

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les relations entre la mortalité (proportion, arc sinus, n = 18) et les variables conjointes COT (mg C·L ⁻¹) et concentration en Al (µM).....	99
Figure 1-1. Plots (log-survival time vs log proportion surviving) of the Al and mixture survival data at pH 4.5 (open symbols: experiment 1; closed symbols: experiment 2).....	133
Figure 1-2. Plots (log-survival time vs log proportion surviving) of the Al and mixture survival data at pH 4.5 (open symbols: Al exposures; closed symbols: Al and Zn exposures).....	134
Figure 1-3. Plots (log-survival time vs log proportion surviving) of the Al and mixture survival data at pH 4.8 (open symbols: Al exposures; closed symbols: Al and Zn exposures).....	135
Figure 1-4. Plots (log-survival time vs log proportion surviving) of the Al and mixture survival data at pH 5.2 (open symbols: Al exposures; closed symbols: Al and Zn exposures).....	136
Figure 1-5. Survival curves generated at the Al concentration of the LC-50 (2.0 µM), for Al and Al-Zn exposures at pH 5.26 in Experiment. 6. The degree of increased risk attributable to the presence of Zn can be judged by the reduced survival times in the mixture. (open symbols: Al exposures; closed symbols: Al and Zn exposures).....	137
Figure 1-6. Equitoxic survival curves (proportion surviving vs survival time) generated for Experiment 6 at pH 5.26. (open symbols: the LC-50 concentration - 2.0 µM in the Al only exposure; closed symbols: the 1.6 µM Al concentration in the mixture exposure, with 0.8 µM of Zn).....	138
Figure 2-1. Mean ⁶⁵ Zn counts (cpm·g ⁻¹ gill tissue, ± SD, background counts subtracted, n = 12) in gill tissues of Atlantic salmon exposed concurrently to 1.0 µM of Zn and various [Al] in experiment 2. «Mucus + tightly bound Zn» counts on gills were obtained after the EDTA treatment and «tightly bound Zn» after the blotting treatment, as described in the text. Zn counts at the same Al concentration were compared with a one way t-test. Zn counts at different Al exposures were compared with ANOVA. Values with the same letter (ANOVA: a, b;; t-test: x, y) are not significantly different at p = 0.05.....	163
Figure 2-2. Mean ⁶⁵ Zn counts (cpm·g ⁻¹ gill tissue, ± SD, background counts subtracted, n = 12) in gill tissues of Atlantic salmon exposed concurrently to 1.0 µM of Zn and various [Al] in experiment 3. «Mucus + tightly bound Zn» counts on gills were obtained after the EDTA treatment and «tightly bound Zn» after the blotting treatment, as described in the text. Zn counts at the same Al concentration were compared with a one way t-test. Zn counts at different Al exposures were compared with ANOVA. Values with the same letter (ANOVA: a, b; t-test: x, y) are not significantly different at p = 0.05.....	164
Figure 3-1. TOC levels (mg C·L ⁻¹) in bioassay tanks in Experiment 1. Pre-experimental levels of TOC were calculated from absorbance readings taken when the stock basins were prepared.....	192
Figure 3-3. Measured daily concentrations of Al _i (µM ± SD) in bioassay tanks with FA in Experiment 2.....	194
Figure A1-1. Bound Al calculated using MINEQL ⁺ for three [FA] at pH 5.0, at a total Al of 7.4 µM. Bound was calculated with the log K _c specific for each [FA]. (solid bars, on left), and with the log K _c for 10 mg·L ⁻¹ FA (= 6.54) to estimate bound Al at 5 and 20 mg·L ⁻¹ (open bar, on right).....	211
Figure A1-2. Inorganic Al concentrations (µM) in bioassay tanks at pH 5.0. [Al _i] was measured in samples taken directly from the tanks (“colorimetry”, mean ± SD) and on the contents of	

dialysis bags (“dialysis”). Predicted $[Al_i]$ (“MINEQL”) were calculated using MINEQL ⁺ and the constants in Tables 1 and 2.....	212
Figure A2-1. La relation entre les concentrations d’Al ajouté et les mesures de l’Al réactif à l’acide dans les solutions avec l’acide fulvique ($y = 0.85x - 0.35$).....	215
Figure A3-1. La relation entre la concentration en acide fulvique et l’absorbance à 400 nm.	221
Figure A4-1. Concentrations d’Al mesurées (moyenne \pm ÉT, n = 4) à l’intérieur des sacs à dialyse dans une solutions d’EDR avec l’AF. Les blocs avec le même symbole ne sont pas différents ($p > 0.05$).	236
Figure A4-2. Concentrations d’Al mesurées (moyenne \pm ÉT, n = 4) à l’intérieur des sacs à dialyse dans une solution d’EDR. Les blocs avec le même symbole ne sont pas différents ($p > 0.05$).	237
Figure A4-3. La relation entre les concentrations en Al mesurées dans les solutions EDR-AF et à l’intérieur des sacs à dialyse.....	238

SYNTHÈSE

1.0. PRÉFACE/ INTRODUCTION.

Depuis 20 ans, plusieurs chercheurs dans le domaine de la toxicologie aquatique étudient les liens qui existent entre la spéciation des métaux toxiques et leur biodisponibilité. Ces expériences ont conduit à la formulation du "Modèle de l'Ion Libre" (ou MIL), selon lequel la biodisponibilité d'un métal donné varie en fonction de la concentration de l'ion métallique libre dans le milieu d'exposition. Cependant, pour la très grande majorité, ces expériences ont été réalisées avec des métaux bivalents (surtout le Cu^{2+}), des micro-organismes (ex.: algues) et des milieux artificiels contenant des ligands synthétiques. Dans ce contexte, le thème de la présente recherche est d'évaluer la pertinence du modèle de l'ion libre en ce qui concerne trois aspects particuliers de la toxicologie d'un métal trivalent, l'aluminium (Al): la toxicité du métal à différents pH, la toxicité des mélanges d'Al et de zinc (Zn) à faible pH et la toxicité de l'Al dans des solutions contenant de la matière organique dissoute (MOD). Ces trois aspects représentent des conditions pouvant exister en milieu naturel.

En conditions acides, les poissons sont soumis non seulement à un faible pH, mais aussi à des concentrations élevées de métaux (Spry *et al.*, 1981; Baker, 1982; McDonald *et al.*, 1989). En particulier, l'aluminium a été associé à l'acidification des lacs et au déclin des populations de poisson (Schofield et Trojnar, 1980; Muniz et Leivestad, 1980; Baker, 1982). D'autres métaux, tels le manganèse (Mn), le fer (Fe), le cadmium (Cd) et le Zn, peuvent également devenir disponibles en conditions acides, ce qui crée un stress additionnel pour les populations de poisson, même lorsque ces métaux sont en très faible concentration (Baker, 1982; McDonald *et al.*, 1989; Brezonik *et al.*, 1990; Nelson et Campbell, 1991). On a observé une augmentation des teneurs en Zn avec l'acidification (Nelson et Campbell, 1991), et cette augmentation a été reliée à la toxicité envers la truite brune, *Salmo trutta*, des rivières acidifiées du Pays de Galles (Turnpenny *et al.*, 1987; Weatherley *et al.*, 1990). Par ailleurs, depuis l'implantation de contrôles plus stricts sur la

pollution de l'air, certains écosystèmes aquatiques semblent récupérer lentement avec l'augmentation progressive des niveaux de pH (par exemple, dans la région de Sudbury: Gunn et Keller, 1990). Il est donc opportun d'examiner la toxicité des mélanges de métaux tels l'Al et le Zn à des pH > 4.5.

De plus, la MOD se retrouve naturellement dans les eaux du bouclier canadien, avec des concentrations maximales observées surtout à la période de la fonte des neiges (Campbell *et al.*, 1992; Driscoll *et al.*, 1980), et c'est un ligand naturel important pour plusieurs métaux, y compris l'Al (Nelson et Campbell, 1991; Campbell *et al.*, 1992). Malgré les recherches déjà publiées sur ce sujet, le rôle de la MOD naturelle dans l'atténuation de la toxicité des métaux n'est pas encore entièrement éclairci. Ceci est plus particulièrement vrai en ce qui concerne l'Al, puisque les complexes Al-MOD formés à la fonte des neiges constituent une forte proportion de l'Al total présent dans les eaux de certains systèmes aquatiques comme par exemple les rivières de la Côte-Nord du Saint-Laurent (Campbell *et al.*, 1992).

Le modèle de l'ion libre (MIL) suggère que la toxicité des métaux envers les organismes aquatiques est fonction de la concentration de l'ion libre, M^{z+} (Morel et Hering, 1993). Des modifications à ce modèle permettent de tenir compte de la compétition entre le métal, les principaux cations et l'ion H^+ (Pagenkopf, 1983; Neville et Campbell, 1988). À l'aide de ce modèle, on a examiné les interactions de métaux individuels à faible pH chez les algues (Petersen, 1982; Parent et Campbell, 1994) et le poisson (Pagenkopf, 1983; Neville et Campbell, 1988).

Nos études ont été effectuées en laboratoire, afin de mieux contrôler les conditions. Cependant, les conditions expérimentales ont été soigneusement choisies pour être aussi représentatives que possible des conditions présentes dans les eaux douces acidifiées du bouclier canadien. L'information obtenue ainsi nous permettra de mieux comprendre les processus et les effets en milieu naturel.

1.1. L'acidification et les métaux.

Le Zn et l'Al sont parmi les métaux dont la concentration est la plus susceptible d'augmenter lors de l'acidification du milieu (Nelson et Campbell, 1991). Ce phénomène s'observe tant dans les lacs et les cours d'eau acidifiés de façon chronique que dans les cours d'eau sujets à des diminutions de pH épisodiques. Par exemple, des réductions épisodiques de pH accompagnées d'augmentations des teneurs en Al ont été documentées dans certains cours d'eau de la Scandinavie (Henriksen *et al.*, 1984; Borg, 1986), de l'est des Etats-Unis (Driscoll *et al.*, 1980; McAvoy, 1989) et du bouclier canadien (LaZerte et Dillon, 1984; Campbell *et al.*, 1992). Des concentrations augmentées d'autres métaux, en particulier de zinc, ont été détectées dans certains bassins versants de l'Ontario (Spry *et al.*, 1981), de la Scandinavie (Dickson, 1978; Steinnes, 1990) et des Adirondacks (Baker, 1982; White et Driscoll, 1987). Les concentrations de zinc et d'aluminium augmentent également dans les lacs acidifiés expérimentalement (Schindler *et al.*, 1980; Santschi *et al.*, 1986; Brezonik *et al.*, 1990). Les teneurs élevées en Zn sont attribuées à la mobilisation du métal présent dans les sols (Campbell *et al.*, 1985; Borg et Johansson, 1989), ou à sa déposition après le transport à longue distance (Henriksen et Wright, 1978; Evans *et al.*, 1983; Ross, 1987; Steinnes, 1990). De plus, les formes dissoutes du métal sont favorisées aux pH acides, comparativement aux formes adsorbées (Schindler *et al.*, 1980; Santschi *et al.*, 1986; White et Driscoll, 1987).

Il est clair que dans les environnements acidifiés, les populations de poisson auront tendance à être exposées non seulement à de hautes concentrations en ion hydrogène mais aussi à des teneurs élevées de plusieurs métaux. Le déclin des populations de poisson suivant l'acidification du milieu a été attribué à la mobilisation de l'Al (Driscoll *et al.*, 1980; Henriksen *et al.*, 1984); dans certaines situations, la concentration en Al "total" peut excéder 15 μM (Driscoll et Schecher, 1988). D'autres études ont suggéré que le Zn contribue aussi à la toxicité envers les populations de salmonidés, souvent observée dans les rivières acidifiées (Turnpenny *et al.*, 1987; Weatherley *et al.*, 1990). Selon une étude récente des concentrations de métaux dans les milieux aquatiques acidifiés (Reader, 1986; cité dans McDonald *et al.*, 1989), les concentrations de Zn peuvent atteindre 1.9 μM , quoique la plupart des valeurs rencontrées varient de 0.10 à 1.0 μM (Henriksen

et Wright, 1978; Baker, 1982; Troutman et Peters, 1982; Yan et Miller 1984; White et Driscoll, 1987; Steinnes, 1990).

1.2. La toxicité des mélanges de métaux.

À pH neutre, la toxicité des mélanges de métaux s'avère généralement additive, chaque métal contribuant proportionnellement, selon sa concentration, à la toxicité du mélange (Eaton, 1973; Lewis, 1978; Finlayson et Verrue, 1982; Enserink *et al.*, 1991; tableau 1). Selon le modèle des unités toxiques (Sprague, 1973; Pagenkopf, 1983), la toxicité d'un mélange peut être estimée en calculant la somme des fractions toxiques des métaux présents dans le mélange. Ces fractions toxiques sont déterminées par la valeur de la CL-50 (concentration létale pour 50% des individus) de chaque métal constituant. Le modèle prédit qu'un mélange sera léthal lorsque la somme des unités toxiques sera ≥ 1.0 (Sprague, 1973). Lorsque, pour une réponse donnée, la somme des unités toxiques est supérieure à 1.0, la toxicité du mélange est considérée comme étant moins qu'additive, lorsqu'elle est inférieure à 1.0, elle peut être considérée comme étant plus qu'additive.

À mesure que le pH diminue, la toxicité des métaux pris individuellement a tendance à décroître (Zn - Bradley et Sprague, 1985; Everall *et al.*, 1989; Cu - Howarth et Sprague, 1978; Chakoumakos *et al.*, 1979; Cu, Cd, Zn - Cusimano *et al.*, 1986). La plupart des études effectuées à faible pH ont considéré l'Al comme étant le métal principalement responsable de la toxicité et ont négligé les effets de faibles concentrations d'autres métaux. Cependant, par exception à cette généralisation, Hutchinson et Sprague (1986) ont observé que l'exposition du poisson-étendard *Jordanella floridae* à pH 5.8 à des mélanges d'Al, de Zn, de cuivre (Cu) et de quatre autres métaux pouvait compromettre sérieusement sa reproduction. Des essais avec différentes combinaisons de métaux indiquent que l'Al et le Zn étaient principalement responsables des effets observés. Hickie *et al.* (1993) ont également démontré que les concentrations de métaux typiques dans les lacs acidifiés du bouclier canadien, en particulier celles de l'Al et du Cu, étaient létales pour les espèces sensibles aux conditions acides, comme le mené tête-en-boule *Pimephales promelas*. Par ailleurs, la toxicité des mélanges de métaux associés avec l'acidification, tels l'Al et le Zn, reste mal connue (Spry *et al.*, 1981; McDonald *et al.*, 1989).

Seulement quelques études ont traité de l'accumulation de métaux pour des expositions à des mélanges de deux métaux. Lors d'expositions chroniques (jusqu'à 100 jours) à pH neutre, Spehar *et al.* (1978) ont observé que la prise-en-charge corporelle de Cd par le poisson-étendard n'était pas affectée par la présence de Zn. Lors d'expositions variant de 1 à 50 jours, Wicklund *et al.* (1988) ont constaté que la prise-en-charge de Cd par les branchies du poisson-zébré (*Brachydanio rerio*) était comparable à différentes concentrations de Zn.

1.3. Le rôle de la matière organique dissoute.

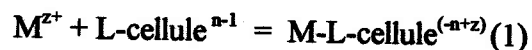
La matière organique dissoute (MOD), composée principalement des acides fulviques (AF) et des acides humiques (AH), est une composante importante des eaux naturelles, y compris celles du bouclier canadien. Campbell *et al.* (1992) ont obtenu des valeurs en carbone organique total de 3 à 11 mg C·L⁻¹ dans les rivières de la Côte-Nord du fleuve St-Laurent. Lacroix et Kan (1986) ont mesuré des valeurs de 7 à 25 mg C·L⁻¹, en carbone organique dissous, dans les rivières à saumon de Nouvelle-Ecosse. Les concentrations en MOD dans plusieurs rivières augmentent avec le débit, au printemps (Campbell *et al.*, 1992) et également avec les pluies d'automne; les complexes organiques de l'Al sont souvent les formes dominantes dans ces eaux brunes (LaZerte, 1984; LaZerte et Dillon, 1984; Lacroix et Kan, 1986; Christophersen *et al.*, 1990).

D'après les résultats d'études avec les eaux brunes naturelles, les complexes organiques de l'Al sont considérés peu toxiques (Driscoll *et al.*, 1980; Baker et Schofield, 1982; Skogheim *et al.*, 1984; Lacroix et Townsend, 1987; Lacroix, 1989a). On a observé dans des études de laboratoire que la toxicité pour les salmonidés de l'Al à pH acide était atténuée par la présence d'acides fulviques et humiques naturels (van Coillie *et al.*, 1983; Neville, 1985; Skogheim *et al.*, 1988; Lydersen *et al.*, 1990; Parkhurst *et al.*, 1990; Witters *et al.*, 1990). Il a aussi été noté qu'en présence de MOD, les branchies de poissons bioaccumulent l'Al, mais le métal ne cause pas les dommages cellulaires notés après des expositions à l'Al inorganique (Karlsson-Norrgren *et al.*, 1986; Youson et Neville, 1987; Lacroix, 1989a).

À la fonte des neiges, plusieurs cours d'eau, incluant les rivières de la Côte-Nord, sont sujets à une arrivée massive et soudaine d'eau acide. À cette période, le pH des cours d'eau décroît, tandis que les teneurs en Al dissous et en carbone organique dissous (COD) augmentent (Campbell *et al.*, 1992). Les acides fulviques et humiques constituent environ 50% du COD dans de tels cours d'eau et une forte proportion de l'Al existe sous forme de complexes organiques dissous (Campbell *et al.*, 1992). Ces cours d'eau sont des habitats importants pour les juvéniles du saumon de l'Atlantique à cette période de l'année (Brouard *et al.*, 1982; van Coillie *et al.*, 1984). La présence de concentrations élevées d'Al met ces populations en danger, comme c'est le cas pour les populations d'autres rivières à saumon (Lacroix et Townsend, 1987; Lacroix, 1989a; Lacroix, 1989b).

1.4. Le modèle de l'ion libre.

Le modèle de l'ion libre (MIL) suggère que la toxicité d'un métal est déterminée par la concentration de l'ion libre $M(H_2O)_n^{z+}$ ou pour plus de simplicité, M^{z+} (Pagenkopf, 1983; Morel et Hering, 1993; Campbell, 1995). Pour causer un effet toxique, le métal doit réagir avec ou traverser une membrane biologique. Il semble peu probable que l'aquo ion, chargé, puisse traverser la membrane par diffusion simple. Le MIL attribue les effets biologiques d'un métal à ses interactions avec un ligand cellulaire (L) localisé à la surface biologique (par exemple la membrane branchiale) pour former un complexe M^{z+} -L-cellule. On peut représenter la formation de ce complexe par l'équation:



La réponse biologique, par exemple la toxicité, est supposée proportionnelle à la concentration de ce complexe de surface, elle-même proportionnelle à la concentration de l'ion libre dans le milieu. À l'aide de ce modèle, on a examiné les effets de métaux individuels à faible pH chez les algues (Petersen, 1982) et le poisson (Pagenkopf, 1983; Neville et Campbell, 1988).

1.5. Le modèle de l'ion libre et la toxicité de l'Al à faible pH.

La concentration du complexe M^{z+} -L-branchie, à faible pH, est influencée par les changements de forme chimique du métal en solution, ainsi que par l'interaction compétitive de l'ion H^+ au niveau de la membrane cellulaire (Campbell et Stokes, 1985; Campbell, 1995). Des modifications au modèle de l'ion libre permettent de tenir compte de la compétition entre M^{z+} , les principaux cations et l'ion H^+ (Pagenkopf, 1983; Neville et Campbell, 1988). Selon le MIL, la toxicité de l'Al à pH acide devrait être proportionnelle à la concentration du complexe de surface $\{Al^{2+}$ -L-branchie $\}$:

$$\text{toxicité} \propto \{Al^{2+}\text{-L-branchie}\} = K_1 [Al^{3+}] \{L\text{-branchie}\}_{\text{libre}} \quad (2)$$

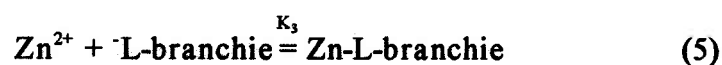
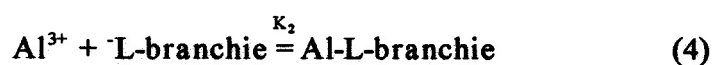
où K est la constante de formation conditionnelle pour le complexe de surface métal-branchie, et $\{L\text{-branchie}\}_{\text{libre}}$ est la concentration des sites de complexation libres (ionisés), celle-ci étant déterminée par le pH dans le micro-environnement branchial (Playle et Wood, 1989a, b) et la valeur de pK_a des sites de complexation. Le nombre de sites ionisés sur les branchies aux différents pH peut être évalué selon l'approche de Cusimano et ses collègues (1986) pour les sites branchiaux et de Parent et Campbell (1994) pour les sites à la surface algale, selon l'équation suivante:

$$\{L\text{-branchie}\}_{\text{libre}} = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \quad (3)$$

En conditions équitoxiques, c'est-à-dire à des concentrations aqueuses d' Al^{3+} égales à la valeur de CL-50 (Al^{3+}), le produit de la concentration de l'ion libre et du nombre de sites de complexation libres devrait demeurer constant à différents pH.

1.6. Le modèle de l'ion libre et la toxicité de mélanges d'Al et de Zn:

Selon le MIL, la toxicité d'un métal cationique peut être réduite en présence d'un deuxième cation entrant en compétition avec le premier - un tel effet a été observé pour plusieurs métaux en présence de fortes concentrations de Ca^{2+} et de H^+ (Pagenkopf, 1983). Par exemple, les principaux cations, en particulier Ca^{2+} , jouent un rôle de protection contre la toxicité du Zn (Holcombe et Andrew, 1978; Bradley et Sprague, 1985; Everall *et al.*, 1989). On peut proposer que deux métaux interagissent avec le même ligand à la surface des branchies (L-branchie). Dans une eau synthétique, à un pH acide fixe, on peut présupposer que $[\text{H-L-branchie}]$ et $[\text{Ca/Mg-L-branchie}]$ seront constantes pour le mélange et pour le métal seul, et les valeurs de K seront spécifiques pour ces conditions de pH et $[\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}]$. Donc, si on considère les ions libres Al^{3+} et Zn^{2+} , les réactions possibles sont (avec les charges éliminées pour plus de simplicité):



où les valeurs K_2 et K_3 représentent les constantes d'équilibre conditionnelles pour les complexes formés.

En présence de concentrations sous-létales de Zn, un effet de compétition analogue à celui observé pour $[\text{H}^+]$ et $[\text{Ca}^{2+}]$, résulterait en une diminution de la toxicité de l'Al. Si la somme $\{[\text{Al}^{3+}\text{-L-branchie}] + [\text{Zn}^{2+}\text{-L-branchie}]\}$ s'approche de la concentration totale $[\text{L-branchie}]_{\text{total}}$, on pourrait observer un antagonisme de la toxicité d'un métal en présence d'un deuxième métal.

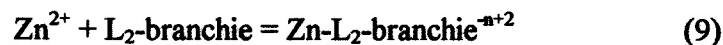
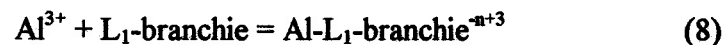
$$\text{toxicité} \propto \frac{\{\text{Al}^{3+}\} \cdot K_2}{\{\text{Zn}^{2+}\} \cdot K_3 + \{\text{Al}^{3+}\} \cdot K_2} \quad (6)$$

Dans le cas où le Zn contre l'effet de l'Al, il faut vérifier que les métaux soient liés seulement aux ligands sur les branchies, et non pas à d'autres sites, comme au mucus, pour que l'antagonisme soit conforme aux prédictions du MIL.

Si $[L\text{-branchie}]_{\text{libre}}$ est beaucoup plus grande que la somme des complexes $[M\text{-L-branchie}]$, la toxicité d'un mélange peut être plus élevée que celle des métaux individuels. Dans ce cas, on aura:

$$\text{toxicité} \propto \{Al^{3+}\} \cdot K_2 + \{Zn^{+}\} \cdot K_3 \quad (7)$$

De plus, dans le cas où des métaux comme l'Al et le Zn agiraient à des sites différents sur la membrane branchiale, on s'attendrait à observer un effet semblable. On peut envisager la formation de complexes distincts pour chaque métal:



Dans ce cas, et avec des concentrations réalistes ($\leq \mu\text{mol L}^{-1}$) de métaux, il n'y aura pas de compétition pour les mêmes ligands cellulaires et la toxicité d'un mélange de deux métaux devrait être plus élevée que celle des métaux pris individuellement:

$$\text{toxicité} \propto [Al\text{-}L_1\text{-branchie}^{-n+3}] + [Zn\text{-}L_2\text{-branchie}^{-n+2}] \quad (10)$$

1.7. Le modèle de l'ion libre et la biodisponibilité des métaux en présence de MOD.

Il est assez reconnu que la MOD influence les formes chimiques et la biodisponibilité des métaux (McCarthy, 1989; Campbell, 1995). La toxicité des solutions comprenant des complexes MOD-M va varier avec: (i) le pH, (ii) les interactions compétitives entre les métaux et les principaux cations au niveau de la membrane cellulaire, et (iii) l'interaction compétitive entre la MOD et la membrane

cellulaire pour la formation de liens chimiques avec les métaux (McCarthy, 1989). Selon le MIL, un ligand tel la MOD devrait réagir à la manière des ligands synthétiques comme l'EDTA (éthylènediamine-tétraacétate), qui réduisent la concentration de l'ion libre et, par conséquent, la toxicité des métaux.

Des études avec des métaux à pH neutre, ou presque neutre, confirment en général un tel effet pour la MOD. La présence de MOD diminue la toxicité du Cu chez le saumon coho (*Onchorhynchus kisutch*; Buckley, 1983), le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*; Zitko *et al.*, 1973) et la puce d'eau (*Daphnia magna*; Meador, 1991). De même, à faible pH, la MOD naturelle dans une eau de lac réduit la toxicité du Cu pour le mené tête-en-boule (Welsh *et al.*, 1993), ainsi que la toxicité d'un mélange de métaux (Al, Cu, Zn) pour le poisson-étendard *Jordanella floridae* (Hutchinson et Sprague, 1987).

Selon d'autres chercheurs, la formation de complexes impliquant le métal et des métabolites de faible poids moléculaire, comme le citrate et certains acides aminés, ne produit qu'une réduction partielle de la toxicité d'un métal. Au cours d'une étude avec la crevette d'eau douce australienne *Paratya australiensis*, Daly et ses collègues (1990a) ont observé que la toxicité résiduelle du cuivre en présence de l'acide aminé glycine était supérieure à celle prédite selon la concentration de l'ion libre Cu^{2+} . Borgmann et Ralph (1983) ont obtenu des résultats semblables en étudiant les effets des complexes Cu-glycine sur *Daphnia magna*. Pour leur part, Part et Wikmark (1984) ont étudié la prise-en-charge du Cd par des branchies perfusées de truite arc-en-ciel. En présence de citrate, la prise-en-charge de Cd a été plus élevée que la concentration de l'ion libre Cd^{2+} ne permettait de le prévoir. Ils ont proposé que la prise-en-charge du Cd est augmentée par transport facilité, le citrate agissant comme transporteur.

D'autres chercheurs se sont penchés sur la toxicité de certains complexes produits en présence de MOD naturelle. Geisy et ses collègues ont observé que certains complexes de Cu (Geisy *et al.*, 1983) et de Cd (Geisy *et al.*, 1977) étaient toxiques pour le cladocère *Simocephalus serrulatus* et que des complexes de faible poids moléculaire étaient impliqués dans la toxicité résiduelle.

De cette analyse, il ressort que la formation de complexes entre un métal et la MOD mène généralement à une réduction de la toxicité du métal, sauf dans le cas de certains ligands spécifiques qui forment des complexes $M-L_n^0$ lipophiles. Cependant, la réduction de la toxicité généralement observée demeure qualitative, dans le sens qu'il n'y a que peu d'études ayant tenté de relier la toxicité résiduelle à la concentration de l'ion métallique libre (M^{z+}) présente à l'équilibre avec le complexe M-MOD. En d'autres termes, même si on peut affirmer que la complexation d'un métal mène normalement à une diminution de sa biodisponibilité, on ne peut conclure que le MIL s'applique rigoureusement dans ces conditions (tableau 2).

La MOD peut elle-même causer une toxicité, comme l'indiquent les études avec 'l'eau d'étang noire'. À faible pH, des concentrations élevées de cette MOD se sont avérées toxiques pour les amphibiens *Rana pipiens* et *Bufo americanus* (Freda *et al.*, 1990) et pour le cladocère *Daphnia magna* (Petersen et Persson, 1987). D'autres effets physiologiques, comme les pertes d'ions plasmiques chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), ont été observés lors d'expositions à de la MOD (Witters *et al.*, 1990).

En ce qui concerne l'Al, sa toxicité semble diminuée ou éliminée lors d'expositions en laboratoire comprenant des ligands organiques. Ceci a été démontré pour le citrate (Baker, 1982; Driscoll *et al.*, 1980; avec le meunier noir, *Catostomus commersoni*), les acides salicylique et oxalique (Peterson *et al.*, 1989; avec les juvéniles de saumon de l'Atlantique), l'acide humique (van Coillie *et al.*, 1983; Parkhurst *et al.*, 1990 avec l'omble de fontaine, *Salvelinus fontinalis*), et l'acide fulvique (Neville, 1985; Witters *et al.*, 1990, avec la truite arc-en-ciel). Toutefois, aucune de ces études n'a démontré de façon rigoureuse que la diminution de la toxicité résulte de la diminution de la concentration de l'Al inorganique monomère. En effet, malgré cette réduction, la toxicité résiduelle n'est pas toujours proportionnelle aux teneurs en Al monomère inorganique mesurées dans les solutions (Peterson *et al.*, 1989; Parkhurst *et al.*, 1990). Par exemple, Peterson *et al.* (1989) ont exposé des saumons à l'Al en présence de diverses fractions de MOD (acides/basiques ou hydrophobes/hydrophiles). Leurs résultats suggèrent que l'Al démontre une toxicité résiduelle qui varie en fonction de la fraction de MOD.

2.0. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE ET HYPOTHÈSES.

Le but de ce travail est de déterminer si la concentration de l'ion libre Al^{3+} détermine la toxicité du métal dans les conditions suivantes:

- à trois concentrations du proton, pH 4.5, pH 4.8 et pH 5.2.
- en présence de concentrations sous-létales de Zn, à ces mêmes pH.
- en présence de MOD naturelle, à pH 5.0.

Selon le MIL, la toxicité d'un métal cationique peut être réduite en présence d'un deuxième cation entrant en compétition avec le premier. Dans le cas du proton, l'effet de compétition aux différents pH peut être inclu en tenant compte du degré d'ionisation du ligand principal à la surface branchiale, L-branchie. Par un effet de compétition analogue à celui observé pour des augmentations de $[H^+]$ et de $[Ca^{2+}]$, la toxicité de l'Al pourrait être atténuée en présence de concentrations sous-létales de Zn. L' Al^{3+} et le Zn^{2+} , en tant que cations de "classe A" et "à la limite" ("borderline"), respectivement, ayant une préférence pour O^- comme atome donneur, pourraient interagir aux même sites de complexation sur les branchies, menant à un antagonisme. De plus, si on enlève le métal adsorbé, l'accumulation de Zn sur les branchies des poissons exposés à l'Al à un pH donné devrait être inversement proportionnelle aux concentrations d' Al^{3+} présentes.

D'une façon similaire, l'effet d'un ligand comme la MOD devrait être proportionnel au degré de complexation du métal par le ligand. Le rôle de la MOD devrait être identique à celui d'un ligand synthétique comme l'EDTA, c'est-à-dire de réduire la concentration de l'ion libre et donc la toxicité des solutions d'Al.

Les hypothèses à vérifier dans nos expériences sont donc les suivantes:

1. Les CL-50 déterminées à trois niveaux de pH sont semblables lorsqu'exprimées en ion Al^{3+} , si l'on tient compte du degré d'ionisation des sites branchiaux.
2. À faible pH, des teneurs sous-létales de Zn créent un antagonisme à la toxicité de l'Al. Les CL-50 et les temps de survie sont donc augmentés pour des solutions contenant de l'Al et des teneurs sous-létales de Zn.
3. À faible pH, à une concentration de Zn constante, et à différentes concentrations d'Al, l'accumulation de Zn dans les branchies du saumon est inversement proportionnelle à la concentration d'Al.
4. Dans des eaux douces acides contenant de l'Al, les CL-50 exprimées en Al^{3+} sont les mêmes pour les solutions inorganiques que pour des solutions contenant de l'acide fulvique (AF) comme source de MOD.
5. Des pré-expositions de courte durée à des solutions organiques ou inorganiques, sans Al, à pH 5.0 n'auront pas d'effets sur la survie des organismes subséquentement exposés à l'Al inorganique. Les CL-50, en terme d'Al inorganique, déterminées dans des expositions à l'Al inorganique seront semblables pour les poissons pré-exposés à l'AF comparativement à ceux exposés à une eau synthétique au même pH sans AF.

Ces hypothèses ont été examinées dans des conditions représentatives de celles observées à la période de la fonte des neiges dans les eaux des rivières de la Côte-Nord. L'approche expérimentale a consisté à exposer des juvéniles de saumon de l'Atlantique à des eaux douces reconstituées, à des pH de l'ordre de 4.5 à 5.2. Les solutions d'exposition inorganiques ont été préparées par ajout de concentrations létales d'Al et sous-létales de Zn. Les solutions organiques ont été préparées avec des concentrations d'Al et un acide fulvique naturel.

La spéciation de l'Al a été déterminée expérimentalement au moyen de différentes méthodes (colorimétrie, dialyse) décrites plus loin. Afin de minimiser les complications occasionnées par le travail en milieu sursaturé pour ce qui est des formes d' $\text{Al}(\text{OH})_3$ solides (donc non défini), les concentrations maximales d'Al monomère inorganique dans les solutions d'exposition synthétiques ont été maintenues en deçà de la limite de solubilité calculée pour $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$ avec $K_{\text{sp}} = 10^{-8.05}$. Au-delà de cette limite, la chimie de l'Al en solution aqueuse devient extrêmement complexe et imprévisible (Bertsch, 1989) - des formes polynucléaires d' Al_{13} dissous, des colloïdes d'hydroxy-Al et de l' $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$ particulaire peuvent coexister dans ces conditions, ces formes étant toutes reconnues pour être très lentes à passer d'une forme à l'autre.

3.0. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans le tableau 3, on présente une description sommaire des expériences réalisées pendant cette étude.

3.1. Organisme cible - le saumon de l'Atlantique

Nous avons choisi le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar* L.) comme organisme-cible, compte tenu de sa sensibilité aux conditions acides (Rosseland et Skogheim, 1984; Skogheim et Rosseland, 1984). Les rivières de la Côte Nord du St-Laurent qui supportent des populations de saumons sont soumises à des précipitations acides, lesquelles peuvent également apporter des métaux (Brouard *et al.*, 1982; van Coillie *et al.*, 1984; Campbell *et al.*, 1992). Le déclin et même l'extinction de populations de saumon affectées par l'acidification ont été observés dans des rivières de Nouvelle-Ecosse (Watt *et al.*, 1983; Watt, 1987; Lacroix, 1989a, 1989b) et de Scandinavie (Fivelstad et Leivestad, 1984; Rosseland et Skogheim, 1984; Skogheim et Rosseland, 1984; Skogheim *et al.*, 1984).

3.2. Eau douce reconstituée (EDR): préparation et stabilisation.

Une eau douce reconstituée a été préparée pour l'acclimatation des organismes et pour les solutions d'exposition. L'EDR avait la composition suivante: $[Ca^{2+}] = 44 \mu M$; $[Mg^{2+}] = 62 \mu M$; $[Na^+] = 143 \mu M$; $[K^+] = 7 \mu M$; $[Cl^-] = 7 \mu M$; $[SO_4^{2-}] = 106 \mu M$; $[CO_3^{2-}] = 143 \mu M$. L'EDR a été préparée en ajoutant des sels de qualité 'réactif' à de l'eau déminéralisée. L'eau fraîchement préparée a été aérée vigoureusement pendant au moins 6 h et refroidie à 10 °C avant d'être utilisée (pH 6.1 - 6.5 après aération et ajustement de la température).

3.3. Acclimatation et maintien des organismes.

Les juvéniles de saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) ont été obtenus d'une pisciculture gouvernementale (Ministère du Loisir, de la Chasse et de la Pêche, MLCP, Gaspé, QC) et d'un établissement privé (La Pisciculture Saukeb, Nouvelle, QC). Ces poissons provenaient à l'origine de rivières de la Côte-Nord (Saukeb) et de la Gaspésie (MLCP). Les organismes ont été gardés dans un bassin de réserve de 550 L à l'intérieur d'une chambre à température constante réglée à 10°C, sous un cycle lumineux de 12 h: 12 h lumière: obscurité. L'eau du bassin était recirculée au moyen d'un filtre biologique au charbon actif et partiellement remplacée avec 360 L d'EDR, deux fois par jour. L'oxygène dissous s'est toujours maintenu au-dessus de 95 % de saturation. Les poissons ont été nourris *ad libitum* avec de la moulée pour truite (Corey Mills, Fredricton, NB). À chaque nouvel arrivage, les poissons ont été acclimatés à nos conditions de laboratoire pendant au moins deux semaines avant d'être utilisés pour les expériences. Les poissons ont jeûné pendant les 24 h précédant chacune des expériences.

3.4. Solutions d'exposition

L'EDR pour les bioessais a été préparée comme décrit plus haut. Pour la préparation des solutions d'exposition des bioessais, le pH a été initialement ajusté à pH 4.0 - 4.8 avec de l'acide nitrique 2.0 N. Lorsque nécessaire, les volumes appropriés de solution-mère d'Al (1000 ppm Al préparé avec $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$; pH < 4.0) ont été ajoutés au même moment. Après 12 h de stabilisation et d'aération, le pH a été vérifié, ajusté si nécessaire, et la solution a été transvidée dans le système de dosage.

Les solutions d'acide fulvique (AF) ont été préparées à l'aide d'un acide fulvique commercial (acide fulvique Laurentien, Ecolinc Inc., Roxboro, QC) déjà bien caractérisé. Une solution-mère de 20 mg·mL⁻¹ d'AF a été préparée avec de l'eau déminéralisée ultrapure. Après avoir ajusté le pH à ≤ 4.5, les volumes appropriés des solution-mères d'Al et d'AF (concentration finale nominale de 5 mg·L⁻¹) ont été ajoutés et une aération douce a été fournie. Le pH a ensuite été ajusté à 5.0 ±

0.1 et les concentrations d'AF et d'Al total ont été vérifiées. Les solutions ont reposé pendant un minimum de 48 h pour stabiliser le pH et équilibrer l'Al-AF.

3.5. Bioessais en continu

Les bioessais de toxicité aiguë de 96-144 h (toxicité des mélanges Al-Zn et des solutions d'AF) ont été effectués en continu. Les volumes et les débits des bassins ont été déterminés selon la méthode de Sprague (1973), permettant un remplacement moléculaire de >95% du volume du bassin d'exposition (8 - 20 L) en 8 à 24 h. Sept à dix poissons ont été introduits dans chacun des bassins. Les mesures de pH (un minimum de deux fois par jour) et d'oxygène dissous (à chaque jour) ont été faites. L'oxygène dissous a varié de 85% à >90% de saturation.

3.5.1. Bioessais avec les mélanges Al-Zn: toxicité.

Lors des essais d'exposition à l'Al et au mélange Al-Zn, deux réservoirs de 350 L ont été connectés au système de dosage. Un des réservoirs contenait la plus haute concentration d'Al et l'autre contenait de l'eau de dilution, les deux solutions étant au pH choisi. Les solutions ont été pompées dans deux contenants surélevés se déversant par gravité dans les bassins à bioessai, au moyen de pompes péristaltiques (Masterflex). Les pompes étaient calibrées pour donner les concentrations d'Al nécessaires au bioessai. Le Zn (solution-mère de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3.3-3.8 mM) était pompé séparément dans les bassins appropriés à un débit calculé pour donner une exposition à 1.5 μM de Zn, en tenant compte du débit total dans chacun des bassin. Les concentrations moyennes de Zn dosées dans les solutions expérimentales de mélange variaient de 0.8 à 1.7 μM .

Les poissons ont été exposés à des concentrations d'Al et au mélange Al-Zn, à trois niveaux de pH acide (pH 4.5, pH 4.8 and pH 5.2). Chaque expérience comportait douze bassins expérimentaux: cinq concentrations d'Al, deux bassins par concentration, ainsi que deux bassins témoins. Le deuxième bassin de chaque concentration d'Al recevait un ajout de Zn. Les deux bassins témoins recevaient, respectivement, de l'EDR seulement, au pH de l'expérience, et de l'EDR avec ajout de Zn. Les expériences ont duré 120 h, à l'exception des expériences 2 (144 h) et 3 (96 h), à cause de

difficultés techniques avec le système de dosage. Des bioessais de toxicité du Zn seul à pH 4.5 et 5.2 ont également été effectués, pour évaluer la toxicité du Zn aux pH utilisés ici. Les conditions expérimentales pendant les expériences sont présentées au tableau 4.

D'autres essais ont été effectués pour permettre de calculer les concentrations létales pour 50% de la population (CL-50). Un essai avec une concentration plus élevée d'Al a été fait huit jours après l'expérience 2, et des concentrations additionnelles du mélange Al-Zn ont été essayées immédiatement après l'expérience 6.

3.5.2. Essais avec les solutions Al-AF et Al-EDR.

Les poissons ont été exposés à des solutions Al-AF et Al-EDR, à pH 5.0, dans un système à débit continu. Les expositions aux solutions Al-EDR ont été faites avec un système de dosage identique à celui utilisé pour les essais Al-Zn. Les solutions expérimentales d'AF ont été préparées dans des bassins de 65 L doublés de plastique et ont été ensuite pompées dans les bassins d'exposition.

Deux expériences ont été faites, chacune comportant des expositions concomitantes à une série de solutions d'Al inorganique et une série de solutions d'Al organique. Les solutions inorganiques d'exposition (Al-EDR) ont consisté de cinq (expérience 10) ou six (expérience 11) concentrations d'Al et d'un témoin sans Al. Les expositions aux solutions Al-AF comportaient seulement quatre concentrations d'Al, à cause du coût élevé de l'AF naturel. Les volumes restant dans les bassins réservoirs de Al-AF ont été combinés au jour 4 de l'expérience 11, afin d'avoir un volume suffisant pour continuer l'expérience pendant un jour de plus. L'expérience 10 a duré 96 h et l'expérience 11, 120 h. Après l'expérience 11, une autre exposition a été faite, pour permettre de calculer la valeur de CL-50 dans la solution Al-EDR de cette expérience. Les conditions expérimentales sont présentées au tableau 5.

Une troisième expérience (expérience 12) comprenant une 'pré-exposition' de 4 jours en conditions statiques, est décrite dans la section suivante. Pendant cette période, les poissons ont

été exposés à de l'EDR ou à une solution d'AF, à pH 5.0, pour être ensuite exposés à de l'Al inorganique seulement.

3.6. Bioessais en conditions statiques

Deux séries d'expériences ont été effectuées dans des conditions statiques - les essais d'exposition au Zn radioactif et la pré-exposition aux solutions d'EDR ou d'AF à pH 5.0. Il a été nécessaire d'employer des expositions statiques pour des raisons de sécurité dans l'emploi et l'élimination des déchets du ^{65}Zn et à cause du coût élevé de l'AF naturel utilisé. Les bassins d'exposition ont été préparés (ajustement du pH, ajout des solutions de métaux, aération) 24 h avant l'introduction des organismes. Durant les essais, le pH a été vérifié fréquemment et, si nécessaire, ajusté manuellement. Une aération douce a été fournie pour la durée de l'essai et l'oxygène dissous s'est maintenu au-dessus de 85% de saturation.

3.6.1. Essais avec les mélanges Al-Zn: accumulation de Zn dans les branchies.

Les essais d'exposition au Zn radioactif ont été de courte durée (24 h). Trois expériences (7, 8 et 9) ont consisté à exposer des saumons juvéniles (masse humide moyenne \pm ÉT: 2.2 ± 0.9 g) à des concentrations élevées d'Al et des concentrations sous-létales de Zn, à un pH nominal de 4.8. Après l'ajustement du pH de l'EDR, les volumes appropriés des solution-mères d'Al et de Zn ($1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, BDH Inc, qualité 'AAS') et du traceur radioactif ^{65}Zn (DuPont, Wilmington, DE) ont été ajoutés.

Les expositions de l'expérience 7 ont été faites dans des bassins de 62 L, avec 8 individus par bassin, à une concentration de $1.6 \mu\text{M}$ en Zn total et $0.9 \mu\text{Ci}\cdot\text{L}^{-1}$ de traceur ^{65}Zn (activité spécifique de $0.6 \mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}$, tableau 6). Les concentrations d'Al dans cette expérience allaient de $0.7 \mu\text{M}$ dans le bassin témoin à une concentration létale de $7.5 \mu\text{M}$. Cette expérience a comporté deux essais (7a et 7b) avec des poissons différents, mais dans la même solution, et ne peuvent donc être considérés comme de véritables réplicats. Après le premier essai, les bassins ont été acidifiés à pH 4.0, aérés durant 24 h et le pH a ensuite été réajusté avant la deuxième introduction

d'organismes. Dans chacun des bassins, cinq poissons ont été sélectionnés au hasard pour dissection des branchies; les comptes des cinq poissons exposés aux mêmes concentrations dans les deux essais ont été regroupés pour augmenter la taille de l'échantillon. Avant ce regroupement, les comptes de Zn des individus exposés aux mêmes concentrations dans les deux essais de l'expérience 7 ont été comparés au moyen d'un test de *t*. Sauf pour une exception, il n'y avait pas de différences significatives ($p > 0.05$) entre les groupes des deux essais. L'exception était pour l'exposition à $1.9 \mu\text{M Al}$, où des comptes anormalement élevés de Zn ont été observés pour les poissons du premier essai (expérience 7a). Donc, seulement les comptes du deuxième essai (expérience 7b) ont été retenus.

Les expériences 8 et 9 ont été effectuées en parallèle dans des solutions d'exposition fraîchement préparées. Les poissons ont été exposés, dans des bassins de 20 L, à une concentration nominale en Zn total de $1.0 \mu\text{M}$ et à $10 \mu\text{Ci L}^{-1}$ de traceur ^{65}Zn (10.9 et $8.8 \mu\text{Ci } \mu\text{mol}^{-1}$). Les concentrations de Zn total dans ces expériences étaient plus basses, pour s'approcher de celles utilisées au cours des bioessais avec l'Al et le Zn. Les teneurs en Al dans ces expériences allaient de $1.7 \mu\text{M}$ à un maximum de $5.4 \mu\text{M}$, avec un ratio approximatif de 1: 2: 3 pour les trois bassins d'exposition.

3.6.2. Exposition aux solutions d'EDR ou d'AF à pH 5.0

Il existe certaines indications indirectes que la MOD peut réagir avec la membrane biologique et affecter sa perméabilité ou même son fonctionnement métabolique. Par exemple, en présence de MOD, les branchies bioaccumulent l'Al, mais le métal ne cause pas les dommages cellulaires qu'on observe normalement après des expositions à l'Al inorganique (Karlsson-Norrgren *et al.*, 1986; Youson et Neville, 1987; Lacroix, 1989a). De plus, il semble qu'une pré-exposition à la MOD seule pourrait protéger les organismes contre des expositions subséquentes. Des poissons pré-exposés au citrate semblent être plus tolérants à l'aluminium que les poissons n'ayant pas subi cette même période de pré-exposition (communication personnelle, J.R. Kramer, McMaster University, Dept. of Geology). Par ailleurs, dans des expériences réalisées en présence de citrate, Lacroix *et*

al. (1993) ont observé que la sévérité des lésions branchiales, causées par l'Al, a été légèrement réduite, mais la protection du citrate n'a pas été considérée complète.

À la lumière des résultats obtenus en présence de la MOD (voir ci-dessous), nous avons voulu vérifier si l'effet protecteur de la MOD persisterait une fois la solution d'exposition renouvelée avec de l'eau sans MOD. Si un rôle protecteur est attribué à la matière organique, l'interaction de la MOD avec la surface biologique pourrait contribuer à la réduction de toxicité de l'Al comme il a été observé pour les poissons exposés à des acides organiques.

Les poissons ont été pré-exposés, en conditions statiques, à une solution d'EDR ou d'AF pour une durée de 96 h. Cent poissons ont été divisés en deux groupes de cinquante, et acclimatés pendant quatre jours à ces deux solutions sans Al. Le premier groupe était dans de l'EDR seulement, à pH 5.0. Le deuxième groupe était dans une solution d'AF, également à pH 5.0. Suivant cette 'pré-exposition', les organismes ont été soumis, en continu, à une série de concentrations d'Al inorganique à pH 5.0, afin de déterminer si la pré-exposition à l'AF offrait une protection contre une exposition subséquente à l'Al. Les conditions expérimentales pendant les pré-expositions sont présentées au tableau 7.

3.7. Calcul des CL-50

Les mortalités ont été vérifiées à toutes les 3 h durant les expériences, sauf pour une période de 7 h durant la nuit. Les poissons ont été considérés morts lorsqu'il n'y avait aucune réponse à un stimulus physique. Les CL-50 et leurs intervalles de confiance à 95% ont été calculés selon la méthode de Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977). Les CL-50 pour les expositions correspondantes ont été comparées au moyen de l'erreur standard des différences moyennes (Sprague et Fogels, 1977).

Afin de pouvoir comparer la toxicité de l'Al seul et du mélange à chaque niveau de pH, les unités toxiques pour l'Al et le mélange Al-Zn ont été calculées de la façon suivante:

$$UT_{pH_i} = \frac{[Al]_n}{CL-50_{Al_i}} + \frac{[Zn]_i}{CL-50_{Zn_i}} \quad (11)$$

où UT_{pH_i} = unités toxiques au pH i , $[Zn]_i$ est la concentration moyenne mesurée au cours de l'expérience, $[Al]_n$ est la concentration mesurée dans le bassin d'exposition n , et $CL-50_{Al_i}$ et $CL-50_{Zn_i}$ sont les valeurs CL-50 pour Al et Zn au pH i , déterminées indépendamment.

3.8. Analyse des métaux.

Tous les échantillons ont été manipulés et entreposés à l'aide de matériel de laboratoire en polypropylène préalablement lavé à l'acide. Les échantillons destinées à la détermination du métal total ont été préservés en ajoutant du HNO_3 de qualité 'métaux traces' pour obtenir une concentration finale de 0.1 M. Les échantillons pour l'analyse de l'Al total ont été conservés au moins 24 h à la température de la pièce avant l'analyse, pour permettre la solubilisation de toutes formes polynucléaires ou colloïdales initialement présentes dans la solution.

3.8.1. Al.

Les échantillons destinés à la détermination de l'Al monomère ont été filtrés (0.4 μm) mais non acidifiés. La détermination des différentes formes chimiques de l'Al dans la solution d'exposition a été faite par une méthode colorimétrique automatisée (Rogeberg et Henriksen, 1985) qui mesure l'Al monomère. Cette méthode permet de différencier l'Al monomère total (Al_{CV}) de l'Al monomère organique (Al_O), à l'aide d'une colonne à échange ionique. L'Al monomère inorganique (Al_i) est alors estimé en faisant la différence $Al_{CV} - Al_O$. Les teneurs en Al dissous total (l'Al réactif à l'acide) ont été déterminées séparément, avec les échantillons préservés à

l'acide. Les concentrations d'Al dans les témoins (moyenne \pm écart-type = $0.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$) ont varié d'en dessous de la limite de détection de $0.1 \mu\text{M}$ à une valeur maximale de $1.4 \mu\text{M}$.

Pour les essais avec acide fulvique, la dialyse a été utilisée comme technique complémentaire pour évaluer la concentration en Al inorganique. Les sacs à dialyse (Spectra-Por 7, pour sélectionner les molécules de poids moléculaire < 1000 , de qualité analytique "métaux traces") ont été rincés à l'eau déminéralisée ultrapure, remplis avec $\approx 10 - 15 \text{ mL}$ d'EDR, puis bien fermés. Ils ont ensuite été placés dans les bassins pour bioessais avec Al-FA (3 par bassin dans l'expérience 10, 5 par bassin dans l'expérience 11), au même moment que les poissons, et y sont restés jusqu'à la fin du bioessai (96 h ou 120 h). Des essais préliminaires (Annexe 4) avaient indiqué qu'une période d'au moins 48 h était nécessaire pour que les concentrations d'Al à l'intérieur et à l'extérieur du sac atteignent l'équilibre. À la fin de l'essai, les sacs ont été retirés des bassins et bien rincés à l'eau déminéralisée ultrapure pour enlever l'Al adsorbé. Le contenu a ensuite été transvidé dans des éprouvettes de polypropylène propres et analysé le jour même pour l'Al inorganique, comme décrit plus haut, sans toutefois effectuer de filtration préalable.

3.8.2. Zn.

Des échantillons aqueux destinés à l'analyse du Zn ont été pris quotidiennement, préservés par acidification, puis analysés par absorption atomique (flamme air-acétylène). Les concentrations de Zn dans les bassins témoins ont été inférieures à la limite de détection de $0.1 \mu\text{M}$ ($5 \mu\text{g L}^{-1}$).

3.9. Mesure du carbone organique total (COT).

La concentration initiale d'AF dans les bassins a été vérifiée en déterminant l'absorbance à 400 nm, par comparaison avec une courbe de calibration standard (Annexe 3). Au cours des expériences, des échantillons ont été pris pour déterminer le COT. Ces échantillons ont été conservés à 4°C et dans l'obscurité, jusqu'au moment de l'analyse, dans les 72 h suivant la fin de l'expérience.

Le COT a été mesuré par photooxydation des échantillons pré-acidifiés et purgés de CO₂; le carbone inorganique produit par irradiation aux UV a été mesuré par dialyse automatisée par comparaison avec une solution standard de NaOH, suivi de conductimétrie. Cette méthode a une limite de détection de 0.1 mg C·L⁻¹.

3.10. Calcul de la spéciation chimique de l'Al par modélisation de l'équilibre chimique.

Les formes chimiques de l'Al monomère inorganique ont été calculées à l'aide des logiciels d'équilibre chimique HYDRAQL (Papelis *et al.*, 1988) et MINEQL⁺ v2 (Schecher et McAvoy, 1991). Les constantes d'équilibre (log K) pour les complexes inorganiques de l'Al sont tirées de Schecher et Driscoll (1987): AlOH²⁺, 9.03; Al(OH)₂⁺, 19.33; Al(OH)₄⁻, 32.7; Al(OH)₃, aq, 27.00; AlSO₄⁺, 3.02; Al(SO₄)⁻, 4.92. Les constantes ont été corrigées pour une température de 10 °C. Afin de s'assurer que les limites de solubilité de Al(OH)₃ ne soient pas dépassées dans les expériences en conditions inorganiques, nous avons choisi de maintenir les concentrations totales d'Al à des niveaux inférieurs aux limites de solubilité calculées pour le gibbsite synthétique (log K_{SO} = -8.05) comme phase solide. Les constantes d'équilibre pour le Zn ont été extraites d'une banque de données courante (NIST, 1993). Dans les conditions expérimentales utilisées ici, le Zn était présent essentiellement (>99 %) sous forme d'ion libre Zn²⁺.

3.11. Traitement des branchies et évaluation du Zn total et lié: traitement à l'EDTA et technique d'épongeage.

Afin de mesurer seulement le métal lié aux branchies, il faut enlever la portion adsorbée. L'extraction à l'EDTA a été souvent utilisée pour enlever les métaux liés aux surfaces biologiques (Bates *et al.*, 1983; Mason *et al.*, 1988; Wilkinson *et al.*, 1993). Des expériences préliminaires avec les branchies du saumon exposé au ⁶⁵Zn suggéraient que la fraction non étroitement liée du Zn pouvait varier beaucoup. Les branchies n'ayant pas subi de trempage à l'EDTA ont présenté des comptes (cpm·g⁻¹ tissu branchial) variant du simple au double de ceux des branchies ayant subi

le trempage (données non présentées). Pour minimiser cette variation, toutes les branchies de saumon ont été trempées dans une solution d'EDTA avant d'être soumises au comptage.

Pour se protéger des irritants branchiaux, par exemple des concentrations élevées de métal, les poissons sécrètent du mucus (Mallet, 1985). L'exposition à l'Al stimule la production de mucus par les branchies des poissons (Muniz et Leivestad, 1980; Jagoe *et al.*, 1987). Il a été démontré que le mucus a une affinité pour des métaux comme le Cd et le Hg (Part et Lock, 1983), l'Al (Handy et Eddy 1989; Wilkinson et Campbell 1993) et le Zn (Handy and Eddy, 1990). Wilkinson et Campbell (1993) ont mis au point une méthode pour enlever le mucus des branchies en épongeant doucement le tissu branchial avec du papier filtre de fibre de verre (de type GF/C). Cette technique a été adaptée et utilisée ici pour permettre de différencier entre le métal lié au mucus et le métal réellement lié à la branchie. Une telle distinction nous semblait importante, puisque le taux de production de mucus est susceptible d'augmenter à mesure que les concentrations d'Al dans les milieux d'exposition augmentent.

Après 24 h, les poissons ont été retirés des bassins et anesthésiés dans une solution de 0.15% de MS-222 (l'ester éthyle de l'acide 3-aminobenzoïque, Sigma Chemicals, St. Louis, MO; pH ajusté à 5.0 ± 0.2). Les branchies ont été enlevées par dissection et rincées rapidement dans de l'EDR à pH 5.0 avant d'être soumises à un des traitements suivants:

(i) trempage à l'EDTA: le tissu branchial a été immergé dans 1.5 mL d'une solution glacée d'EDTA 10 mM durant 15 min, puis rincé rapidement dans de l'EDR et transféré dans un tube à centrifuger pré-pesé. Le traitement à l'EDTA a été conçu pour extraire le Zn échangeable non étroitement lié, le reste étant considéré comme le "Zn branchial".

(ii) épongeage au papier filtre GF/C: le tissu branchial a été épongé doucement avec du papier filtre de fibre de verre (GF/C, Whatman Paper Co, Maidstone, UK) pour enlever le mucus, puis transféré dans un tube à centrifuger. Ce traitement a été conçu pour enlever le Zn associé au mucus, le reste étant considéré comme le "Zn lié".

Pour l'expérience 7, les branchies entières ont été soumises au traitement (i) seulement. Pour les expériences 8 et 9, les branchies ont subi les deux traitements successivement. Après le traitement à l'EDTA, les branchies ont été coupées en deux; une des moitiés a été transférée dans le tube à centrifuger et l'autre a subi le traitement (ii) avant le transfert. Pour l'expérience 7, les comptes des branchies représentent donc le Zn "branchial" et pour les expériences 8 et 9, le Zn "branchial" et le Zn "lié" sont tous deux évalués.

L'ordre d'échantillonnage des bassins a été inversé pour les expériences faites au même moment (expériences 7a et 7b, expériences 8 et 9), les bassins témoins étant tantôt échantillonnés en premier, tantôt en dernier. Pour évaluer le bruit de fond, des branchies de poissons provenant du bassin de réserve ont aussi été échantillonnées, et ce, dans chacune des expériences. Des poissons du bassin de réserve ont été exposés à une surdose de MS-222 et leurs branchies ont été extraites par dissection, puis rincées brièvement à l'EDR, pesées et soumises au comptage.

Après chacun des traitements, les tissus branchiaux ont été lyophilisés et pesés. Dans la plupart des cas, le procédé résultait en une poudre compacte au fond du tube à centrifuger. Si nécessaire, la poudre était envoyée au fond en cognant légèrement le tube ou à l'aide d'une baguette en acier inoxydable propre. Le tube était ensuite déposé dans un cylindre de comptage maintenant le tube en position verticale puis soumis à un comptage de radioactivité.

Les comptage a été fait à l'aide d'un compteur gamma LKB, pendant 1800 sec, l'erreur de comptage maximale se situant en deçà de 4%. Le bruit de fond (32-34 cpm) n'a pas montré de différences significatives ni entre les poissons individuels ni entre les expériences. Les comptes des poissons exposés au ^{65}Zn ont toujours été significativement supérieurs au bruit de fond (ANOVA, $p < 0.05$). Le bruit de fond a été soustrait des comptes expérimentaux et ceux-ci ont été divisés par la masse des branchies pour obtenir une valeur en $\text{cpm Zn} \cdot \text{g}^{-1}$ branchie (masse sèche).

À cause des variances inégales, les données ont dû être transformées en log (log X+1) avant de faire les comparaisons statistiques. Les comptes pour le Zn "branchial" et le Zn "lié" des poissons soumis aux mêmes concentrations d'Al ont été comparés par test de t. Les comptes des branchies

trempées à l'EDTA (Zn branchial) et des branchies trempées à l'EDTA puis épongées (Zn lié) pour les différents traitements d'Al ont été comparés séparément (tous les comptes 'branchial', tous les comptes 'lié') par une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test *a posteriori* des différences les moins significatives (LSD).

4.0. RÉSULTATS ET DISCUSSION.

4.1. Toxicité de l'Al à faible pH.

Les valeurs CL-50 ont été déterminées après les expositions à des concentrations d'Al, à trois niveaux de pH acide (pH 4.5, pH 4.8 and pH 5.2). Ces expériences ont été effectuées en même temps que les expositions au mélange Al-Zn.

En examinant les résultats des bioessais réalisés avec l'Al inorganique seul, à différents pH, on peut faire une première constatation: la toxicité de l'Al décroît lorsque le pH diminue. Les valeurs de CL-50 (exprimées en μM Al inorganique ou Al^{3+}) sont plus élevées à pH 4.5 qu'à pH 5.2 (tableaux 8 et 9). La distribution des différentes formes chimiques de l'Al change entre pH 5.2 et pH 4.5, la proportion de l'ion libre (Al^{3+}), devenant prédominante lorsque le pH s'approche de pH 4.0. Selon le MIL, la toxicité du métal devrait être proportionnelle aux concentrations de l'ion libre, mais il est évident que les CL-50, même exprimées en Al^{3+} , augmentent avec la baisse du pH (tableau 9).

Les valeurs de CL-50 déterminées pour l'Al inorganique en l'absence de Zn (de 2 à 11 μM Al_i , selon le pH; tableau 8) sont semblables à celles publiées récemment dans la littérature scientifique, compte tenu des différences inévitables dans les variables expérimentales (période d'acclimatation, source d'eau douce, espèce et lignée des poissons). Des CL-50 approximatives peuvent être calculées à partir des données publiées dans d'autres études, comme celle de Wilkinson *et al.* (1990), à partir de laquelle on obtient une CL-50 168 h de 3.2 μM en Al^{3+} (4.9 μM Al_i) à pH 4.5 pour des juvéniles de saumon. Les valeurs pour les autres salmonidés sont égales ou supérieures à celles observées chez le saumon de l'Atlantique. Orr et ses collègues (1986) ont publié un seuil de toxicité létale de 6.5 μM pour des juvéniles de truite arc-en-ciel à pH 5.2.

Malgré cette correspondance approximative entre nos valeurs de CL-50 et celles de la littérature, il faut cependant admettre qu'il y a peu de résultats disponibles pour fins de comparaison. Cette

rareté de valeurs CL-50 (et non d'études sur l'Al et les poissons en général) reflète la nature aiguë de la réponse du poisson à l'Al, c'est-à-dire la difficulté d'obtenir des mortalités 'partielles'. Il est en effet nécessaire d'obtenir des mortalités 'partielles' reproductibles pour calculer des valeurs précises de CL-50. Dans l'étude présente, la gamme de concentrations en Al auxquelles il y a eu des mortalités partielles était très limitée et difficile à subdiviser. Hutchinson et ses collègues (1987) ont aussi observé qu'à faible pH, les juvéniles de salmonidés ne démontrent une réponse qu'à une étendue très étroite de concentrations, ce qu'ils ont nommé le seuil de réponse.

Il a été établi précédemment, pour le saumon de l'Atlantique (Muniz et Lievestad, 1980) et certaines autres espèces de poissons (Baker, 1982; Neville et Campbell, 1988; Holtze et Hutchinson, 1989), que la toxicité de l'Al inorganique diminue lorsque le pH diminue. Même lorsqu'on les exprime en termes de l'ion libre Al^{3+} , pour tenir compte des changements de forme chimique qui se produisent lorsque le pH change, les valeurs de CL-50 (Al^{3+}) augmentent de 45 fois avec une diminution de moins d'une unité de pH, c'est-à-dire qu'elles passent de 0.15 μM à pH 5.3 à 6.8 μM à pH 4.4 (tableau 9). *Il est donc clair que la concentration de l'ion libre seule ne nous permet pas de prédire les effets biologiques de l'Al.* Des conclusions similaires ont été publiées récemment pour les algues d'eau douce (Gensemer, 1991; Parent et Campbell, 1994).

La diminution de la toxicité de l'Al à faible pH est en accord avec le concept de compétition accrue entre le proton H^+ et l'ion libre Al^{3+} pour les sites de complexation ou de transport à la surface branchiale (Campbell et Stokes, 1985; Neville et Campbell, 1988). Des calculs (équations 5 et 6) ont été faits afin de modifier le MIL pour tenir compte de l'effet du pH sur la surface branchiale et la proportion de sites libres aux valeurs expérimentales de pH. Les valeurs approximatives de pK_a suggérées pour les composantes glucidiques présentes à la surface branchiale vont de 3.6 (Reid et McDonald, 1991) à environ 5.0 (Pagenkopf, 1983). La valeur $pK_a = 4.5$ a été choisie pour évaluer la proportion de sites L-branchie libres, cette valeur ayant été utilisée dans d'autres études de modélisation (Neville et Campbell, 1988; Wilkinson *et al.*, 1990). Cependant, d'après le tableau 10, il appert que le produit de la concentration en ion libre Al^{3+} et de la proportion de sites L-branchies libres n'est pas constant pour les pH testés, le produit

démontrant une forte association avec le pH, même en tenant compte de l'effet du pH sur la surface branchiale.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette dépendance 'résiduelle' entre le pH et la toxicité de l'Al. Dans le calcul de la proportion de sites L-branchies libres, la valeur de pH de la solution-mère a été utilisée; cependant, dans le cas de poissons exposés à une solution acide non-tamponnée, le pH dans le micro-environnement branchial pourrait être plus élevé que dans la solution-mère (Playle et Wood, 1989a) - une telle augmentation mènerait à une proportion plus élevée de sites {L-branchie_{libre}} ionisés. De plus, certains auteurs ont postulé que des complexes mixtes comme HO-Al²⁺-L-branchie peuvent se former à la surface branchiale et contribuer à la toxicité observée (Neville et Campbell, 1988; Wilkinson *et al.*, 1990). Il en ressort que le modèle de l'ion libre, "modifié" pour tenir compte de la compétition entre le proton H⁺ et l'ion libre Al³⁺ à la surface branchiale, peut expliquer une partie de la variation des valeurs de CL-50 (Al³⁺) avec le pH. Il n'en demeure pas moins une dépendance résiduelle, encore inexpliquée. Signalons que des résultats semblables ont été observés pour la toxicité de l'aluminium envers les algues (Parent et Campbell, 1994).

4.2. La toxicité du Zn à faible pH.

Des bioessais de toxicité du Zn seul à pH 4.5 et 5.2 ont également été effectués, en même temps que les expositions à des concentrations d'Al et au mélange Al-Zn. L'objectif était d'évaluer la toxicité du Zn aux pH utilisés ici.

Tout comme pour l'aluminium, la toxicité du Zn est plus faible à pH 4.5 qu'à pH 5.2. Les valeurs CL-50 en µM Zn (limites de confiance à 95%) déterminées dans les expositions au Zn seulement ont été 11.9 (8.4 - 16.8) à pH 4.5 et 5.1 (4.6 - 5.7) à pH 5.2. Une réduction semblable de la toxicité du Zn a été observée pour la truite arc-en-ciel par Cusimano et ses collègues (1986), qui ont obtenu une valeur CL-50 de 10.3 µM Zn à pH 4.7.

Comme dans le cas de l'aluminium, on peut invoquer la compétition H^+/Zn^{2+} au niveau des branchies pour expliquer partiellement l'effet protecteur de l'ion H^+ . Encore une fois, le produit de $[Zn^{2+}]$ et de $[L\text{-branchie}]_{libre}$ n'est pas constant (tableau 11), mais les valeurs sont plus rapprochées les unes des autres que les valeurs obtenues avec l'Al. On observe à nouveau un effet bénéfique résiduel de l'acidification qui ne peut être expliqué par la simple compétition H^+/M^{z+} .

Les unités toxiques (UT) de Zn ont été calculées comme décrit dans la section 3.7. Les UT de Zn dans les expositions avec l'Al varient de 0.1 UT à pH 4.5 à 0.2 UT à pH 5.2 (tableau 8). Il convient de noter qu'il n'y a pas eu de mortalité dans les témoins exposés à ces concentrations de Zn sans Al.

4.3. Toxicité des mélanges d'Al et de Zn

Les valeurs de CL-50 pour l'Al ont été calculées d'après les expositions à différentes concentrations d'Al et à une concentration fixe de Zn. Ces expériences ont été réalisées à trois niveaux de pH acide (pH 4.5, pH 4.8 and pH 5.2), et ont eu lieu en même temps que les expositions à l'Al seul (section 4.1).

Les valeurs CL-50 (exprimées en μM Al inorganique ou Al^{3+}) des mélanges ont été généralement semblables à celles calculées pour les expositions à l'Al seulement (tableaux 8 et 9). Les CL-50 du mélange ont été légèrement plus basses que celles des expositions à l'Al seulement, mais elles n'ont été significativement différentes ($p \approx 0.05$) que pour les expériences 2 et 5. Les répétitions des expériences ont produit des résultats semblables, à l'exception des expériences 3 et 4. Dans ce cas particulier les CL-50 des expositions à l'Al ont été différentes ($p < 0.05$), mais il n'y avait pas eu de différence entre les CL-50 des mélanges correspondants ($p > 0.05$). Il est probable que les différences de masse moyenne des organismes dans ces deux expériences ont contribué à ce résultat.

4.3.1. Modélisation des temps de survie - approche.

Suite à une inspection préliminaire des temps de survie, il est apparu qu'aux concentrations élevées d'Al, le mélange Al-Zn a résulté en une toxicité plus élevée que celle de l'Al seul. Pour mieux utiliser les données obtenues au cours des bioessais, les temps de survie ont été modélisés à l'aide du logiciel STATISTICA (Statistica for Windows, Statsoft release 4.5, 1993), en utilisant les sous-routines 'Survival Analysis' et 'Statistica Command Language'. Les données des trois concentrations les plus élevées d'Al de chaque expérience ont été sélectionnées (mortalité $\geq 20\%$ dans au moins un des réplicats). Toutes les données ont été censurées à droite à 120 h, sauf celles de l'expérience à pH 4.8, censurées à 96 h. C'est une caractéristique des données de survie de devoir être censurées, car tous les organismes ne meurent pas avant la fin de l'expérience. Dans ce type d'étude, tous les individus sont censurés au même moment: à la fin de l'expérience. Dans notre cas, une expérience à pH 4.8 s'est terminée à 96 h et, pour ne pas biaiser les données, les deux expériences à pH 4.8 ont été censurées à 96 h. Les autres expériences se sont terminées à 120 h et ont donc été censurées à ce temps.

Les données de survie n'ont pu être associées ($p < 0.05$) à aucune distribution disponible (exponentielle, Weibull, log-linéaire, Gompertz). Les données des expériences à chacun des pH ont été comparées par une analyse Kaplan-Meier. Les courbes de hasard cumulatif (log survie *vs.* log temps) étaient à peu près parallèles, ce qui confirme la supposition que les dangers étaient proportionnels dans chacune des expériences (Dixon et Newman, 1991). Les données correspondant à chacun des pH ont été combinées pour augmenter le nombre de cas individuels. La fonction de distribution étant inconnue, le modèle non-paramétrique de hasard proportionnel de Cox (Cox et Oakes, 1984; Dixon et Newman, 1991) a été utilisé pour comparer la fonction de hasard dans les expositions Al-Zn à chacun des pH.

Le modèle de hasard proportionnel de Cox présuppose que le hasard sous-jacent est fonction de variables indépendantes, sans pourtant présumer de la forme de la courbe de hasard. Le modèle se décrit ainsi:

$$h\{(t), (z_1, z_2, \dots, z_i)\} = h_0(t) \bullet \exp(\beta_1 z_1 + \beta_2 z_2 + \dots \beta_i z_i) \quad (13)$$

où $h(t)$ est le hasard actuel avec les variables z_1, z_2, \dots, z_i et le temps de survie t . Le terme $h_0(t)$ fait référence au hasard de base ("baseline hazard") alors que toutes les variables sont remises à zéro. L'effet d'un traitement est de multiplier le hasard de base par les valeurs β - les valeurs estimées des paramètres ("parameter estimates"). L'ajustement d'un modèle nous permet d'évaluer la conformité de l'ajustement ("goodness of fit") désigné comme le log-vraisemblance ("log-likelihood"). La pertinence d'un modèle est déterminée par le calcul du Chi-carré, comparant les valeurs de log-vraisemblance du modèle ajusté (en tenant compte des estimés des paramètres) avec celles du cas nul, où toutes les valeurs estimées sont ramenées à zéro. Dans le cas où certaines présuppositions seraient vérifiées, l'inclusion des variables continues ou de classification peut nous donner un modèle avec un log-vraisemblance plus positif et une meilleure conformité aux données. Lorsque l'on compare deux modèles comprenant des variables différentes, la conformité de l'ajustement peut également être calculée avec un test de Chi-carré. Si le double de la différence absolue entre deux valeurs de log-vraisemblance est supérieur à la valeur Chi-carré correspondante, alors le modèle avec le log-vraisemblance le plus élevé est plus pertinent.

Une variable peut être utilisée dans une analyse stratifiée, où le hasard n'est pas nécessairement proportionnel, mais les effets ne sont pas estimés. Il est aussi possible d'utiliser la variable comme covariante et d'en estimer les effets, en supposant que les hasards soient proportionnels. Dans la présente étude, une analyse stratifiée ("stratified analysis") a été effectuée pour chacun des groupes de pH, en prenant la concentration d'Al (soit en μM d'Al inorganique ou avec les valeurs calculées de l'ion libre - Al^{3+}) comme variable indépendante continue et la présence/absence de Zn ("code Zn" = 1 ou 0) comme strates ("strata"). Les courbes des données de survie (log survie cumulative vs. log temps) à chaque pH pour Al et Al-Zn étaient parallèles, suggérant un hasard proportionnel. Les concentrations en Al et en Zn ont donc été utilisées comme covariantes dans

d'autres modèles, le zinc étant utilisé soit comme variable de classification (code Zn) ou en utilisant la concentration moyenne (μM) comme variable continue dans chaque série expérimentale. Finalement, le nombre d'unités toxiques pour chaque bassin a été pris comme covariante simple pour les expériences à pH 4.5 et à pH 5.2, pour lesquelles les données de toxicité pour le Zn seul étaient disponibles.

4.3.2. Modélisation des temps de survie - résultats.

Les résultats de l'analyse stratifiée des temps de survie indiquent que le Zn a un effet négatif significatif sur les poissons exposés au mélange Al-Zn (tableau 12, 13 et 14). Le Zn n'atténue donc pas la toxicité de l'Al; au contraire, les organismes exposés simultanément aux deux métaux ont un temps de survie diminué. Cet effet n'a pas été généralement mis en évidence par les données de CL-50. Seulement deux expériences ont révélé de légères différences entre les valeurs CL-50 obtenues dans les expositions à l'Al et dans les mélanges des deux métaux (tableau 8). En fait, puisqu'il n'y a pas eu de mortalité dans aucun des témoins Zn (Zn sous-létal sans Al, à un pH acide donné), on se serait attendu à avoir très peu ou pas d'augmentation de la toxicité avec le mélange Al-Zn.

Mais, si le Zn abaisse le temps de survie des poissons, pourquoi les CL-50 ne différaient-elles pas? On pourrait supposer que des temps d'exposition plus longs auraient révélé des différences significatives entre les CL-50 de l'Al seul et celles du mélange Al-Zn. Cependant, c'est très peu probable car ces CL-50 mesurées s'approchent déjà des valeurs intrinsèques ('incipient LC50s') - dans les expositions à l'Al où des réponses partielles ont été obtenues, les mortalités ont cessé bien avant la fin du bioessai. Nous en concluons que l'effet du Zn sur le temps de survie est bien réel, mais que les CL-50 ne nous permettent pas de le détecter, ce qui révèle les faiblesses de cette approche toxicologique classique (Dixon et Newman, 1991).

Les résultats de la modélisation des temps de survie indiquent que la toxicité des deux métaux peut généralement s'additionner pour nous permettre d'évaluer la toxicité globale du mélange Al-Zn (tableaux 12, 13 et 14). Dans la littérature scientifique, en ce qui concerne les bioessais avec des

poissons à pH neutre, la toxicité des mélanges de métaux a été décrite comme étant égale à la somme de la toxicité des métaux pris individuellement, ou légèrement inférieure à celle-ci lorsque l'un des métaux est en très faible concentration. C'est le cas pour le saumon chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposé à un mélange Zn-Cd-Cu (Finlayson et Verrue, 1982) et pour le mené (*Phoxinus phoxinus*) exposé à des concentrations sous-létales de Zn et de Cd (Wicklund Glyn et al., 1992). Dans une étude avec le saumon de l'Atlantique à pH neutre, Sprague (1964) a observé que les poissons mouraient plus tôt dans un mélange Cu-Zn que les temps létaux pour les métaux individuels ne permettait de le prévoir. Dans quelques cas, les mélanges de métaux à faible pH paraissent moins toxiques que prévu. Par exemple, dans une étude récente sur le mené tête-en-boule (*P. promelas*), Hickie et ses collègues (1993) ont déterminé les CL-50 individuelles pour l'Al, le Cu et le Zn à pH 4.9, ainsi que pour un mélange de ces métaux au même pH. Le mélange s'est avéré moins toxique que prévu ($\Sigma UT = 1.54$ à la concentration égale à la CL-50 du mélange).

Dans certains cas, les poissons peuvent avoir une réponse moins qu'additive (inférieure à la somme des unités toxiques) ou même indépendante, à des mélanges de deux métaux, plus particulièrement quand un des métaux est en concentration élevée et l'autre en concentration faible ($\leq 0.1 UT$: Eaton, 1973; Parrott et Sprague, 1993). Néanmoins, ces observations peuvent refléter le fait que les taux de mortalité sont rarement publiés dans les études de toxicologie aiguë avec des mélanges de métaux. Les organismes pouvant tolérer une certaine concentration d'un métal A pourraient sans doute tolérer simultanément la présence d'un métal B à plus faible concentration. Quant aux organismes plus sensibles, ceux qui mourraient à cette même concentration du métal A, il se pourrait qu'ils meurent plus tôt en présence de faibles concentration du métal B, mais on ne pourrait détecter cet effet qu'en comparant les temps minimum d'exposition nécessaires pour calculer le seuil de CL-50. La modélisation des temps de survie est mieux adaptée à ce genre de résultat; elle permet de comparer ces types de réponse de façon efficace et statistiquement valable, avec l'avantage supplémentaire de nous fournir des informations plus précises et plus nombreuses (Dixon et Newman, 1991).

4.4. Accumulation de Zn dans les branchies en présence d'Al.

Les essais d'exposition au Zn radioactif ont été de courte durée (24 h). Trois expériences (7, 8 et 9) ont consisté à exposer des saumons juvéniles à une gamme de concentrations d'Al tout en gardant constante la concentration sous-létale de Zn, à un pH nominal de 4.8 (tableau 6).

4.4.1. Variation des comptes de Zn.

Les comptes de Zn de toutes les expériences ont montré une forte variabilité (coefficients de variation $\approx 50\%$; tableaux 15, 16 et 17), peut-être à cause des faibles niveaux de Zn accumulé dans ces expositions à court terme. La variabilité était semblable pour les comptes des branchies trempées à l'EDTA (Zn branchial) et pour ceux des branchies trempées et épongeées (Zn lié) dans les expériences 8 et 9.

Plusieurs facteurs ont pu contribué à cette variabilité. Il est probable que la sécrétion de mucus varie en fonction de la concentration ambiante d'Al. La variabilité des comptes de Zn branchial pourrait donc être due en partie à des différences dans le taux de sécrétion de mucus à différentes concentrations d'Al. Il a été également démontré que le Zn peut s'accumuler dans le plasma sanguin des poissons (Lovegrove et Eddy, 1982; Spry et Wood, 1988, 1989). En dépit des pertes de sang possiblement occasionnées par les techniques utilisées ici (dissection et bissection des branchies, trempage et épongeage), il est probable que des quantités appréciables de Zn accumulé étaient présentes dans le sang qui est demeuré dans les branchies. Des variations dans les pertes de plasma d'un spécimen à l'autre au cours de la dissection et de l'épongeage pourraient contribuer à la variabilité observée dans les comptes de Zn. Toutefois, il faut souligner que les variations observées dans la présente étude sont semblables à celles observées dans d'autres expositions à court terme (≤ 24 h) au ^{65}Zn (accumulation dans le corps entier de l'épinoche, *Gasterosteus aculeatus*: Matthiesen et Brafield, 1977; dans le poisson-chat des canaux: Bentley 1992; dans les branchies des truites arc-en-ciel: Handy et Eddy, 1990).

Les teneurs en Zn branchial dans les branchies des poissons-témoins des expériences 8 et 9, non exposés à l'Al, ne différaient pas de façon significative (test de t , $p < 0.05$). Toutefois, le Zn branchial (en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) des poissons-témoins des expériences 8 et 9 était inférieur aux concentrations observées pour les poissons-témoins de l'expérience 7 (tableaux 15, 16 et 17). L'accumulation de Zn est influencée par la masse des poissons, les poissons plus petits accumulant davantage de Zn (Bradley et Sprague, 1986; Memmert, 1987; Newman et Mitz, 1988). La masse moyenne des poissons de l'expérience 7 (1.6 g) était inférieure à celle des expériences 2 et 3 (2.4 et 2.8 g), ce qui peut expliquer les différences dans les comptes de Zn. De plus, les expositions de l'expérience 7 ont eu lieu dans un plus grand volume (60 L comparativement à 20 L pour les expériences 8 et 9) et les poissons ont donc pu être plus actifs, accumulant ainsi davantage de Zn.

4.4.2. Zn branchial - expérience 7.

Dans l'expérience 7, pour les concentrations de 3.2, 5.1 et 5.8 μM Al, le niveau de Zn branchial chez les poissons exposés à l'Al était égal ou significativement supérieur à celui observé chez les témoins exposés au Zn seulement (tableau 15). Dans l'expérience 7a, les comptes de ^{65}Zn pour les branchies des poissons exposés à 1.9 μM d'Al étaient très élevés et variables. Ces comptes ont été plus élevés que les comptes obtenus dans l'expérience 7b, ayant la même concentration d'Al, et ont été plus élevés que les comptes des autres expositions ($p < 0.05$, analyse de variance). Nous avons éliminés ces résultats aberrants de l'expérience 7a pour deux raisons. Premièrement, les comptes de l'expérience 7b à cette concentration d'Al n'ont pas été différents de ceux des témoins; et deuxièmement, les comptes obtenus aux concentrations semblables d'Al dans les expériences 8 et 9 n'avaient pas démontré cette variabilité.

Il y a eu significativement moins de Zn branchial pour les deux plus hautes concentrations d'Al, 9.2 et 7.3 μM ($p < 0.05$; tableau 15). De plus, la quantité de Zn branchial a été significativement ($p < 0.05$) moins élevée pour la concentration nominale en Al de 9.2 μM que pour celles de 7.3 et de 5.8 μM (tableau 15). Cependant, la teneur en Al monomère mesurée dans ces bassins n'était que de 5.4 μM , c'est-à-dire nettement inférieure à la concentration nominale de 9.2 μM , ce qui indique une perte en Al monomère à cette concentration. Les calculs initiaux avec le modèle

d'équilibre chimique en utilisant $\log K = -9.35$ pour la phase solide de contrôle $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$ indiquaient que la majorité de l'Al à $9.2 \mu\text{M}$ serait présent sous forme monomère inorganique. Toutefois, un calcul plus restrictif avec la constante de gibbsite synthétique ($\log K = -8.05$) suggère que la limite de solubilité de cette forme était dépassée, ce qui aurait pu entraîner la formation de quantités appréciables de formes polymères au pH de l'expérience. Afin d'éviter les difficultés d'interprétation causées par la présence d'Al non-monomère, les plus hautes concentrations ont été limitées à $\leq 6.0 \mu\text{M}$ dans les expériences subséquentes (8 et 9).

4.4.3. Zn branchial et Zn lié - expériences 8 et 9.

Dans les expériences 8 et 9, les comptes en Zn des branchies des poissons exposés à l'Al étaient égaux ou supérieurs à ceux des témoins sans Al. Dans l'expérience 8, le Zn branchial accumulé chez les poissons exposés à 2.2 , 4.2 et $5.6 \mu\text{M}$ d'Al était plus élevé que le Zn branchial des poissons témoins ($p < 0.05$; tableau 16). Les niveaux de Zn lié dans les expositions à l'Al étaient également significativement plus élevés que les niveaux de Zn lié dans les branchies des témoins ($p < 0.05$; tableau 16).

Dans l'expérience 9, le Zn branchial accumulé par les poissons dans les expositions à 1.4 et $4.7 \mu\text{M}$ d'Al ne différait pas significativement du Zn lié dans les branchies des témoins ($p > 0.05$; tableau 17). Les branchies des organismes exposés à $3.6 \mu\text{M}$ d'Al avaient cependant accumulé significativement plus de Zn branchial que celles des organismes exposés à $1.4 \mu\text{M}$ et celles des témoins ($p < 0.05$; tableau 17). Toutefois le Zn lié pour ce niveau ne différait pas de façon significative du Zn lié des autres niveaux ($p > 0.05$; tableau 17).

Le Zn lié aux branchies obtenu pour les expériences 8 et 9 a été converti en $\mu\text{g Zn}\cdot\text{mg}^{-1}$ masse sèche de branchies, calculé à partir d'une efficacité de comptage de 9% (Hare *et al.*, 1991), l'activité spécifique du ^{65}Zn en solution, et les teneurs mesurées de Zn total (AAS) dans les bassins (tableaux 16 et 17). Pour les bassins témoins, sans ajout d'Al, l'accumulation de Zn dans les branchies a été de $0.05 - 0.06 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (tableau 18). Cette valeur est beaucoup plus basse que celles rapportées dans d'autres études, qui incluent le Zn facilement échangeable, faiblement lié, ici

enlevé par extraction à l'EDTA. Par comparaison, dans une étude faite à des concentrations d'exposition causant une toxicité aiguë ($[Zn] = 93 \mu M$) chez la truite arc-en-ciel, à pH 5.5 et en eau peu dure (30 mg L^{-1} en CaCO_3), Bradley et Sprague (1985) ont mesuré les quantités de Zn dans les branchies de poissons qui étaient sur le point de mourir. Ils ont obtenu une teneur moyenne en Zn dans les branchies de $370 \mu\text{g Zn}\cdot\text{g}^{-1}$. Cette accumulation de Zn est plus élevée, de trois à quatre ordres de grandeur, que celle de la présente étude, faite à des teneurs en Zn beaucoup plus basses ($1 \text{ à } 2 \mu M \text{ Zn}$). À des concentrations d'exposition semblables à celles utilisées ici ($2.3 \mu M \text{ Zn}$) et à pH neutre (pH 7.9-8.2), Hogstrand *et al.* (1994) ont mesuré une accumulation de Zn dans les branchies des truites arc-en-ciel de $75 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masse fraîche ($\approx 250 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masse sèche, admettant un contenu en eau de 70%) après un temps d'exposition de 60 jours. Malgré le fait que ces niveaux de Zn incluent une quantité indéterminée de Zn non étroitement lié, il semble que l'accumulation de Zn dans les branchies augmente de façon marquée à des concentrations en Zn dissous plus élevées, ou pour des temps d'exposition plus longs.

4.4.4. Le rôle du mucus.

À des concentrations d'exposition élevées, les deux métaux étudiés ici stimulent la production de mucus sur les branchies (Al: Schofield et Trojnar, 1980; Muniz et Leivestad, 1980; Handy et Eddy, 1989; Zn: Eddy et Fraser, 1982). D'autre part, il a été démontré que le mucus des poissons se lie à des métaux comme le Cd et le Hg (Part et Lock, 1983), le Zn (Handy and Eddy 1990) et l'Al (Wilkinson et Campbell 1993).

Dans la présente étude, une portion considérable du Zn branchial était enlevée par le procédé d'épongeage - environ 20 à 40% du Zn non extractible à l'EDTA (tableaux 16, 17 et 18). Dans l'expérience 8, pour des concentrations en Al de $5.6 \mu M$, $2.2 \mu M$, ainsi que pour les témoins, le Zn branchial était significativement plus élevé que le Zn lié, pour une même concentration d'Al ($p < 0.05$; tableau 16). Pour l'expérience 9, le Zn branchial était significativement plus élevé que le Zn lié seulement pour l'exposition à $4.7 \mu M$ ($p < 0.05$; tableau 17). Puisqu'une quantité appréciable d'une substance muqueuse était visible sur les filtres ayant servi à l'essuyage, la plus grande part

de la fraction enlevée par la procédure d'épongeage était probablement du Zn lié au mucus, avec quelques débris cellulaires et un peu de sang.

Nos résultats suggèrent alors que le mucus joue un rôle modeste dans l'accumulation à court terme du Zn. D'autre part, selon Wilkinson et Campbell (1993), le mucus constitue un compartiment beaucoup plus important pour l'accumulation de l'Al chez les branchies. Ces chercheurs ont exposé des juvéniles de saumon de l'Atlantique à l'Al à pH 4.5 et ont observé qu'une très grande partie de l'Al était enlevée par le procédé d'épongeage. Après une exposition de 24 h à 7 μM d'Al, l'Al total dans les branchies (après trempage dans une solution d'EDTA) était de $\approx 250 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ et le procédé d'épongeage et de trempage a enlevé environ 90% de cet Al branchial. Par contre, dans la présente étude avec le Zn, <40% du métal a été enlevé par le procédé d'épongeage. Il semble que l'Al ait une plus grande affinité pour le mucus que le Zn, et que ce compartiment contienne une proportion plus importante de l'Al.

Le mucus comprend une prépondérance de groupes donneurs d' O^- (Handy, 1989) et a probablement donc une forte affinité pour les cations de classe A comme Al^{3+} , mais une affinité moindre pour un cation "à la limite" comme le Zn^{2+} . En effet, étant donné les différences du rapport charge/rayon (z/r), on peut prévoir que l'Al aura davantage tendance à se lier au mucus que le Zn.

Il est aussi possible que la production de mucus soit plus importante en présence d'Al que dans les expositions au Zn. Selon ce scénario l'Al serait un plus grand irritant que le Zn à la surface des branchies, et stimulerait ainsi une plus grande production de mucus. Dans un tel cas, une plus grande proportion de l'Al se lierait au mucus.

Pour terminer cette discussion sur le rôle du mucus, il est intéressant de considérer les résultats obtenus dans l'expérience 7, aux plus fortes concentrations en Al (concentrations nominales en Al de 9.2 et 7.3 μM ; tableau 15). Dans des conditions s'approchant de ou excédant la limite de solubilité pour $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$, une augmentation de sécrétion de mucus suivie de son élimination pourrait contribuer à réduire l'accumulation de Zn sur les branchies de poissons exposés au Zn et à

l'Al. Les concentrations élevées d'Al stimulant la production de mucus branchial, on peut supposer que si ce mucus peut être périodiquement éliminé ('sloughing'), la concentration de Zn accumulé par les branchies pourrait diminuer lors d'expositions à un tel mélange Al-Zn. Aux concentrations d'Al les plus élevées de l'expérience 7, nous avons en effet obtenu moins de Zn dans les branchies qu'aux concentrations plus faibles (concentrations nominales en Al de 9.2 et 7.3 μM ; tableau 15). Des calculs de modélisation des équilibres chimiques suggèrent que des formes polymères d' $\text{Al}(\text{OH})_n$ et des colloïdes auraient pu être formés à ces concentrations. Des différences entre les concentrations nominales et mesurées d'Al monomère ont été observées à la plus haute concentration d'exposition (tableau 2), ce qui appuie cette interprétation. Il a été observé que la sécrétion de mucus augmente en présence de concentrations sursaturées en Al (Muniz and Leivestad, 1980), et des mesures prises dans l'eau expirée par les branchies de truites arc-en-ciel exposées à l'Al à pH faible ont relevé que l'élimination du mucus enlevait 90% de l'Al réagissant avec les branchies (Playle and Wood, 1991). Playle et Wood (1991) ont également suggéré que la perte de mucus permet l'enlèvement d'une grande partie de l'Al (90%) capté par les branchies. L'augmentation de mucus produite par les concentrations élevées d'Al pourrait donc également réduire la quantité de Zn accumulé par les branchies lors d'expositions simultanées aux deux métaux. Dans ce cas, la présence d'Al non-monomère pourrait affecter la prise en charge du Zn par les branchies.

4.4.5. L'accumulation de Zn sur les branchies.

Nous avons d'abord prévu que Al^{3+} et Zn^{2+} , en tant que cations de "classe A" et "à la limite", ayant une préférence pour O^- comme atome donneur, pourraient interagir aux mêmes sites de complexation sur les branchies, menant à un antagonisme. Cependant, nous n'avons pas observé de faits supportant une compétition entre l'Al et le Zn pour les mêmes sites branchiaux chez le saumon. Cette absence de compétition est manifeste même si les concentrations de l'ion libre des deux métaux étaient comparables. Pour l'expérience 8, les concentrations d' Al^{3+} dans les bassins d'exposition étaient de 2.6, 1.8 et 0.9 μM , tandis que pour l'expérience 9 elles étaient de 2.0, 1.5 et 0.6 μM . Dans ces expériences, les concentrations de Zn total étaient de 0.9-1.0 μM , et à ce pH, le Zn est présent principalement sous forme d'ion Zn^{2+} . En d'autres termes, même aux plus faibles

niveaux d'exposition à l'Al, les concentrations des deux ions libres Al^{3+} et Zn^{2+} étaient presque identiques. Malgré ceci, l'accumulation de Zn dans les branchies s'est avérée indépendante de la concentration d'Al (tableaux 16 et 17).

Les résultats des trois expériences d'accumulation branchiale du Zn démontrent que le Zn et l'Al ne sont pas en compétition pour les mêmes sites de complexation, à pH 4.8, aux concentrations de Zn réalistes utilisées. L'accumulation de Zn dans les branchies des poissons exposés simultanément à l'Al et au Zn était plus grande ou égale à l'accumulation de Zn dans les solutions contenant du Zn seulement (tableaux 15, 16 et 17). Bentley (1992) a publié des résultats similaires pour des poissons-chats des canaux (*Ictalurus punctatus*) exposés à $1 \mu M$ Zn et à une concentration élevée d'Al ($10 \mu M$) à pH 5.0, en eau douce ($0.1 \text{ mM } Ca^{2+}$). Dans cette étude, la prise-en-charge de Zn, mesurée pour le corps entier des poissons chats, ne différait pas pour les poissons exposés au Zn seulement et pour ceux exposés au Zn et à l'Al.

L'accumulation des métaux dans les branchies pour les mélanges de Zn et d'autres métaux semble également se faire de façon indépendante. Selon l'étude de Wicklund et ses collègues (1988), l'accumulation de Cd dans les branchies du poisson-zèbre (*Brachydanio rerio*) exposés à des mélanges de Zn et de Cd (Cd: $0.009 \mu M$; Zn: $0.15 \mu M$) n'était pas influencée par la présence de Zn.

Les concentrations d'Al dans les trois expériences de bioaccumulation de Zn comprenaient des niveaux causant une toxicité aiguë pour les juvéniles de saumon de l'Atlantique à ce pH (CL-50 à pH 4.8 = $3 - 4 \mu M$; section 4.1). L'absence de compétition entre l'Al et le Zn au niveau des branchies concorde avec le temps de survie diminué des poissons exposés au mélange Al-Zn comparé à celui des poissons exposés à l'Al seulement, une tendance établie pour les pH 4.4 à 5.2 (section 4.3). L'accumulation de Zn dans les branchies, et possiblement sa prise-en-charge par le corps entier, ne change pas à des niveaux élevés d'Al. Les effets toxiques du Zn sur les branchies, comme l'inhibition de l'absorption du Ca déjà mise en évidence pour des teneurs en Zn semblables dans les eaux douces neutres (Hogstrand *et al.*, 1994), constitueraient un stress additionnel pour les organismes exposés à l'Al. Les effets de l'Al à faible pH sur les branchies de plusieurs espèces

de salmonidés sont bien documentés; ils incluent les dommages causés au mécanisme de l'ionorégulation (Wood et McDonald, 1987; Potts et McWilliams, 1989) ainsi qu'une toxicité respiratoire (à pH > 5.0; Neville, 1985, Playle *et al.*, 1989). *Le stress additionnel causé par l'exposition à des teneurs sous-létales de Zn serait la cause de la mortalité précoce des organismes comparativement à ceux exposés aux mêmes concentrations d'Al en l'absence de Zn.*

Pour conclure cette section sur les interactions Al-Zn, l'accumulation branchiale de Zn s'est avérée indépendante de la concentration d'Al lors d'expositions conjointes aux deux métaux à pH 4.8. Une proportion appréciable de Zn est liée par le mucus, quoique cette proportion soit moindre que celle observée antérieurement pour l'Al se liant aux branchies dans des conditions similaires. Il est probable que les deux métaux se lient à des sites différents sur la membrane branchiale, ou encore que les sites branchiaux soient présents en grand excès (ce qui permettrait l'action indépendante et additive des deux métaux). Nos résultats soulignent l'importance du mucus dans l'accumulation branchiale des métaux et peuvent expliquer partiellement la toxicité accrue observée dans les mélanges des deux métaux à faible pH.

4.5. Toxicité de l'Al en présence de l'acide fulvique.

Les valeurs de CL-50 ont été calculées d'après les expositions à des solutions Al-AF et Al-EDR, qui ont eu lieu en même temps. Deux expériences (expériences 10 et 11) ont été réalisées, à un pH de 5.0. Une troisième expérience (expérience 12) comprenait une 'pré-exposition' de 4 jours en conditions statiques, où les poissons ont été exposés à de l'eau douce reconstituée ou à une solution d'AF, à pH 5.0, pour être ensuite exposés à de l'Al inorganique seulement. Les conditions expérimentales sont présentées aux tableaux 5 et 8.

4.5.1. Conditions dans les bassins d'exposition Al-AF.

Des changements physico-chimiques ont été observés dans les bassins à bioessai contenant de l'AF et des concentrations élevées d'Al. Dans les expériences 10 et 11, les niveaux de carbone organique total (COT) ont diminué dans les bassins contenant >22 $\mu\text{M Al}_t$. Cette diminution

coïncide avec la formation de matière particulaire brune, ce qui supporte l'idée qu'une partie de l'AF ait été enlevée de la solution. Les niveaux d'Al total ont également diminué par rapport aux niveaux initiaux dans ces bassins, plus particulièrement aux jours 2 et 3 de l'expérience 11. Cette diminution du COT aux concentrations élevées d'Al est probablement due à la co-précipitation de l'Al et de l'AF. Browne et Driscoll (1993) ont observé que l'AF favorise la formation de formes polynucléaires d'Al, lesquelles n'auraient pu être détectées dans nos mesures de la spéciation de l'Al sur des échantillons non acidifiés. De telles formes polynucléaires de l'Al sont utilisées couramment dans le traitement des eaux pour enlever la MOD par coagulation et co-précipitation (Hundt and O'Melia, 1988). Ces changements physico-chimiques ne se sont pas manifestés dans les bassins contenant de l'AF et des niveaux moins élevés d'Al (<22 μM); dans ces bassins les niveaux de COT sont demeurés relativement stables.

En général, il y a eu une bonne concordance entre l'Al inorganique mesuré par la colonne d'échange ionique et les quantités d'Al dialysable, avec une seule exception. Malgré les changements physico-chimiques décrits plus haut, les niveaux d'Al_i dans les deux expériences sont demeurés relativement constants jusqu'au dernier jour des expériences - le jour 4 dans l'expérience 10 et le jour 5 dans l'expérience 11. Les niveaux d'Al dialysable ont concordé avec [Al_i] dans les expériences (tableau 19). Dans l'expérience 11, l'Al dialysable était plus élevé que la concentration moyenne en l'Al_i mesurée dans les échantillons pris directement dans le bassin, quoique cette différence ne soit pas significative (test-t, $p > 0.05$).

4.5.2. Toxicité des solutions Al-AF et Al-EDR.

Selon le modèle de l'ion libre, les CL-50 (Al^{3+}) auraient dû être identiques pour les deux milieux d'exposition. Par ailleurs, si la MOD elle-même ou les complexes Al-AF avaient contribué d'une manière ou d'une autre à la toxicité du milieu, les CL-50 (Al^{3+}) auraient été plus faibles dans le milieu organique. Or, ni l'un ni l'autre de ces résultats n'a été observé. Il s'agit là d'un résultat inattendu.

Contrairement aux prédictions du MIL, il est clair que l'Al inorganique est moins toxique en présence d'AF à pH 5.0. En présence d'AF, la CL-50, exprimée en μM d'Al inorganique, diffère significativement de la CL-50 en conditions inorganiques ($p < 0.05$), étant de deux à trois fois plus élevée que celle-ci, au même pH (tableau 20). La même observation peut être faite lorsque la CL-50 est exprimée en Al dialysable mesuré dans les bassins d'exposition à l'AF (tableau 20). Les CL-50 déterminées dans les expositions Al-EDR (2.9 et 4.0 μM , tableau 20) se comparent bien à celles déterminées pour l'exposition à l'Al seul dans les expériences Al-Zn faites à pH 4.8 (2.8 - 4.5 μM ; section 4.1).

La validité de cette conclusion dépend de la fiabilité des mesures d'Al inorganique effectuées. Un mécanisme qui pourrait augmenter les niveaux apparents d' Al_i est la dissociation des complexes Al-AF lors du passage de l'eau à travers la colonne à échange ionique qui permet de différencier Al_o d' Al_i . En particulier, si la technique analytique utilisée pour déterminer l'aluminium inorganique monomère $[\text{Al}_i]$ était entachée d'un biais positif en présence d'AF, nos valeurs calculées de $[\text{Al}^{3+}]$ surestimeraient les véritables valeurs confrontant les poissons en présence d'AF. Backes et Tipping (1987) ont suggéré la possibilité de dissociation des complexes Al-MOD dans la colonne à échange ionique. Toutefois, la contribution maximale de telles réactions de dissociation a été évaluée à 25% (Backes and Tipping, 1987), c'est-à-dire un facteur de 1.25, beaucoup moins que le ratio de 2 à 4 observé pour les valeurs de CL-50. Nous considérons peu probable que les complexes Al-AF puissent se dissocier au cours du passage dans la colonne d'échange ionique, comme cela peut se produire pour d'autres ligands organiques faiblement liés à l'Al. D'autres études ont démontré que l' Al_i est mesuré de façon exacte par la méthode PCV dans des solutions de sols contenant des niveaux élevés d'Al total (Hodges, 1987; Kervan *et al.*, 1989; McAvoy *et al.*, 1992) et dans des solutions d'Al-AF (Lewis *et al.*, 1988). Dans notre étude de titrage (Annexe 1), les constantes conditionnelles pour Al-AF ont été calculées et indiquent que l'Al est assez fortement lié à l'AF. Notre confiance dans les estimés de $[\text{Al}_i]$ est renforcée par la concordance entre nos deux approches analytiques indépendantes: échange ionique et dialyse (tableau 19). *Nous sommes donc rassurés que les niveaux d' Al_i mesurés dans les bassins Al-AF reflètent avec précision les concentrations d'Al_i dans les bassins et que l'effet protecteur de l'AF est bien réel.*

4.5.3. Pré-exposition à l'AF sans Al.

La pré-exposition des organismes à une solution d'AF à pH 5.0 n'a pas protégé les poissons contre une exposition subséquente à l'Al inorganique. Les saumons pré-exposés à l'AF ou à l'EDR ont manifesté des CL-50 virtuellement identiques lorsqu'introduits dans des solutions inorganiques d'Al (tableau 7). La diminution de la toxicité de l'Al en présence d'AF n'opère pas lorsque les organismes sont transférés dans des solution sans AF.

4.5.4. Modèles de régression pour l'exposition à Al-AF et Al-EDR à pH 5.0.

Les données (expériences Al-AF et Al-EDR 10 et 11) ont été analysées par régression multiple. Les données de mortalité ont été transformées pour normaliser la distribution, au moyen de la fonction arc-sinus. La mortalité a été considérée comme variable dépendante en tant que proportion de morts et les termes pour le COT et l'Al ont été pris comme variables jointes indépendantes. La valeur de COT utilisée a été la concentration moyenne de COT ($\text{mg C}\cdot\text{L}^{-1}$) mesurée dans les bassins avec AF. La valeur introduite pour l'Al a été exprimée soit en $\mu\text{M Al}_t$ ou en $\mu\text{M Al}_i$ ou en $\log \text{Al}_i$. Le résultat des modèles de régression (valeurs p, points d'intersection, R^2) décrivant la relation entre la variable dépendante (mortalité proportionnelle) avec soit Al_t , Al_i , ou $\log \text{Al}_i$ et la variable jointe COT, est décrit au tableau 21.

Le modèle de régression le plus approprié inclut des termes pour l'Al inorganique et le COT et est très significatif ($p < 0.001$). Le modèle suggère un rôle important pour l'AF dans la réduction de la mortalité à des niveaux similaires d' Al_i , puisque le terme COT est négatif. Ceci contredit les prédictions du MIL, puisque celui-ci ne tient pas compte du rôle indépendant des ligands organiques dans la toxicité des métaux, sauf dans les cas où les complexes métal-ligand sont lipophiles. L'AF semble avoir un effet biologique direct, protégeant la membrane branchiale contre les effets toxiques des métaux. Ce type d'effet n'est habituellement pas considéré dans l'étude de la toxicologie des métaux, la plupart des modèles ne se penchant que sur le rôle des ligands, comme l'AF, dans la formation de complexes avec les métaux.

4.5.5. Comparaison avec la littérature

Il a souvent été observé que la toxicité pour les salmonidés de l'Al à pH acide est atténuée par la présence d'acides fulviques et humiques naturels (van Coillie *et al.*, 1983; Neville, 1985; Skogheim *et al.*, 1988; Parkhurst *et al.*, 1990; Witters *et al.*, 1990). Les résultats de la présente étude sont qualitativement semblables à ceux de ces études précédentes en ce que l'acide fulvique utilisé dans nos expériences a en effet protégé les juvéniles de saumon des effets toxiques de l'Al à pH 5 - lorsque celui-ci est exprimé en termes de l'Al réactif total Al_i , les valeurs CL-50 pour les expositions organiques ont été de 7.1 à 8.4 fois plus élevées que pour les solutions inorganiques.

L'atténuation de la toxicité de l'aluminium par la MOD naturelle a généralement été attribuée à la complexation du métal libre par la MOD, mais cette hypothèse a rarement été vérifiée en mesurant les véritables concentrations d' Al_i et en les reliant avec la toxicité résiduelle. Dans la présente étude, nous avons mesuré la spéciation de l'Al dans des milieux d'exposition organiques et inorganiques, comparant ainsi la toxicité de l'Al libre inorganique avec ou sans AF. Nos résultats indiquent que l'Al est considérablement moins toxique pour les juvéniles de saumon de l'Atlantique en présence d'AF que la concentration résiduelle d'Al inorganique nous permettait de le prévoir, c'est-à-dire qu'il faut plus d'Al inorganique libre pour tuer les poissons lorsque les bioessais sont faits avec de l'acide fulvique (6.1-8.0 vs. 2.9 - 4.0 μM).

Nos résultats concordent avec ceux d'une étude similaire sur le Cu, la MOD naturelle et la crevette d'eau douce australienne *Paratya australensis* effectuée par Daly *et al.* (1990b). Ces chercheurs ont déterminé la capacité de complexation des eaux d'étang naturelles au moyen de la polarographie inverse (anodic stripping voltammetry, ASV) et d'une électrode sélective; ils ont calculé la concentration en ion libre Cu^{2+} avec le logiciel d'équilibre chimique MINEQL. Les crevettes ont été exposées à l'eau d'étang ou à un témoin sans MOD, avec ajout de Cu; le Cu^{2+} a été mesuré au cours de l'expérience par l'électrode sélective. Ils ont obtenu des CL-50, exprimées en Cu^{2+} , de deux à trois fois plus élevées pour l'eau d'étang que pour le témoin, tant en se basant sur les valeurs calculées que sur les valeurs mesurées de Cu^{2+} . Les auteurs ont soigneusement noté les difficultés inhérentes à la mesure par électrode sélective en présence de MOD, auxquelles ils

ont attribué le manque de concordance entre la toxicité et la concentration de l'ion libre Cu^{2+} . Cependant, il est également possible que la MOD naturelle présente dans leurs essais ait offert une protection similaire à celle effectuée par l'AF dans notre étude.

Certaines études suggèrent un effet plus direct de la MOD sur les organismes. Hargeby et Petersen (1988) ont exposé l'amphipode *Gammarus pulex* à un pH faible avec ou sans ajout de MOD et ont observé que les animaux exposés aux conditions de faible pH - MOD avait un contenu en eau plus élevé que ceux exposés simplement au pH faible. Ils ont proposé que la MOD réduit la perméabilité des membranes, possiblement à cause de ses caractéristiques amphotères. Wilkinson *et al.* (1993) ont également suggéré une interaction directe de la MOD avec la membrane branchiale. Ces chercheurs ont mesuré le potentiel à la surface de cellules branchiales isolées de l'achigan à grande bouche (*Micropterus salmoides*) au moyen de la micro-électrophorèse. Les cellules exposées à l'AF à pH 4.5 ont montré un potentiel de surface plus élevé que celles étudiées à ce même pH mais sans AF. L'augmentation du potentiel de surface a été attribuée à l'association de l'acide fulvique avec les cellules de branchie. Cette association impliquerait des liens hydrogènes et/ou des interactions hydrophobes.

Contrairement aux résultats présentés ici, Lydersen *et al.* (1990) ont observé au cours de leurs expériences avec le saumon de l'Atlantique que la toxicité était strictement reliée aux concentrations d'Al inorganique présentes. Ils ont exposé de très jeunes saumons (encore pourvu de leur sac vitellin) à deux eaux de lac différant par leur contenu en COD (faible et élevé), mais toutes deux contenant des niveaux élevés d'Al. Ils ont également exposé des organismes à la même eau de lac riche en Al, mais débarrassée de son contenu en COD. Ils ont obtenu des temps de survie identiques pour des quantités égales d'Al inorganique, sans égard à la présence de COD.

Plusieurs facteurs pourraient expliquer l'effet différent obtenu dans notre étude. Une explication possible pourrait être les différents stades de vie utilisés dans les deux expériences. Lydersen *et al.* (1990) ont exposé des poissons encore dotés de leur sac vitellin et ayant des branchies sous-développées, alors que nous avons étudié des poissons juvéniles dans la présente étude. Le sac

vitellin, une membrane exposée, présente une plus grande surface pour interaction avec l'Al que les branchies d'un poisson juvénile.

De plus, le degré d'interaction de la MOD avec la surface branchiale, et donc ses effets protecteurs, peut varier avec les caractéristiques de la MOD, comme sa masse moléculaire, son hydrophobicité et son affinité à former des liens hydrogène, tout autant qu'avec sa concentration. Nous avons utilisé un acide fulvique dérivé du sol d'une masse moléculaire plus faible (500 -1000 Da) que la MOD provenant d'un lac (3000 - 10 000 Da) utilisée par Lydersen *et al.* (1990). L'effet que nous avons observé peut être relié à la source de MOD utilisée, un acide fulvique extrait du sol, par opposition à de l'humus ou de la MOD provenant d'un lac. De plus, les conditions physico-chimiques ambiantes (ex.: pH de la solution, force ionique, température) peuvent influencer l'intensité de l'interaction de la MOD à la surface branchiale. Tandis que nos expériences ont été faites à pH 5.0, le pH dans Lydersen *et al.* (1990) variait de pH 4.8 - pH 5.7. Le pH de la solution semble être une variable importante influençant les interactions de la MOD avec la surface branchiale. Par exemple, dans l'étude de Wilkinson *et al.* (1993) sur les cellules branchiales isolées, les liens chimiques avec l'AF étaient plus intenses à des pH de 4 à 5 qu'à des pH autour de la neutralité. La proportion de groupements carboxyliques non-ionisés dans la molécule d'AF et sur la membrane branchiale aurait tendance à augmenter à des pH plus bas, favorisant ainsi les interactions hydrophobes et/ou les liens hydrogène.

4.5.6. Implications environnementales

Nos conditions expérimentales avaient été choisies à la suite d'expériences préliminaires indiquant que le stade juvénile du saumon de l'Atlantique était particulièrement résistant à des concentrations d'Al_i qui seraient normalement toxiques en l'absence d'acide fulvique. Certaines de ces expériences Al-AF ont été effectuées en conditions de sursaturation ou de non-équilibre, des conditions qui risquent peu de se produire dans un milieu naturel affecté par l'acidification chronique. Toutefois, ces conditions sont comparables à celles pouvant se produire lors du chaulage (liming) de bassins versants acidifiés riches en Al et contenant de la MOD (Weatherley *et al.*, 1991; Lacroix, 1992; Rosseland *et al.*, 1992).

Pendant les chocs acides printaniers ou automnaux, les populations de poisson peuvent être exposées à des augmentations soudaines et extrêmes de l'acidité et de la concentration en aluminium d'une durée de plusieurs jours. De telles réductions épisodiques de pH accompagnées d'augmentations des teneurs en Al ont été documentées dans certains cours d'eau de la Scandinavie (Henriksen *et al.*, 1984; Borg, 1986), de l'est des Etats-Unis (Driscoll *et al.*, 1980; McAvoy, 1989) et du bouclier canadien (LaZerte et Dillon, 1984; Campbell *et al.*, 1992). Les concentrations de matière organique dissoute dans les rivières peuvent également augmenter pendant ces périodes d'acidification épisodique, et exercer une influence importante sur la spéciation de l'aluminium (en Nouvelle Angleterre, McAvoy, 1989; en Scandinavie, Skogheim *et al.*, 1984; Andersson et Nyberg, 1984; en Nouvelle Écosse, Lacroix et Kan, 1986 et au Québec, Campbell *et al.*, 1992). D'après les résultats d'études avec les eaux brunes naturelles, les complexes organiques de l'Al sont considérées peu toxiques (Driscoll *et al.*, 1980; Baker et Schofield, 1982; Skogheim *et al.*, 1984; Lacroix et Townsend, 1987; Lacroix, 1989a).

Par ailleurs, certains résultats obtenus sur le terrain suggèrent eux-aussi que l'Al inorganique est moins toxique en présence de la matière organique dissoute. Il a été noté que'en présence de MOD, les branchies de poisson bioaccumulent l'Al, mais le métal ne cause pas les dommages cellulaires notés après des expositions à l'Al inorganique (Karlsson-Norrgren *et al.*, 1986; Lacroix, 1989a). De même, une étude de bioessais *in situ*, effectué avec l'omble de fontaine dans des cours d'eau acidifiés des Adirondacks, a comparé les mortalités des poissons dans des cours d'eau ayant des concentrations différentes en MOD (Simonin *et al.*, 1993). Les chercheurs ont observé des mortalités supérieures dans la rivière contenant peu de MOD, pour des teneurs similaires en Al, que dans des cours d'eau ayant un contenu plus élevé en MOD (Simonin *et al.*, 1993).

5.0. CONCLUSION.

5.1. Hypothèses et résultats

En guise de conclusion, il convient d'abord de se rappeler des hypothèses examinées dans cette recherche et des conclusions qui en ont découlé:

Hypothèse 1: Les CL-50 déterminées à trois niveaux de pH sont semblables lorsqu'exprimées en ion Al^{3+} , si l'on tient compte du degré d'ionisation des sites branchiaux.

Résultat: Le produit de la concentration de l' Al^{3+} avec la proportion de sites L-branchie_{libre} n'est pas constant pour l'éventail des pH expérimentaux.

Hypothèse 2: À faible pH, des teneurs sous-létales de Zn occasionnent un antagonisme de la toxicité de l'Al.

Résultat: Les temps de survie des organismes diminuent pour des solutions contenant de l'Al et des teneurs sous-létales de Zn.

Hypothèse 3: À faible pH et à différentes concentrations d'Al, l'accumulation de Zn dans les branchies du saumon est inversement proportionnelle à la concentration d'Al.

Résultat: L'accumulation de Zn dans les branchies est indépendante de la concentration de l'Al lors d'expositions conjointes, à pH 4.8.

Hypothèse 4.: Dans des eaux douces acides contenant de l'Al, les CL-50, exprimées en Al monomère inorganique, sont les mêmes pour les solutions inorganiques que pour des solutions contenant de l'acide fulvique comme source de matière organique dissoute.

Résultat: En présence d'acide fulvique, la CL-50, exprimée en Al inorganique, diffère significativement de la CL-50 en conditions inorganiques ($p < 0.05$), étant de deux à trois fois plus élevée que celle-ci, au même pH.

Hypothèse 5: Une pré-exposition de courte durée à des solutions organiques (à pH 5.0, sans Al) protège les organismes subséquentement exposés à l'Al.

Résultat: Pour des bioessais réalisés dans des solutions d'aluminium inorganique à pH 5.0, la CL-50 pour les saumons pré-exposés à l'acide fulvique dans une eau douce reconstituée est virtuellement identique à celle des poissons non-exposés.

Le thème global de cette recherche était d'évaluer la pertinence du modèle de l'ion libre pour expliquer trois aspects particuliers de la toxicologie de l'aluminium vis-à-vis du saumon Atlantique: (i) la toxicité du métal à différents pH, (ii) la toxicité des mélanges d'Al et de zinc à faible pH, et (iii) la toxicité de l'Al dans des solutions contenant de la matière organique dissoute. On examinera ce thème à la lumière des résultats obtenus dans le cadre de la présente étude.

5.2. Le modèle de l'ion libre et la toxicité de l'Al à faible pH.

Le MIL suggère que la toxicité de l'Al devrait être déterminée par la concentration de l'ion libre, Al^{3+} , dans le milieu. Il est cependant évident, d'après les résultats de cette étude, que la connaissance de la concentration de l'ion libre à elle seule ne permet pas de prédire les effets biologiques de l'aluminium. Tout d'abord, les CL-50 déterminées à trois niveaux de pH sont différentes, même lorsqu'elles sont exprimées en termes de l'ion Al^{3+} .

La diminution de la toxicité de l'Al à faible pH est qualitativement en accord avec le concept de compétition accrue entre le proton H^+ et l'ion libre Al^{3+} pour les sites de complexation ou de transport à la surface branchiale (Campbell et Stokes, 1985; Neville et Campbell, 1988). Il est possible de modifier le MIL pour tenir compte de cette compétition en calculant la proportion de sites libres à différents pH. En conditions équitoxiques, c'est-à-dire à des concentrations aqueuses

d' Al^{3+} égales à la valeur de CL-50 (Al^{3+}), le produit de la concentration de l'ion libre et de la proportion de sites de complexation libres devrait demeurer constant à différents pH.

Les résultats de cette étude démontrent que le produit de la concentration de l'ion libre avec la proportion de sites L-branchie libres n'est pas constant pour l'éventail des pH expérimentaux. Le produit démontre une dépendance résiduelle envers le pH, même lorsque l'on tient compte des effets du pH sur l'ionisation des groupements fonctionnels présents à la surface branchiale. On peut donc conclure que le modèle de l'ion libre, "modifié" pour tenir compte de la compétition entre le proton H^+ et l'ion libre Al^{3+} à la surface branchiale, n'explique qu'une partie de la dépendance des valeurs CL-50 (Al^{3+}) envers le pH - il en reste une dépendance résiduelle.

Quelques hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette dépendance 'résiduelle' entre le pH et la toxicité de l'Al.

(a) - existence d'un micro-environnement branchial.

Dans le calcul de la proportion de sites $\{\text{L-branchie}\}_{\text{libres}}$, la valeur de pH de la solution d'exposition a été utilisée. Cependant, dans le cas de poissons exposés à une solution acide non-tamponnée, le pH dans le micro-environnement branchial pourrait être plus élevé que dans le milieu (Playle et Wood, 1989a; Randall et Wright, 1989; Lin et Randall, 1990). Par exemple, Playle et Wood (1989a) ont mesuré le pH de l'eau branchiale après son passage sur les branchies de la truite arc-en-ciel. Leurs résultats suggèrent que, dans les eaux acides très douces ($\text{pH} < 5.0$), le pH du micro-environnement des branchies est tamponné par l'excrétion de produits respiratoires, principalement l'ammoniaque NH_3 . Dans de tels cas le pH dans le micro-environnement branchial peut augmenter de 0.4 - 0.8 unités de pH, comparativement à la solution d'exposition (pH de 4.5 à 5.5).

Une telle augmentation de pH mènerait cependant à une proportion plus élevée de sites $\{\text{L-branchie}\}$ ionisés, comparativement à la proportion calculée en fonction du pH de la solution mère, et réduirait l'effet de compétition entre le proton H^+ et l'ion libre Al^{3+} pour les sites de

complexation ou de transport à la surface branchiale; ceci aurait pour effet de diminuer l'effet protecteur apparent de l'ion H^+ , alors que c'est le phénomène inverse qui s'observe, à savoir un effet protecteur résiduel inexpliqué. Par ailleurs, Playle et Wood (1989b) suggèrent que l'augmentation du pH branchial provoque la "précipitation" de l'Al sur les branchies et que cette "précipitation" nuise au poisson. Il n'est cependant pas évident qu'une telle accumulation de $Al(OH)_3(s)$ sur les branchies causerait les perturbations de l'ionorégulation associées avec la toxicité de l'Al au faible pH (Wood et McDonald, 1987). De plus, la neutralisation rapide des solutions contenant de l'Al est caractérisée par la formation de formes polynucléaires et de colloïdes de l'Al, plutôt que par la formation d' $Al(OH)_3(s)$ (Bertsch, 1989). En d'autres termes, un micro-environnement branchial à pH plus élevé que celui de la solution-mère pourrait bien exister, mais cela ne semble pas offrir d'explication plausible de la dépendance résiduelle des valeurs $CL-50(Al^{3+})$ envers le pH.

(b) - effet de l'acidification sur la charge superficielle des branchies.

Dans sa forme "modifiée", le MIL tient compte d'une compétition directe entre l'ion H^+ et l' Al^{3+} pour des sites spécifiques sur les branchies. Par ailleurs, l'acidification du milieu peut également avoir un effet indirect sur les branchies - au fur et à mesure que le pH baisse, le nombre de groupements ionisés diminue, et la charge superficielle des branchies devient moins négative. Selon des études récentes de Kinraide (Kinraide *et al.*, 1992; Kinraide, 1994), traitant de la rhizotoxicité de l'aluminium envers le blé, cette diminution de la charge superficielle entraîne une baisse de la concentration en Al^{3+} retenu dans la double-couche électrique située à proximité de la surface des racines. L'influence "résiduelle" du pH sur la toxicité de l'aluminium reflète possiblement cet effet indirect de l'acidification, puisque le MIL n'en tient pas compte.

(c) - implication de complexes ternaires, $(HO)_nAl-L$ -branchie, dans la réponse biologique.

Selon le MIL, seuls les complexes Al-L-branchie sont impliqués dans l'expression de la toxicité de l'Al. Par ailleurs, l'aluminium a tendance à former des hydroxo-complexes en solution, par ex. $AlOH^{2+}$, la formation de ces complexes étant favorisée par une augmentation du pH. Si ces formes d'aluminium se liaient à la membrane branchiale, formant un complexe mixte HO-Al-L-branchie, et

si ces complexes mixtes contribuaient à la toxicité de l'aluminium, le métal s'avérerait alors plus toxique que prévu (on suppose ici que la toxicité des complexes Al-L-branchie et HO-Al-L-branchie est additive). Le corollaire à ce raisonnement, c'est qu'en acidifiant le milieu on supprimerait la formation des complexes HO-Al-L-branchie; dans de telles conditions la toxicité de l'aluminium diminuerait plus rapidement que prévue selon le MIL, et on évoquerait un effet "protecteur" additionnel du proton. Certains auteurs ont effectivement démontré une corrélation entre la toxicité de l'Al à faible pH et les concentrations calculées en solution des complexes de l'Al hydrolysés, AlOH^{2+} et Al(OH)_2^+ (Fivelstad et Leivestad, 1984). Neville et Campbell (1988) ont démontré mathématiquement que ce genre de corrélation peut s'expliquer en termes de la formation de complexes mixtes $(\text{HO})_n\text{Al-L-branchie}$. Soulignons que la formation de complexes mixtes a également été suggérée pour expliquer la toxicité de l'Al en présence de fluorures. Wilkinson *et al.* (1990) ont démontré que la complexation de l'Al par les fluorures atténue sa toxicité chez le saumon de l'Atlantique. Cependant, la toxicité résiduelle de l'aluminium en présence de fluorures est plus importante que celle prédite à partir des concentrations en Al^{3+} (et des hydroxo-complexes d'Al). La corrélation apparente entre la mortalité et la concentration de Al(F)^{2+} s'expliquerait donc par la formation d'un complexe mixte {F-Al-L-branchie}.

(d) - effets physiologiques d'une exposition chronique à des solutions acides.

Le MIL ne considère pas les actions physiologiques du proton, comme la perturbation de l'ionorégulation qui se manifeste pendant les expositions dans la gamme de pH 4.5 à 5.5 (McDonald, 1983; Wood, 1989). Wood et McDonald (1987) séparent les réponses physiologiques de poissons soumis à un faible pH, ou à des teneurs élevées de l'Al, en deux phases. Premièrement, il y a une phase "choc", caractérisée par des pertes rapides d'ions plasmiques. Cette phase est suivie par une phase de récupération, où les pertes ioniques sont minimisées et l'organisme démontre une adaptation au stress induit. D'après les travaux de Booth *et al.* (1988) avec l'omble de fontaine, il semble que les poissons soumis à des conditions plus sévères ne soient plus capables de résister à un stress subséquent. Booth *et al.* (1988) ont soumis des truites à trois pH acides (pH 4.4, pH 4.8 et pH 5.2), suivis par des expositions à court terme (6 h) à différentes concentrations en Al (4.1, 12.3 et 37 μM Al). Ils ont mesuré les concentrations d'ions (Na, Cl,

Ca) dans l'eau. Les pertes d'ions plasmiqes en présence de l'Al (12.3 μ M) étaient moindres chez les poissons qui avaient été préalablement acclimatés au pH 4.5, comparément à celle des organismes acclimatés au pH 4.8 ou 5.2 (pertes de Na de 33% chez les poissons acclimatés au pH 4.5, par rapport aux pertes de 83% et 100% observées chez les poissons acclimatés au pH 4.8 et pH 5.2 respectivement). Il est possible que l'induction des mécanismes de récupération soit plus rapide chez les poissons acclimatés au pH le plus acide.

Les poissons exposés à l'Al démontrent des réponses physiologiques semblables (Wood *et al.*, 1988; Wilson and Wood, 1992). Il est possible que les mécanismes de récupération physiologiques soient induits plus rapidement, ou qu'ils soient plus efficaces, chez les poissons soumis à l'Al en conditions extrêmes de pH. Dans un tel cas, les organismes seraient plus résistants à l'aluminium à pH 4.5 qu'à pH 4.8 ou 5.2. Les adaptations physiologiques au faible pH protégeraient les organismes contre les effets néfastes de l'Al, et augmenteraient, de façon temporaire, la résistance de l'organisme au métal.

5.3. Le modèle de l'ion libre et la toxicité du Zn à faible pH.

Tout comme pour l'aluminium, la toxicité du Zn est plus faible à pH 4.5 qu'à pH 5.2. Comme dans le cas de l'aluminium, on peut invoquer la compétition H^+/Zn^{2+} au niveau des branchies pour expliquer partiellement l'effet protecteur de l'ion H^+ . De nouveau, le MIL modifié n'explique qu'une partie de la réduction de la toxicité du Zn à faible pH, mais les valeurs $Cl-50(Zn^{2+})$ sont plus rapprochées les unes des autres que les valeurs obtenues avec l'Al; il semble que le MIL modifié explique mieux la toxicité de Zn à faible pH. En comparaison avec l'Al, le Zn a moins de tendance à s'hydrolyser (moins de tendance à former des hydroxo-complexes) et la formation de complexes mixtes HO-Zn-L-branchie est nettement moins favorisée. Selon cette interprétation, et d'après l'hypothèse (c) émise ci-haut, de tels complexes mixtes ne joueraient pas de rôle dans la réponse toxique de *Salmo salar* au zinc et le MIL donnerait donc une meilleure prédiction de la toxicité de ce métal que de celle de l'aluminium.

5.4. Le modèle de l'ion libre et la toxicité de mélanges d'Al et de Zn:

Dans le cas de mélanges de deux métaux, le MIL suggère (1) que la toxicité d'un métal cationique pourrait être réduite en présence d'un deuxième cation entrant en compétition avec le premier ou, s'il n'y a pas de compétition entre les métaux pour les mêmes ligands à la surface branchiale, (2) que la toxicité du mélange des deux métaux devrait être plus élevée que celle des métaux pris individuellement. Cette étude démontre que des concentrations faibles de zinc caractéristiques du milieu naturel causent une toxicité supplémentaire en présence d'aluminium et à faible pH.

Le premier effet n'est pas mis en évidence par les données de CL-50, qui n'indiquent pas de différences significatives entre l'exposition à l'aluminium et l'exposition aux deux métaux. Cependant, les résultats de l'analyse stratifiée des temps de survie démontrent un effet significativement négatif du zinc sur les poissons exposés au mélange Al-Zn. Nous pouvons donc conclure que la présence de zinc n'atténue pas la toxicité de l'aluminium dans ces conditions, mais entraîne plutôt une diminution des temps de survie pour les poissons exposés aux deux métaux. La modélisation des temps de survie est un outil puissant pour prédire les effets de mélanges de métaux sur les populations à risque.

Dans le deuxième cas, où la toxicité d'un mélange est plus élevée que celle des métaux individuels, il en ressort deux possibilités. Premièrement, si la concentration de sites {L-branchie} libres était beaucoup plus grande que la somme des complexes {M-L-branchie}, il y aurait peu de compétition pour les sites sur les branchies. Deuxièmement, il est possible que l'Al et le Zn agissent à des sites différents sur la membrane branchiale; dans ce cas on s'attendrait à observer un effet semblable. L'hypothèse d'une toxicité additive pour l'Al et le Zn est appuyée par le fait que l'accumulation de Zn dans les branchies est indépendante de la concentration de l'Al lors d'expositions conjointes, à pH 4.8. Il se peut que ces deux métaux agissent à des sites différents sur la membrane branchiale en raison de leurs affinités différentes: Al^{3+} est un cation de classe A, avec une forte affinité pour les groupements fonctionnels renfermant de l'oxygène (R-C(O)O^- ; R-O^-), alors que le Zn^{2+} est classifié comme cation "à la limite" avec davantage d'affinité pour les groupements fonctionnels renfermant du soufre (R-S^-).

Cette étude a aussi démontré qu'une portion du Zn est liée par le mucus, quoique que cette portion soit moins élevée que celle observée pour l'Al dans des études comparables. Ces résultats soulignent l'importance du mucus dans l'accumulation de métaux dans les branchies.

Cette étude démontre que les concentrations faibles de zinc caractéristiques du milieu naturel causent une toxicité supplémentaire en présence d'aluminium et à faible pH, une conclusion qui peut avoir des applications sur le terrain. À la fonte des neiges, les populations de poisson peuvent être exposées à des augmentations soudaines et extrêmes de l'acidité et de la concentration en aluminium d'une durée de plusieurs jours (Campbell *et al.*, 1992). Dans de telles conditions acides, les poissons pourront être soumis non seulement à l'Al à faible pH, mais aussi à d'autres métaux, tels l'Al, le Mn, le Cd et le Zn, (Baker, 1982; Andersson et Nyberg, 1984; McDonald *et al.*, 1989; Brezonik *et al.*, 1990; Nelson et Campbell, 1991). La présence de faibles quantités d'autres métaux comme le zinc peut réduire le temps de survie et par conséquent causer une mortalité accrue durant de tels épisodes.

Des résultats obtenus sur le terrain suggèrent qu'un mélange d'Al et de Zn est plus toxique que l'Al seule. Les rivières acidifiées au Pays de Galles contiennent des concentrations en Al et de faibles teneurs en Zn (Turnpenny *et al.*, 1987; Weatherley *et al.*, 1990). Les auteurs suggèrent que ces teneurs faibles de Zn contribue à la toxicité envers les populations de salmonidés dans ces rivières (Turnpenny *et al.*, 1987; Weatherley *et al.*, 1990).

5.5. Le modèle de l'ion libre et la toxicité de l'Al en présence de matière organique dissoute naturelle (MOD).

Selon le MIL, un ligand comme la MOD devrait réagir à la manière des ligands synthétiques comme l'EDTA (éthylènediamine-tétraacétate), qui réduisent la concentration de l'ion libre et, par conséquent, la toxicité des métaux. En présence de l'Al, le rôle de la MOD devrait être identique à celui d'un ligand synthétique comme l'EDTA, c'est-à-dire de réduire la concentration de Al^{3+} et donc la toxicité des solutions d'Al. Il faut cependant admettre que la structure de l'EDTA est très

différente de celle de la MOD. La MOD est composée principalement des acides fulviques (AF) et des acides humiques (AH); ces hétéropolymères polydispersés ont des poids moléculaires nettement supérieurs à celui de l'EDTA et leurs molécules renferment à la fois des groupements fonctionnels hydrophiles et une "épine dorsale" plutôt hydrophobe (noyaux aromatiques).

Cette étude a démontré que, contrairement aux prédictions du MIL, l'Al inorganique est moins toxique en présence d'AF à pH 5.0 que dans des solutions à ce même pH ne contenant que l'Al inorganique. Le modèle de régression entre la mortalité, les concentrations en Al inorganique, et le carbone organique suggère que l'AF a un effet biologique direct, protégeant la membrane branchiale contre les effets toxiques de l'aluminium. Il est possible de proposer un mécanisme pour expliquer cette action de l'AF.

Premièrement, il est connu que l'acide fulvique possède des caractéristiques amphotères (Sposito, 1981) et qu'il peut affecter la membrane biologique (Petersen et Persson, 1987; Hargeby et Petersen, 1988). Hargeby et Petersen (1988) ont démontré une réduction de la perméabilité de la membrane de l'amphipode *Gammarus pulex* à un pH faible en présence de la MOD. Chez les algues, la prise-en-charge de molécules neutres comme le sorbitol s'effectue normalement par simple diffusion. Parent *et al.* (1996) ont démontré que la prise-en-charge de ¹⁴C-sorbitol diminuait lorsque les cellules algales étaient exposées simultanément au sorbitol et à l'Al inorganique à pH 5; cette perméabilité était cependant restaurée en présence de l'acide fulvique.

Wilkinson *et al.* (1993) ont également suggéré une interaction directe de la MOD avec la membrane branchiale. Ces chercheurs ont mesuré le potentiel à la surface de cellules branchiales isolées de l'achigan à grande bouche (*Micropterus salmoides*) au moyen de la micro-électrophorèse. Les cellules exposées à l'AF à pH 4.5 ont montré un potentiel de surface plus élevé que celles étudiées à ce même pH mais sans AF. L'augmentation du potentiel de surface a été attribuée à l'association de l'acide fulvique avec les cellules de branchie. Cette association impliquerait des liens hydrogènes et/ou des interactions hydrophobes.

L'association de l'AF avec les surfaces biologiques semble augmenter à des pH acides, (Wilkinson *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1997); il s'ensuit que le rôle direct de l'AF dans l'atténuation de la toxicité des métaux risque d'être plus important à faible pH qu'à pH neutre. L'interaction de l'AF avec les surfaces biologiques pourrait également varier en fonction de la concentration en AF. Il s'agit là de deux pistes de recherche qui mériteraient d'être explorées à l'avenir.

Les effets biologiques de l'acide fulvique, qui semblent offrir une protection contre la toxicité des métaux au niveau de la membrane des branchies, doivent être pris en considération dans les études de la toxicologie des métaux en présence de matière organique dissoute. Cette conclusion peut avoir des applications sur le terrain. À la fonte des neiges, les populations de poisson peuvent être exposées à des augmentations soudaines et extrêmes de l'acidité et de la concentration en aluminium d'une durée de plusieurs jours (Campbell *et al.*, 1992). La présence de faibles quantités d'autres métaux comme le zinc pourrait réduire le temps de survie des poissons et par conséquent causer une mortalité accrue durant de tels épisodes. Par ailleurs, la matière organique dissoute naturelle, comme l'acide fulvique, pourrait offrir une meilleure protection contre la toxicité des métaux que celle résultant d'une simple diminution de la concentration de l'ion libre.

6.0. PERSPECTIVES DE RECHERCHE.

L'étude des interactions dans les mélanges de métaux est un sujet méritant d'être exploré d'avantage en toxicologie aquatique, surtout en ce qui a trait aux milieux oligotrophes. Les études à venir auront intérêt à utiliser les approches nouvelles permettant de contrôler la chimie du milieu et de déterminer la forme chimique des métaux. Ces approches comprennent l'utilisation d'une eau reconstituée de composition définie, les logiciels d'équilibres chimiques et un éventail de techniques d'analyse (ASV, ISE, résines d'échange ionique, dialyse) permettant la mesure exacte de la concentration de l'ion métallique libre. Peu d'études récentes sur le poisson se sont servis de l'ensemble de ces outils.

De plus, les méthodes toxicologiques classiques, comme l'analyse des temps de survie, devraient être mises en valeur. Ces méthodes permettent l'utilisation efficace des données de toxicité et la mesure de différences subtiles dans les réponses biologiques à des concentrations réalistes des métaux. L'inclusion des autres variables chimiques pertinentes (ex.: la concentration des principaux ions) et des facteurs biologiques (ex.: masse, sexe) pourrait améliorer la précision des prédictions offertes par la modélisation.

Un autre domaine de recherche des plus pertinents est l'étude du rôle de la matière organique dissoute naturelle dans la toxicité des métaux. La MOD peut jouer un rôle indépendant de protection contre la toxicité des métaux, mais cet effet devrait être défini selon l'origine et les propriétés chimiques de la MOD. Il serait important d'explorer les processus physiologiques agissant à la surface membranaire qui sont à l'origine de cet effet protecteur.

BIBLIOGRAPHIE

Anderrsson, P. et P. Nyberg. 1984. Experiments with brown trout (*Salmo trutta* L.) during spring in mountain streams at low pH and elevated levels of iron, manganese and aluminium. Reports Institute of Freshwater Research. 61: 34-47.

Backes, C. A. et E. Tipping. 1987. Aluminium complexation by an aquatic humic fraction under acidic conditions. Water Res. 21: 211-216.

Baker, J. P. 1982. Effects on fish of metals associated with acidification. pp. 165-176. dans: J. Johnston, ed., Acid Rain/Fisheries. Proc. Int. Sym. Acidic Precip. Fish. Impact. American Fisheries Society, Bethesda, MD.

Baker J. P. et C. L. Schofield. 1982. Aluminium toxicity to fish in acidic waters. Water Air Soil Pollut. 16: 289-309.

Bates, S. S., M. Letourneau, A. Tessier et P. G. C. Campbell. 1983. Variation in zinc adsorption and transport during growth of *Chlamydomonas variabilis* (Chlorophyceae) in batch culture with daily addition of zinc. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40: 895-904.

Bentley, P. J. 1992. Influx of zinc by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Uptake from external environmental solutions. Comp. Biochem. Physiol. 101C: 215-217.

Bertsch, P. M. 1989. Aqueous polynuclear aluminum species. pp. 87-115. dans: G. Sposito, ed., The Environmental Chemistry of Aluminum. CRC Press. Boca Raton, FL.

Booth C. E., D. G. McDonald, B. P. Simons et C. M. Wood. 1988. Effects of aluminum and low pH on net ion fluxes and ion balance in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45:1563-1574

Borg, H., 1986. Metal speciation in acidified mountain streams in central Sweden. Water Air Soil Pollut. 30: 1007-1014.

Borg, H. et K. Johansson. 1989. Metal fluxes to Swedish forest lakes. Water Air Soil Pollut. 47: 427-440.

Borgmann, U. et K. M. Ralph. 1983. Complexation and toxicity of copper and the free metal bioassay technique. Water Res. 17: 1697-1703.

Borgmann, U. et C. C. Charlton. 1984. Copper complexation and toxicity to *Daphnia* in natural waters. J. Great Lakes Res. 10: 393-398.

Bradley, R. W. et J. B. Sprague. 1985. The influence of pH, water hardness, and alkalinity on the acute lethality of zinc to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42: 731-736.

- Bradley, R. W. et J. B. Sprague. 1986. Accumulation of zinc by rainbow trout as influenced by pH, water hardness and fish size. *Environ. Toxicol. Chem.* 4: 685-694.
- Brezonik, P. L., C. E. Mach, G. Downing, N. Richardson et M. Brigham. 1990. Effects of acidification on minor and trace metal chemistry in Little Rock Lake, Wisconsin. *Environ. Toxicol. Chem.* 9: 871-885.
- Brouard, D., M. Lachance, G. Schooner et R. van Coillie. 1982. Sensibilité à l'acidification de quatre rivières à saumons de la Côte Nord du fleuve Saint-Laurent (Québec). *Rapp. tech. sci. halieut. aquat.* no 1109F. 56p.
- Browne, B. A. et C. T. Driscoll. 1993. pH-dependent binding of aluminum by a fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* 27: 915-922.
- Buckley, J. A. 1983. Complexation of copper in the effluent of a sewage treatment plant and an estimate of its influence on toxicity to coho salmon. *Water Res.* 17: 1929-1934.
- Campbell, P. G. C. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the Free-Ion Activity Model. Chapitre 2, pp.45-102, dans: A. Tessier et D. R. Turner, eds., *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. J Wiley & Sons, London, UK.
- Campbell, P. G. C., H. J. Hansen, B. Dubreuil et W. O. Nelson, 1992. Geochemistry of Quebec North Shore salmon rivers during snow melt: organic acid pulse and aluminum mobilization. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 1938-1952.
- Campbell, P. G. C. et P. M. Stokes. 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 2034-2049.
- Campbell, P. G. C., P. M. Stokes et J. N. Galloway. 1985. Acid-deposition: effects on geochemical cycling and bioavailability of trace elements. U.S. National Academy of Sciences, Royal Society of Canada, Academia de la Investigación Científica Mexico. Washington, DC.
- Campbell, P. G. C., M. R. Twiss et K. J. Wilkinson. 1997. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells - implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* (sous presse).
- Chakoumakos, C., R. Russo et R. V. Thurston, 1979. Acute toxicity of copper to cutthroat trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, pH and hardness. *Environ. Sci. Technol.* 13: 213-219.
- Christophersen N., C. Neal, R. Vogt, J. M. Esser et S. Andersen S. 1990. Aluminum mobilization in soil and stream waters at three Norwegian catchments with different acid deposition and site characteristics. *Sci. Total Environ.* 96: 175-188.
- Cox, D. R. et D. Oates. 1984. *Analysis of Survival Data*. Chapman and Hall, London. 201p.

- Cusimano, R. F., D. F. Brakke et G. A. Chapman. 1986. Effect of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 1497-1503.
- Cuvin-Aralar, M.A.L. et E. V. Aralar. 1993. Effects of long-term exposure to a mixture of cadmium, zinc and inorganic mercury on two strains of tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 891-897.
- Daly, H. R., I. C. Campbell et B. T. Hart. 1990a. Copper toxicity to *Paratya australiensis* .1. Influence of nitrilotriacetic acid and glycine. *Environ. Toxicol. Chem.* 9: 997-1006.
- Daly, H. R., M. J. Jones, B. T. Hart et I. C. Campbell. 1990b. Copper toxicity to *Paratya australiensis* .3. Influence of dissolved organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 9: 1013-1018.
- Dickson, W. 1978. Some effects of the acidification of Swedish lakes. *Verh. Inter. Verein. Limnol.* 20: 851-856.
- Dixon, P. M. et M. C. Newman, 1991. Analyzing toxicity data using statistical models for time-to-death: an introduction. pp. 207-242. dans: M. C. Newman et A. W. McIntosh, ed., *Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications*. *Adv. Trace Substances Res.* Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- Driscoll, C. T., J. P. Baker, J. J. Bisogni et C. L. Schofield. 1980. Effect of aluminum speciation on fish in dilute acidified waters. *Nature (Lond)* 284: 161-164.
- Driscoll, C. T. et W. D. Schecher, 1988. Aluminum in the environment. pp. 59-122. dans: H. Sigel et A. Sigel, ed., *Aluminum and its Role in Biology*. *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 24. Marcel Dekker Inc., New York, NY.
- Eaton, J. G. 1973. Chronic toxicity of a copper, cadmium and zinc mixture to the fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque). *Water Res.* 7: 1723-1736.
- Eddy, F. B. et J. E. Fraser. 1982. Sialic acid and mucus production in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) in response to zinc and sea water. *Comp. Biochem. Physiol.* 73C: 357-359.
- Enserink, E. L., J. L. Maasdiepeveen et C. J. Vanleeuwen, 1991. Combined effects of metals - an ecotoxicological evaluation. *Water Res.* 25: 679-687.
- Evans, H. E., P. J. Smith et P. J. Dillon. 1983. Anthropogenic zinc and cadmium burdens in sediments of selected southern Ontario lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 570-579.
- Everett, N. C., N. A. A. MacFarlane et R. W. Sedgwick. 1989. The interactions of water hardness and pH with the acute toxicity of zinc to the brown trout, *Salmo trutta* L. *J. Fish Biol.* 35: 27-36.

- Finlayson, B. J. et K. M. Verrue. 1982. Toxicities of mixtures of copper, zinc and cadmium mixtures to juvenile chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 111: 645-650.
- Fivelstad, S. et H. Leivestad. 1984. Aluminium toxicity to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and brown trout (*Salmo trutta* L.): mortality and physiological response. *Rep. Inst. Freshwat. Res. Drottningholm* 61: 69-77.
- Freda, J., V. Cavdek et D. G. McDonald. 1990. Role of organic complexation in the toxicity of aluminum to *Rana pipiens* embryos and *Bufo americanus* tadpoles. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 217-224.
- Geisy, J. P., G. J. Leversee et D. R. Williams. 1977. Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on Cd toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae) and *Gambusia affinis* (Poeciliidae). *Water Res.* 11: 1013-1020.
- Geisy, J. P., A. Newell et C. G. Leversee. 1983. Cu accumulation in soft, humic waters: effects on Cu bioaccumulation by and toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae). *Sci. Total Environ.* 28: 23-36 .
- Gensemer, R. W. 1991. The effects of pH and aluminum on the growth of the acidophilic diatom *Asterionella ralfsii* var. americana. *Limnol. Oceanogr.* 36: 123-131.
- Gunn, J. M. et W. Keller. 1990. Biological recovery of an acid lake after reductions in industrial emissions of sulphur. *Nature (Lond)* 345: 431-433.
- Hamilton, M. A., R. C. Russo et R. V. Thurston. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11: 714-719.
- Hamilton, S. J. et K. J. Buhl. 1990a. Safety assessment of selected inorganic elements to fry of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Ecotox. Environ. Safety* 20: 307-324.
- Hamilton, S. J. et K. J. Buhl. 1990b. Acute toxicity of boron, molybdenum, and selenium to fry of chinook salmon and coho salmon. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 366-373.
- Handy, R. D. 1989. The ionic composition of rainbow trout body mucus. *Comp. Biochem. Physiol.* 93A: 571-575.
- Handy, R. D. et F. B. Eddy. 1989. Surface absorption of Al by gill tissue and body mucus of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at the onset of episodic exposure. *J. Fish Biol.* 34: 865- 874.
- Handy, R. D. et F. B. Eddy. 1990. The interactions between the surface of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and waterborne metal toxicants. *Functional Ecol.* 4: 385-392.
- Hare, L., E. Saouter, P. G. C. Campbell, A. Tessier, F. Ribeyre et A. Boudou. 1991 Dynamics of cadmium, lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* (Ephemeroptera) and the environment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 39-47.

- Hargeby, A. et R. C. Petersen. 1988. Effects of growth and humus on the survivorship, growth and feeding of *Gammarus pulex* (L.) (Amphipoda). *Freshwat. Biol.* 19: 235-247.
- Henriksen, A., O. K. Skogheim et B. O. Rosseland. 1984. Episodic changes in pH and aluminium-speciation kill fish in Norwegian salmon river. *Vatten* 40: 255-260.
- Henriksen, A. et R. F. Wright. 1978. Concentrations of heavy metals in small Norwegian lakes. *Water Res.* 12: 101-112.
- Morel, F.M.M. et J.G. Hering. 1993. *Principles of Aquatic Chemistry*, 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Hickie, B. E., N. J. Hutchinson, D. G. Dixon et P. V. Hodson. 1993. Toxicity of trace metals mixtures to alevin rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and larval fathead minnow (*Pimephales promelas*) in soft, acidic water. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 1348-1355.
- Hodges, S. C. 1987. Aluminum speciation: a comparison of five methods. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51: 57-64.
- Hogstrand, C., R. W. Wilson, D. Polgar et C. M. Wood. 1994. Effects of zinc on the kinetics of branchial calcium uptake in freshwater rainbow trout during adaptation to waterborne zinc. *J. Exp. Biol.* 186: 55-73
- Holcombe, G. W. et R. W. Andrew. 1978. The acute toxicity of zinc to rainbow and brook trout in hard and soft water: comparisons in hard and soft water. EPA 600/3-78-094. U.S. Environmental Protection Agency. Duluth, MN. 25p.
- Holtze, K. E. et N. J. Hutchinson. 1989. Lethality of low pH and Al to early life stages of six fish species inhabiting Precambrian Shield waters in Ontario. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1188-1202.
- Howarth, R. S. et J. B. Sprague. 1978. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. *Water Res.* 12: 455-462.
- Hundt, T. R. et C. R. O'Melia. 1988. Aluminum-fulvic acid interactions: mechanisms and applications. *J. Am. Water Works. Assoc.* 80: 176-186.
- Hutchinson, N. J. et J. B. Sprague. 1986. Toxicity of trace metal mixtures to American flagfish (*Jordanella floridae*) in soft acidic water and implications for cultural acidification. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 647-655.
- Hutchinson, N. J. et J. B. Sprague. 1987. Reduced lethality of Al, Zn and Cu mixtures to American flagfish by complexation with humic substances in acidified soft waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 6: 755-765.

- Hutchinson, N. J., K. E. Holtze, J. R. Munro et T. W. Pawson. 1987. Lethal responses of salmonid early life stages to H^+ and Al in dilute waters. *Annls. Soc. R. Zool. Belg.* 117 (Suppl 1): 201-217.
- Jago, C. H., T. A. Haines et D. R. Buckler. 1987. Abnormal gill development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry exposed to aluminium at low pH. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.* 117 (Suppl. 1): 375-386
- Karlsson-Norrgren, L., W. Dickson, O. Ljungberg, et P. Runn. 1986. Acid water and Al exposure: experimentally induced gill lesions in brown trout, *Salmo trutta*, *Salmo trutta* L. *J. Fish Dis.* 9: 11-25.
- Kaur, K. et K. Bajwa. 1987. Effect of zinc and cadmium on early life stages of common carp, *Cyprinus carpio* Linneaus. *Ann. Biol.* 3: 28-33.
- Kervan, G. L., D. G. Edwards, C. J. Asher, P. S. Hallman et S. Kohot. 1989. Aluminium determination in soil solution. I. Evaluation of existing colorimetric and separation methods for the determination of inorganic monomeric aluminium in the presence of organic acid ligands. *Aust. J. Soil Res.* 25: 79-90.
- Kinraide, T. M. 1994. Use of a Gouy-Chapman-Stern model for membrane-surface electrical potential to interpret some features of mineral rhizotoxicity. *Plant Physiol.* 106: 1583-1592.
- Kinraide T. M., P. R. Ryan et L.V. Kochian. 1992. Interactive effects of Al^{3+} , H^+ , and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. *Plant Physiol.* 99: 1461-1468.
- Kramer, J. R. et J. Hummel. 1985, Acute effect of aluminium to shiner minnows. Affiche, Int. Symp. Acidic Precipitation. le 15-20 septembre, Muskoka, Ontario.
- Lacroix, G. L. 1989a. Ecological and physiological responses of Atlantic salmon in acidic organic rivers of Nova Scotia, Canada. *Water Air Soil Pollut.* 46: 375-386.
- Lacroix, G. L. 1989b. Production of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) in two acidic rivers of Nova Scotia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 2003-2018.
- Lacroix, G. L. 1992. Mitigation of low stream pH and its effects on salmonids. *Environ. Pollut.* 78: 157-164.
- Lacroix, G. L., D. J. Hood, C. S. Belfry et G. T. Rand. 1990. Plasma electrolytes, gill aluminum content, and gill morphology of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) indigenous to acidic streams of Nova-Scotia. *Can. J. Zool.* 68: 1270-1280.

- Lacroix, G. L. et K. T. Kan. 1986. Speciation of aluminum in acidic rivers of Nova Scotia supporting Atlantic salmon: a methodological evaluation. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1501. 12 p.
- Lacroix, G. L., R. H. Peterson, C. S. Belfry et D. J. Martin-Robichaud. 1993. Aluminum dynamics on gills of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry in the presence of citrate and effects on integrity of gill structures. *Aquat. Toxicol.* 27: 373-402.
- Lacroix, G. L. et D. R. Townsend. 1987. Responses of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) to episodic increases in acidity of Nova Scotia rivers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 1475-1484.
- Laegreid, M., J. Alstad, D. Klaveness et H. M. Seip. 1983. Seasonal variation of cadmium toxicity toward the alga *Selenastrum capricornutum* Printz in two lakes with different humus content. *Environ. Sci. Technol.* 17: 357-361.
- LaZerte B. D. 1984. Forms of aqueous aluminum in acidified catchments of central Ontario: a methodological analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41:766-776.
- LaZerte, B. D. et P. J. Dillon. 1984. The relative importance of anthropogenic versus natural sources of acid in lakes and streams of central Ontario. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41: 1664-1677.
- Lewis, M. 1978. Acute toxicity of copper, zinc and manganese in single and mixed salt solutions to juvenile longfin dace, *Agosia chrysogaster*. *J. Fish Biol.* 13: 695-700.
- Lewis, T. E., D. E. Dobb, J. M. Henshaw et S. J. Simon. 1988. Apparent monomeric aluminum concentrations in the presence of humic and fulvic acid and other ligands: an interlaboratory comparison study. *Intern. J. Anal. Chem.* 34: 69-87.
- Lin H et D. J. Randall. 1990. The effect of varying water pH on the acidification of expired water in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 149: 149-160.
- Lovegrove, S. M. et B. Eddy. 1982. Uptake and accumulation of zinc in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Environ. Biol. Fish.* 7: 285-289.
- Lydersen, E., A. B. S. Poleo, I. P. Muniz, B. Salbu et H. E. Bjornstad. 1990. The effects of naturally occurring high and low molecular weight inorganic and organic species on the yolk-sack larvae of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) exposed to acidic aluminium-rich lake water. *Aquat. Toxicol.* 18: 219-229.
- Mallet, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 630-648
- Mason, A. Z., K. D. Jenkins et P. A. Sullivan. 1988. Mechanisms of trace metal accumulation in the polychaete *Neanthes arenaceodentata*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 68: 61-80.

- Matthiessen, P. et A. E. Brafield. 1977. Uptake and loss of dissolved Zn by the stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. J. Fish Biol. 10: 399-410.
- McAvoy, D. C. 1989. Episodic response of aluminum chemistry in an acid-sensitive Massachusetts catchment. Water Resour. Res. 25: 233-240.
- McAvoy, D. C., R. C. Santore, J. D. Shosa et C. T. Driscoll. 1992. Comparison between pyrocatechol violet and 8- hydroxyquinoline procedures for determining aluminum fractions. Soil Sci. Soc. Am. J. 56: 449- 455.
- McCarthy, J. F. 1989. Bioavailability and toxicity of metals and hydrophobic compounds. pp. 263-277. dans: J. H. Suffet et P. MacCarthy, ed., Aquatic Humic Substances Influence on Fate and Treatment of Pollutants. Advances in Chemistry Series 219. American Chemical Society, Washington, DC.
- McDonald, D.G. 1983. The effects of H⁺ upon the gills of freshwater fish. Can. J. Zool. 61: 691-703.
- McDonald, D. G., J. P. Reader et T. R. K. Dalziel. 1989. The combined effects of pH and trace metals on fish ionoregulation. pp. 221-242. dans: R. Morris, E. W. Taylor, D. J. A. Brown et J. A. Brown ed. Acid Toxicity and Aquatic Animals. Society for Experimental Biology Seminar Series No. 34. Cambridge University Press, Cambridge.
- Meador, J. P. 1991. The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. Aquat. Toxicol. 19: 13-31.
- Memmert, U. 1987. Bioaccumulation of zinc in two freshwater organisms (*Daphnia magna*, Crustacea and *Bracydanio rerio*, Pisces). Water Res. 21: 99-106.
- Morel, F. M. M. et J. G. Hering. 1993. Principles of Aquatic Chemistry. 2nd Edition. John Wiley & Sons, NY. 308 p.
- Muniz, I. P. et H. Leivestad, 1980. Toxic effects of aluminum on the brown trout, *Salmo trutta*. pp. 320-321. dans: D. Drablos et A. Tollen, ed., Proc. Int. Conf. Ecol. Impact Acid Precip. SNSF Project. Oslo, Norway.
- Nelson, W. O. et P. G. C. Campbell, 1991. Review of the effects of acidification on the geochemistry of Al, Cd, Pb and Hg in freshwater environments. Environ. Pollut. 71: 91-130.
- Neville, C. M. 1985. Physiological responses of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to acid and aluminum-prediction of field responses from laboratory data. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42: 2004-2019.

- Neville, C. M. et P. G. C. Campbell. 1988. Possible mechanisms of aluminum toxicity in a dilute, acidic environment to fingerlings and older life stages of salmonids. *Water Air Soil Pollut.* 42: 311-327.
- Newman, M. C. et S. V. Mitz. 1988. Size dependence of zinc elimination and uptake from water by mosquitofish *Gambusia affinis* (Baird & Girard). *Aquat. Toxicol.* 12: 17-32.
- NIST. 1993. Critical Stability Constants of Metal Complexes Database. NIST Standard Reference Database 46, version 1.0. U.S. Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Data Program. Gaithersburg, MD.
- Orr, P. L., R. W. Bradley, J. B. Sprague et N. J. Hutchinson. 1986. Acclimation-induced changes in toxicity of aluminum to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 243-246.
- Pagenkopf, G. K. 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness. *Environ. Sci. Technol.* 17: 342-347.
- Papelis, C., K. F. Hayes et J. O. Leckie. 1988. HYDRAQL: a program for the computation of chemical equilibrium composition of aqueous batch systems including surface-complexation modeling of ion adsorption at the oxide/solution interface. Dept. of Civil Engineering Technical Report No. 306. Stanford University, Stanford CA. 130 p.
- Parent, L. et P. G. C. Campbell, 1994. Aluminum bioavailability to the green alga *Chlorella pyrenoidosa* in acidified synthetic soft water. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 587-598.
- Parent L., M. R. Twiss et P. G. C. Campbell. 1996. Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga *Chlorella*: A test of the Free-Ion Model of trace metal toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1713-1720.
- Parkhurst, B. R., H. L. Bergman, J. Fernandez, D. D. Gulley, J. R. Hockett et D. A. Sanchez. 1990. Inorganic monomeric aluminum and pH as predictors of acidic water toxicity to brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 1631-1640.
- Parrott, J. L. et J. B. Sprague. 1993. Patterns in toxicity of sublethal mixtures of metals and organic chemicals determined by Microtox[®] and by DNA, RNA, and protein content of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 2245-2253.
- Part, P. et R. A. C. Lock. 1983. Diffusion of calcium, cadmium and mercury in a mucous solution from rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 76C: 259-263.
- Part, P. et G. Wikmark. 1984. The influence of some complexing agents (EDTA and citrate) on the uptake of Cd in perfused rainbow trout gills. *Aquat. Toxicol.* 5: 277-289.
- Petersen, R. 1982. Influence of copper and zinc on the growth of a freshwater alga, *Scenedesmus quadricauda*: the significance of chemical speciation. *Environ. Sci. Technol.* 16: 443-447.

- Petersen, R. C. et U. Persson. 1987. Comparison of the biological effects of humus materials under acidified conditions. *Sci. Total. Environ.* 62: 387-398.
- Peterson, R. H., R. A. Bourbonnière, G. L. Lacroix, D. J. Martin-Robichaud, P. Takats et G. Brun. 1989. Responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*) alevins to dissolved organic carbon and dissolved aluminum at low pH. *Water Air Soil Pollut.* 46: 399-413.
- Playle, R. C., G. G. Goss et C. M. Wood. 1989. Physiological disturbances in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during acid and aluminum exposures in soft water of two calcium concentrations. *Can. J. Zool.* 67: 314-324.
- Playle, R. C. et C. M. Wood. 1989a. Water chemistry changes in the gill micro-environment of rainbow trout: experimental observations and theory. *J. Comp. Physiol.* B159: 527-537.
- Playle, R. C. et C. M. Wood. 1989b. Water pH and aluminum chemistry in the gill micro-environment of rainbow trout during acid and aluminum exposures. *J. Comp. Physiol.* B159: 539-550.
- Playle, R. C. et C. M. Wood. 1991. Mechanisms of aluminium extraction and accumulation at the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in acidic soft water. *J. Fish Biol.* 38: 791-805.
- Potts, W. T. W. et P. G. McWilliams. 1989. The effects of hydrogen and aluminium ions on fish gills. pp. 201-220 dans: R. Morris, E. W. Taylor, D. J. A. Brown et J. A. Brown, ed., *Acid Toxicity and Aquatic Animals*. Society for Experimental Biology Seminar Series, vol. 34. Cambridge University Press, Cambridge.
- Randall, D. J. et P.A. Wright. 1989. The interaction between carbon dioxide and ammonia excretion and water pH in fish. *Can. J. Zool.* 67: 2936-2942
- Reader, J. P. 1986. thèse de doctorat, citée dans: D. G. McDonald, J. P. Reader et T. R. K. Dalziel. 1989. The combined effects of pH and trace metals on fish ionoregulation. pp. 221-242. dans: R. Morris, E. W. Taylor, D. J. A. Brown et J. A. Brown, ed., *Acid Toxicity and Aquatic Animals*. Society for Experimental Biology Seminar Series No. 34. Cambridge University Press, Cambridge.
- Reid, S. D. et D. G. McDonald, 1991. Metal binding activity of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1061-1068.
- Roch, M. J. et J. A. McCarter. 1984. Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Exposed to a mixture of zinc, copper and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.* 77(C): 71-75.

- Rogeberg, E. J. S. et A. Henriksen. 1985. An automatic method for fractionation and determination of Al species in fresh-waters. *Vatten* 41: 48-53.
- Ross, H. B. 1987. Trace metals in precipitation in Sweden. *Water Air Soil Pollut.* 36: 349-363.
- Rosseland, B. O. et O. K. Skogheim. 1984. A comparative study on salmonid fish species in acid aluminium-rich water. II. Physiological stress and mortality of one- and two-year old fish. *Rep. Inst. Freshwat. Res. Drottningholm* 61: 69-77.
- Rosseland, B. O., I. A. Blakar, A. Bulgar, F. Krogland, A. Kvellstad, E. Lydersen, D. H. Oughton, B. Salbu, M. Staurnes et R. Vogt. 1992. The mixing zone between limed and acidic river waters: complex aluminium chemistry and extreme toxicity for salmonids. *Environ. Pollut.* 78: 3-8.
- Santschi, P. H., V. P. Nyffeler, R. F. Anderson, S. L. Schiff, P. O'Hara et R. H. Hesslein. 1986. Response of radioactive trace metals to acid-base titrations in controlled ecosystems: evaluation of transport parameters for applications to whole-lake radio-tracer experiments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 60-77.
- Sayer, M. D., J. P. Reader et R. Morris. 1991. Embryonic and larval development of brown trout, *Salmo trutta* L - exposure to trace metal mixtures in soft water. *J. Fish. Biol.* 38: 773-787.
- Schecher, W. D. et C. T. Driscoll, 1987. An evaluation of uncertainty associated with aluminum equilibrium calculations. *Water Resour. Res.* 23: 525-534.
- Schecher, W. D. et D. C. McAvoy. 1991. MINEQL⁺ a chemical equilibrium program for personal computers, version 2.22. Environmental Research Software, Hallowell, ME et Proctor & Gamble Company, Cincinnati, OH.
- Schindler, D. W., R. H. Hesslein, R. Wageman et W. S. Broecker. 1980. Effects of acidification on mobilization of heavy metals and radionuclides from the sediments of a freshwater lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 373-377.
- Schofield, C. L. et J. R. Trojnar. 1980. Aluminum toxicity to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in acidified waters. pp. 341-366. dans: Y. Toribara, M. W. Miller et P. E. Morrow, ed., *Proc. Conf. Polluted Rain*. Plenum Press, New York, NY.
- Simonin, H. A., W. A. Kretser, D. W. Bath, M. Olson et J. Gallagher. 1993. *In situ* bioassays of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and blacknose dace (*Rhinichthys atratulus*) in Adirondack streams affected by episodic acidification. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 902-912.
- Skogheim, O. K. et B. O. Rosseland. 1984. A comparative study on salmonid fish species in acid aluminium-rich water. I. Mortality of eggs and alevins. *Rep. Inst. Freshwater Res. Drottningholm* 61: 177-185.

Skogheim, O. K., B. O. Rosseland et I. H. Sevaldrud. 1984. Death of spawners of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in River Ognå, SW Norway, caused by acidified aluminium-rich water. Rep. Inst. Freshwater Res. Drottningholm 61: 195-202.

Skogheim, O. K., B. O. Rosseland, E. Hoell et F. Krogland. 1988. Effects of humic acid on acute aluminium toxicity to smolts of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in acidic soft water. dans: B. O. Rosseland et O. K. Skogheim, Acidic Water and Neutralization: Effects on Fish Physiology and Fish Populations, thèse de doctorat conjointe. Directorate for Nature and Management. Trondheim, Norway.

Spehar, R. L., E. N. Leonard et D. L. DeFoe. 1978. Chronic effects of cadmium and zinc mixtures on flagfish (*Jordanella floridae*). Trans. Am. Fish. Soc. 107: 354-360.

Spehar, R. L. et J. T. Fiandt. 1986. Acute and chronic effects of water quality criteria-based metal mixtures on three aquatic species. Environ. Toxicol. Chem. 5: 917-931.

Sposito, G. 1981. Trace metals in contaminated waters. Environ. Sci. Technol. 15: 396-403.

Sprague, J. B. 1964. Lethal concentration of copper and zinc for young Atlantic salmon. J. Fish. Res. Bd. Can. 21: 17-26.

Sprague, J. B. 1973. The ABCs of pollutant bioassay using fish. pp. 6-30. dans: Biological Methods for the Assessment of Water Quality. ASTM STP 528. Am. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia, PA.

Sprague, J. B. et A. Fogels. 1977. Watch the Y in bioassay. pp. 107-118. dans: Proc. 3rd Aquat. Tox. Workshop. Environ. Prot. Serv. Tech. Rep. No. EDS-5-AR-77-1.

Sprague, J. B. et B. A. Ramsay. 1965. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon. J. Fish. Res. Bd. Can. 22: 425-432.

Spry, D. J. et C. M. Wood. 1988. Zinc influx across the isolated, perfused head preparation of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in hard and soft water. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 2206-2215.

Spry, D. J. et C. M. Wood. 1989. A kinetic method for the measurement of zinc influx in vivo in the rainbow trout and the effects of waterborne calcium on flux rates. J. exp. Biol. 142: 425-446.

Spry, D. J., C. M. Wood et P. V. Hodson. 1981. The effects of environmental acid on freshwater fish, with particular reference to the softwater lakes of Ontario and the modifying effects of heavy metals. A literature review. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 999. 148 p.

Statistica for Windows. 1993. Statsoft, 2325 E 13th St., Tulsa, OK.

Steinnes, E. 1990. Lead, cadmium and other metals in Scandinavian surface waters, with emphasis on acidification and atmospheric deposition. Environ. Toxicol. Chem. 9: 825-831.

- Thompson, K. W., A. C. Hendricks et J. Cairns. 1980. Acute toxicity of zinc and copper singly and in combination to the bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 122-129.
- Troutman, D. E. et N. E. Peters. 1982. Deposition and transport of heavy metals in three lake basins affected by acid precipitation in the Adirondack Mountains, New York. pp. 33-61. dans: L. H. Keith, ed., *Energy and Environmental Chemistry*. Vol. 2. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI.
- Turnpenny, A. W. H., K. Sadler, R. J. Aston, A. G. P. Milner et S. Lynam, 1987. The fish populations of some streams in Wales and northern England in relation to acidity and associated factors. *J. Fish. Biol.* 31: 415-434.
- van Coillie, R., D. Brouard, M. Lachance et Y. Vigneault. 1984. Possibilités écotoxicologiques des précipitations acides pour le saumon dans 4 rivières à la Côte Nord du fleuve Saint-Laurent. *Annls. Limnol.* 20: 215-227.
- van Coillie, R., C. Thellen, P. G. C. Campbell et Y. Vigneault. 1983. Effets toxiques de l'aluminium chez les salmonidés en relation avec des conditions physico-chimiques acides. *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* no 1237. 88 p.
- Voyer, R. A., J. A. Cardin, J. F. Heltshe et G. L. Hoffman. 1982. Viability of embryos of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* exposed to mixtures of cadmium and mercury in combination with selected fixed salinities. *Aquat. Toxicol.* 2: 223-235.
- Watt, W. D. 1987. A summary of the impact of acid rain on Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Canada. *Water Air Soil Pollut.* 35: 27-35.
- Watt, W. D., C. D. Scott et W. J. White. 1983. Evidence of acidification of some Nova Scotia rivers and its impact on Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 462-473.
- Weatherley, N. S., A. P. Rogers, X. Goenaga et S. J. Ormerod. 1990. The survival of early life stages of brown trout (*Salmo trutta* L.) in relation to aluminium speciation in upland Welsh streams. *Aquat. Toxicol.* 17: 213-230.
- Weatherley, N. S., G. P. Rutt, S. P. Thomas et S. J. Ormerod. 1991. Liming acid streams - aluminium toxicity to fish in mixing zones. *Water Air Soil Pollut.* 55: 345-353.
- Welsh, P. G., J. F. Skidmore, D. J. Spry, D. G. Dixon, P. V. Hodson, N. J. Hutchinson et B. E. Hickie. 1993. Effect of pH and dissolved organic carbon on the toxicity of copper to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*) in natural lake waters of low alkalinity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 1356-1362.
- White, J. R. et C. T. Driscoll. 1987. Zinc cycling in an acidic Adirondack lake. *Environ. Sci. Technol.* 21: 211-216

- Wicklund, A., P. Runn et L. Norrgren. 1988. Cd and Zn interactions in fish: effects of Zn on the uptake organ distribution, and elimination of ¹⁰⁹Cd in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 17: 345-354.
- Wicklund Glynn, A., C. Haux, et A. Hogstrand, 1992. Chronic toxicity and metabolism of Cd and Zn in juvenile minnows (*Phoxinus phoxinus*) exposed to a Cd and Zn mixture. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 2070-2079.
- Wilkinson, K. J., P. M. Bertsch, C. H. Jagoe et P. G. C. Campbell. 1993. Surface complexation of aluminum on isolated fish gill cells. Environ. Sci. Technol. 27: 1132-1136.
- Wilkinson, K. J., P. G. C. Campbell et P. Couture. 1990. Effect of fluoride complexation on aluminum toxicity towards juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 1446-1452.
- Wilkinson, K. J. et P. G. C. Campbell, 1993. Aluminum bioconcentration at the gill surface of juvenile Atlantic salmon in acidic media. Environ. Toxicol. Chem. 12: 2083-2095.
- Wilson, R. W. et C. M. Wood. 1992. Swimming performance, whole body ions, and gill Al accumulation during acclimation to sublethal aluminium in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiol. Biochem. 10: 149-159.
- Witters, H. E., S. Van Puymbroeck, J. H. D. Vangenechten et O. L. J. Vanderborcht. 1990. The effect of humic substances on the toxicity of aluminium to adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquat. Toxicol. 37: 43-53.
- Wood, C. M. 1989. The physiological problems of fish in acid waters. pp. 125-152. dans: Morris, R.; E.W. Taylor, D. J. A. Brown et J. A. Brown, ed., Acid Toxicity and Aquatic Animals. (Society for Experimental Biology Seminar Series; v. 34). Cambridge University Press. Cambridge.
- Wood, C. M. et D. G. McDonald. 1987. The physiology of acid/aluminum stress in trout. Annls. Soc. R. Zool. Belg. 117 (Suppl 1): 399-410.
- Wood, C.M., D. G. McDonald, C. E. Booth, B. P. Simons, C. G. Ingersoll et H. L. Bergman. 1988. Physiological evidence of acclimation to acid/aluminum stress in adult brook trout (*Salvelinus fontinalis*). 1. Blood composition and net sodium fluxes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 1587-1596.
- Yan, N. D. et G. E. Miller. 1984. Effects of deposition of acids and metals on chemistry and biology of lakes near Sudbury, Ontario. pp. 243-282. dans: J. Nriagu, ed., Environmental Impact of Smelters. Advances in Environment Series. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Youson, J. H. et C. M. Neville. 1987. Deposition of aluminum on the gill epithelium of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) subjected to sublethal concentrations of the metal. Can. J. Zool. 65: 647-656.

Zitko, P., W. V. Carson et W. G. Carson. 1973. Prediction of incipient lethal levels of copper to juvenile Atlantic salmon in the presence of humic acid by cupric electrode. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 10: 265-271.

Tableau 1 A. Sommaire d'études de laboratoire sélectionnées sur la toxicité de mélanges de métaux pour les poissons.

Espèce	Métaux	pH	Toxicité	Référence
<i>Salmo salar</i>	Cu, Zn	7.9 - 9.3	plus qu'additive (temps de survie)	Sprague, 1964
<i>S. salar</i>	Cu, Zn	7.0 - 7.4	additive	Sprague et Ramsay, 1965
<i>Pimephales promelas</i>	Cu, Cd, Zn	7.4 - 7.9	moins qu'additive	Eaton, 1973;
<i>Agosia chrysogaster</i>	Cu, Zn; Cu, Mn	7.8	Cu-Zn: plus qu'additive Cu-Mn: moins qu'additive	Lewis, 1978
<i>Jordanella floridae</i>	Cd, Zn	7.1 - 7.9	moins qu'additive	Spehar <i>et al.</i> , 1978
<i>Lepomis macrochirus</i>	Zn, Cu	6.8 - 7.5	additive	Thompson <i>et al.</i> , 1980.
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Zn, Cd, Cu	7.1 - 7.2	additive ou légèrement moins qu'additive	Finlayson et Verrue, 1982
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Cd, Ag	neutre, eau marine	moins qu'additive	Voyer <i>et al.</i> , 1982
<i>O. mykiss</i>	Zn, Cu, Cd	neutre ?	additive	Roch et McCarter, 1984
<i>J. floridae</i>	Al, Mn, Cu, Fe, Ni, Zn, Pb	5.8	≈ additive	Hutchinson et Sprague, 1986

Tableau 1 B. Sommaire d'études de laboratoire sélectionnées sur la toxicité de mélanges de métaux pour les poissons.

Espèce	Métaux	pH	Toxicité	Référence
<i>P. promelas</i>	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb	7.4 - 8.2	additive, plus qu'additive,	Spehar et Fiandt, 1986
<i>Brachydanio rerio</i>	Cd, Zn	neutre ?	prise-en-charge de Cd indépendante de [Zn].	Wicklund <i>et al.</i> , 1988
<i>S. trutta</i>	Al, Cu, Pb, Zn, Mn, Fe, Cd	5.6	plus qu'additive, moins qu'additive	Sayer <i>et al.</i> , 1991
<i>O. tshawytscha</i>	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ag, V, Zn, Se	7.6 - 8.1	additive	Hamilton et Buhl, 1990a
<i>O. tshawytscha</i>	B, Mo, Se	7.6 - 7.8	additive	Hamilton et Buhl, 1990b
<i>O. kisutch</i>				
<i>Cyprinus carpio</i>	Zn, Cd	neutre ?	plus qu'additive, additive	Kaur et Bajwa, 1987
<i>Phoxinus phoxinus</i>	Zn, Cd	neutre ?	additive ou légèrement moins qu'additive	Wickland Glynn <i>et al.</i> , 1992
<i>P. promelas</i>	Cu, Zn	7.8 - 8.2	additive, moins qu'additive ou indépendante	Parrott et Sprague, 1993
<i>P. promelas</i>	Al, Cu, Zn	4.9	additive, moins qu'additive	Hickie <i>et al.</i> , 1993
<i>Oreochromis niloticus</i>	Cd, Zn, Hg	7.3	plus qu'additive	Cuvin-Aralar et Aralar, 1993

Tableau 2. La toxicité des métaux en présence de matière organique naturelle: exceptions possibles au modèle de l'ion libre (adapté de Campbell, 1995).

Espèce	Métal, source de MOD	Réponse	Toxicité	Référence
<i>Simocephalus serrulatus</i>	Cu, eau naturelle (étang)	prise-en-charge Cu	toxicité augmentée; plus d'accumulation que prédite par la [Cu ²⁺]	Geisy <i>et al.</i> , 1983
<i>Daphnia magna</i>	Cu, eau de lac	immobilisation	toxicité augmentée; plus de toxicité que prédite par la [Cu ²⁺]	Borgmann et Charlton, 1984
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Cd, eau de lac	prise-en-charge ¹⁴ CO ₂	protection augmentée	Laegreid <i>et al.</i> , 1983
<i>S. salar</i>	Al, acide humique, pH acide	mortalité, temps létaux	protection augmentée en solutions AH (Al _i)	Skogheim <i>et al.</i> , 1988
<i>S. salar</i>	Al, eau de rivière, MOD séparée en fractions hydrophile, hydrophobe et neutre, pH acide	mortalité, accumulation branchiale	mortalité, accumulation α fraction MOD	Peterson <i>et al.</i> , 1989
<i>Parataya australiensis</i>	Cu, eau de tourbière	mortalité	protection augmentée; moins de mortalité que prédite par la [Cu ²⁺]	Daly <i>et al.</i> , 1990b
<i>Salvelinus fontinalis</i>	Al, eau naturelle, pH acides	mortalité	généralement α Al _i , mais augmentée au pH 4.0	Parkhurst <i>et al.</i> , 1990
<i>Rana pipiens</i> <i>Bufo americanus</i>	Al, eau d'étang, pH acides	mortalité	plus de protection, moins de protection (toxicité DOM)	Freda <i>et al.</i> , 1990

Tableau 3. Description des expériences.			
Étude	Numéro d'expérience	pH	description
toxicité Al	1, 2	4.5	<ul style="list-style-type: none"> - expositions conjointes Al/Al + Zn, avec 5 - 6 [Al] à chaque pH - deux répétitions par pH - contrôles: pH seulement, pH + Zn (sans Al)
toxicité Al-Zn	3, 4	4.8	
toxicité Zn	5, 6	5.2	
		4.5	<ul style="list-style-type: none"> - expositions faites en même temps que bioessais avec Al, Al+Zn - minimum 4 [Zn] à chaque pH
		5.2	
accumulation de Zn sur les branchies en présence de l'Al	7, 8, 9	4.8	<ul style="list-style-type: none"> - expositions conjointes Al+ Zn, traceur ⁶⁵Zn - 5 - 7 [Al]
toxicité Al - solutions EDR	10	5.0	<ul style="list-style-type: none"> - expositions conjointes Al-EDR, Al-AF - Al-EDR: 5 - 6 [Al]; Al-AF: 4 [Al]
toxicité Al - solutions AF	11	5.0	
pré-expositions solutions AF, EDR, sans Al	12	5.0	<ul style="list-style-type: none"> - expositions conjointes solutions EDR, AF - expositions conjointes des poissons pré-exposés EDR, AF - 5 - 6 [Al]
toxicité Al, solutions EDR, après les pré-expositions		5.0	

Tableau 4. Mesures moyennes du pH et des concentrations de Zn dans les bassins expérimentaux (ÉT; n).

Expérience	pH	[Zn], μM
1.	4.47 (0.05; 132)	1.2 (0.3; 30)
2.	4.42 (0.05; 156)	1.7 (0.4; 42)
3.	4.86 (0.08; 84)	1.7 (0.3; 28)
4.	4.83 (0.08; 132)	1.0 (0.2; 30)
5.	5.26 (0.10; 168)	1.0 (0.3; 30)
6.	5.24 (0.05; 176)	0.8 (0.3; 24)

Tableau 5. Conditions expérimentales moyennes (pH et carbone organique total) dans les bassins d'exposition à l'Al (solutions EDR et AF).

Expérience	Solution	pH (ÉT, n)	COT (ÉT, n)
10	EDR	4.96 (0.16, 54)	2.0 (0.6, 16)
	AF	5.03 (0.13, 36)	
11	EDR	4.98 (0.06, 84)	2.4 (1.0, 16)
	AF	4.97 (0.18, 56)	

Tableau 6. Conditions expérimentales dans les expositions au ^{65}Zn et à des concentrations en Al.				
Expérience	[Al], μM (gamme)	pH moyen (n, ÉT)	[Zn], μM moyenne (n, ÉT)	^{65}Zn ($\mu\text{Ci}\cdot\text{l}^{-1}$) moyen (n, ÉT)
7	0.7 - 7.3	4.9 (42, 0.1)	1.6 (14, 0.1)	0.9 (21, 0.1)
8	0.8 - 5.4	4.8 (60, 0.2)	0.9 (4, 0.1)	10.8 (4, 0.2)
9	0.7 - 4.7	4.8 (72, 0.2)	1.0 (4, 0.1)	9.1 (4, 0.2)

Tableau 7. Conditions expérimentales moyennes (pH, oxygène dissous, OD, et carbone organique total, COT; (ÉT, n)) dans les bassins de pré-exposition (solutions EDR et AF).				
Solution pré-exposition	pH	OD (mg O ₂ ·L ⁻¹)	COT (mg C·L ⁻¹)	CL-50 (96 h) ¹
EDR	4.99 (0.30, 18)	10.8 (0.2, 7)	-	4.6 (3.7 - 5.8)
AF	4.99 (0.24, 17)	10.4 (0.9, 7)	4.2 (0.25), 3	4.6 (3.8 - 5.5)

¹ Les valeurs CL-50 en $\mu\text{M Al}_3$ (limites de confiance à 95%) ont été déterminées après la période de pré-exposition, avec les solutions Al-EDR à pH 5.0. Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs CL-50 ($p > 0.05$).

Tableau 8. Valeurs CL-50 (limites de confiance à 95%) en μM Al calculées pour les bioessais avec l'Al ou un mélange Al et Zn.

Expérience	pH, h	Al	mélange Al + Zn	UT-Zn dans le mélange ¹
1	4.47 - 120 h	9.6 (8.6 - 10.8)	8.3 (7.3 - 9.5)	0.10
2	4.42 - 140 h	10.5 (9.9 - 11.3)	9.0 (8.1 - 9.9) ^a	0.14
3	4.86 - 96 h	2.8 (2.5 - 3.4)	3.1 (2.6 - 3.7)	-
4	4.83 - 120 h	4.5 (4.0 - 5.1) ^b	3.8 (3.0 - 4.8)	-
5	5.26 - 120 h	2.0 (1.9 - 2.1)	1.6 (1.5 - 1.7) ^a	0.20
6	5.24 - 120 h	1.9 (1.8 - 2.0)	1.7 (1.5 - 1.9)	0.18

^a CL-50 du mélange plus basse que celle de l'exposition à l'Al seulement ($p < 0.05$).

^b CL-50 plus élevée que celle de l'expérience 3.

¹ Les unités toxiques (UT) de Zn pour les bioessais au pH 4.5 et pH 5.2 ont été calculées d'après les teneurs en Zn mesurées dans les bassins d'essais (tableau 4) et les valeurs Zn CL-50.

Expérience	pH	ion libre (%) ¹	Al seulement	Al + Zn
1	4.47	69	6.6	5.7
2	4.42	65	6.8	5.9
3	4.86	33	0.9	1.0
4	4.83	35	1.6	1.3
5	5.24	8	0.17	0.14
6	5.26	8	0.15	0.13

¹ La proportion de l'ion libre présent à chaque pH a été calculée par modélisation des équilibres chimiques.

Expérience	pH	L-cellule _{libre} , proportion ¹	CL-50 [Al ³⁺], µM	[L-cellule] _{libre} · [Al ³⁺] ²
1	4.47	0.48	6.6	3.02
2	4.42	0.45	6.8	3.30
3	4.86	0.70	0.9	0.64
4	4.83	0.68	1.6	1.08
5	5.24	0.85	0.17	0.13
6	5.26	0.85	0.15	0.14

¹ La proportion de sites libres ionisés sur les branchies a été calculée avec $pK_a = 4.5$.

² Selon le MIL, le produit de la valeur CL-50 (en concentration de l'ion libre; tableau 11) et de la proportion de sites libres devrait être constant à différents pH.

Tableau 11. Dépendance de la toxicité du Zn vis-à-vis du pH.			
pH	L-cellule _{libre} , proportion ¹	CL-50 [Zn ²⁺], µM	[L-cellule] _{libre} · [Al ³⁺] ²
4.47	0.48	11.9	5.71
4.42	0.45	11.9	5.36
5.24	0.85	5.0	4.25
5.26	0.85	5.1	4.34

¹ La proportion de sites libres ionisés sur la branchie a été calculée avec $pK_a = 4.5$.

² Selon le MIL, le produit de la valeur CL-50 (en concentration de l'ion libre) et de la proportion de sites libres devrait être constant à différents pH.

Tableau 12. Valeurs log-vraisemblance et paramètres estimés (valeurs β) avec les termes des différentes covariables d'après la modélisation des temps de survie pour les bioessais au pH 4.5, selon le modèle de hasard proportionnel de Cox.			
pH 4.5 termes	Valeurs log-vraisemblance	Paramètres estimés (ES)	P > Chi-carré ¹
nulle	-304.723		
[Al _i]	-284.740	0.274 (0.044)	< 0.0000001
[Al ³⁺]	-281.711	0.454 (0.069)	= 0.014
[Al _i] [Zn]	-279.108	0.296 (0.047) 0.517 (0.154)	= 0.022
[Al _i] code Zn	-276.719	0.310 (0.047) 1.009 (0.258)	= 0.029
Unités toxiques	-275.129	3.603 (0.497)	n.s.

¹ Les modèles subséquents ont été comparés avec le modèle précédant par Chi-carré (n.s. = pas de différence significative; $p > 0.05$).

Tableau 13. Valeurs log-vraisemblance et paramètres estimés (valeurs β) avec les termes des différentes covariables d'après la modélisation des temps de survie pour les bioessais au pH 4.8, selon le modèle de hasard proportionnel de Cox.			
pH 4.8, termes	Valeurs log-vraisemblance	Paramètres estimés (ES)	P > Chi-square ¹
nulle	-336.022		
[Al ³⁺]	-321.650	2.825 (0.561)	< 0.00001
[Al _i]	-319.008	1.037 (0.190)	= 0.022
[Al _i] Zn code	-305.091	1.320 (0.206) 1.306 (0.206)	< 0.0001
[Al _i] [Zn]	-303.314	1.274 (0.194) 0.960 (0.168)	n.s.

¹ Les modèles subséquents ont été comparés avec le modèle précédant par Chi-carré (n.s. = pas de différence significative; $p > 0.05$).

Tableau 14. Valeurs log-vraisemblance et paramètres estimés (valeurs β) avec les termes des différentes covariables d'après la modélisation des temps de survie pour les bioessais au pH 5.2, selon le modèle de hasard proportionnel de Cox.

pH 5.2, termes	Valeurs log-vraisemblance	Paramètres estimés (ES)	P > Chi-square ¹
nulle	-286.393		
[Al ³⁺]	-266.843	53.836 (9.359)	< 0.0000001
[Al _i]	-266.366	4.115 (0.726)	n.s.
Unités toxiques	-257.520	7.841 (1.100)	< 0.001
[Al _i] [Zn]	-257.418	4.376 (0.729) 1.127 (0.272)	n.s.
[Al _i] Zn code	-256.964	4.546 (0.734) 1.120 (0.265)	n.s.

¹ Les modèles subséquents ont été comparés avec le modèle précédent par Chi-carré (n.s. = pas de différence significative; $p > 0.05$).

Tableau 15. Accumulation de Zn (^{65}Zn : comptes moyens·min. $^{-1}$ · g $^{-1}$ tissu branchial (ÉT); Zn total: ·µg g $^{-1}$ tissu branchial (ÉT)) sur les branchies de saumon après une exposition à 1.6 µM Zn et à des concentrations en Al dans l'expérience 7

[Al], µM	^{65}Zn , cpm·g $^{-1}$ ²	Zn, µg·g $^{-1}$
5.4 (0.5), 9.2 ¹	1135 (821) a	0.6 (0.5)
7.3 (0.3)	2270 (870) b	1.3 (0.5)
5.8 (0.2)	4710 (1500) c	2.7 (0.8)
5.1 (0.3)	5180 (2290)c	2.9 (1.3)
3.2 (0.2)	5630 (3130) c	3.2 (1.8)
1.9 (0.3)	6110 (2830) c	3.5 (1.6)
0.7 (0.2)	5720 (2300) c	3.2 (1.3)

¹ concentration en Al nominale.

² Les comptes aux différentes concentrations en Al ont été comparés par une analyse de variance. Les valeurs avec le même symbole (a, b, c,d) ne sont pas différentes à p = 0.05. (n = 10 à l'exception de l'exposition à 1.9 µM Al où n = 5).

Tableau 16. Comptes de ^{65}Zn (comptes moyens-min. $^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ tissu branchial (ÉT), bruit de fond soustrait, n = 12) des branchies de saumon après une exposition à 1.0 μM Zn et à des concentrations en Al dans l'expérience 8.

[Al], μM	^{65}Zn , cpm g^{-1} Zn total	^{65}Zn , cpm g^{-1} Zn lié
5.6	4020 (1470) a,x	3180 (1170) a ,y
4.2	3570 (1610) a, x	2860 (1300) a, y
2.2	3420 (840) a, x	2690 (710) a, y
0.9 (contrôle)	1900 (1040) b, x	1440 (1030) b, x

Les comptes aux mêmes concentrations d'Al ont été comparés par test-*t*. Les valeurs obtenues aux différentes concentrations en Al ont été comparées par une analyse de variance (ANOVA). Les valeurs avec le même symbole (ANOVA: a, b; test-t: x, y) ne sont pas différentes à $p = 0.05$.

Tableau 17. Comptes de ^{65}Zn (comptes moyens $\cdot \text{min.}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ tissu branchial (ÉT), bruit de fond soustrait, $n = 12$) des branchies de saumon après une exposition à $1.0 \mu\text{M}$ Zn et à des concentrations en Al dans l'expérience 9.

[Al], μM	^{65}Zn , $\text{cpm}\cdot\text{g}^{-1}$ Zn total	^{65}Zn , $\text{cpm}\cdot\text{g}^{-1}$ Zn lié
4.7	2960 (2030) a,b, x	2320 (2110) a,x
3.6	4770 (3190) b, x	2710 (1880) a, y
1.4	2350 (1650) a, x	1550 (1090) a, x
0.8 (contrôle)	1670 (940) a, x	1300 (930) a, x

Les comptes aux mêmes concentrations d'Al ont été comparés par un test-*t*. Les valeurs obtenues aux différentes concentrations en Al ont été comparées par analyse de variance (ANOVA). Les valeurs avec le même symbole (ANOVA: a, b; test-*t*: x, y) ne sont pas différentes à $p = 0.05$.

Tableau 18. Zn total et Zn lié ($\mu\text{g Zn}\cdot\text{g}^{-1}$ tissu branchial, $n = 12$) sur les branchies de saumon exposées à $1.0 \mu\text{M}$ de Zn et à des concentrations en Al, dans les expériences 8 et 9. L'accumulation de Zn a été calculée d'après les valeurs moyennes des comptes de Zn sur les branchies.

Bassin	Expérience 8			Expérience 9		
	total	lié	proportion liée	total	lié	proportion liée
1	0.12	0.10	0.8	0.11	0.09	0.8
2	0.11	0.07	0.6	0.18	0.10	0.6
3	0.10	0.08	0.8	0.09	0.07	0.8
4	0.06	0.04	0.7	0.06	0.05	0.8

Tableau 19. Concentrations moyennes en Al (μM , \pm ÉT) dans les expériences avec AF (expériences 10 et 11).

Expérience 10						
bassin	nominale	Al_t	Al_{cv}	Al_o	Al_i	dialysable
1	44.4	38.6 ± 3.3	15.6 ± 3.2	2.0 ± 0.4	13.6 ± 3.1	12.1 ± 1.1
2	33.3	33.8 ± 3.7	10.4 ± 0.8	2.3 ± 0.2	8.1 ± 0.8	8.4 ± 0.9
3	22.2	20.8 ± 0.7	9.1 ± 1.4	4.3 ± 0.8	4.8 ± 1.5	2.9 ± 0.3
4	11.1	10.5 ± 0.9	6.8 ± 0.9	4.5 ± 0.8	2.3 ± 0.6	1.3 ± 0.1
Expérience 11.						
bassin	nominale	Al_t	Al_{cv}	Al_o	Al_i	dialysable
1	44.4	37.1 ± 10.1	14.6 ± 4.2	2.3 ± 1.5	12.3 ± 4.1	16.8 ± 2.7
2	33.3	28.0 ± 3.8	9.5 ± 2.6	3.4 ± 1.5	6.1 ± 2.5	11.1 ± 0.2
3	22.2	23.4 ± 2.8	8.6 ± 1.8	4.9 ± 1.3	3.7 ± 1.4	3.1 ± 0.2
4	11.1	10.3 ± 2.3	6.9 ± 0.9	4.7 ± 1.1	2.2 ± 0.7	2.2 ± 0.3

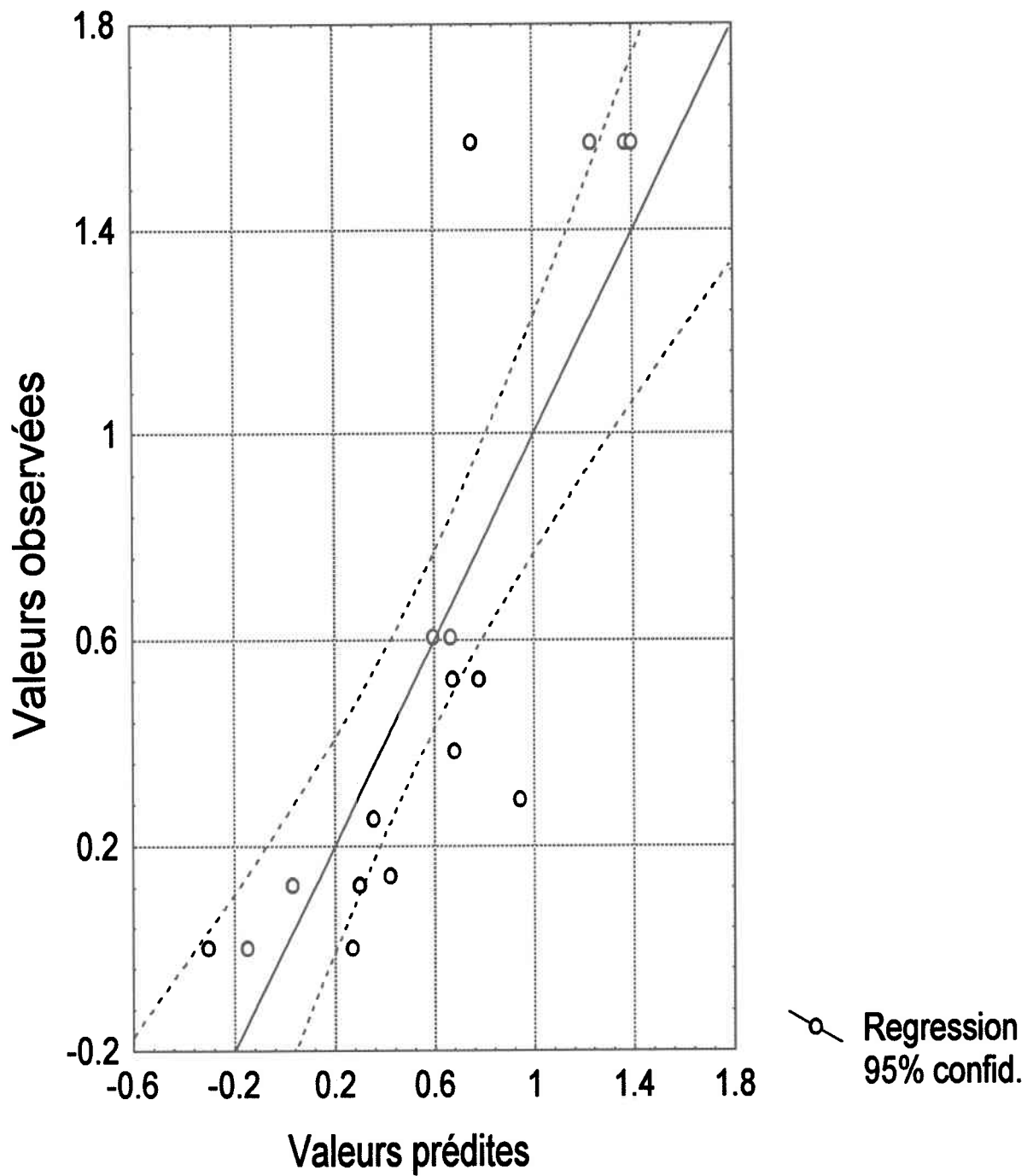
Tableau 20. Valeurs CL-50 en $\mu\text{M Al}_i$, (limites de confiance à 95%) déterminées après les essais avec l'EDR et l'AF.			
Expérience	EDR - Al_i	AF - Al_i (échange ionique)	AF - Al_i (dialyse)
10	2.9 (2.5 - 3.2)	8.0 (6.9 - 9.3)	4.9 (3.7 - 6.2)
11	4.0 (3.5 - 4.5)	6.1 (5.8 - 8.2)	8.1 (6.2 - 10.5)

Les valeurs CL-50 déterminées dans la solution AF sont **significativement plus élevées** que celles de la solution EDR ($p < 0.05$).

Tableau 21. Les relations entre la mortalité (proportion, arc sinus, n = 18) et les variables conjointes COT (mg C·L⁻¹) et concentration en Al (μM).

Paramètres	valeur P	R²	Ordonnée à l'origine	E.S. de l'estimé
Al _t , COT	p<0.02	0.46	0.440	0.470
Al _i , COT	p<0.0002	0.69	0.099	0.357
log (Al _i), COT	p<0.0001	0.71	- 0.215	0.345

Figure 1. Les relations entre la mortalité (proportion, arc sinus, $n = 18$) et les variables conjointes COT ($\text{mg C}\cdot\text{L}^{-1}$) et concentration en Al (μM).



CHAPITRE 1

(Aquat. Toxicol. 33: 155-176).

Survival time modeling of exposure of juvenile Atlantic salmon (Salmo salar)
to mixtures of Al and Zn in soft water at low pH

Robert Roy and Peter G.C. Campbell

Université du Québec, INRS-Eau

C.P. 7500, Ste-Foy

Québec, Canada G1V 4C7

ABSTRACT

The toxicity of mixtures of aluminum and zinc to Atlantic salmon (*Salmo salar*) was studied under conditions representative of the low ionic strength waters of the Canadian Shield. Organisms were exposed to elevated concentrations of inorganic monomeric Al singly, and to a mixture of Al and a sublethal concentration of zinc (1.7 to 0.8 μM), at three acidic pH levels (pH 4.5, pH 4.8 and pH 5.2). Survival times at each pH exposure were modeled with a Cox proportional hazards model. In all cases, there was a highly significant effect of the presence of Zn on survival times in the mixture. Models with the best fit included a covariate term for Al (either as Al^{3+} or as inorganic monomeric Al) and a classification code variable for Zn.

Concentrations of the free Al ion at each exposure pH were calculated using the chemical equilibrium modeling program HYDRAQL. Even when expressed in terms of Al^{3+} , the LC-50 values at each pH were still different. We suggest that a modification of the free ion activity model, including competition between the proton, H^+ , and the free Al ion, Al^{3+} , at the gill surface, can explain part of the pH dependence of the LC-50 (Al^{3+}) values, but that there remains some residual dependence on H^+ concentration.

Keywords: aluminum, zinc, toxicity, metal mixtures, acidic pH, proportional hazard model, free ion activity model.

INTRODUCTION

Of the metals responding to environmental acidification, Al and Zn are among those that consistently show the most obvious increases in concentration (Nelson and Campbell, 1991). This geochemical response is noted both in chronically acidified lakes and streams, and in streams subject to episodic pH depressions. For example, episodic pH depressions with accompanying increases in Al have been documented in rivers and streams in Scandinavia (Henriksen et al., 1984; Borg, 1986), in the eastern US (Driscoll et al., 1980; McAvoy, 1989) and on the Canadian Precambrian Shield (LaZerte and Dillon, 1984; Campbell et al., 1992). Elevated concentrations of other metals, in particular zinc, have been detected in acidified watersheds in Ontario (Spry et al., 1981), Scandinavia (Dickson, 1978; Steinnes, 1990) and in the Adirondacks (Baker, 1982; White and Driscoll, 1987). Aluminum and Zn concentrations also increase in experimentally acidified lakes (Schindler et al., 1980; Santschi et al., 1986; Brezonik et al., 1990).

Clearly, fish populations in acidified environments will tend to be exposed not only to high concentrations of the hydrogen ion itself, but also to elevated concentrations of more than one metal. Indeed, declines of fish populations in response to environmental acidification have been associated with the mobilization of aluminum (Driscoll et al., 1980; Henriksen et al., 1984); Al concentrations in such environments may exceed 15 μM (Driscoll and Schecher, 1988). It has also been suggested that Zn contributes to the toxicity towards salmonid populations that is often observed in acidified rivers (Turnpenny et al., 1987; Weatherley et al., 1990). According to a recent survey of metal concentrations in acidified watersheds (McDonald et al., 1989), concentrations of Zn may attain levels as high as 1.9 μM , with most values ranging from 0.10 to 1.0 μM .

At neutral pH, the toxicity of mixtures of metals is generally additive, with each metal contributing proportionally, depending on its concentration, to the toxicity of the mixture (Eaton, 1973; Lewis, 1978; Finlayson and Verrue, 1982; Enserink et al., 1991). As the pH is lowered, the toxicity of metals tested individually tends to decrease (Zn - Bradley and Sprague, 1985; Cu - Howarth and Sprague, 1978; Chakamoukos et al., 1978; Cu, Cd, Zn - Cusimano et al., 1986), but little is known about the effects of acidification on the toxicity of metal mixtures. Most studies

conducted at low pH have considered Al as the primary metal responsible for toxicity and have neglected the effects of low levels of other metals. In a notable exception to this generalization, Hutchinson and Sprague (1986) reported that a mixture of Zn, Al and 5 other metals severely affected the reproduction of flagfish (*Jordanella floridae*) at pH 5.8. Trials with different combinations of metals suggested that Al and Zn were primarily responsible for the observed effects. Similarly, Hickie et al. (1993) recently demonstrated that metal concentrations typical of acidified lakes on the Canadian Shield may be lethal to acid-sensitive species, such as the fathead minnow (*Pimephales promelas*).

The free-ion activity model (FIAM) suggests that the toxicity of a metal is determined by the concentration of the free or aquo ion – $M(H_2O)^{z+}$ or M^{z+} for simplicity (Morel, 1983; Pagenkopf, 1983; Campbell, 1995). The FIAM attributes the biological effect of the metal to its interaction with a cellular ligand (L-cell) located at the biological surface (e.g., the gill membrane), to form a surface complex M^{z+} -L-cell. The biological response, such as toxicity, is assumed to be proportional to the concentration of this surface complex, which is in turn proportional to the ambient free-ion concentration. According to the FIAM approach, the toxicity of a cationic metal might be reduced in the presence of a second competing cation - such behaviour has been shown to be the case for many metals in the presence of elevated concentrations of Ca^{2+} and H^+ (Pagenkopf, 1983). By analogy with the competitive effects of increased $[H^+]$ and $[Ca^{2+}]$, we hypothesized that the toxicity of Al might be ameliorated in the presence of sub-lethal levels of Zn. Alternatively, if Al and Zn were to act at different sites on the gill, one might anticipate an additive effect.

The objective of this study was thus to determine if the toxicity of Al to Atlantic salmon (*Salmo salar*) would be affected by the presence of sub-lethal concentrations of Zn, under conditions representative of those observed during snow melt in Quebec North Shore rivers. The experimental approach involved the exposure of juvenile Atlantic salmon to a range of pH conditions (pH 4.5 - 5.2), with additions of lethal concentrations of Al and sub-lethal concentrations of Zn. To minimize the complications of working in oversaturated (and thus undefined) media, maximum concentrations of inorganic monomeric Al in the synthetic exposure

solutions were maintained below the solubility limit calculated for $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$. Above this solubility limit, the aqueous chemistry of Al becomes exceedingly complex and unpredictable (Bertsch, 1989) - dissolved polynuclear Al_{13} species, hydroxy-Al colloids and particulate $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$ may all co-exist under these conditions, their inter-conversion being notoriously slow.

MATERIALS AND METHODS

Maintenance and acclimation of organisms

Juvenile Atlantic salmon (*S. salar*), with average test weights of 1 to 7 g, were obtained from a provincial fish hatchery (Ministère de Loisir Chasse et Pêches, Gaspé, Québec) and from a commercial aquaculture establishment (La Pisciculture Saukeb, Nouvelle, Gaspé, Québec). One experiment, experiment 3, involved fish weighing $6.8 \text{ g} \pm 2.2 \text{ g}$ (mean, S.D.); in all other experiments fish weighed on average $1.4 \pm 0.4 \text{ g}$ (mean, S.D.). The organisms were maintained in a 550 L holding tank situated in a 10 °C temperature controlled chamber, with a 12 h : 12 h light-dark cycle controlled by a timer. Water in the holding tank was recirculated through an activated carbon-biological filter system, and was also partially renewed with 360 L of reconstituted soft water twice a day. Dissolved oxygen in the holding tank was always >95% saturation. Fish were fed trout chow pellets (Corey Mills, Fredricton, New Brunswick) ad libitum. The organisms were acclimated to laboratory conditions for at least two weeks. Fish were not fed for 24 h prior to an experiment.

A reconstituted soft water ($[\text{Ca}^{2+}] = 44 \text{ } \mu\text{M}$; $[\text{Mg}^{2+}] = 62 \text{ } \mu\text{M}$; $[\text{Na}^+] = 143 \text{ } \mu\text{M}$; $[\text{K}^+] = 7 \text{ } \mu\text{M}$; $[\text{Cl}^-] = 7 \text{ } \mu\text{M}$ $[\text{SO}_4^{2-}] = 106 \text{ } \mu\text{M}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 143 \text{ } \mu\text{M}$) was prepared by the addition of reagent grade salts to deionized water and was used for acclimation of the organisms and for all experimentation. The newly prepared soft water was vigorously aerated for a minimum of 6 h and chilled to 10 °C before addition to the holding tank (pH 6.1 - 6.5, after aeration and temperature adjustment).

Bioassays

Water for experiments was prepared in 360 L polypropylene tank reservoirs. The pH of the chilled water was adjusted to pH 4.0 - 4.8 with 2.0 N HNO₃. If necessary, an appropriate volume of an Al stock solution (1000 ppm Al as Al₂(SO₄)₃•18 H₂O, acidified to pH < 4.0) was added at the same time. The reservoirs were gently aerated for a minimum of 12 h and the pH was checked frequently. After this period of equilibration, the pH was verified and the water was transferred to the dosing system. Two of the reservoirs were connected to the dosing system. One reservoir contained the highest Al concentration for the bioassay and the other contained dilution water, both at the appropriate pH. The solutions were pumped into two head-boxes and then fell by gravity to a series of Masterflex proportional pumps, and then to the bioassay tanks. The proportional pumps were arranged to provide the series of Al concentrations in each bioassay. Zinc (as a ZnSO₄•7H₂O stock solution; 3.3-3.8 mM) was pumped separately to each duplicate bioassay tank at a rate calculated to provide exposure to 1.5 μM Zn, based on the total flowrates for each tank.

Metal exposures were conducted in a flow-through system. Basin volumes and flowrates were determined according to Sprague (1973), allowing >95% molecular replacement of the basin volume (8 - 20 L) within 8 h. Prior to the introduction of fish, the system was set into operation for a period of 24 h. Ten fish were then placed in each exposure tank and measurements of the pH (twice daily; Table 1) and dissolved oxygen (daily) were taken over the course of the experiment. Dissolved oxygen was always >90% saturation. Mortalities were monitored every 3 h throughout the experiments, except for a 7 h period at night, to permit the calculation of median survival times. Fish were considered dead when no reaction was obtained after prodding.

Fish were exposed concurrently to concentrations of Al and to the mixture (Al and Zn), at three acid pH levels (pH 4.5, pH 4.8 and pH 5.2). Two experiments were conducted at each pH, with five Al concentrations and two control tanks. One control consisted of experimental water without Al or Zn, at the pH of that experiment. A second control consisted of exposure to the sub-lethal concentration of Zn used in the particular experiment, also at the pH of that experiment. No mortalities occurred in either of the controls in any of the experiments. The duration of all

experiments was 120 h, with the exception of experiment 3, which was terminated at 96 h, and experiment 2, which was continued for an additional 24 h, both due to failure/malfunction of the dosing system. In addition, bioassays of Zn toxicity were conducted at pH 4.5 and pH 5.2; in these experiments fish were exposed to a range of Zn concentrations without Al, in order to assess the degree of Zn toxicity present in the mixture within the limits of our pH exposures.

Aluminum toxicity occurred over a narrow concentration range. In order to calculate lethal concentrations for 50% of the population (LC-50 values), additional exposures were conducted at the conclusion of two of the experiments. One higher Al exposure was conducted 8 days after the conclusion of experiment 2, and additional Al and Al- Zn exposures were run immediately following experiment 6. The LC-50s and corresponding 95% confidence limits were determined using the trimmed Spearman-Kärber method (Hamilton et al., 1977). LC-50s at the same pH were compared using the standard error of mean differences (Sprague and Fogels, 1977).

The toxic units model (Pagenkopf, 1983; Sprague, 1973) suggests that the toxicity of a mixture can be approximated by the sum of the toxic fractions of each metal present in the mixture. These toxic fractions are determined by the LC-50 value for each constituent. In its simplest form, the model predicts that a mixture will be lethal if the sum of these units is ≥ 1.0 (Sprague, 1973). If the sum is greater than 1.0 for the same response, the mixture toxicity is considered as less-than-additive; if less than one, its toxicity is more-than-additive. If the presence of Zn attenuated the toxicity of Al, one would expect the mixture to show less-than-additive toxicity. We wished to relate the toxicity of the mixture at each pH to what would be expected from the concentration of each constituent, so toxic units were calculated for Al and for Al-Zn exposures:

$$TU_{pH_i} = \frac{[Al]}{LC-50_{Al_i}} + \frac{[Zn]}{LC-50_{Zn_i}}$$

where TU_{pHi} = toxic units at a particular pH i , $[Zn]_i$ is the average concentration measured during the particular experiment, $[Al]_n$ was the measured concentration in the exposure tank n , and where $LC-50_{Al_i}$ and $LC-50_{Zn_i}$ are the Al and Zn LC-50 values at pH i .

Metal analysis

All samples destined for metal analysis were handled and stored using acid-washed polypropylene plasticware. Samples for total Al analysis were preserved by addition of concentrated trace-metal grade HNO_3 at a final concentration of 0.1 M. Samples for the determination of monomeric Al were filtered (0.4 μm) but were not acidified. Aluminum speciation in the exposure media was determined with an automated colorimetric technique (Rogeberg and Henriksen, 1985), which measured either monomeric or acid reactive Al (= total dissolved Al). Background Al concentrations (mean \pm S.D = 0.4 \pm 0.3 μM) ranged from below the detection limit of 0.1 μM to a single high value of 1.4 μM .

Water samples for Zn analysis were taken daily and were preserved with ultra-pure trace metal grade HNO_3 prior to analysis by flame atomic absorption (air-acetylene flame). Concentrations of added Zn in the experiments ranged from 1.7 to 0.8 μM (Table 1). Concentrations in experiments at pH 4.8 and pH 5.2 fell below the target Zn concentration, either due to differences between the calculated and actual dilution rates, lower than calculated pumping rates, errors in the preparation of the stock solution, or adsorption to the sides of the bioassay tanks. Background Zn concentrations measured in the control tanks were below the detection limit of 0.1 μM (5 $\mu g L^{-1}$).

The speciation of inorganic monomeric Al was calculated using the chemical equilibrium program HYDRAQL (Papelis et al. 1988). Equilibrium constants (log K) for the inorganic complexes of Al were taken from Schecher and Driscoll (1987): $AlOH^{2+}$, -4.97; $Al(OH)^+$, -8.67; $Al(OH)_4^-$, -23.30; $Al(OH)_3$, aq, -15.00; $AlSO_4^+$, 3.02; $Al(SO_4)^-$, 4.92. The constants were corrected for a temperature of 10 °C. In order to ensure that the solubility limit for $Al(OH)_3$

precipitation was not exceeded, we ran the program using synthetic gibbsite ($\log K_{so} = -8.05$) as the controlling phase. This conservative approach ensured that all added Al was present as inorganic monomeric forms in the bioassay tanks (i.e., no precipitation, no polynuclear Al). Indeed, there were no significant differences between the two Al measurements (monomeric and total), indicating that all added Al was present in dissolved monomeric form. Equilibrium constants for Zn were taken from a standard reference database (NIST, 1993). At our experimental pH values and in our synthetic exposure media, Zn was present predominantly (>99 %) as the free ion, Zn^{2+} .

RESULTS

Lethal Al concentrations (LC-50s)

At each experimental pH, the LC-50 values (as μM Al_i or Al^{3+}) were similar for Al and Al-Zn exposures (Tables 2 and 3). The mixture LC-50s were generally lower than those determined in the Al-only exposures. In experiments 2 and 5, the mixture LC-50s were significantly lower than Al-only exposures, but only marginally so ($p \approx 0.05$). Replicate experiments also produced similar results, with one exception: at pH 4.8 (experiments 3 and 4), the LC-50 values determined for Al-only exposures were significantly different ($p < 0.05$), yet the two corresponding mixture LC-50s were not ($p > 0.05$). The average weight of fish in experiment 3 was 6.8 g, compared to 1.2 g in experiment 4; this weight difference may account for the difference in the Al-only LC-50s.

There is an apparent reduction in the toxicity of Al_i as the pH decreases - the LC-50 values increase notably as pH decreases from pH 5.2 to pH 4.5 (Tables 2 and 3). The speciation of Al varies markedly over this pH range, with the free ion, Al^{3+} , becoming predominant as the pH approaches 4.0. The FIAM suggests that the toxicity of Al should be proportional to the free ion concentration, yet even when the LC-50s are expressed in terms of the free ion (Al^{3+} - see Table 3), they still increase as the pH is lowered.

Zinc toxicity

Zinc was also less toxic at pH 4.5 than at pH 5.2 - the LC-50 values determined in Zn-only exposures at pH 4.5 and pH 5.2 were 11.9 (8.4 - 16.8) and 5.1 (4.6 - 5.7) respectively (expressed as $\mu\text{M Zn} \pm 95\%$ confidence limits). Similar reductions in Zn toxicity with decreasing pH have been reported in studies with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). At pH 4.7, with a soft water matrix similar to ours, Cusimano et al. (1986) reported a LC-50 value of 10.3 $\mu\text{M Zn}$, while at pH 5.6 in water of greater hardness, Bradley and Sprague (1985) reported a threshold LC-50 for rainbow trout of 13.5 $\mu\text{M Zn}$. At pH 4.9, in very soft water, Hickie et al. (1993) reported a value of 6.6 $\mu\text{M Zn}$ for alevin rainbow trout.

Using the LC-50 values and the average Zn concentrations measured during the exposures, toxic units (TUs) of zinc were calculated for experiments performed with Al at pH 4.5 and pH 5.2 (Table 2). The TUs of Zn present in the mixtures with Al ranged from 0.1 TU at pH 4.5 to 0.2 TU at pH 5.2 - no mortality was observed at these concentrations of Zn in the controls for each experiment.

Survival time modeling - approach

It was apparent from a preliminary inspection of lethal times that at elevated Al concentrations the Al + Zn mixture had greater toxicity than the Al-only solutions. In order to maximize the use of the bioassay data, survival times were modeled with the computer program STATISTICA (Statistica for Windows, Statsoft release 4.5, 1993), using the sub-routines Survival Analysis and Statistica Command Language. Data from the three highest Al exposures in each experiment were selected (with mortality > 20% in at least one of the concurrent exposure tanks). All data were right-censored at 120h, with the exception of experiments at pH 4.8, which were censored at 96 h. Censoring is characteristic of survival data because not all organisms die before the end of the study. In this type of study, all individuals are censored at the same time: the length of the experiment. In our case, one experiment at pH 4.8 was terminated at 96 h and in order not to bias the data by including different censoring times, both pH 4.8 experiments were censored at 96 h. All other experiments ended at 120 h and so were censored at this time.

The survival data did not match ($p < 0.05$) any of the available survival distributions (exponential, Weibull, log-linear, Gompertz). Data from experiments at each pH were compared using a Kaplan-Meier analysis. Cumulative hazard plots (log survival vs. log time) were reasonably parallel (Figure 1: experiments at pH 4.5), supporting the assumption that the hazards were proportional in each experiment (Dixon and Newman, 1991). (Plots of data from experiments conducted at pH 4.8 and pH 5.2 were similar and are not included). The data at each pH were then combined in order to increase the number of individual cases. Since the distribution function was unknown, the nonparametric Cox proportional hazard model (Cox and Oakes, 1984; Dixon and Newman, 1991) was used to compare the hazard function in the Al and Al-Zn exposures at each pH.

The Cox proportional hazard model assumes that the underlying hazard rate is a function of the independent variables, without any assumptions as to the shape of the hazard function. The model is written as:

$$h\{t, (z_1, z_2, \dots, z_i)\} = h_0(t) \bullet \exp(\beta_1 z_1 + \beta_2 z_2 + \dots + \beta_i z_i)$$

where $h(t)$ is the actual hazard with the i variables z and the survival time t . The term $h_0(t)$ refers to the baseline hazard, when all the independent variables are set to zero. The effect of a treatment is to multiply the baseline hazard by the β values - the parameter estimates. Fitting a model results in estimates of the goodness-of-fit, termed the log-likelihood value. The significance of a model is determined by a Chi-square computation, comparing the log-likelihood values for the model with the parameter estimates, and the null case, where all estimates are set to zero. If certain assumptions in the data are verified, the inclusion of either continuous or classification variables may result in a model with a more positive log-likelihood and a better fit to the data. If two models with different variables are compared, a Chi-square goodness of fit comparison can also be calculated. If twice the absolute difference in the two log-likelihoods is greater than the appropriate Chi-squared value (with degrees of freedom as the difference in the number of parameters in each model), then the model with the greater log-likelihood is a significant improvement. In Tables 4, 5 and 6, the terms are arranged according to the log-likelihood value,

from the most negative to the most positive. While the order of terms is different in each table, the most significant term(s) can easily be seen as the last significant entry in the series.

A variable may be used in a stratified analysis, where the hazard does not have to be proportional but the effects are not estimated, or it may be entered as a covariate, where the effect is estimated and tested, but the hazards are assumed to be proportional. In this study, a stratified analysis was performed on each of the pH groups, with the Al concentrations (either as μM inorganic Al or using the calculated values of the free ion - Al^{3+}) as the independent continuous variable and the presence/absence of Zn ("Zn code" = 1 or 0) defining the strata. Plots (log cumulative survival vs. log time) of the Al and mixture survival data at each pH were also parallel, suggesting that the hazards were proportional. Thus both the Al concentration and Zn were entered as covariates in further models, the latter as either a classification variable (Zn code) or as a continuous variable using the average Zn concentration (μM) in each experimental series. Finally, the toxic units in each tank were entered as a single covariate for experiments at pH 4.5 and pH 5.2, where Zn toxicity data were available.

Survival time modeling - results

The results of the stratified analysis showed a highly significant effect of the presence of Zn on survival times in the mixture (Figs. 2, 3 and 4; Tables 4, 5 and 6), despite the sub-lethal concentrations of the metal (0.1 - 0.2 TUs; Table 2). At each pH, the separation of the data into two groups - with and without Zn - results in a more positive log-likelihood and a significant improvement in the model. Accordingly, Zn was included with Al either as a covariate ("Zn μM " = average Zn concentration in the mixture) or as a classification variable ("Zn code", = 0 or 1) at each pH (Tables 4, 5 and 6). The Al concentration was entered as either the inorganic Al concentration (" Al_i ") or as the concentration of the free ion ($[\text{Al}^{3+}]$) calculated at each experimental pH (Table 3). In one case, at pH 4.5, the (Al^{3+}) term resulted in a slightly improved log-likelihood value compared to the model with $[\text{Al}_i]$ (Table 4; $p < 0.05$). However, at pH 4.8 and pH 5.2, use of the (Al^{3+}) term did not significantly improve the fit compared to the $[\text{Al}_i]$ models (Tables 5 and 6). As the pH becomes more acidic slight differences in pH result in greater differences in the proportion of Al as Al^{3+} . The small differences in average pH- (0.05

pH) in the two pooled experiments at pH 4.5 resulted in a 4% difference in the Al^{3+} concentrations. (Table 3). Thus the calculated Al^{3+} concentrations show more variability than the measured $[\text{Al}_i]$, and result in a better model for the data at this pH. The range of free ion concentrations at the less acidic pH values may have been too similar to the Al_i concentrations to result in significantly improved models at pH 4.8 and pH 5.2

In an attempt to elucidate the role of pH (as the H^+ -ion concentration) in the toxicity response, we included all appropriate data in one survival model (all survival data right censored at 120 h, excluding data from experiment 3). However, both Al^{3+} and Al_i terms show a high dependence on the H^+ -ion concentration, with an elevated covariance between these terms; since the covariates were not independent, the resulting model was considered to be invalid.

In most cases, the Zn code classification variable (where Zn code = 0 or 1) provided the best fit or described the data at least as well as the use of toxic units (Table 4: pH 4.5; Table 6, pH 5.2); at pH 4.8 the use of Zn concentration as a continuous variable (Zn μM) provided a slightly better approximation (Table 5), probably due to the greater range of Zn concentrations (1.0 and 1.7 μM) used in these experiments. The difference between the two models (toxic units vs. proportional hazard) lies in the use of the parameter estimates - the use of toxic units describes an additive function (Al and Zn in one term), whereas in the proportional hazard model a separate parameter - either "Zn code" or "Zn μM " - multiplies the corresponding hazard represented by the Al parameter. There is no significant difference between the additive and multiplicative descriptions at the relatively low levels of Zn in these experiments, which were not designed to test the effect of different Zn concentrations. However, it is possible to estimate the increased risk to individuals exposed at the same Al concentration, using the separate Zn parameter.

The increased risk of concurrent exposure to Al and Zn, relative to exposure to the same concentration of Al alone, can be calculated on the basis of the Zn code parameter estimates. These parameter estimates can be transformed into relative risks, which are the probability of dying in one group as compared to a reference group. The parameters are entered as the power of the exponent term in the hazard equation. Thus, an individual exposed to the mixture at pH 4.8

has $e^{1.306} = 3.7$ -fold greater risk compared to an individual exposed to Al only, and is more likely to expire during the experiment. At the two other pH exposures, the risks are respectively 2.7 ($e^{1.009}$, pH 4.5) and 3.1 ($e^{1.120}$, pH 5.2). Similar calculations were performed with the Zn μM parameter and the average Zn concentration for the experiment (Table 7). Thus, at pH 4.8 and for an average Zn concentration in the mixture of 1.0 μM , the increased risk is $e^{(1.0)(0.960)} = 2.6$ (Table 7).

This increased risk can be related to decreased median survival times if the survival distribution matches one of the models discussed previously. For example, if the survival distribution matches an exponential or Weibull distribution, median survival time to death for the different treatment groups can be generated (Dixon and Newman, 1991). The Cox proportional hazard model does not furnish direct estimates of the median time to death, yet STATISTICA can be used to generate survival curves at different Al concentrations in order to visualize the increased risk resulting from exposure to the mixture. This was done with data from the individual, unpooled experiments (experiments 1, 4 and 6). A survival curve at the LC-50 value, determined in the Al-only exposure in that experiment, was first generated. A similar curve at the same Al concentration in the mixture was generated for comparison. The degree of increased risk can be judged by the reduced survival times in the mixture (Figure 5)

We also calculated the concentration of Al in the mixture that would cause the same toxicity as the LC-50 concentration in the Al-only exposure (i.e., an equitoxic Al concentration in the mixture). This was done by subtracting the Zn TUs present in the mixture from the Al TUs determined in the Al-only exposures at that pH, and multiplying this fraction by the LC-50 value for the Al-only exposure. For example, at pH 5.3 in experiment 6, there were 0.2 TUs of Zn present in the mixture. The LC-50 for the Al-only exposure was 2.0 μM (= 1.0 TUs); the equitoxic concentration in the mixture should be $(0.8 \cdot 2.0 = 1.6 \mu\text{M Al})$. When the resulting curves are plotted (e.g., Figure 6), they overlap each other, as one would expect for equitoxic conditions. In this case, the equitoxic concentration also corresponds to the LC-50 value in the mixture (experiment 6, mixture LC-50 = 1.7 μM ; Table 2).

DISCUSSION

Al-only exposures

The LC-50 values determined for Al_i in the absence of Zn (2-11 μM Al_i, depending on the exposure pH; Table 2) are similar to those reported for salmonids in the recent literature, given the inevitable differences in experimental variables (acclimation period; sources of soft water; species and strains of fish). Approximate LC-50s can be estimated from the data in other studies, such as Wilkinson et al. (1990), from which we obtained a 168 h LC-50 at pH 4.5 for juvenile salmon of 3.2 μM as Al³⁺ (4.9 μM Al_i). Values for other salmonids are equal to or greater than the values for Atlantic salmon. For example, van Coillie et al. (1983) exposed brook trout (*Salvelinus fontinalis*) to inorganic Al in a soft water matrix similar to that used in this study and obtained 168 h LC-50s (as total Al) of 35 μM at pH 4.5 and 17.8 μM at pH 5.3. Orr et al. (1986) reported a threshold lethal concentration of 6.5 μM for juvenile rainbow trout (*O. mykiss*) exposed at pH 5.2.

Comparison of the present toxicity data with earlier results is hampered by the relative scarcity of LC-50 values for Al in the toxicological literature. This scarcity of LC-50 values (not of Al-fish studies in general) probably reflects the nature of the acute response of fish to aluminum, i.e. the difficulty of obtaining "partial" mortalities. To derive precise LC-50 values one requires reproducible "partial" mortalities, but in the present study the range of Al concentrations over which partial mortalities occurred was very narrow and difficult to sub-divide. Hutchinson et al. (1987) also observed a narrow response range to Al at low pH, what they termed a threshold response, in some of their studies with early life stages of salmonids.

As has been reported by earlier workers for Atlantic salmon (Muniz and Lievestad, 1980) and for other salmonids (Baker, 1982; Neville and Campbell, 1988; Holtze and Hutchinson, 1989), the toxicity of inorganic Al decreased as the pH decreased. Even when expressed in terms of the free Al³⁺ ion, to take into account pH-induced changes in Al speciation in solution, LC-50(Al³⁺) values increased 45-fold in less than a single pH decade, i.e., from 0.15 μM at pH 5.3 to 6.8 μM at pH 4.4 (Table 3). Knowledge of the free-ion concentration alone is clearly not sufficient to predict the biological effects of Al. Similar conclusions were recently reported for freshwater algae (Gensemer, 1991; Parent and Campbell, 1994).

The decrease in Al toxicity at low pH is qualitatively in agreement with the concept of increased competition between the proton, H^+ , and the free-metal ion, Al^{3+} , for binding and/or transport sites on the gill surface (Campbell and Stokes, 1985; Neville and Campbell, 1988). According to the FIAM, Al toxicity should be proportional to the concentration of the surface complex $\{Al^{z+}\text{-L-gill}\}$:

$$\text{toxicity} \propto \{Al^{z+}\text{-L-gill}\} = K [Al^{3+}] \{L\text{-gill}\}_{\text{free}}$$

where K is the conditional formation constant for the metal-gill surface complex, and $\{L\text{-cell}\}_{\text{free}}$ is the concentration of free (ionized) binding sites at the gill surface, the latter being determined by the pH in the gill microenvironment (Playle and Wood, 1989a,b) and the pK_a values of the binding sites on the gill surface. For equitoxic exposure conditions, e.g. at aqueous Al^{3+} concentrations corresponding to the $LC-50(Al^{3+})$ value, the product of the free ion concentration and the number of free binding sites on the gill should remain approximately constant at different pH values. Following the approach of Cusimano et al. (1986) for fish gill sites, and of Parent and Campbell (1994) for sites on algal surfaces, we estimated the number of ionized sites on the gill at each exposure pH. Approximate pK_a values suggested for the carbohydrate-sugar moieties on gill surfaces have ranged from 3.6 (Reid and McDonald, 1991) to about 5.0 (Pagenkopf, 1983). A value of $pK_a = 4.5$ was chosen, a value which has been used in other modeling studies (Neville and Campbell, 1988; Wilkinson et al., 1990). This pK_a was entered into the following equation to estimate the proportion of free L-gill sites:

$$\text{proportion ionized} = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a - pH)}}$$

It is evident from Table 8 that the product of the free Al^{3+} concentration and the proportion of free L-gill sites is not constant over the range of experimental pH values; the product still shows a marked pH dependence even after the effect of pH on the gill surface is taken into account.

Several possible hypotheses can be advanced to explain this "residual" pH dependence of Al toxicity. In calculating the proportion of free L-gill sites, we used the bulk solution pH value; for fish exposed to dilute, unbuffered acidic solutions, the pH in the gill microenvironment may be higher than that measured in the bulk solution (Playle and Wood, 1989a) - such an increase would affect the calculation of $\{L\text{-cell}_{\text{free}}\}$. In addition, some authors have postulated that mixed-ligand complexes such as $\text{HO-Al}^{2+}\text{-L-gill}$ may form at the gill surface and contribute to the observed toxicity (Neville and Campbell, 1988; Wilkinson et al., 1990). We conclude that the "modified" FIAM, involving competition between the proton, H^+ , and the free Al ion, Al^{3+} , at the gill surface, can explain part of the pH dependence of the LC-50 (Al^{3+}) values, but that there remains some residual pH dependence, as yet unexplained.

Al + Zn exposures

The results of the stratified survival time analysis show a highly significant negative effect of Zn on fish exposed to the Al+Zn mixture. We can therefore conclude that Zn does not attenuate the toxicity of Al under these conditions, but rather decreases survival times of individuals exposed to both metals. This effect was not readily apparent in the LC-50 data (Table 2), where no significant differences in toxicity were detected between the single metal and metal-mixture exposures. In fact, since no mortality occurred in the control Zn exposures (sublethal Zn without Al, at the particular acid pH,) in any experiment, one would have predicted little increased toxicity in the mixtures of Al and Zn.

Why, if added Zn lowered survival times, were the LC-50 values for the Al-only and the Al+Zn mixture at each pH not significantly different? It might be argued that the use of longer exposure times would have revealed a significant difference in LC-50 values between the mixture and the single metal exposures. However, we discount this explanation since the LC-50 values reported here approach incipient values - in the Al exposures where partial responses occurred, mortalities had normally ceased well before the end of the bioassay. We conclude that the effect of Zn on survival times is real, and that the apparent insensitivity of the LC-50 determinations to the presence of Zn is a reflection of the deficiencies of this classical approach to the analysis of toxicity data (Dixon and Newman, 1991).

The survival time modeling results generally support a simple additive model for the toxicity of the Al+Zn mixture. Indeed, for fish bioassays conducted at neutral pH, the toxicity of metal mixtures has been described in the literature as simply additive, or slightly less than additive when one of the metals is present at low concentration. This was the case for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to Zn, Cd and Cu (Finlayson and Verrue, 1982) and for minnows (*Phoxinus phoxinus*) exposed to mixtures of sub-lethal concentrations of Zn and Cd (Wickland Glynn et al., 1992). Similarly, in an early study with Atlantic salmon at neutral pH, Sprague (1964) reported an additive response in that the fish died more rapidly in mixtures of Cu and Zn than would have been expected on the basis of the lethal times measured in exposures to individual metals. In some cases, mixtures of metals at low pH appear less toxic than predicted. For example, in a recent study of the fathead minnow (*P. promelas*), Hickie et al. (1993) determined individual metal LC-50 values for Al, Cu and Zn at pH 4.9, and for a mixture of all three metals at the same pH. Bioassays of the mixture showed somewhat less toxicity than expected (Σ TUs = 1.54 at the mixture LC-50 concentration).

In some cases, fish have been reported to exhibit less-than-additive or even independent responses to binary metal mixtures, notably when metal A is present at high concentration and metal B at a low level (≤ 0.1 TUs: Eaton, 1973; Parrott and Sprague, 1993). However, these observations may reflect the fact that rates of mortality are rarely reported in mixture studies dealing with acute toxicity. If individuals can tolerate a certain concentration of metal A, they may also tolerate the presence of metal B at a lower concentration in a mixture. Sensitive individuals, those that would die at the same concentration of metal A, may die earlier in the presence of low concentrations of metal B, but this effect might only be apparent when the minimum exposure times for determining the incipient or threshold LC-50s are compared. In contrast, survival time modeling offers an efficient and statistically powerful method of comparing such responses, with the additional advantages of a greater abundance and precision of information (Dixon and Newman, 1991).

Mechanistic considerations

The increased toxicity of Al observed in the presence of low levels of Zn may be related to the mechanism of Al toxicity. Many gill irritants, including Al, stimulate the production of mucus. In an earlier study (Wilkinson and Campbell, 1993) we examined aluminum uptake by Atlantic salmon in the laboratory at pH 4.5; gill uptake of Al was slow, approaching steady state only after 3 d of exposure and initially most of the Al was sorbed not to the gill surface itself, but to the gill mucus. Mucus appeared to retard Al transport from solution to the membrane surface, thus delaying the acute biological response of the fish (cf. Exley et al., 1991).

Zinc would also be expected to bind to fish mucus (e.g., Handy and Eddy, 1990), but less strongly than Al, and thus any protective effect of mucus would be less effective for Zn than for Al. Indeed, exposure of trout to Zn results in a rapid influx of the metal through the gills into the plasma at neutral pH (Spry and Wood, 1988) and at a pH of 5.6 (Handy and Eddy, 1990) - unlike the delayed response noted for Al, no lag is noted in the influx of Zn. This influx is enhanced in fish that have been acclimated to low ionic strength waters (Spry and Wood, 1988), such as the salmon in the present study, and by acid exposure (Bentley, 1992). In this latter study, Zn influx into channel catfish (*Ictalurus punctatus*) increased at low pH (pH 5.0), but was unaffected by an elevated concentration (10 μ M) of Al at this pH.

On the basis of these observations, we speculate that Zn is not bound as tightly to gill mucus as is Al, and that therefore it can continue to enter/damage the gill during the initial exposure period, i.e. while the mucus affords transitory protection to the gill vis-à-vis the Al challenge. However, when the Al is subsequently transferred to the sensitive gill binding sites, after this period, the fish may be overwhelmed by the two metals and succumb earlier than it would have in an Al-only exposure.

In conclusion, this study has shown that environmentally realistic concentrations of Zn cause additional toxicity in the presence of Al at low pH. These findings may be relevant to situations in the field. For example, during snow melt fish can be exposed to an acid-aluminum pulse lasting several days (Campbell et al. 1992). The presence of low levels of other metals, such

as Zn, may reduce the survival time, thereby causing increased mortality during such episodes. Survival time modeling offers a powerful tool to predict the effects of such mixtures on the populations at risk. Other relevant chemical variables (e.g., concentrations of major ions) and biological factors (e.g., weight, sex) could in principle be incorporated in the survival models to increase the accuracy of such predictions (Dixon and Newman, 1991).

ACKNOWLEDGMENTS

Funding for this research was provided by Fisheries and Oceans Canada (Research Subvention Programme) and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Partial student support (RR) from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche is also gratefully acknowledged. Dr. Louis Bernatchez graciously permitted the use of his computer for the analysis of survival data. Dr. Neil Hutchinson and Dr. Christopher Exeley provided constructive criticisms which greatly improved the manuscript.

REFERENCES

- Baker, J.P., 1982. Effects on fish of metals associated with acidification. In: Acid Rain/Fisheries. Proc. Inter. Symp. Acidic Precip. Fish. Impact, edited by J. Johnston, American Fisheries Society, Bethesda, MD, pp.165-176.
- Bentley, P.J., 1992. Influx of zinc by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Uptake from external environmental solutions. Comp. Biochem. Physiol. 101C: 215-217.
- Bertsch, P.M., 1989. Aqueous polynuclear aluminum species. In: The Environmental Chemistry of Aluminum, edited by G. Sposito, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 87-115.
- Borg, H., 1986. Metal speciation in acidified mountain streams in central Sweden. Water Air Soil Pollut. 30: 1007-1014.
- Bradley, R.W. and J.B. Sprague, 1986. The influence of pH, water hardness, and alkalinity on the acute lethality of zinc to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42: 731-736.
- Brezonik, P.L., C.E. Mach, G. Downing, N. Richardson and M. Brigham, 1990. Effects of acidification on minor and trace metal chemistry in Little Rock Lake, Wisconsin. Environ. Toxicol. Chem. 9: 871-885.
- Campbell, P.G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the Free-Ion Activity Model. In: Metal Speciation and Bioavailability, edited by A. Tessier and D.R. Turner, Lewis Publishers Inc., Boca Raton, FL, Chapter 2 (in press).
- Campbell, P.G.C., H.J. Hansen, B. Dubreuil and W.O. Nelson, 1992. Geochemistry of Quebec North Shore salmon rivers during snow melt: organic acid pulse and aluminum mobilization. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 1938-1952.
- Campbell, P.G.C. and P.M. Stokes, 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42: 2034-2049.
- Chakoumakos, C., R. Russo and R. V. Thurston, 1979. Acute toxicity of copper to cutthroat trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, pH and hardness. Environ. Sci. Technol. 13: 213-219.
- Cox, D.R. and D. Oates, 1984. Analysis of Survival Data. Chapman and Hall, London. pp. 201.
- Cusimano, R.F., D.F. Brakke and G.A. Chapman, 1986. Effect of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43: 1497-1503.
- Dickson, W., 1978. Some effects of the acidification of Swedish lakes. Verh. Inter. Verein. Limnol. 20: 851-856.

- Dixon, P.M. and M.C. Newman, 1991. Analyzing toxicity data using statistical models for time-to-death: an introduction. In: *Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications*, edited by M.C. Newman and A.W. McIntosh, Adv. Trace Substances Res., Lewis Publishers, Chelsea, MI, pp.207-242.
- Driscoll, C.T., J.P. Baker, J.J. Bisogni and C.L. Schofield, 1980. Effect of aluminum speciation on fish in dilute acidified waters. *Nature (Lond)* 284: 161-164.
- Driscoll, C.T. and W.D. Schecher, 1988. Aluminum in the environment. In: *Aluminum and its Role in Biology*, edited by H. Sigel and A. Sigel, Metal Ions in Biological Systems, Vol. 24, Marcel Dekker Inc., New York, NY, pp.59-122.
- Eaton, J. G., 1973. Chronic toxicity of a copper, cadmium and zinc mixture to the fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque). *Water Res.* 7: 1723-1736.
- Enserink, E.L., J.L. Maasdiepeveen and C.J. Vanleeuwen, 1991. Combined effects of metals - an ecotoxicological evaluation. *Water Res.* 25: 679-687.
- Exley, C., J.S. Chappell and J.D. Birchall, 1991. A mechanism for acute aluminum toxicity in fish. *J. Theor. Biol.* 151: 417-428.
- Finlayson, B.J. and K.M. Verrue, 1982. Toxicities of mixtures of copper, zinc and cadmium mixtures to juvenile chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 111: 645-650.
- Gensemer, R.W., 1991. The effects of pH and aluminum on the growth of the acidophilic diatom *Asterionella ralfsii* var. *americana*. *Limnol. Oceanogr.* 36: 123-131.
- Handy, R.D. and F.B. Eddy, 1990. The interactions between the surface of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and waterborne metal toxicants. *Functional Ecol.* 4: 385-392.
- Henriksen, A., O.K. Skogheim and B.O. Rosseland, 1984. Episodic changes in pH and aluminium-speciation kill fish in Norwegian salmon river. *Vatten* 40: 255-260.
- Hickie, B.E., N.J. Hutchinson, D.G. Dixon and P.V. Hodson, 1993. Toxicity of trace metals mixtures to alevin rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and larval fathead minnow (*Pimephales promelas*) in soft, acidic water. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 1348-1355.
- Holtze, K.E. and N.J. Hutchinson, 1989. Lethality of low pH and Al to early life stages of six fish species inhabiting Precambrian Shield waters in Ontario. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1188-1202.
- Howarth, R.S. and J.B. Sprague, 1978. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. *Water Res.* 12: 455-462.
- Hutchinson, N.J. and J.B. Sprague, 1986. Toxicity of trace metal mixtures to American flagfish (*Jordanella floridae*) in soft acidic water and implications for cultural acidification. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 647-655.

- Hutchinson, N. J., K. E. Holtze, J. R. Munro and T. W. Pawson, 1987. Lethal responses of salmonid early life stages to H^+ and Al in dilute waters. *Annls. Soc. R. Zool. Belg.* 117 (Suppl 1): 201-217.
- LaZerte, B.D. and P.J. Dillon, 1984. The relative importance of anthropogenic versus natural sources of acid in lakes and streams of central Ontario. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41: 1664-1677.
- Lewis, M., 1987. Acute toxicity of copper, zinc and manganese in single and mixed salt solutions to juvenile longfin dace, Agosia chrysogaster. *J. Fish Biol.* 13: 695-700.
- McAvoy, D.C., 1989. Episodic response of aluminum chemistry in an acid-sensitive Massachusetts catchment. *Water Resour. Res.* 25: 233-240.
- McDonald, D. G., J.P. Reader and T. R. K. Dalziel, 1989. The combined effects of pH and trace metals on fish ionoregulation. In: *Acid Toxicity and Aquatic Animals*, edited by R. Morris, R., E. W. Taylor, D. J. A. Brown and J. A. Brown, Soc. Exp. Biol. Seminar Series vol.34, Cambridge University Press, Cambridge, U.K. pp. 221-242.
- Morel, F.M.M., 1983. *Principles of Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, New York, NY., pp. 300-308.
- Muniz, I.P. and H. Leivestad, 1980. Toxic effects of aluminum on the brown trout, Salmo trutta. In: *Proc. Intern. Conf. Ecol. Impact Acid Precip.*, edited by D. Drablos and A. Tollen, SNSF Project, Oslo, Norway, pp. 320-321.
- Nelson, W.O. and P.G.C. Campbell, 1991. Review of the effects of acidification on the geochemistry of Al, Cd, Pb and Hg in freshwater environments. *Environ. Pollut.* 71: 91-130.
- Neville, C.M. and P.G.C. Campbell, 1988. Possible mechanisms of aluminum toxicity in a dilute, acidic environment to fingerlings and older life stages of salmonids. *Water Air Soil Pollut.* 42: 311-327.
- NIST, 1993. *Critical Stability Constants of Metal Complexes Database*, NIST Standard Reference Database 46, version 1.0, U.S. Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Data Program, Gaithersburg, MD 20899.
- Orr, P.L., R.W. Bradley, J.B. Sprague and N.J. Hutchinson, 1986. Acclimation-induced changes in toxicity of aluminum to rainbow trout (Salmo gairdneri). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 243-246.
- Pagenkopf, G.K., 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness. *Environ. Sci. Technol.* 17: 342-347.
- Papelis, C., K.F. Hayes and J.O. Leckie, 1988. Hydrapl: a program for the computation of chemical equilibrium composition of aqueous batch systems including surface-complexation modeling of ion adsorption at the oxide/solution interface. Dept. of Civil Engineering Technical Report No. 306, Stanford University, Stanford CA. pp130.

- Parent, L. and P.G.C. Campbell, 1994. Aluminum bioavailability to the green alga Chlorella pyrenoidosa in acidified synthetic soft water. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 587-598.
- Parrott, J.L. and J.B. Sprague, 1993. Patterns in toxicity of sublethal mixtures of metals and organic chemicals determined by Microtox[®] and by DNA, RNA, and protein content of fathead minnows (Pimephales promelas). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 2245-2253.
- Playle, R.C. and C.M. Wood, 1989a. Water chemistry changes in the gill micro-environment of rainbow trout: experimental observations and theory. *J. Comp. Physiol.* B159: 527-537.
- Playle, R.C. and C.M. Wood, 1989b. Water pH and aluminum chemistry in the gill micro-environment of rainbow trout during acid and aluminum exposures. *J. Comp. Physiol.* B159: 539-550.
- Reid, S. D. and D.G. McDonald, 1991. Metal binding activity of the gills of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1061-1068.
- Rogeberg, E.J.S. and A. Henriksen, 1985. An automatic method for fractionation and determination of Al species in fresh-waters. *Vatten* 41: 48-53.
- Santschi, P.H., V.P. Nyffeler, R.F. Anderson, S.L. Schiff, P. O'Hara and R.H. Hesslein, 1986. Response of radioactive trace metals to acid-base titrations in controlled ecosystems: evaluation of transport parameters for applications to whole-lake radio-tracer experiments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 60-77.
- Schecher, W.D. and C.T. Driscoll, 1987. An evaluation of uncertainty associated with aluminum equilibrium calculations. *Water Resour. Res.* 23: 525-534.
- Schindler, D.W., R.H. Hesslein, R. Wageman and W.S. Broecker, 1980. Effects of acidification on mobilization of heavy metals and radionuclides from the sediments of a freshwater lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 373-377.
- Sprague, J.B., 1964. Lethal concentration of copper and zinc for young Atlantic salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 21: 17-26.
- Sprague, J. B. 1973. The ABCs of pollutant bioassay using fish. In: *Biological Methods for the Assessment of Water Quality*, ASTM STP 528, Am. Soc. for Testing and Materials. pp.6-30.
- Sprague, J. B. and A. Fogels, 1977. Watch the Y in bioassay. In: *Proc. 3rd Aquatic Toxicity Workshop*; Nov 2-3, 1976, Halifax, N.S., *Environ. Prot. Serv. Tech. Rep. No. EDS-5-AR-77-1*. pp.107-118.
- Spry, D.J. and C.M. Wood, 1988. Zinc influx across the isolated, perfused head preparation of the rainbow trout (Salmo gairdneri) in hard and soft water. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 2206-2215.

Spry, D.J., C.M. Wood and P.V. Hodson, 1981. The effects of environmental acid on freshwater fish, with particular reference to the softwater lakes of Ontario and the modifying effects of heavy metals. A literature review. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 999, 148p.

Statistica for Windows, 1993. Statsoft, 2325 E 13th St., Tulsa OK.

Steinnes, E., 1990. Lead, cadmium and other metals in Scandinavian surface waters, with emphasis on acidification and atmospheric deposition. Environ. Toxicol. Chem. 9: 825-831.

Turnpenny, A. W. H., K. Sadler, R. J. Aston, A. G. P. Milner and S. Lynam, 1987. The fish populations of some streams in Wales and northern England in relation to acidity and associated factors. J. Fish. Biol.. 31: 415-434.

van Coillie, R., C. Thellen, P.G.C. Campbell and Y. Vigneault, 1983. Effets toxiques de l'aluminium chez les salmonidés en relation avec des conditions physico-chimiques acides. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. No. 1237, 88p.

Weatherley, N.S., A.P. Rogers, X. Goenaga and S.J. Omerod, 1990. The survival of early life stages of brown trout (Salmo trutta L.) in relation to aluminium speciation in upland Welsh streams. Aquat. Toxicol. 17: 213-230.

White, J.R. and C.T. Driscoll, 1987. Zinc cycling in an acidic Adirondack lake. Environ. Sci. Technol. 21: 211-216

Wickland Glynn, A.; C. Haux, and A. Hogstrand, 1992. Chronic toxicity and metabolism of Cd and Zn in juvenile minnows (Phoxinus phoxinus) exposed to a Cd and Zn mixture. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 2070-2079.

Wilkinson, K.J. and P.G.C. Campbell, 1993. Aluminum bioconcentration at the gill surface of juvenile Atlantic salmon in acidic media. Environ. Toxicol. Chem. 12: 2083-2095.

Wilkinson, K.J., P.G.C. Campbell and P. Couture, 1990 Effect of fluoride complexation on aluminum toxicity towards juvenile Atlantic salmon (Salmo salar). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 1446-1452.

Table 1-1. Mean experimental pH and Zn concentrations (\pm S.D.; n) in bioassay tanks.

Experiment, h	pH	[Zn], μ M
1. - 120 h	4.47 (0.05; 132)	1.2 (0.3; 30)
2. - 140 h	4.42 (0.05; 156)	1.7 (0.4; 42)
3. - 96 h	4.86 (0.08; 84)	1.7 (0.3; 28)
4. - 120 h	4.83 (0.08; 132)	1.0 (0.2; 30)
5. - 120 h	5.26 (0.10; 168)	1.0 (0.3; 30)
6. - 120 h	5.24 (0.05; 176)	0.8 (0.3; 24)

Table 1-2. LC-50 values (\pm 95% confidence limits) as μ M Al for bioassays with Al or with a mixture of Al+Zn. Toxic units of Zn for bioassays at pH 4.5 and pH 5.2 were calculated using average [Zn] measured in bioassay tanks (Table 1) and the Zn LC-50 values determined at pH 4.5 and pH 5.2, as described in the text.

Experiment	pH, h	Al	Al + Zn mixture	TUs of Zn in mixture
1	4.47 - 120 h	9.6 (8.6 - 10.8)	8.3 (7.3 - 9.5)	0.10
2	4.42 - 140 h	10.5 (9.9 - 11.3)	9.0 (8.1 - 9.9) ^a	0.14
3	4.86 - 96 h	2.8 (2.5 - 3.4)	3.1 (2.6 - 3.7)	-
4	4.83 - 120 h	4.5 (4.0 - 5.1) ^b	3.8 (3.0 - 4.8)	-
5	5.26 - 120 h	2.0 (1.9 - 2.1)	1.6 (1.5 - 1.7) ^a	0.20
6	5.24 - 120 h	1.9 (1.8 - 2.0)	1.7 (1.5 - 1.9)	0.18

^aLC-50 of mixture significantly less than Al-only exposure ($p < 0.05$).

^bLC50 significantly higher than value determined in experiment 3 ($p < 0.05$).

Table 1-3. LC-50 values in Table 2 expressed as the free ion, Al^{+3} (μM). The proportion of free ion at each pH was calculated from the relevant chemical equilibria (see text).

Experiment	pH	% free ion	Al only	Al + Zn
1	4.47	69	6.6	5.7
2	4.42	65	6.8	5.9
3	4.86	33	0.9	1.0
4	4.83	35	1.6	1.3
5	5.24	8	0.17	0.14
6	5.26	8	0.15	0.13

Table 1-4. Log-likelihood and parameter estimates (β values) for different covariate terms in a Cox proportional hazard model for bioassay data at pH 4.5. Subsequent models were compared with the previous one for significance by Chi-square (n.s. = no significant difference; $p > 0.05$).

pH 4.5 terms	Log likelihood	Parameter Estimates (SE)	P > Chi-square
null:	-304.723		
[Al]	-284.740	0.274 (0.044)	< 0.0000001
[Al ³⁺]	-281.711	0.454 (0.069)	= 0.014
[Al] [Zn]	-279.108	0.296 (0.047) 0.517 (0.154)	= 0.022
[Al] Zn code	-276.719	0.310 (0.047) 1.009 (0.258)	= 0.029
toxic units	-275.129	3.603 (0.497)	n.s.

Table 1-5. Log-likelihood and parameter estimates (β values) for different covariate terms in a Cox proportional hazard model for bioassay data at pH 4.8. Subsequent models were compared with the previous one for significance by Chi-square (n.s. = no significant difference; $p > 0.05$).

pH 4.8, terms	Log Likelihood	Parameter Estimates (SE)	P > Chi-square
null	-336.022		
[Al ³⁺]	-321.650	2.825 (0.561)	< 0.00001
[Al _i]	-319.008	1.037 (0.190)	= 0.022
[Al _i] Zn code	-305.091	1.320 (0.206) 1.306 (0.206)	< 0.0001
[Al _i] [Zn]	-303.314	1.274 (0.194) 0.960 (0.168)	n.s.

Table 1-6. Log-likelihood and parameter estimates (β values) for different covariate terms in a Cox proportional hazard model for bioassay data at pH 5.2. Subsequent models were compared with the previous one for significance by Chi-square (n.s. = no significant difference; $p > 0.05$).

pH 5.2, terms	Log Likelihood	Parameter Estimates (SE)	P > Chi-square
null	-286.393		
[Al ³⁺]	-266.843	53.836 (9.359)	< 0.0000001
[Al _i]	-266.366	4.115 (0.726)	n.s.
toxic units	-257.520	7.841 (1.100)	< 0.001
[Al _i] [Zn]	-257.418	4.376 (0.729) 1.127 (0.272)	n.s.
[Al _i] Zn code	-256.964	4.546 (0.734) 1.120 (0.265)	n.s.

Table 1-7. Increased risks for organisms exposed to the Al + Zn mixture, compared to those at the same Al concentration in the single metal exposures. The risks were calculated using the exponent parameters for Zn (Zn μM) at each pH (Tables 4, 5 and 6) and the average Zn concentration in the mixtures (Table 1).

pH	Experiment	Zn exponent parameter	[Zn] in the mixture (μM)	Increased Risk
4.5	1	0.517	1.2	1.9
	2		1.7	2.4
4.8	3	0.96	1.7	5.1
	4		1	2.6
5.2	5	1.127	1	3.1
	6		0.9	2.8

Table 1-8. Dependence of Al toxicity on pH. The proportion of free ionized sites on the gill was calculated, using a theoretical pK_a of 4.5, and then multiplied by the calculated free ion concentration at the LC-50 (Table 3). If the FIAM applied, this product would be pH-invariant.

Experiment	pH	L-cell _{free} , proportion	[Al ³⁺], μ M	[L-cell] _{free} · [Al ³⁺],
1	4.47	0.48	6.6	3.02
2	4.42	0.45	6.8	3.30
3	4.86	0.70	0.9	0.64
4	4.83	0.68	1.6	1.08
5	5.24	0.85	0.17	0.13
6	5.26	0.85	0.15	0.14

Figure 1-1. Plots (log-survival time vs log proportion surviving) of the AI and mixture survival data at pH 4.5 (open symbols: experiment 1; closed symbols: experiment 2).

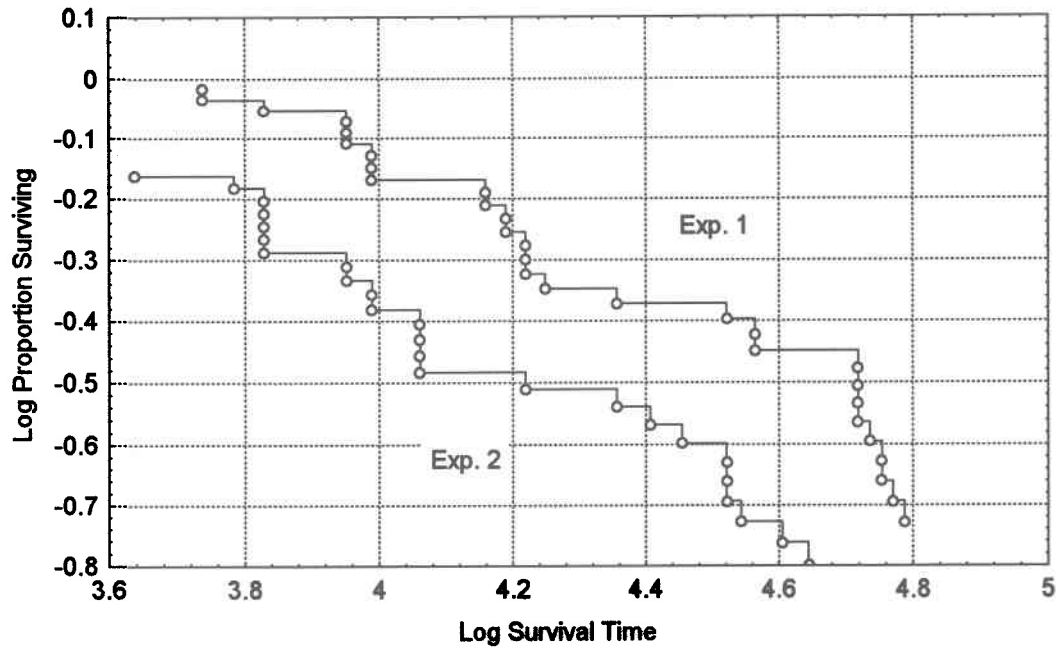


Figure 1-2. Plots (log-survival time vs log proportion surviving) of the Al and mixture survival data at pH 4.5 (open symbols: Al exposures; closed symbols: Al and Zn exposures).

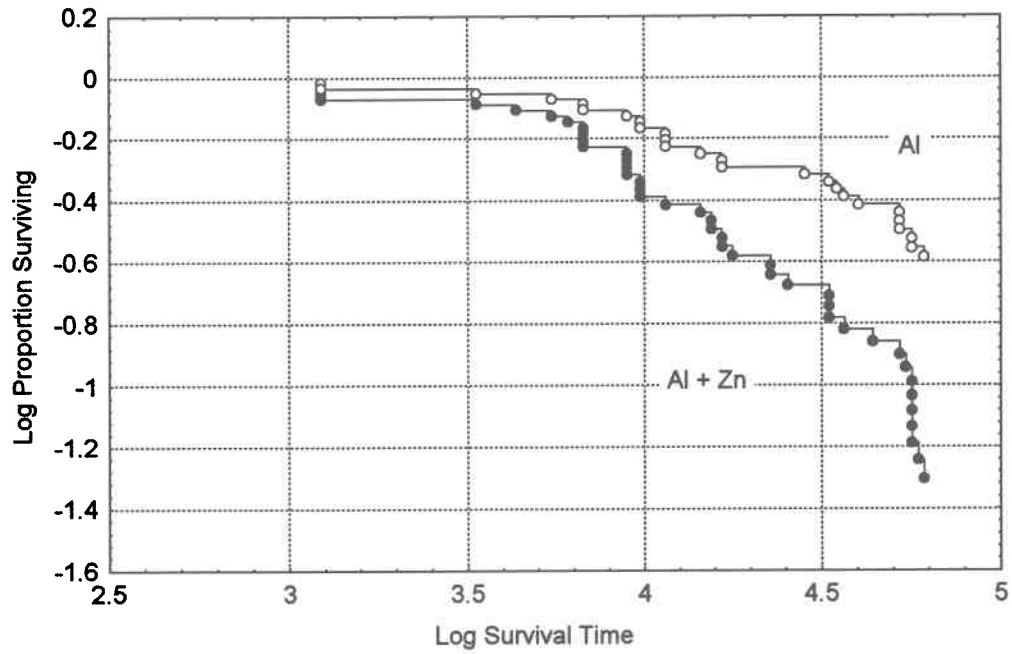


Figure 1-3. Plots (log-survival time vs log proportion surviving) of the Al and mixture survival data at pH 4.8 (open symbols: Al exposures; closed symbols: Al and Zn exposures).

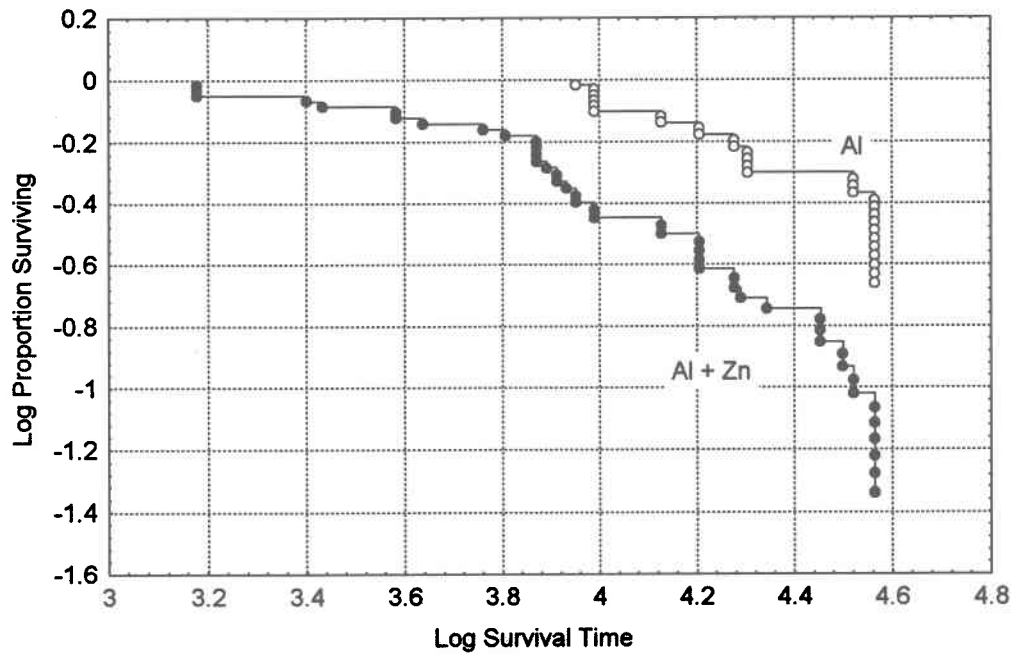


Figure 1-4. Plots (log-survival time vs log proportion surviving) of the Al and mixture survival data at pH 5.2 (open symbols: Al exposures; closed symbols: Al and Zn exposures).

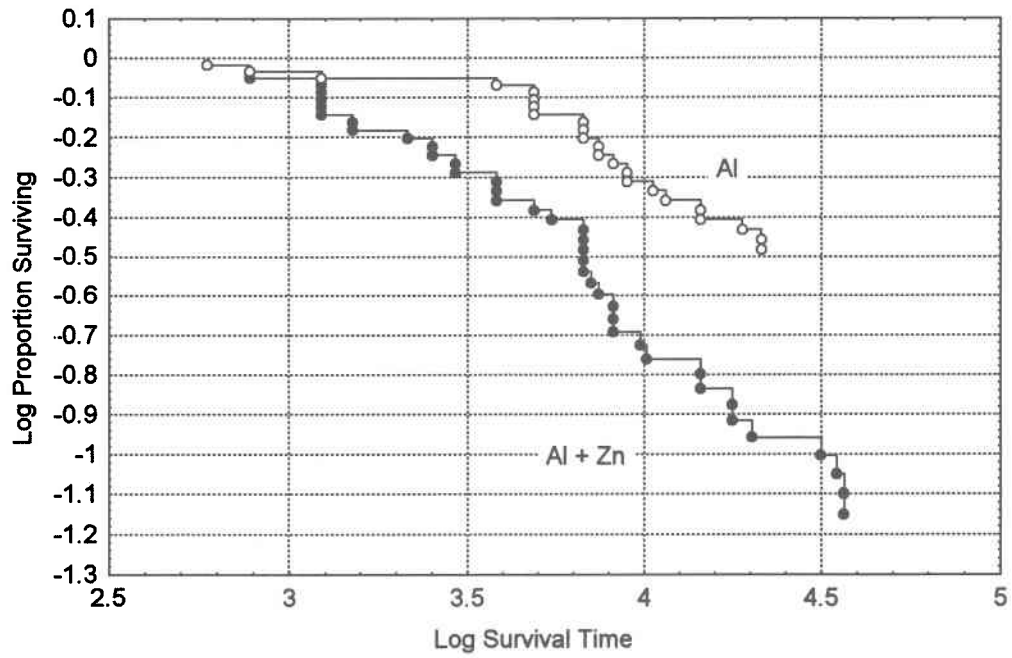


Figure 1-5. Survival curves generated at the Al concentration of the LC-50 (2.0 μM), for Al and Al-Zn exposures at pH 5.26 in Experiment. 6. The degree of increased risk attributable to the presence of Zn can be judged by the reduced survival times in the mixture. (open symbols: Al exposures; closed symbols: Al and Zn exposures).

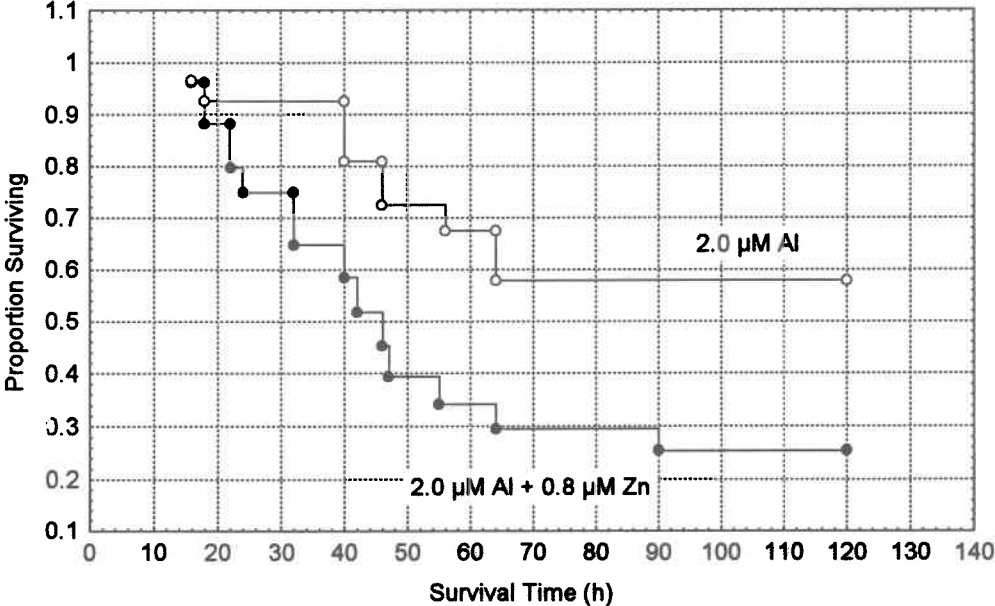
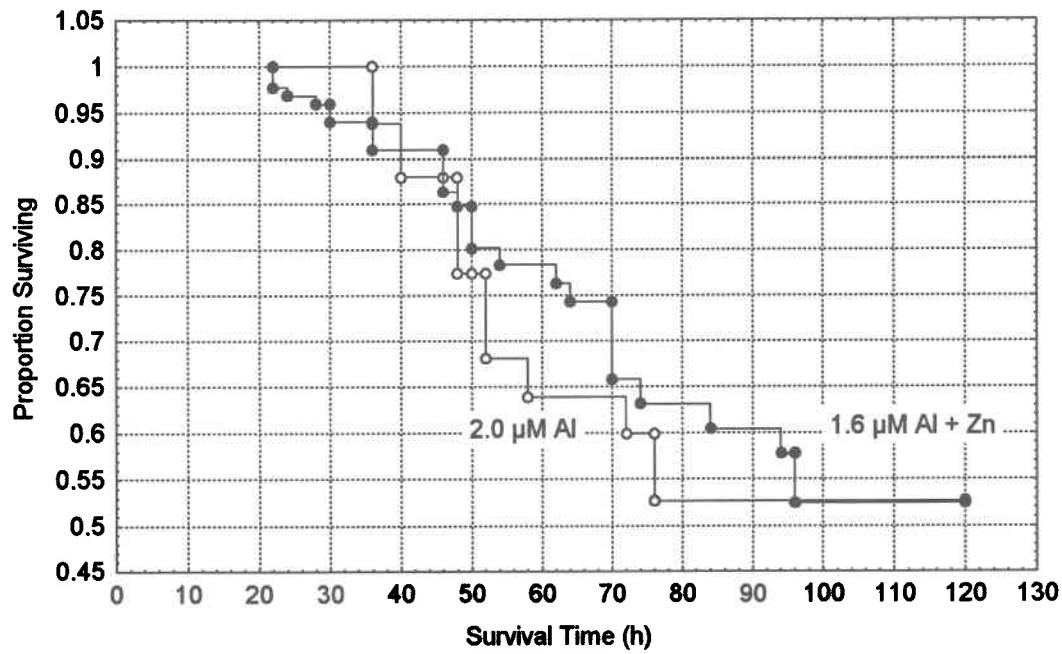


Figure 1-6. Equitoxic survival curves (proportion surviving vs survival time) generated for Experiment 6 at pH 5.26. (open symbols: the LC-50 concentration - 2.0 μM in the Al only exposure; closed symbols: the 1.6 μM Al concentration in the mixture exposure, with 0.8 μM of Zn).



CHAPITRE 2

Gill accumulation of Zn in Atlantic salmon (*Salmo salar*)

exposed to a range of Al concentrations at low pH

(soumis à *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*)

Robert L. Roy and Peter G.C. Campbell

ABSTRACT

An earlier study showed that the presence of sub-lethal Zn concentrations decreases the survival time of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to lethal concentrations of monomeric inorganic Al. The present experiments were designed to clarify the mechanism of this effect. The accumulation of Zn on the gills of Atlantic salmon parr (2.2 ± 0.9 g) was studied in solutions with different concentrations of Al (0 - 8 μM), at nominal pH 4.8. Fish were exposed to 1.0 - 1.6 μM Zn under static conditions, with 1 or 10 $\mu\text{Ci}\cdot\text{l}^{-1}$ ^{65}Zn added as a tracer. After 24 h, fish were sacrificed and the gills were dissected, briefly soaked in a 1 mM EDTA solution to remove loosely adsorbed Zn and then counted. In two experiments, half gills were also blotted with filter paper to remove mucus-bound metal; a moderate amount (≈ 20 to 40%) of the gill Zn remaining after the EDTA treatment was removed by the blotting procedure. Zinc accumulation on the gills was independent of inorganic monomeric Al levels in solution. The possibility that Al and Zn bind to different ligands on the gill surface is discussed.

INTRODUCTION

In laboratory exposures, metal mixtures have been shown to be highly toxic to fish. At neutral pH, the toxicity of such mixtures is generally additive, with each metal contributing proportionally, depending on its concentration, to the toxicity of the mixture (Pagenkopf 1983). A similar mechanism may account for the toxicity of mixtures at low pH. For example, a mixture of Al, Zn and five other metals at pH 5.8 had severe effects on the reproduction of the flagfish, *Jordanella floridae* (Hutchinson and Sprague 1986), while a mixture of eight metals, including Al and Zn, was extremely toxic to juvenile brown trout, *Salmo trutta* (Reader et al. 1989). However, in only a few cases has the accumulation of metals been examined in solutions containing mixtures of two metals. In chronic exposures (up to 100 days) performed at neutral pH, Spehar *et al.* (1978) found that Cd whole body uptake in the flagfish was not affected by the presence of Zn. Similarly, Wicklund et al. (1988) found that Cd uptake by the gills of the zebrafish *Brachydanio rerio* was comparable at different concentrations of Zn during exposures ranging from 1 to 50 days.

The free ion model (FIM) has been used to explain the interaction of metals with biological surfaces (Pagenkopf 1983, Morel and Hering 1993, Campbell 1995). The FIM holds that in order to cause a biological effect, a metal (M) must first bind to a cellular ligand (L-cell) present at the biological surface, forming a surface complex ([M-L-cell]; charges not shown for simplicity); the concentration of this surface complex then determines the extent of the biological effect. Since at equilibrium the concentration of [M-L-cell] is proportional to the concentration of the free-metal ion, M^{z+} , in solution, the biological effect should be proportional to $[M^{z+}]$ in the solution close to the biological surface. This model is a useful construct to examine the interactions between two metals, as it potentially includes competitive, additive and antagonistic relationships. Competitive effects due to binding of the cellular ligand to the major cations (Ca^{2+} , Mg^{2+}) and the proton (H^+) are also expected (Pagenkopf 1983), but can be ignored if pH and major ion concentrations are kept constant.

In a previous study in our laboratory (Roy and Campbell 1995), juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) were exposed to series of increasing concentrations of Al and a constant sub-lethal concentration of Zn at acidic low pH, under conditions representative of the low ionic strength waters found on the Canadian Precambrian Shield. We initially anticipated that Al^{3+} and Zn^{2+} , as class "A" and "borderline" cations with preferences for O^- as a donor atom, might interact at the same gill binding sites, leading to antagonism. Contrary to this prediction, zinc was shown to aggravate the toxicity of the monomeric inorganic Al, shortening survival times. This result suggests that there is minimal competition between Al^{3+} and Zn^{2+} for binding sites on the gills.

The aim of the present experiment was to test the hypothesis that Zn and Al do not compete for uptake sites on the gill, by determining whether or not the accumulation of Zn on the gills of salmon is affected by the presence of elevated concentrations of Al. Juvenile salmon were exposed at a nominal pH 4.8, to sublethal levels of Zn (1.0 to 1.6 μM) and to Al concentrations bracketing the LC_{50} (Roy and Campbell 1995), in short-term experiments. Zinc accumulation was monitored by the use of ^{65}Zn , added as a tracer. We also used techniques developed previously with Al (Wilkinson and Campbell 1993) to differentiate operationally between Zn that is tightly bound to the gills, and zinc that is bound to mucus. Experiments were conducted in soft, acidic reconstituted water, under conditions representative of those encountered in acidified watersheds on the Canadian Shield.

MATERIALS AND METHODS

Maintenance and Acclimation of Organisms, Preparation of Reconstituted Soft Water

Juvenile Atlantic salmon (average wet weight 2.2 ± 0.9 g, range 0.9 - 3.1 g) were obtained from a provincial fish hatchery (Le ministère de l'Environnement et de la Faune, Gaspé, Québec; Gaspé stock) and from a commercial aquaculture establishment (La Pisciculture Saukeb, Nouvelle, Québec; North Shore stock). Fish were acclimated for a minimum of two weeks to a reconstituted soft water (RSW), prepared by the addition of reagent grade salts to deionized water. Holding and acclimation conditions have been previously described in Roy and Campbell (1995) and are summarized as follows: volume of holding tank: 550 l; water renewal: twice daily; temperature: 10

###C, dissolved oxygen: > 95% saturation; 12 h : 12 h light-dark cycle. The reconstituted soft water had the following composition: $[Ca^{2+}]$: 44 μM ; $[Mg^{2+}]$: 62 μM ; $[Na^+]$: 143 μM ; $[K^+]$: 7 μM ; $[Cl^-]$: 7 μM $[SO_4^{2-}]$: 106 μM ; $[CO_3^{2-}]$: 143 μM ; pH 6.1 - 6.5, after aeration and temperature adjustment. RSW was used for acclimation of the organisms and for all experimentation. Fish were fed trout chow pellets (Corey Mills, Fredericton, N.B.) *ad libitum*, but were not fed for 24 h prior to an experiment.

Exposures to Al and Zn

Three experiments (1, 2 and 3) were performed involving short-term (24 h) exposures of juvenile salmon to elevated concentrations of Al and to a sublethal concentration of Zn (Table 1). Experiments involved static exposures at a nominal pH of 4.8. Test basins were prepared 24 h before adding the organisms. The pH of the chilled (10 °C) RSW was adjusted to pH 4.0 - 4.8 with 2.0 N HNO₃. Concentrations of Al were prepared by addition of an appropriate volume of an Al stock solution (1000 mg·l⁻¹ Al, pH < 4.0, prepared from Fisher reagent grade Al₂(SO₄)₃ · 18 H₂O); an appropriate volume of Zn stock solution (1000 mg·l⁻¹, BDH Inc, AAS grade) was added at the same time. The basins were aerated for 24 h and the pH was adjusted to 4.8 if necessary prior to introduction of fish. During the exposures, the pH was verified frequently and manually adjusted to maintain constant acidity. A gentle aeration was provided in all experimental basins and dissolved oxygen levels were maintained at levels > 85% saturation.

In experiment 1, exposures were conducted in 62 l test basins with 8 individual fish per basin (wet weights, mean, SD: 1.6 ± 0.3 g). Radiolabelled ⁶⁵Zn (DuPont, Wilmington, DE) was diluted with cold Zn and added as a tracer at 0.9 $\mu Ci \cdot l^{-1}$, with a concentration of 1.6 μM total Zn (specific activity of 0.6 $\mu Ci \cdot \mu mol^{-1}$; Table 1). This experiment consisted of two trials (experiments 1a and 1b) with different fish, but with the same solutions. At the conclusion of the first trial, the test basins were acidified to pH < 4, aerated for 24 h and then readjusted to pH 4.8 prior to the second introduction of fish. Since fish in the first trial may have "conditioned" their exposure medium, the two trials cannot be considered as true replicates. Five individuals from each exposure concentration were selected at random for gill dissection. With the exception of the 1.9

μM Al exposure, the gill counts from the five fish exposed to similar concentrations of Al in the two trials were subsequently shown to be statistically indistinguishable (see below); these results were thus pooled to increase the sample size. The anomalously high counts obtained in the 1.9 μM exposure in experiment 1a were discounted, and only results from experiment 1b were retained.

Experiments 2 and 3 were conducted with fresh exposure solutions and with higher specific activity (10.9 and 8.8 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$). In each experiment, twelve fish were exposed in each of the 20 l basins with 10 $\mu\text{Ci}\cdot\text{l}^{-1}$ ^{65}Zn tracer and total Zn concentrations of 1.0 μM (Table 1). Wet weights (mean \pm SD) of fish in these experiments were 2.8 ± 0.8 and 2.4 ± 1.0 g, respectively. Total Zn concentrations were slightly lower in these experiments in order to approach the average concentrations used in previous exposures (Roy and Campbell 1995).

Total Al concentrations in experiment 1 ranged from a concentration of 0.7 μM in the control tank to an acutely lethal concentration of 7.3 μM (Table 1). In experiments 2 and 3, Al levels ranged from 1.7 μM to 5.4 μM ; a ratio of Al concentrations of approximately 1:2:3 was maintained in the three exposure tanks (Figs. 1 and 2). Average background Al concentrations in the control tanks for experiments 2 and 3 were 0.8 and 0.7 μM respectively.

Chemical Equilibrium Modeling

The inorganic speciation of Al and Zn in the exposure tanks was calculated with the chemical equilibrium program MINEQL⁺ v. 2 (Schecher and McAvoy 1991). Equilibrium constants (log K) for the inorganic complexes of Al and the solubility product for $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$ were taken from Schecher and Driscoll (1987): AlOH^{2+} : 9.03; $\text{Al}(\text{OH})_2^+$: 19.33; $\text{Al}(\text{OH})_4^-$: 32.7; $\text{Al}(\text{OH})_3, \text{aq}$: 27.00; AlSO_4^+ , 3.02; $\text{Al}(\text{SO}_4)_2^-$: 4.92; $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$: 32.65. The constants were corrected for a temperature of 10 °C. Constants for the complexation of Zn were taken from NIST (1993). At pH 4.8, Zn was present predominantly (> 99 %) as the free ion, $\text{Zn}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$.

Estimates of Fractions of Bound Zn: EDTA Treatment and Blotting Techniques:

In order to measure only gill-bound metal, the loosely adsorbed portion must be removed. Extraction with EDTA (ethylenediamine-tetraacetate) has been used in the past to remove metals adsorbed to biological surfaces (Bates et al. 1983, Mason et al. 1988, Wilkinson and Campbell 1993). Preliminary experiments with juvenile salmon exposed to ^{65}Zn suggested that the loosely-bound Zn fraction associated with the gills was highly variable from fish to fish. In order to minimize this variation, salmon gills in this study were all soaked in an EDTA solution and rinsed prior to counting.

Fish exposed to gill irritants, including H^+ -ions and elevated concentrations of metals, secrete mucus as a protective measure (Mallet 1985). Exposure to Al has been shown to induce mucus production in fish gills (Jagoe et al. 1987, Muniz and Leivestad 1980), and fish mucus has been shown to bind metals such as Cd and Hg (Part and Lock 1983), Zn (Handy and Eddy 1990) and Al (Wilkinson and Campbell 1993). The latter authors developed a method to remove gill mucus, by gently wiping the tissues with glass fibre filter paper. This technique was adapted in the present study in order to control for the possible effects of different rates of mucus production in fish exposed to various elevated concentrations of Al.

The complete treatment applied to the excised gills thus involved the following steps. After 24 h, the individual fish were removed from each basin and anaesthetized in a 0.15% MS-222 solution (3-aminobenzoic acid ethyl ester, Sigma Chemicals, St. Louis, MO; pH adjusted to pH 5.0 ± 0.2). The entire gill basket was dissected and quickly rinsed in pH 5.0 RSW water before being subjected to one of the treatments described below.

(i) EDTA soaking: Gill tissue was immersed in 1.5 mL of an ice-cold 10 mM EDTA solution for 15 min, followed by a quick rinse in RSW and transfer to a pre-weighed centrifuge tube. The EDTA treatment was intended to extract loosely-bound exchangeable Zn from the gill surface, the remaining zinc being considered as Zn associated with mucus and as metal tightly bound to the gill («mucus + tightly bound Zn»).

(ii) Blotting : Gill tissue was gently wiped with glass fibre filter paper (GF/C, Whatman Paper Co, Maidstone, UK) to remove mucus, before transfer to a centrifuge tube. This treatment was intended to remove Zn sequestered by mucus, the remaining metal being considered as «tightly bound Zn».

In experiment 1, the entire gill was subjected to treatment (i) only. In experiments 2 and 3, gills were subjected to both treatments in sequence. Following the EDTA treatment, the gill basket was dissected and one half-gill was placed in a pre-weighed centrifuge tube. The other half-gill was subjected to blotting before transfer to a second centrifuge tube. Thus, in experiment 1 gill counts reflect the sum of «mucus + tightly bound Zn»; in experiments 2 and 3 «mucus bound» and «tightly bound» Zn are accounted for separately.

The sampling order of the basins was switched in experiments performed at the same time (experiments 1a and 1b; experiments 2 and 3), so that control basins were sampled first in one case and last in another. In all experiments, fish were sampled from the holding tank, exposed to an overdose of MS-222 and the gills excised. The excised gills were briefly rinsed in RSW, weighed and then counted for background counts.

Counting

After each treatment, gill tissues were freeze-dried and weighed. In most cases, the freeze-drying process left a level compact lyophilized powder at the bottom of the centrifuge tube. If necessary, the powder was displaced to the bottom of the centrifuge tubes by gently tapping the tubes, or by using a clean stainless steel probe to gently pat the powder into position. The tube was carefully placed into a counting cylinder, which confined the centrifuge tube in a vertical position, and then counted.

Gills were counted on an LKB gamma counter for 30 min, with a maximum error of < 4%. The background counts (32-34 cpm) were consistently low for individual fish in each experiment and among the three experiments. Gills from fish exposed to ^{65}Zn had counts that were significantly greater than background in all cases (ANOVA, $p < 0.05$). The background counts

were subtracted from the experimental counts and the latter then divided by the gill weight to obtain $\text{cpm Zn}\cdot\text{g}^{-1}$ gill.

Statistics

As the variances were unequal, the data were log-transformed (as $\log X+1$) before statistical comparisons were performed. Prior to pooling, gill Zn counts in individuals exposed to similar concentrations of Al in the two trials in experiment 1 were compared with a t-test. With one exception, there were no significant differences in counts from fish exposed to the same levels of Al ($p > 0.05$). The exception was the $1.9 \mu\text{M}$ Al exposure, where anomalously high Zn counts were observed in all fish from the first trial (experiment 1a). Gill counts from this trial were excluded and only counts from experiment 1b were retained (see below). In experiments 2 and 3, counts of «mucus + tightly bound Zn», and «tightly bound Zn» for gills from fish exposed to the same Al concentration were compared with a one way t-test for paired samples. Counts of either the EDTA-soaked (mucus + tightly bound Zn), or the EDTA-soaked and blotted gills (tightly bound Zn) at the various Al treatments were compared separately with an Analysis of Variance (ANOVA) followed by the *a posteriori* least significant differences (LSD) test.

Metal Sampling and Analysis

The exposure tanks were sampled during the exposure periods to monitor the concentrations of Al and Zn. All samples destined for metal analysis were handled and stored using acid-washed polypropylene plasticware. Al was measured colorimetrically as total monomeric Al using an automated technique based upon the reaction of Al with pyrocatechol violet, to form a complex which absorbs at 590 nm (Rogeborg and Henriksen 1985). Background Al in the control tanks ranged from less than the detection limit ($\approx 0.1 \mu\text{M}$) to $0.8 \mu\text{M}$. Total zinc was measured by flame atomic absorption. Three samples for Zn analysis were taken from each basin in experiment 1 and only one each in experiments 2 and 3. Samples were preserved with 0.05% trace metal grade HNO_3 . Zinc concentrations in the RSW were consistently below the instrument detection limit of $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

RESULTS

Mucus + tightly bound Zn - Experiment 1

In experiment 1, for exposures to 3.2, 5.1 or 5.8 μM Al, levels of Zn associated with the gills were similar to those in the control fish exposed to Zn only (Table 2). Gills from the 1.9 μM Al exposure in experiment 1a were anomalously high and variable. These counts were significantly higher than counts at the same Al exposure in experiment 1b, and were indeed significantly higher than those obtained in any of the other exposures (ANOVA, $p < 0.05$). Since levels of Zn on gills of fish in experiment 1b were not significantly different than control fish (Table 2), and since subsequent exposures of fish in experiments 2 and 3 to Al in this concentration range do not show this anomaly, we discounted the high values in experiment 1a.

Significantly less Zn was associated with gills at the two highest nominal concentrations of Al, 9.2 and 7.3 μM ($p < 0.05$, Table 2). The measured concentrations of monomeric Al in the nominal 9.2 μM exposure were only 5.4 μM , however, suggesting that there had been some loss of monomeric Al at this exposure concentration. Equilibrium modeling calculations with $\log K_{so} = 32.65$ for the controlling solid phase $(\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s}))$ indicated that most of the Al at a concentration of 9.2 μM should be present as inorganic monomeric Al. A more conservative calculation using the constant for synthetic gibbsite ($\log K_{so} = 33.95$) indicated that the solution was over-saturated with respect to this solid phase. If oversaturation did occur, colloidal hydroxy-aluminum polymers may well have formed, leading to a decrease in measurable monomeric Al. To avoid the potential complications occasioned by the presence of non-monomeric Al, the highest concentration of added Al was set at $\leq 6.0 \mu\text{M}$ in the subsequent experiments (2 and 3).

Mucus + tightly bound Zn - Experiments 2 and 3:

In experiments 2 and 3, the gills from Al-exposed fish had levels of Zn that were greater than or equal to those on gills of fish in the control Zn exposures without Al. In experiment 2, values for «mucus + tightly bound Zn» accumulated by the gills of fish in the 2.2, 4.2 and 5.6 μM Al exposures were greater than those for gills from the control fish ($p < 0.05$, Fig. 1). The levels of

«tightly bound Zn» on gills in the Al exposures in this experiment were also significantly greater than on control gills ($p < 0.05$, Fig. 1).

In experiment 3, levels of «mucus + tightly bound Zn» accumulated by the gills of fish in the 1.4 and 4.7 μM Al exposures were not significantly different than those on gills from the controls ($p > 0.05$, Fig. 2). Gills from the 3.6 μM Al exposure had significantly more «mucus + tightly bound Zn» accumulation than did gills from the 1.4 μM and control exposures ($p < 0.05$, Fig. 2). However, after the blotting procedure, all values of «tightly bound gill Zn» in this experiment were comparable ($p > 0.05$, Fig. 2).

The levels of «mucus + tightly bound Zn» on gills in experiments 2 and 3 were converted into $\mu\text{g Zn}\cdot\text{g}^{-1}$ gill dry weight, calculated using a counting efficiency of 9% (Hare et al. 1991), the measured specific activity of ^{65}Zn in solution, and the measured levels of total Zn (AAS) in the exposure tanks (Table 1, Figs. 1 and 2). For the Al-exposed fish, concentrations of zinc associated with gills and mucus varied between 0.09 and 0.18 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Zn (Table 3) whereas in control Zn exposures without Al the accumulation of Zn on the gills was $\approx 0.06 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

A moderate proportion of gill Zn is removed by the blotting procedure - approximately 20-40% of the non-EDTA extractable Zn (Figs. 1 and 2). In experiment 2, counts of «mucus + tightly bound Zn» were significantly greater than «tightly bound Zn» at the same Al concentration in the 5.6 μM , 2.2 μM and control exposures ($p < 0.05$, Fig. 1). In experiment 3, «mucus + tightly bound Zn» was significantly greater than «tightly bound Zn» only for the 4.7 μM exposure ($p < 0.05$, Fig. 2). A considerable amount of a mucus-like substance was visible on the filters during the blotting procedure, suggesting that most of this removable fraction was mucus-bound Zn, together with some cell debris and blood.

We estimated the amount of mucus removed by the blotting procedure used in this study by calculating the average difference in weights between the EDTA-soaked and the blotted gill halves from experiments 2 and 3. The average difference in weights was ≈ 2.6 mg gill dry weight, and this corresponded to an average difference in accumulated Zn between the soaked and blotted

gill halves of $0.03 \mu\text{g Zn}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight. If the weight difference is assumed to consist mainly of mucus, the mucus contained approximately $0.01 \mu\text{g Zn}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight. This is probably an underestimate, since the EDTA soaking may have removed some of the Zn originally bound to the mucus.

DISCUSSION

Variability of Zn accumulation

The Zn counts in all of the experiments showed a high degree of variability (coefficients of variation of $\approx 50\%$; Table 2, Figs. 1 and 2). This variability was of a similar magnitude for counts of EDTA-soaked («mucus + tightly bound gill Zn») and for EDTA-soaked and blotted gills («tightly bound gill Zn») in experiments 2 and 3. Several factors may have contributed to this variability:

- Low levels of accumulated Zn: The short exposure times (24 h) and low ambient Zn concentrations ($0.9 - 1.6 \mu\text{M}$) used in the present experiments resulted in relatively low levels of Zn accumulation: coefficients of variation often increase at low levels of accumulation.
- Variable mucus secretion: The variability in counts of «mucus + tightly bound Zn» may be partially due to dissimilar rates of mucus secretion at the different concentrations of ambient Al. However, if this were the case the variability would be expected to be more important for «mucus + tightly bound Zn» than for «tightly bound Zn» alone; as mentioned above, the observed variability was similar for both gill treatments.
- Variable losses of gill plasma: On exposure of rainbow trout to Zn, the plasma rapidly accumulates Zn (Lovegrove and Eddy 1982, Spry and Wood 1988, 1989). Variable amounts of plasma may have been lost from individual gills during bisection and blotting, which would contribute to the variability observed in counts of «tightly bound Zn».

Note, however, that the variability encountered in the present study is in the same range as that reported (when it has been reported) in other short term (≤ 24 h) exposures to ^{65}Zn : whole body accumulation in stickleback, *Gasterosteus aculeatus* - Matthiesen and Brafield (1977); in channel catfish - Bentley (1992); accumulation in rainbow trout gills - Handy and Eddy (1990).

Role of mucus

At elevated exposure concentrations, both Al and Zn have been shown to stimulate mucus production by fish gills (Al: Schofield and Trojnar 1980, Muniz and Leivestad 1980, Handy and Eddy 1989, Zn: Eddy and Fraser 1982). Fish mucus has been shown to bind metals such as Cd and Hg (Part and Lock 1983), Zn (Handy and Eddy 1990) and Al (Wilkinson and Campbell 1993).

In the present experiments, 20 to 40% of the Zn originally associated with the gills was removed by the blotting procedure, i.e., was presumably bound to mucus (Figs. 1 and 2). The zinc content of the gill mucus was low, approximately $0.01 \mu\text{g Zn}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight. In contrast to this modest role in the short-term accumulation of Zn, mucus constitutes a major compartment for the accumulation of gill Al. In comparable short-term (24 h) exposures of juvenile Atlantic salmon to inorganic Al at pH 4.5, >90% of the aluminum associated with the gills could be removed by blotting (Wilkinson and Campbell 1993). For example, after an exposure to $7 \mu\text{M Al}$ for 24 h, total gill Al (EDTA soaked) was $\approx 250 \mu\text{g g}^{-1}$ dry weight; after the blotting and soaking procedure, the remaining Al was only $\approx 20 \mu\text{g g}^{-1}$ dry weight. As a metal-complexing ligand, mucus consists of predominantly O^- donor groups (Handy 1989), and therefore is likely to have an appreciable affinity for Class A cations like Al^{3+} , but somewhat less affinity for borderline cations such as Zn^{2+} . Indeed, given their differences in charge/radius ratios (z/r), one would predict that Al would have a greater affinity for mucus than Zn.

Gill Zn Accumulation - Absence of Al

In the present study the accumulation of Zn on the gills was $0.05 - 0.06 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in control Zn exposures without Al (Figs. 1 and 2). These gill Zn levels are considerably less those cited in other reports, which normally include some readily exchangeable, loosely bound Zn; this latter fraction was removed by the EDTA soaking procedure in our experiments. For example, Bradley and Sprague (1985) measured gill Zn levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acutely toxic exposures ($[\text{Zn}] = 93 \mu\text{M}$) conducted with at pH 5.5 in low hardness water ($30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ as CaCO_3). Under these conditions, for fish sampled shortly before death, the average gill Zn levels were $\approx 370 \mu\text{g Zn g}^{-1}$ dry weight. This level of accumulated Zn is three to four orders of

magnitude greater than that observed in our study, which used much lower exposure levels of Zn. For Zn concentrations similar to those used in our study (2.3 μM), with rainbow trout exposed at pH 7.9-8.2, Hogstrand et al. (1994) measured gill Zn levels of 75 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ wet weight ($\approx 250 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight, assuming a gill water content of 70 %) after 60 d exposure. While these levels of gill Zn may include a considerable amount of loosely adsorbed metal, it appears that at higher exposure concentrations, and/or prolonged exposure times, gill Zn accumulation increases substantially.

The levels of «mucus + tightly bound Zn» in gills of control fish in experiments 2 and 3, which were not exposed to Al, were not significantly different ($p < 0.05$, Figs. 1 and 2). However, the concentrations of «mucus + tightly bound Zn» ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) for gills from control fish in experiments 2 and 3 were considerably lower than those for gills of control fish in experiment 1 (Table 2, Figs. 1 and 2). Zn accumulation is influenced by fish weight, larger fish having been shown to accumulate less Zn (Bradley and Sprague 1985, Memmerst 1987, Newman and Mitz 1988). Average weights of fish used in experiment 1 (1.6 g) were less than those in experiments 2 and 3 (2.4 - 2.8 g), and this difference in weights may account for the difference in Zn accumulation. In addition, exposures in experiment 1 were conducted in larger volumes (60 l) than in experiments 2 and 3 (20 l). Fish in experiment 1 were possibly more active and may have accumulated a greater amount of Zn as a result.

Gill Zn Accumulation - Presence of Al

Within the limitations imposed by the inherent variability of the gill Zn measurements, we found no evidence for competition between Al and Zn for the same binding sites on salmon gills. This tendency is also apparent when the free ion concentrations of the two metals in the exposure tanks are compared. We calculated the concentration of the free ion, Al^{3+} , present in the bioassay tanks in experiments 2 and 3 ($\approx 42\%$ at pH 4.8). In experiment 2, the concentrations of Al^{3+} in the exposure tanks were 2.6, 1.8 and 0.9 μM ; while in experiment 3, they were 2.0, 1.5 and 0.6 μM . In these experiments, total Zn concentrations were 0.9-1.0 μM , and most of the Zn was present as Zn^{2+} at pH 4.8. Thus, at the lowest Al exposures, the concentrations of the two free

ions, Al^{3+} and Zn^{2+} were almost identical, yet the gill accumulation of Zn was clearly not dependent on the concentration of Al^{3+} (Figs. 1 and 2).

Our results suggest that Zn and Al do not compete for similar binding sites at pH 4.8 at the realistic concentrations of Zn used in this study: the accumulation of Zn on the gills of fish exposed simultaneously to Al and Zn was greater than or equal to Zn accumulation in solutions only containing Zn (Table 2, Figs. 1 and 2). A similar finding was reported by Bentley (1992), who exposed channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to 1 μM Zn and an elevated concentration of Al (10 μM) at pH 5.0 in soft water (0.1 mM Ca^{2+}). In this latter study, the rate of zinc uptake, measured in the whole body, was not different in fish exposed to Zn only or to Al and Zn. The gill accumulation of metals in mixtures of Zn and other metals may follow a similar pattern of independence. In experiments with the zebrafish (*Brachydanio rerio*) exposed to mixtures of Zn and Cd (Cd: 0.009 μM ; Zn: 0.15 μM), gill accumulation of Cd was not influenced by the presence of Zn (Wicklund et al. 1988).

The results of the present study are in agreement with our earlier toxicity studies, which showed that rather than compete with Al (and thus attenuate Al toxicity), Zn tended to aggravate Al toxicity. The concentrations of Al used in this study bracketed acutely toxic levels for juvenile Atlantic salmon at this pH (LC_{50} at pH 4.8 = 3 - 4 μM ; Roy and Campbell 1995). Fish exposed for 96 -120 h to these concentrations of Al and a similar concentration of Zn (1.2 μM) did not survive as long as fish exposed to Al only. The absence of competition between Zn and Al is consistent with the reduced survival times observed in Al-Zn mixtures at low pH.

As shown in the present study, Zn accumulation within the gills, and possibly its uptake into the body, is unchanged at elevated levels of Al. The toxic effects of Zn on the gill, such as the disruption of Ca uptake that has been shown to occur at similar levels of Zn in neutral soft water (Hogstrand et al. 1993), would constitute an added stress to an organism exposed to Al. The effects on fish gills of exposure to elevated levels of Al at low pH have been well documented with several species of salmonids, and include disruption of ionoregulation (Wood and McDonald 1987, Potts and McWilliams 1989) and respiratory toxicity (at pH >5.0; Neville 1985, Playle et al.

1989). The additional stress of sub-lethal exposure to Zn causes fish to succumb at an earlier time than those organisms exposed to identical concentrations of Al only.

In conclusion, gill accumulation of Zn was independent of Al concentration in joint exposures at pH 4.8. A significant proportion of Zn appeared to be bound by mucus, though this proportion was less than mucus-bound Al determined in similar studies. It is possible that the two metals bind to different sites on the gill, or that the number of metal-binding sites on the gill is not limited, permitting independent binding and an additive toxicity. Our results emphasize the importance of mucus in the gill accumulation of metals and they can partially explain the increased toxicity observed in mixtures of the two metals at low pH.

REFERENCES

Bates SS, Letourneau M, Tessier A, Campbell PGC (1983) Variation in zinc adsorption and transport during growth of *Chlamydomonas variabilis* (Chlorophyceae) in batch culture with daily addition of zinc. *Can J Fish Aquat Sci* **40**: 895-904

Bentley PJ (1992) Influx of zinc by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): uptake from external environmental solutions. *Comp Biochem Physiol* **101C**: 215-217

Bradley RW, Sprague JB (1985) Accumulation of zinc by rainbow trout as influenced by pH, water hardness and fish size. *Environ Toxicol Chem* **4**: 685-694

Campbell PGC (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the Free-Ion Activity Model. In: Tessier A, Turner DR (eds) *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. J Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, p. 45

Eddy FB, Fraser JE (1982) Sialic acid and mucus production in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) in response to zinc and seawater. *Comp Biochem Physiol* **73C**: 357-359

Handy, RD (1989) The ionic composition of rainbow trout body mucus. *Comp Biochem Physiol* **93A**: 571-575

Handy RD, Eddy FB (1989) Surface absorption of Al by gill tissue and body mucus of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at the onset of episodic exposure. *J Fish Biol* **34**: 865- 874

Handy RD, Eddy FB (1990) The influence of starvation on waterborne zinc accumulation by rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at the onset of episodic exposure in neutral soft water. *Water Res* **24**: 521-527

- Hare L, Saouter E, Campbell PGC, Tessier A, Ribeyre F, Boudou A (1991) Dynamics of cadmium, lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* (Ephemeroptera) and the environment. *Can J Fish Aquat Sci* **48**: 39-47
- Hogstrand C, Wilson RW, Polgar D, Wood CM (1994) Effects of zinc on the kinetics of branchial calcium uptake in freshwater rainbow trout during adaptation to waterborne zinc. *J Exp Biol* **186**: 55-73
- Hutchinson NJ, Sprague JB (1986) Toxicity of trace metal mixtures to American flagfish (*Jordanella floridae*) in soft acid waters and implications for cultural acidification. *Can J Fish Aquat Sci* **43**: 647-655
- Jago CH, Haines TA, Buckler DR (1987) Abnormal gill development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry exposed to aluminium at low pH. *Ann Soc Roy Zool Belge* **117** (Suppl.1): 375-386
- Lovegrove SM, Eddy B (1982) Uptake and accumulation of zinc in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Environ Biol Fish* **7**: 285-289
- Mallet J (1985) Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can J Fish Aquat Sci* **42**: 630-648
- Mason AZ, Jenkins KD, Sullivan PA (1988). Mechanisms of trace metal accumulation in the polychaete *Neanthes arenaceodentata*. *J Mar Biol Ass U K* **68**: 61-80
- Matthiessen P, Brafield AE (1977) Uptake and loss of dissolved Zn by the stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *J Fish Biol* **10**: 399-410
- Memmert U (1987) Bioaccumulation of zinc in two freshwater organisms (*Daphnia magna*, Crustacea and *Bracydanio rerio*, Pisces) *Water Res* **21**: 99-106

- Morel FMM, Hering JG (1993) Principles of Aquatic Chemistry, 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York
- Muniz IP, Leivestad H (1980) Toxic effects of aluminum on the brown trout, *Salmo trutta*. In: Drablos D, Tollen A (eds) Proceedings of an International Conference on the Ecological Impacts of Acidic Precipitation. SNSF Project, Oslo, Norway, p. 320
- Neville CM (1985) Physiological response of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to acid and aluminum - prediction of field responses from laboratory data. Can J Fish Aquat Sci 42: 2004 - 2019
- Newman MC, Mitz SV (1988) Size dependence of zinc elimination and uptake from water by mosquitofish *Gambusia affinis* (Baird & Girard). Aquat Toxicol 12: 17-32
- NIST (1993) Critical Stability Constants of Metal Complexes Database. NIST Standard Reference Database 46, version 1.0. US Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Data Program, Gaithersburg, MD 20899
- Pagenkopf GK (1983) Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness. Environ Sci Technol 17: 342-347
- Part P, Lock RAC (1983) Diffusion of calcium, cadmium and mercury in a mucous solution from rainbow trout. Comp Biochem Physiol 76C: 259-263
- Playle RC, Goss GG, Wood CM (1989) Physiological disturbances in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during acid and aluminum exposures in soft water of two calcium concentrations. Can J Zool 67: 314-324

- Potts WTW, McWilliams PG (1989) The effects of hydrogen and aluminium ions on fish gills. In: Morris R, Taylor EW, Brown DJA, Brown JA (eds) *Acid Toxicity and Aquatic Animals*. Society for Experimental Biology Seminar Series, vol 34, Cambridge University Press, Cambridge, p. 201
- Reader JP, Everall NC, Sayer MDJ, Morris R (1989) The effects of eight trace metals in acid soft water on survival, mineral uptake and skeletal calcium deposition in yolk-sac fry of brown trout, *Salmo trutta* L. *J Fish Biol* **35**: 187-198
- Rogeberg EJS, Henriksen A (1985) An automatic method for fractionation and determination of Al species in fresh-waters. *Vatten* **41**: 48-53
- Roy RL, Campbell PGC (1995) Survival time modeling of exposure of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) to mixtures of Al and Zn in soft water at low pH. *Aquat Toxicol* **33**: 155-176
- Schecher WD, Driscoll CT (1987) An evaluation of uncertainty associated with aluminum equilibrium calculations. *Water Resour Res* **23**: 525-534
- Schecher WD, McAvoy DC (1991) MINEQL⁺ a chemical equilibrium program for personal computers, version 2.22. Environmental Research Software, Hallowell, ME and the Proctor & Gamble Company, Cincinnati, OH
- Schofield CL, Trojnar JR (1980) Aluminum toxicity to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in acidified waters. In: Toribara Y, Miller MW, Morrow PE (eds), *Proceedings of a Conference on Polluted Rain*. Plenum Press, New York, p. 341
- Spehar RL, Leonard EN, DeFoe DL (1978) Chronic effects of cadmium and zinc mixtures on flagfish (*Jordanella floridae*). *Trans Am Fish Soc* **107**: 354-360
- Spry DJ, Wood CM (1988) Zinc influx across the isolated perfused head preparation of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in hard and soft water. *Can J Fish Aquat Sci* **45**: 2206-2215

Spry DJ, Wood CM (1989) A kinetic method for the measurement of zinc influx *in vivo* in the rainbow trout and the effects of waterborne calcium on flux rates. *J Exp Biol* 142: 425-446

Wicklund A, Runn P, Norrgren L (1988) Cd and Zn interactions in fish: effects of Zn on the uptakeorgan distribution, and elimination of ¹⁰⁹Cd in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch Environ Contam Toxicol* 17: 345-354

Wilkinson KJ, Campbell PGC (1993) Aluminum bioconcentration at the gill surface of juvenile Atlantic salmon in acidic media. *Environ Toxicol Chem* 12: 2083-2095

Wood CM, McDonald DG (1987) The physiology of acid/aluminum stress in trout. *Annls Soc R Zool Belg* 117 (Suppl 1): 399-410

Table 2-1. Experimental conditions in exposures of salmon to ^{65}Zn and concentrations of Al.				
Experiment	[Al], μM (range)	pH mean (n, \pm SD)	[Zn], μM mean (n, \pm SD)	^{65}Zn , ($\mu\text{Ci}\cdot\text{l}^{-1}$) mean (n, \pm SD)
1	0.7 - 7.3	4.9 (42, 0.1)	1.6 (14, 0.1)	0.9 (21, 0.1)
2	0.8 - 5.4	4.8 (60, 0.2)	0.9 (4, 0.1)	10.8 (4, 0.2)
3	0.7 - 4.7	4.8 (72, 0.2)	1.0 (4, 0.1)	9.1 (4, 0.2)

Table 2-2. Mean accumulation (\pm SD) of «mucus + tightly bound Zn» on gills of salmon exposed to Zn and Al in experiment 1. Zn counts with the same letter (a, b, c) are not significantly different by ANOVA at $p = 0.05$ ($n = 10$).

[Al], μM	^{65}Zn ($\text{cpm}\cdot\text{g}^{-1}$ gill tissue) ^a	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$ gill tissue)
5.4 ± 0.5 (9.2^{b})	1135 ± 821 a	0.6 ± 0.5
7.3 ± 0.3	2270 ± 870 b	1.3 ± 0.5
5.8 ± 0.2	4710 ± 1500 c	2.7 ± 0.8
5.1 ± 0.3	5180 ± 2290 c	2.9 ± 1.3
3.2 ± 0.2	5630 ± 3130 c	3.2 ± 1.8
$1.9 \pm 0.3^{\text{c}}$	6110 ± 2830 c	3.5 ± 1.6
0.7 ± 0.2	5720 ± 2300 c	3.2 ± 1.3

^a background count subtracted

^b nominal Al concentration

^c $n = 5$

Table 2-3. Zinc concentrations ($\mu\text{g Zn}\cdot\text{g}^{-1}$ gill tissue, \pm SD, $n = 12$) associated with gills of Atlantic salmon exposed concurrently to $1.0 \mu\text{M}$ of Zn and various [Al] in experiments 2 and 3. Zn accumulation was calculated from values of mean $\text{cpm}\cdot\text{g}^{-1}$ gill tissue as described in the text.

		Experiment 2				Experiment 3		
Al^{3+} μM	mucus-bound + tightly-bound Zn	tightly bound Zn	proportion tightly bound Zn	Al^{3+} μM	mucus-bound + tightly-bound Zn	tightly bound Zn	proportion tightly-bound Zn	
2.6	0.12	0.10	0.8	2.0	0.11	0.09	0.8	
1.8	0.11	0.07	0.6	1.5	0.18	0.10	0.6	
0.9	0.10	0.08	0.8	0.6	0.09	0.07	0.8	
control	0.06	0.04	0.7	control	0.06	0.05	0.8	

Figure 2-1. Mean ^{65}Zn counts ($\text{cpm}\cdot\text{g}^{-1}$ gill tissue, \pm SD, background counts subtracted, $n = 12$) in gill tissues of Atlantic salmon exposed concurrently to $1.0\ \mu\text{M}$ of Zn and various [Al] in experiment 2. «Mucus + tightly bound Zn» counts on gills were obtained after the EDTA treatment and «tightly bound Zn» after the blotting treatment, as described in the text. Zn counts at the same Al concentration were compared with a one way t-test. Zn counts at different Al exposures were compared with ANOVA. Values with the same letter (ANOVA: a, b,; t-test: x, y) are not significantly different at $p = 0.05$.

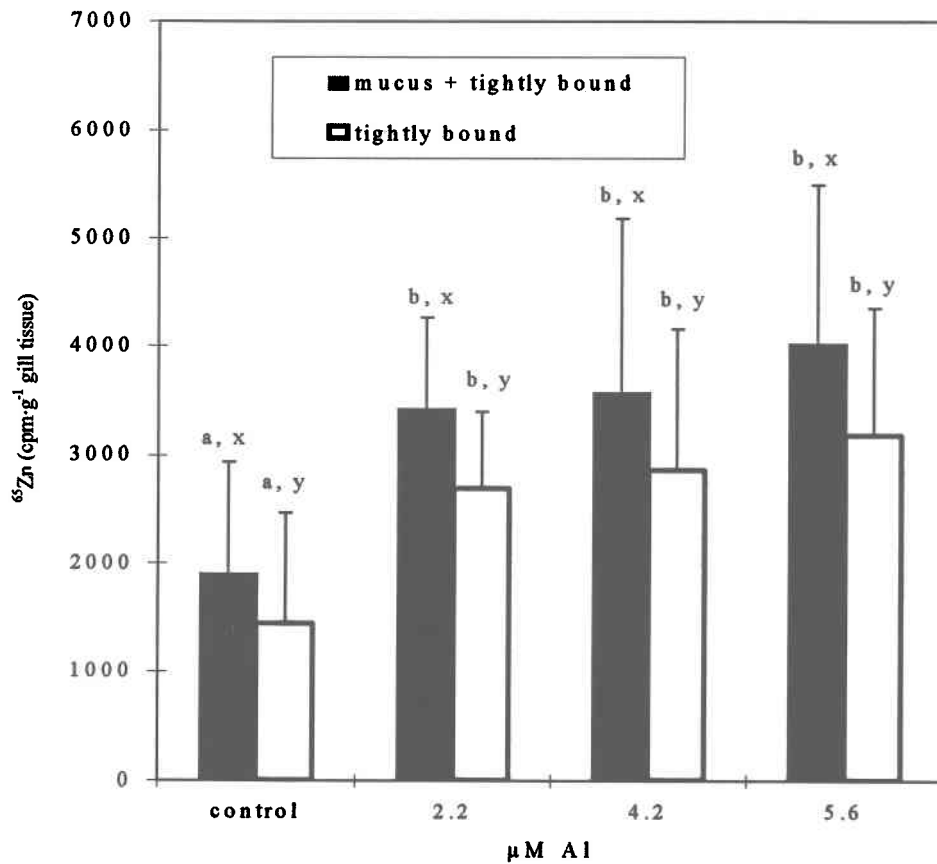
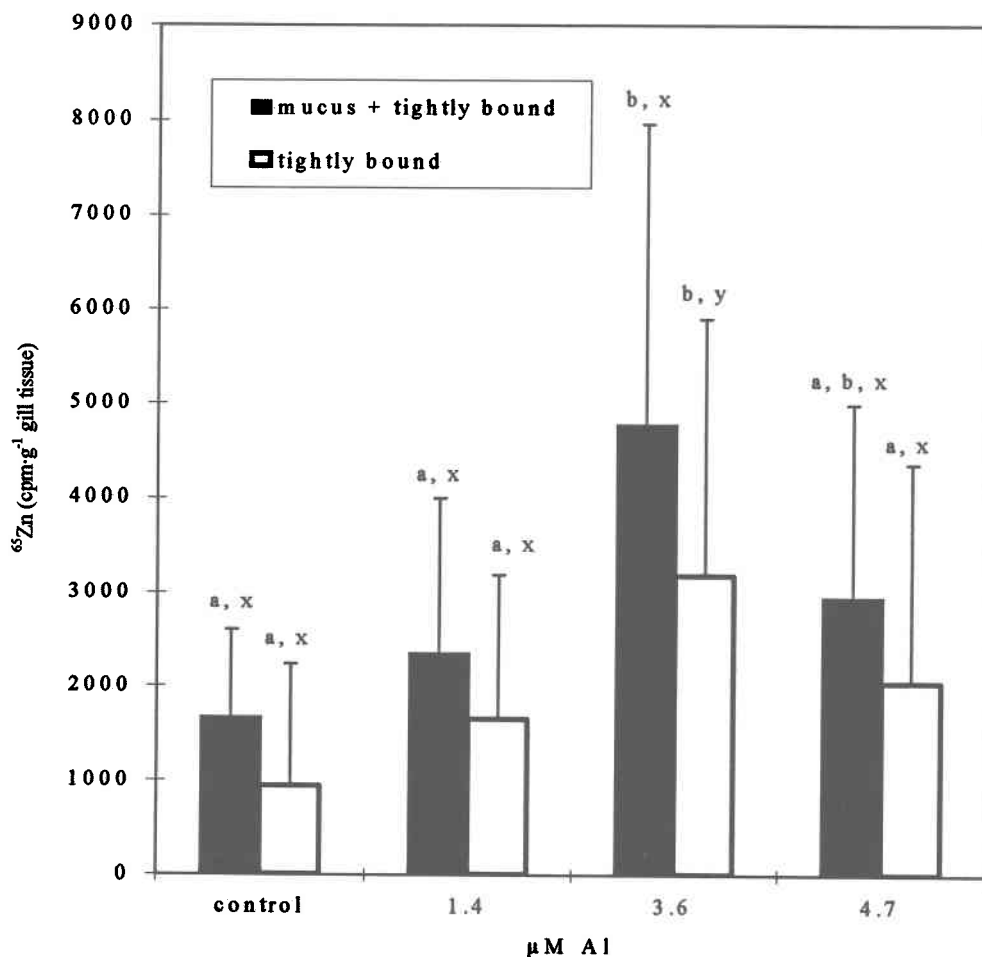


Figure 2-2. Mean ^{65}Zn counts ($\text{cpm}\cdot\text{g}^{-1}$ gill tissue, \pm SD, background counts subtracted, $n=12$) in gill tissues of Atlantic salmon exposed concurrently to $1.0\ \mu\text{M}$ of Zn and various [Al] in experiment 3. «Mucus + tightly bound Zn» counts on gills were obtained after the EDTA treatment and «tightly bound Zn» after the blotting treatment, as described in the text. Zn counts at the same Al concentration were compared with a one way t-test. Zn counts at different Al exposures were compared with ANOVA. Values with the same letter (ANOVA: a, b; t-test: x, y) are not significantly different at $p = 0.05$.



CHAPITRE 3

Decreased toxicity of Al to juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*)
in acidic soft water containing natural organic matter:
a test of the Free-Ion Model

(accepté par *Environmental Chemistry and Toxicology*)

Robert L. Roy and Peter G. C. Campbell*

ABSTRACT

Toxicological experiments were designed to test the predictions of the Free-Ion Model (FIM) in a soft, acidic water containing Al and a natural fulvic acid (FA). Juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) were exposed to Al in either inorganic or organic acidic soft waters, at pH 5.0, and LC₅₀ values were determined for both exposure solutions. Contrary to the predictions of the FIM, the LC₅₀s, expressed as inorganic Al (Al_i), were significantly higher ($p < 0.05$) in the organic solution (6.1 to 8.0 $\mu\text{M Al}_i$) than in the inorganic medium (2.9 to 4.0 $\mu\text{M Al}_i$). Pre-exposure of the fish to a 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fulvic acid solution at pH 5.0, without Al, did not protect the animals from a subsequent Al challenge in solutions without fulvic acid. A regression model related mortality with Al_i and total organic carbon (TOC) and was highly significant (proportion mortality (arc-sine) = $-0.215 + (0.81) \log(\text{Al}_i) - (0.44) \text{TOC}$; $p < 0.0001$, $R^2 = 0.71$). We conclude that natural fulvic acid may play an independent protective role in solutions containing Al, in addition to that of decreasing Al toxicity by complexation of the metal and reducing the free Al³⁺ concentration.

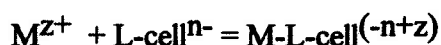
Key words: Inorganic monomeric Al; Toxicity; Atlantic salmon; Free ion model; Fulvic acid.

INTRODUCTION

During periods of snowmelt, many rivers on the Canadian Shield are subjected to a pulse of acidic water. For example, in Atlantic salmon rivers along the Quebec North Shore, spring runoff is associated with decreases in river pH and increases in the levels of dissolved Al and dissolved organic carbon [1]. Fulvic and humic acids account for much of the dissolved organic carbon in these rivers, and a high proportion of the Al is present as dissolved organic complexes. These rivers are an important habitat for Atlantic salmon (*Salmo salar*), in particular juvenile salmon parr, at this time of year. The presence of elevated concentrations of Al may pose a threat to these particular salmon populations, as is the case in other salmon rivers [2, 3].

It is well established that dissolved organic matter (DOM) influences the speciation and bioavailability of metals [4], in particular that of Cu. For example, at neutral to near neutral pH, the presence of DOM has been shown to reduce the toxicity of Cu to coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* [5]), to Atlantic salmon [6], and to *Daphnia magna* [7]. At low pH, natural DOM from lake water reduces copper toxicity to the fathead minnow (*Pimephales promelas* [8]), and the toxicity of a mixture of metals (Al, Cu, Zn) to the flagfish *Jordanella floridae* [9]. These studies all support the idea that natural DOM acts as a ligand, reducing toxicity by metal complexation in a similar manner to synthetic organic ligands such as EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid; e.g., see [10]).

The free-ion model (FIM) has been successful in explaining the reduction in toxicity that occurs due to the complexation of metals by inorganic and simple organic ligands. The FIM suggests that the toxicity of a metal is determined by the concentration of the free or aquo ion -- $M(H_2O)^{z+}$ or M^{z+} for simplicity [11, 12]. To cause a biological effect, the metal must first interact with a ligand on the cell membrane (L-cell) to form a surface complex (M^{z+} -L-cell):



The biological response is predicted to be proportional to the concentration of the surface complex, $[M-L-cell^{(-n+z)}]$, which is in turn determined by the concentration of M^{z+} in the exposure solution. The FIM implicitly assumes that hydrophilic metal-DOM complexes will not be able to cross biological barriers and thus will not contribute directly to the toxicity of the metal.

As in the case of Cu, the toxicity of Al appears to be reduced or eliminated in the presence of organic ligands in laboratory exposures. This anticipated effect has been demonstrated qualitatively in studies with citric acid (white sucker, *Catostomus commersoni* [13, 14]), salicylic or oxalic acids (Atlantic salmon fry [15]), humic acid (brook trout, *Salvelinus fontinalis* [16]), and fulvic acid (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [17, 18]). However, none of these studies have quantitatively demonstrated that the reduction in toxicity could be explained by the decrease in concentration of inorganic monomeric Al alone, without invoking the effects of other experimental variables. It is important to note that the Free-Ion Model predicts that natural DOM reduces the toxicity of Al solely by metal complexation, i.e. by reducing the concentrations of Al^{3+} in solution.

Given the omnipresence of DOM in natural waters, its multiple roles in controlling metal toxicity, and the potential importance of these for the toxicity of Al in natural waters, we undertook to investigate the toxicity of Al to fish in synthetic solutions containing natural DOM. The aim of these experiments was to test the predictions of the Free-Ion Model in a soft acidic water containing Al and DOM. Experiments involved the exposure of juvenile Atlantic salmon to a range of Al concentrations in either inorganic or organic acidic soft waters at a controlled pH of 5.0. Aluminum speciation was determined in both exposure media, using two independent analytical techniques, in order to be able to express the LC_{50} s in comparable terms. If the Free-Ion Model applies, the LC_{50} , expressed as Al^{3+} or as monomeric inorganic Al, should not differ for the two conditions at the same pH.

Salmon were also acclimated to an acidic DOM solution without Al for a short period, transferred to DOM-free media, and then challenged by exposure to a range of inorganic Al concentrations. This procedure was designed to determine if the protective effect of the DOM remained after transfer of the fish to a fresh inorganic exposure medium.

MATERIALS AND METHODS

Maintenance and acclimation of organisms, preparation of reconstituted soft water (RSW)

Juvenile Atlantic salmon (average wet weight 1.8 ± 0.8 g, range 0.9 to 3.1 g) were obtained from a provincial fish hatchery (formerly known as the Ministère de Loisir, Chasse et Pêches, Gaspé, QC, Canada) and from a commercial aquaculture establishment (La Pisciculture Saukeb, Nouvelle, Gaspé, QC, Canada). The stocks of salmon originated from rivers of the Gaspé (MLCP) and North Shore (La Pisciculture Saukeb) regions of Québec. The holding and acclimation conditions for the organisms have been previously described [19]. Briefly, fish were maintained in a 550 L holding tank, with daily renewal of the water. Holding conditions were as follows: Temperature: 10 °C, dissolved oxygen >95% saturation, and a 12 h : 12 h light-dark cycle. A reconstituted soft water (RSW) was prepared by the addition of reagent grade salts to deionized water ($[\text{Ca}^{2+}]$: 44 μM ; $[\text{Mg}^{2+}]$: 62 μM ; $[\text{Na}^+]$: 143 μM ; $[\text{K}^+]$: 7 μM ; $[\text{Cl}^-]$: 7 μM $[\text{SO}_4^{2-}]$: 106 μM ; $[\text{CO}_3^{2-}]$: 143 μM ; pH 6.1 - 6.5, after aeration and temperature adjustment) and was used for acclimation of the organisms and for all experiments. The organisms were acclimated to laboratory conditions for at least two weeks and were fed trout chow pellets (Corey Mills, Fredericton, N.B., Canada) ad libitum. Fish were not fed for 24 h prior to an experiment.

Fulvic acid solutions

A commercially available soil fulvic acid (Laurentian fulvic acid: Ecolinc Inc., Roxboro, QC) was chosen to represent the natural DOM found in rivers on the Canadian Shield during periods of snowmelt. This fulvic acid is obtained from soil collected from the Laurentide region north of the St. Lawrence River, on the Precambrian Shield. Fulvic and humic acids, presumably of terrestrial origin, have been shown to be largely responsible for the acidic episodes that occur in Quebec North Shore salmon rivers during snowmelt [1].

A 20 mg FA·ml⁻¹ stock solution was prepared by dissolving a weighed quantity of fulvic acid in deionized water. The experimental fulvic acid solutions were prepared in 65 L basins fitted with plastic liners. Eight basins, two for each Al exposure concentration, were filled with 10 °C RSW, the pH was adjusted to ≤4.5 with 2.0 N HNO₃, and gentle aeration was provided. Appropriate amounts of the fulvic acid stock solution and an Al stock solution (1000 mg·L⁻¹ Al as Al₂(SO₄)₃ · 18 H₂O, acidified to < pH 4.0) were then added. The pH was finally adjusted to 5.0 ± 0.1 and the FA and total Al concentrations were verified. Two experiments involving simultaneous exposures of fish to inorganic Al and to organic Al solutions were conducted. Before introducing the fish, we left the inorganic basins for a period of 48 h to allow the system to stabilize. In the first experiment, the Al-FA solutions were also left undisturbed, aside from gentle aeration, for a similar period (48 h). In the second experiment, the stabilization period for the Al-FA basins was 120 h. Technical problems with the automated analysis system for Al delayed the beginning of the latter experiment for 5 days, resulting in a longer “equilibration” period than for Experiment 1.

Initial fulvic acid concentrations in the stock basins were verified by determining solution absorbance at 400 nm, in comparison with a standard calibration curve. During experiments, samples were taken directly from bioassay tanks for the determination of total organic carbon (TOC). These samples were kept at 4 °C in the dark until the analysis, which was performed within 72 h of the conclusion of each experiment.

Analysis of total, organic monomeric and inorganic monomeric Al

Samples for metal analysis were taken daily using acid-washed plasticware. Samples for determinations of total monomeric Al (Al_{pcv}) were filtered (0.4 μm, Nuclepore polycarbonate membranes) and analyzed with an automated spectrophotometric technique based on the reaction of monomeric Al with pyrocatechol violet [20]. For samples from tanks containing FA, a cation exchange resin was inserted upstream from the reaction with pyrocatechol violet, to differentiate between total monomeric Al (no cation exchange) and organic monomeric Al (Al_o, after cation exchange). Inorganic monomeric Al (Al_i) was then estimated by the difference Al_{pcv} - Al_o. Concentrations of monomeric Al in tanks without FA (inorganic exposures) were measured

directly as Al_{pcv} . Checks on the accuracy of the analysis included analyzing blanks (deionized water) after every five samples, and verifying the standards after every 15 samples.

Samples for analysis of total Al (acid-reactive Al, Al_t) were acidified to pH 1.0 with concentrated trace metal grade HNO_3 , and were left at room temperature for at least 24 h before spectrophotometric analysis.

In situ dialysis

Dialysis bags (Spectra-Por 7, 1000 MWCO, for trace metal analysis; Fisher Scientific, Toronto, ON, Canada) were rinsed in ultrapure deionized water before use, filled with 10 to 15 ml of RSW and clamped shut. They were placed in the Al-FA bioassay tanks (3 per tank in Experiment 1; 5 per tank in Experiment 2) just before the fish were introduced and were left for the duration of the bioassay (96 or 120 h). Preliminary studies had suggested that a period >48 h was necessary to approach equilibrium conditions for dialysable Al inside and outside the bag [21]. At the end of the experiment the bags were removed from the tanks, and the outer surfaces were carefully rinsed in deionized water to remove any adhering solution. The contents were transferred to clean polypropylene test tubes and analyzed, the same day, for inorganic monomeric Al as described above, without prior filtration.

Total organic carbon measurements (TOC)

Total organic carbon was measured by photooxidation of samples that had been pre-acidified and purged of CO_2 ; the inorganic carbon produced by UV irradiation was determined by automated dialysis against a standard solution of NaOH, followed by conductimetry. This method has a detection limit of $0.1 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$. Average TOC measurements in $\text{mg C}\cdot\text{L}^{-1}$ (\pm S.D.; n) were 2.0 (0.6, 16) in Experiment 1 and 2.4 (1.0, 16) in Experiment 2.

Bioassays - Exposures to Al-RSW and Al-FA solutions

Fish were exposed under flow-through conditions to solutions containing only inorganic Al (Al-RSW) and to solutions containing organic Al (Al-FA) with nominal fulvic acid concentrations of 5 mg·L⁻¹. The flow-through system used has been previously described [19]. Two experiments (1 and 2) were performed, each of which involved simultaneous parallel exposures of fish to inorganic Al and to organic Al solutions.

The inorganic exposures consisted of five Al concentrations and a pH 5.0 control without Al. Basin volumes and flow rates were adjusted to ensure >99% molecular replacement of the basin volume (7 or 8 L) within 24 h; identical volumes and flow rates were used in the Al-FA exposures performed at the same time. Seven fish (eight fish in Experiment 2) were placed in each exposure tank and the experiments were run for 96 h (Experiment 1) or 120 h (Experiment 2). At the conclusion of Experiment 2, an additional exposure was conducted with previously non-exposed fish and a more elevated concentration of inorganic Al, to allow the calculation of an LC₅₀ for this inorganic exposure series.

The Al-FA exposures were limited to four Al concentrations, due to the expense of the natural fulvic acid. After the equilibration period, the Al-FA solutions were pumped to the four test basins. The pumping rates were set to allow a 99% replacement time of 24 h with the test basin volumes of 7 L (Experiment 1; 7 fish per basin) and 8 L (Experiment 2; 8 fish per basin). The volumes remaining in the Al-FA stock basins were combined on day 4 of Experiment 2, in order to have sufficient volume to continue the experiment for an additional day.

Measurements of pH (two to three times daily) and dissolved oxygen levels (once daily) were taken over the course of the experiments. Mean pH values (\pm SD, n) in inorganic exposure tanks were pH 4.96 (0.16, 54) in Experiment 1 and pH 4.98 (0.06, 84) in Experiment 2. Mean pH values (\pm SD, n) in basins with FA were pH 5.03 (0.13, 36) in Experiment 1 and pH 4.97 (0.18, 56), in Experiment 2. In both experiments, dissolved oxygen was always >85% saturation. Concentrations of Al_t and Al_{pcv} measured in the inorganic exposure tanks are presented in Table

1. Nominal and measured concentrations of Al (Al_t , Al_{pcv} , Al_o , and dialysable Al) measured in the Al-FA exposures are presented in Table 2.

Bioassays - Pre-exposure to RSW and FA solutions without Al

Experiment 3 involved "pre-exposure" of salmon to RSW or FA solutions under static conditions, followed by exposure to inorganic Al. The organisms were challenged to determine if pre-exposure to fulvic acid would provide some protection against a subsequent Al exposure. Fish were first divided into two groups and acclimated for four days to the two solutions without Al. One group of fifty fish was kept in RSW only, at pH 5.0, whereas another fifty fish were maintained in a fulvic acid solution ($10 \text{ mg FA}\cdot\text{L}^{-1}$) also at pH 5.0. These "pre-exposure" conditions were maintained in two 65 L tanks (i.e., 50 fish per tank), supplied with gentle aeration. The pH was maintained at 5.0 ± 0.2 by the additions of small amounts of 2 N HNO_3 ; dissolved oxygen was verified twice daily and remained at levels $>85\%$ of saturation (Table 3). After 4 days, fish from each pre-exposure condition were exposed to five inorganic Al concentrations (nominal concentrations of 2.0 to 8.0 μM as total Al) and an Al-free control, in a flow-through system. Eight fish were placed in each exposure tank, and mortalities were monitored, as described below, for 96 h.

Determination of LC_{50} values

Mortalities were monitored every 3 h throughout the experiments, except for a 7 h period at night. Fish were considered dead when no reaction was obtained after prodding. The LC_{50} values and their 95% confidence limits were determined using the Spearman-Kärber method [22]. The LC_{50} values determined at the same time (i.e., on the same fish populations) were compared using the standard error of mean differences [23].

RESULTS

Exposure conditions

Levels of Al_t and Al_{pcv} determined in the inorganic exposure tanks in Experiments 1 and 2 were generally similar (Table 1), suggesting that inorganic hydroxy-Al polymers were not formed to any appreciable extent and that the added Al remained in monomeric form.

There was evidence of physical-chemical changes occurring in the bioassay tanks containing fulvic acid and elevated Al concentrations. In both experiments 1 and 2, TOC levels decreased in the tanks containing $>22 \mu M Al_t$ (e.g., see Fig. 1 for Experiment 1). This decrease coincided with the formation of brown particulate matter, which is consistent with the idea that some of the fulvic acid was being removed from solution; total Al levels also decreased from initial levels in these tanks. This decrease in TOC at elevated Al concentrations is likely due to the co-precipitation of Al and FA. The presence of fulvic acid has been reported to favor the formation of polynuclear Al forms [24], which would not be directly detected in our Al speciation measurements on unacidified samples; such polynuclear Al forms are commonly used in water treatment to remove DOM by coagulation and co-precipitation [25]. These physical-chemical changes were not apparent in tanks with fulvic acid that contained lower levels of inorganic Al ($<22 \mu M$); in these tanks, TOC values remained reasonably stable (Fig. 1).

Despite the physical-chemical changes described above, inorganic Al levels in both experiments remained relatively constant until the final day of the experiments - day 4 in Experiment 1 and day 5 in Experiment 2 (Figs. 2 and 3). Of particular interest is the generally good agreement between the two estimates of inorganic monomeric Al, i.e., the values of $[Al_i]$ as determined by the pyrocatechol violet/ion-exchange procedure and the levels of dialysable Al (Table 2). Note that measurements of organic Al inside the dialysis bags were consistently very low ($<1 \mu M$, data not shown).

Toxicity of Al-FA and Al-RSW solutions

Inorganic Al was less toxic in fulvic acid solutions than in the standard reconstituted soft water. In the presence of fulvic acid, the LC_{50} , expressed as μM of inorganic monomeric Al, is significantly different than the LC_{50} determined under inorganic conditions ($p < 0.05$), i.e., approximately two to three times greater than for inorganic conditions at the same pH (Table 4, column 3). A similar pattern is observed when the LC_{50} is expressed as dialysable Al measured in the FA exposure tanks (Table 4, column 4). The $LC_{50}(\text{Al}_i)$ values determined for the inorganic exposure conditions (2.9 and 4.0 μM) are similar to values determined in earlier Al-only exposures with Atlantic salmon conducted at pH 4.8 (2.8 to 4.5 μM ; [19]).

Pre-exposure of Atlantic salmon to DOM solutions without Al

Pre-exposure of the fish to a fulvic acid solution at pH 5.0 did not protect the fish upon subsequent exposure to inorganic Al. Fish from the two pre-exposure media (RSW, FA) exhibited essentially identical responses when placed in solutions of inorganic Al and the LC_{50} values were indistinguishable (Table 3, column 5). The protective effect of fulvic acid in decreasing the toxicity of Al does not persist when the fish are transferred to FA-free solutions.

DISCUSSION

The toxicity of Al-DOM solutions

According to the toxicological literature, the toxicity of aluminum to salmonids at acidic pH is attenuated in the presence of natural fulvic and humic acids [16 - 18]. The results of the present study are qualitatively similar to these earlier studies, in that the fulvic acid used in our experiments did indeed protect Atlantic salmon parr against the toxic effects of aluminum at pH 5 - when expressed in terms of total reactive aluminum, Al_t , the LC_{50} values for the organic exposures were 7.1 to 8.4 times higher than for the inorganic solutions.

The attenuation of aluminum toxicity by natural DOM has generally been attributed to complexation of the free metal by the DOM, but rarely has this been verified by actually measuring the decreased levels of Al_i and relating these to the residual toxicity. In the present study we measured Al speciation in both inorganic and organic exposure media, and thus can compare the toxicity of the free inorganic Al in the presence or absence of fulvic acid. Our results indicate that Al is considerably less toxic to juvenile Atlantic salmon in the presence of fulvic acid than would have been predicted on the basis of the residual concentration of inorganic Al_i ; in other words, it takes more free “inorganic aluminum” to kill the fish when the bioassays are run in the presence of fulvic acid (6.1 to 8.0 vs. 2.9 to 4.0 μM).

The validity of the foregoing conclusion is obviously dependent on the reliability of our measurements of $[Al_i]$. In particular, if the analytical technique used to determine monomeric inorganic aluminum $[Al_i]$ suffered from a positive analytical bias in the presence of fulvic acid, our calculated values of $[Al^{3+}]$ would overestimate the true values experienced by the fish in the presence of fulvic acid. One mechanism that could conceivably increase the apparent levels of Al_i is the dissociation of Al-FA complexes during their passage through the cation exchange column used to distinguish between Al_o and Al_i . However, the maximum contribution by such dissociation reactions has been suggested to be 25% [26], i.e., a factor of 1.25, clearly less than the ratio of 2 to 4 observed for the LC_{50} values. We consider it unlikely that our Al-FA complexes would disassociate appreciably during passage through the cation exchange column, as may occur with other organic ligands that bind Al only weakly. In a previous titration study, conditional stability constants for Al-FA complexes were calculated which indicate that the Al is relatively strongly bound to the Laurentian fulvic acid used in the present study [27]. Other studies have also suggested that Al_i is accurately measured by the pyrocatechol violet/ion exchange method in soil solutions containing elevated levels of total Al [28-31] and in Al-FA solutions [32]. Confidence in the estimates of $[Al_i]$ is reinforced by the good agreement observed between our two independent analytical approaches: Ion exchange and equilibrium dialysis (Table 2). We are thus confident that the levels of Al_i measured in the Al-FA bioassay tanks are accurate estimates of the actual concentrations of Al_i , and that the “additional” protective effect of the fulvic acid is real.

Our results thus suggest that fulvic acids can attenuate aluminum toxicity by mechanisms other than by simply reducing the bioavailability of Al by complexation. Additional support for this contention, namely that DOM may also alleviate metal toxicity by interacting directly with aquatic organisms, comes from a study of similar design performed with Cu, natural DOM and the Australian freshwater shrimp *Paratya australiensis* [32]. Shrimp were maintained in various diluted pond waters or in a DOM-free control water, and were exposed to a range of added Cu concentrations; the free Cu^{2+} ion concentration was measured potentiometrically during the experiments (ion selective electrode). The LC_{50} s, expressed in terms of free Cu^{2+} , were 2-3 times greater in pond waters than in the inorganic control water. The authors were careful to point out the difficulties inherent in the use of ion selective electrodes in the presence of DOM, to which they attributed the lack of agreement between the observed toxicity and the measured free ion Cu^{2+} concentrations. However, it is also possible that the natural DOM in their study played a protective role similar to that attributed to the fulvic acid in our study.

Other studies have suggested that DOM can affect organisms directly. Hargeby and Petersen [33] subjected the amphipod *Gammarus pulex* to low pH conditions in the presence or absence of added DOM, and observed that animals exposed to low pH-DOM conditions had a higher water content than did those exposed to low pH alone. They suggested that DOM reduces membrane permeability, possibly because of its amphoteric nature. Wilkinson et al. [34] also suggested that fulvic acid may interact directly with fish gill membranes. These researchers measured the surface potential of isolated gill cells from the largemouth bass (*Micropterus salmoides*) using microelectrophoresis. Cells exposed to fulvic acid at pH 4.5 exhibited a more negative surface potential (increased negative electrophoretic mobility), indicating binding of the negatively-charged polyanionic fulvic acid to the cell surface. When Al was added, it did bind to the gill cells in the presence of FA, but the cells' electrophoretic mobility was not simply a function of the concentration of the free ion, $[\text{Al}^{3+}]$.

Evidence that fulvic acid can adsorb to cell surfaces is also provided by experiments with microalgae [35, 36]. Sorption of fulvic acid at the algal surface was favored at acidic pH and, in solutions containing Al, this association of fulvic acid with the living surface could be shown to restore the permeability of algal cells, as measured by the uptake of radiolabeled sorbitol [35].

In contrast to the results presented here, Lydersen et al. [37] concluded that the toxicity observed in their studies with Atlantic salmon was attributable only to the concentrations of inorganic Al present. They exposed larval stages to two lake waters, which differed in their DOM content (low and high) but had elevated levels of Al. In addition, they also exposed organisms to the same Al-rich lake waters, but with the DOM removed. They found that the presence of DOM did not affect Al toxicity as survival times were the same in solutions with equal amounts of inorganic Al.

Several factors may explain the differences between our results and those reported by Lydersen et al. [37]. The degree of interaction of DOM with the fish gill surface, and hence its protective effects, may vary with the characteristics of the DOM, such its molecular weight, hydrophobicity and propensity for hydrogen-bonding, as well as its concentration. We used a soil derived fulvic acid, of a lower molecular weight (500 to 1000 Da) than the lake water DOM (3000 to 10 000 Da) used by Lydersen et al. [37]. In addition, the ambient physico-chemical conditions (e.g., solution pH, ionic strength, temperature) might well influence DOM interactions with the gill surface. While our experiments were performed at pH 5.0, the pH levels in the Lydersen et al. study ranged from 4.8 to 5.7; solution pH appears to be an important variable affecting the interaction of DOM with the gill surface [34].

Regression model

Relationships between fish mortality, as observed in all Al-FA and inorganic Al exposures, and the concentrations of Al and TOC were explored by regression analysis. Mortality, as arc-sine transformed proportion dead, was entered as the dependent variable and with TOC and Al terms as joint independent variables. Total organic carbon was expressed as the average TOC concentrations ($\text{mg C}\cdot\text{L}^{-1}$) measured in the exposure tanks with fulvic acid. The joint Al term (μM)

was entered as Al_i , as Al_i , or as $\log Al_i$; results of the regression models (p values, intercepts, R^2 values) are shown in Table 5. The regression model with the best R^2 value (0.71) included terms for $\log Al_i$ and TOC and was highly significant ($p < 0.0001$; Table 5):

$$\text{Proportion mortality (arc-sine)} = -0.215 + (0.81) \log (Al_i) - (0.44) \text{TOC}$$

Parkhurst et al. [16] reported a similar regression result for their experiments on the toxicity of Al to brook trout feeding fry (*Salvelinus fontinalis*); the best logistic model for predicting 21-day survival included terms for inorganic monomeric Al (-ve coefficient) and dissolved organic carbon (+ve coefficient).

The inclusion of Al_i in the regression analyses already takes into account the "benefit" derived from DOM-Al complexation. The improved results obtained when DOM is added to the predictive equation indicate a significant direct role for fulvic acid in reducing fish mortality at similar levels of Al_i . This result is inconsistent with the Free-Ion Model of metal toxicity, since the FIM does not consider the independent role of organic ligands in metal toxicity, aside from cases where the metal-ligand complexes have increased lipophilicity [12].

Environmental relevance

The experimental conditions of the present study were chosen after preliminary studies had shown that juvenile Atlantic salmon in the presence of fulvic acid were remarkably resistant to inorganic Al concentrations that had proven lethal in previous exposures without fulvic acid. Some of the initial exposure concentrations used in the study ($Al_i > 22 \mu\text{M}$; FA present) correspond to non-equilibrium conditions and are unlikely to occur in stable, chronically acidified environments. However, the conditions of our study can be compared to those that occur during the liming of acidic Al-rich watersheds [38-40], if DOM is present. Indeed, field results also suggest that inorganic Al is less toxic in the presence of DOM. Simonin et al. [41] performed in situ bioassays with brook trout in acidified Adirondack streams and found that brook trout mortality was less, at similar levels of Al_i , in streams with higher DOM levels. While the difference in Al toxicity may

reflect physical (temperature) and chemical differences (major cations) between the streams, the possibility that the toxicity of inorganic Al is reduced in the presence of DOM deserves further study under field conditions.

In conclusion, this study has shown that Al is less toxic to juvenile Atlantic salmon in fulvic acid solutions than would be predicted by the Free-Ion Model. We have recently obtained similar results in the laboratory with respect to the bioaccumulation of Cd in the gills of the same fish species (Gauthier and Campbell, unpublished data). We suggest that the biological effects of fulvic acid, which may provide protection against toxicity at the level of the gill membrane, should be considered in future studies of metal toxicity in acidic natural waters.

ACKNOWLEDGMENTS

Funding for this research was provided by Fisheries and Oceans Canada (Research Subvention Programme) and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Partial student support (RR) from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche is also gratefully acknowledged. Neil Hutchinson, Gilles Lacroix, Landis Hare and two anonymous reviewers provided constructive criticisms that helped improve the manuscript.

REFERENCES

1. **Campbell, P.G.C., H.J. Hansen, B. Dubreuil and W.O. Nelson.** 1992. Geochemistry of Quebec North Shore salmon rivers during snow melt: Organic acid pulse and aluminum mobilization. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **49**: 1938-1952.
2. **Lacroix, G.L. and D.R. Townsend.** 1987. Responses of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) to episodic increases in acidity of Nova Scotia rivers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **44**: 1475-1484.
3. **Lacroix, G.L.** 1989. Ecological and physiological responses of Atlantic salmon in acidic organic rivers of Nova Scotia, Canada. *Water Air Soil Pollut.* **46**: 375-386.
4. **McCarthy, J.F.** 1989. Bioavailability and toxicity of metals and hydrophobic compounds. In J.H. Suffet and P. MacCarthy, eds., *Aquatic Humic Substances - Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Advances in Chemistry Series 219. American Chemical Society, Washington, DC, USA, pp. 263-277.
5. **Buckley, J.A.** 1983. Complexation of copper in the effluent of a sewage treatment plant and an estimate of its influence on toxicity to coho salmon. *Water Res.* **17**: 1929-1934.
6. **Zitko, P., W.V. Carson and W.G. Carson.** 1973. Prediction of incipient lethal levels of copper to juvenile Atlantic salmon in the presence of humic acid by cupric electrode. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **10**: 265-271.
7. **Meador, J.P.** 1991. The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. *Aquat. Toxicol.* **19**: 13-31.

8. **Welsh, P.G., J.F. Skidmore, D.J. Spry, D.G. Dixon, P.V. Hodson, N.J. Hutchinson and B.E. Hickie.** 1993. Effect of pH and dissolved organic carbon on the toxicity of copper to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*) in natural lake waters of low alkalinity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**: 1356-1362.
9. **Hutchinson, N.J. and J.B. Sprague.** 1987. Reduced lethality of Al, Zn and Cu mixtures to American flagfish by complexation with humic substances in acidified soft waters. *Environ. Toxicol. Chem.* **6**: 755-765.
10. **Playle, R.C., R.W. Gensemer and D.G. Dixon.** 1992. Copper accumulation on gills of fathead minnows: influence of water hardness, complexation and pH of the gill micro-environment. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**: 381-391.
11. **Morel, F.M.M. and J.G. Hering.** 1993. *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*. J. Wiley & Sons, New York, NY, USA, pp. 405-414.
12. **Campbell, P.G.C.** 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the Free-Ion Activity Model. In A. Tessier and D.R. Turner, eds., *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. J. Wiley & Sons, New York, NY, USA, pp.45-102.
13. **Baker, J.P.** 1982. Effects on fish of metals associated with acidification. *Proceedings, International Symposium on Acidic Rain and Fisheries Impacts on Northeastern North America*. Cornell University, Ithaca, NY, USA, August 2 to 5, 1981, pp.165-176.
14. **Driscoll, C.T., J.P. Baker, J.J. Bisogni, J.J. and C.L. Schofield.** 1980. Effect of aluminium speciation on fish in dilute acidified waters. *Nature (Lond)* **284**: 161-164.
15. **Peterson, R.H., R.A. Bourbonnière, G.L. Lacroix, D.J. Martin-Robichaud, P. Takats and G. Brun.** 1989. Responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*) alevins to dissolved organic carbon and dissolved aluminum at low pH. *Water Air Soil Pollut.* **46**: 399-413.

16. **Parkhurst, B.R., H.L. Bergman, J. Fernandez, D.D. Gulley, J.R. Hockett and D.A. Sanchez.** 1990. Inorganic monomeric aluminum and pH as predictors of acidic water toxicity to brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **47**: 1631-1640.
17. **Neville, C.M.** 1985. Physiological responses of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to acid and aluminum - prediction of field responses from laboratory data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **42**: 2004-2019.
18. **Witters, H.E., S. Van Puymbroeck, J.H.D. Vangenechten and O.L.J. Vanderborght.** 1990. The effect of humic substances on the toxicity of aluminium to adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquat. Toxicol.* **37**: 43-53.
19. **Roy, R. and P.G.C. Campbell.** 1995. Survival time modeling of exposure of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) to mixtures of Al and Zn in soft water at low pH. *Aquat. Toxicol.* **33**: 155-176.
20. **Rogeberg, E.J.S. and A. Henriksen.** 1985. An automatic method for fractionation and determination of Al species in fresh-waters. *Vatten* **41**: 48-53.
21. **LaZerte, B.D.** 1984. Forms of aqueous aluminum in acidified catchments of central Ontario: A methodological analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **41**: 766-776.
22. **Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston.** 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* **11**: 714-719.
23. **Sprague, J.B. and A. Fogels.** 1977. Watch the Y in bioassay. *Proceedings, 3rd Aquatic Toxicity Workshop, Halifax, NS, Canada, November 2 to 3, 1976*, pp.107-118.

24. **Browne, B.A. and C.T. Driscoll.** 1993. pH-dependent binding of aluminum by a fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* **27**: 915-922.
25. **Hundt, T.R. and C.R. O'Melia.** 1988. Aluminum-fulvic acid interactions: Mechanisms and applications. *J. Am. Water Works. Assoc.* **80**: 176-186.
26. **Backes, C.A. and E. Tipping.** 1987. Aluminium complexation by an aquatic humic fraction under acidic conditions. *Water Res.* **21**: 211-216.
27. **Roy, R.L. and P.G.C. Campbell.** 1994. Aluminum complexation by a naturally occurring fulvic acid: Determination of conditional stability constants and prediction of inorganic Al levels in synthetic soft waters. *Proceedings, 20th Annual Aquatic Toxicity Workshop.* Québec, QC, Canada, October 17 to 21, 1993, pp. 208-220.
28. **Hodges, S.C.** 1987. Aluminum speciation: A comparison of five methods. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **51**: 57-64.
29. **Kervan G.L., D.G. Edwards, C.J. Asher, P.S. Hallman and S. Kohot.** 1989. Aluminium determination in soil solution. I. Evaluation of existing colorimetric and separation methods for the determination of inorganic monomeric aluminium in the presence of organic acid ligands. *Aust. J. Soil Res.* **25**: 79-90.
30. **McAvoy, D.C., R.C. Santore, J.D. Shosa and C.T. Driscoll.** 1992. Comparison between pyrocatechol violet and 8-hydroxyquinoline procedures for determining aluminum fractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **56**: 449- 455.
31. **Lewis, T.E., D.E. Dobb, J.M. Henshaw and S.J. Simon.** 1988. Apparent monomeric aluminum concentrations in the presence of humic and fulvic acid and other ligands: An interlaboratory comparison study. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **34**: 69-87.

32. **Daly, H.R., M.J. Jones, B.T. Hart and I.C. Campbell.** 1990. Copper toxicity to *Paratya australiensis* .3. Influence of dissolved organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**: 1013-1018.
33. **Hargeby, A. and R.C. Petersen.** 1988. Effects of growth and humus on the survivorship, growth and feeding of *Gammarus pulex* (L.) (Amphipoda). *Freshwat. Biol.* **19**: 235-247.
34. **Wilkinson, K.J., P.M. Bertsch, C.H. Jagoe and P.G.C. Campbell.** 1993. Surface complexation of aluminum on isolated fish gill cells. *Environ. Sci. Technol.* **27**: 1132-1136.
35. **Parent L., M.R. Twiss and P.G.C. Campbell.** 1996. Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga *Chlorella*: A test of the Free-Ion Model of trace metal toxicity. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 1713-1720.
36. **Campbell, P.G.C., M.R. Twiss and K.J. Wilkinson.** 1997. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells - implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* (in press).
37. **Lydersen, E., A.B.S. Poléo, I.P. Muniz, B. Salbu and H.E. Bjørnstad.** 1990. The effects of naturally occurring high and low molecular weight inorganic and organic species on the yolk-sack larvae of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) exposed to acidic aluminium-rich lake water. *Aquat. Toxicol.* **18**: 219-229.
38. **Weatherley, N.S., G.P. Rutt, S.P. Thomas and S.J. Ormerod.** 1991. Liming acid streams - aluminium toxicity to fish in mixing zones. *Water Air Soil Pollut.* **55**: 345-353.
39. **Lacroix, G.L.** 1992. Mitigation of low stream pH and its effects on salmonids. *Environ. Pollut.* **78**: 157-164.

40. **Rosseland, B.O., I.A. Blakar, A. Bulgar, F. Kroglund, A. Kvellstad, E. Lydersen, D.H. Oughton, B. Salbu, M. Staurnes and R. Vogt.** 1992. The mixing zone between limed and acidic river waters: Complex aluminium chemistry and extreme toxicity for salmonids. *Environ. Pollut.* **78**: 3-8.

41. **Simonin, H. A., W.A. Kretser, D.W. Bath, M. Olson and J. Gallagher.** 1993. In situ bioassays of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and blacknose dace (*Rhinichthys atratulus*) in Adirondack streams affected by episodic acidification. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**: 902- 912.

Table 3-1. Average Al concentrations ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$; n) measured in inorganic Al exposures in Experiments 1 and 2.

Exposure tank	Experiment 1		Experiment 2	
	Al_t^a	Al_i^b	Al_t	Al_i
1	3.9 ± 0.1 (4)	3.8 ± 0.7 (5)	7.8 ± 0.8 (4)	7.4 ± 1.5 (5)
2	3.2 ± 0.1 (4)	3.1 ± 0.8 (5)	3.9 ± 0.3 (5)	3.9 ± 0.6 (5)
3	3.4 ± 0.1 (4)	3.4 ± 0.8 (5)	3.6 ± 0.2 (5)	3.4 ± 0.6 (5)
4	2.2 ± 0.1 (4)	1.9 ± 0.5 (5)	2.4 ± 0.2 (5)	2.2 ± 0.5 (5)
5	1.1 ± 0.1 (4)	1.1 ± 0.3 (5)	1.0 ± 0.2 (5)	1.1 ± 0.6 (5)
control (no Al)	0.4 ± 0.1 (4)	0.4 ± 0.2 (5)	0.1 ± 0.1 (5)	0.4 ± 0.2 (5)

^a Acid-reactive Al

^b Inorganic monomeric Al

Table 3-2: Average Al concentrations ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) in bioassay tanks with fulvic acid in Experiments 1 and 2.						
Experiment 1						
tank	nominal	Al_t	Al_{pcv}^a	Al_o^b	Al_i^c	dialysable
1	44.4	38.6 ± 3.3	15.6 ± 3.2	2.0 ± 0.4	13.6 ± 3.1	12.1 ± 1.1
2	33.3	33.8 ± 3.7	10.4 ± 0.8	2.3 ± 0.2	8.1 ± 0.8	8.4 ± 0.9
3	22.2	20.8 ± 0.7	9.1 ± 1.4	4.3 ± 0.8	4.8 ± 1.5	2.9 ± 0.3
4	11.1	10.5 ± 0.9	6.8 ± 0.9	4.5 ± 0.8	2.3 ± 0.6	1.3 ± 0.1
Experiment 2.						
tank	nominal	Al_t	Al_{pcv}	Al_o	Al_i	dialysable
1	44.4	37.1 ± 10.1	14.6 ± 4.2	2.3 ± 1.5	12.3 ± 4.1	16.8 ± 2.7
2	33.3	28.0 ± 3.8	9.5 ± 2.6	3.4 ± 1.5	6.1 ± 2.5	11.1 ± 0.2
3	22.2	23.4 ± 2.8	8.6 ± 1.8	4.9 ± 1.3	3.7 ± 1.4	3.1 ± 0.2
4	11.1	10.3 ± 2.3	6.9 ± 0.9	4.7 ± 1.1	2.2 ± 0.7	2.2 ± 0.3

^a Total monomeric Al

^b Organic monomeric Al

^c Inorganic monomeric Al

Table 3-3. Mean experimental conditions (\pm SD; n) in pre-exposure tanks containing reconstituted soft water (RSW) and fulvic acid (FA) solutions and LC₅₀s (μ M Al_i \pm 95% confidence limits) determined in exposures to Al in RSW solutions after the pre-exposure period. The LC₅₀s were not significantly different ($p > 0.05$). Refer to text for further details.

Pre-exposure solution	pH	Dissolved O ₂ (mg O ₂ ·L ⁻¹)	TOC (mg C·L ⁻¹)	LC ₅₀ (μ M Al _i)
RSW	4.99 \pm 0.30 (18)	10.8 \pm 0.2 (7)	-	4.6 (3.7 - 5.8)
FA	4.99 \pm 0.24 (17)	10.4 \pm 0.9 (7)	4.2 \pm 0.25 (3)	4.6 (3.8 - 5.5)

Table 3-4. LC ₅₀ s ($\mu\text{M Al}_i \pm 95\%$ confidence limits) determined in bioassays in reconstituted soft water (RSW) only and in fulvic acid (FA) solutions. LC ₅₀ s in RSW were significantly different than those determined at the same time in solutions with FA ($p < 0.05$) ^a .			
Experiment	RSW - Al _i	FA -Al _i (ion exchange)	FA - Al _i (dialysis)
1	2.9 (2.5 -3.2)	8.3 (6.9 - 10.0)	4.9 (3.7 - 6.2)
2	4.0 (3.5 - 4.5)	6.1 (5.8 - 8.2)	8.1 (6.2 -10.5)

^a Al_i was measured spectrophotometrically, after ion exchange, in samples taken directly from bioassay tanks, and in dialysis bags left in the tanks for the duration of the experiment.

Table 3-5. Results of regression analyses (n=18) relating arc-sine transformed proportional mortality and the joint variables TOC (mg C·L⁻¹) and Al concentration (μM).

Parameters	P value	R²	Intercept	SE estimate
Al _i , TOC	p < 0.02	0.46	0.440	0.470
Al _i , TOC	p < 0.0002	0.69	0.099	0.357
log (Al _i), TOC	p < 0.0001	0.71	- 0.215	0.345

Figure 3-1. TOC levels ($\text{mg C}\cdot\text{L}^{-1}$) in bioassay tanks in Experiment 1. Pre-experimental levels of TOC were calculated from absorbance readings taken when the stock basins were prepared.

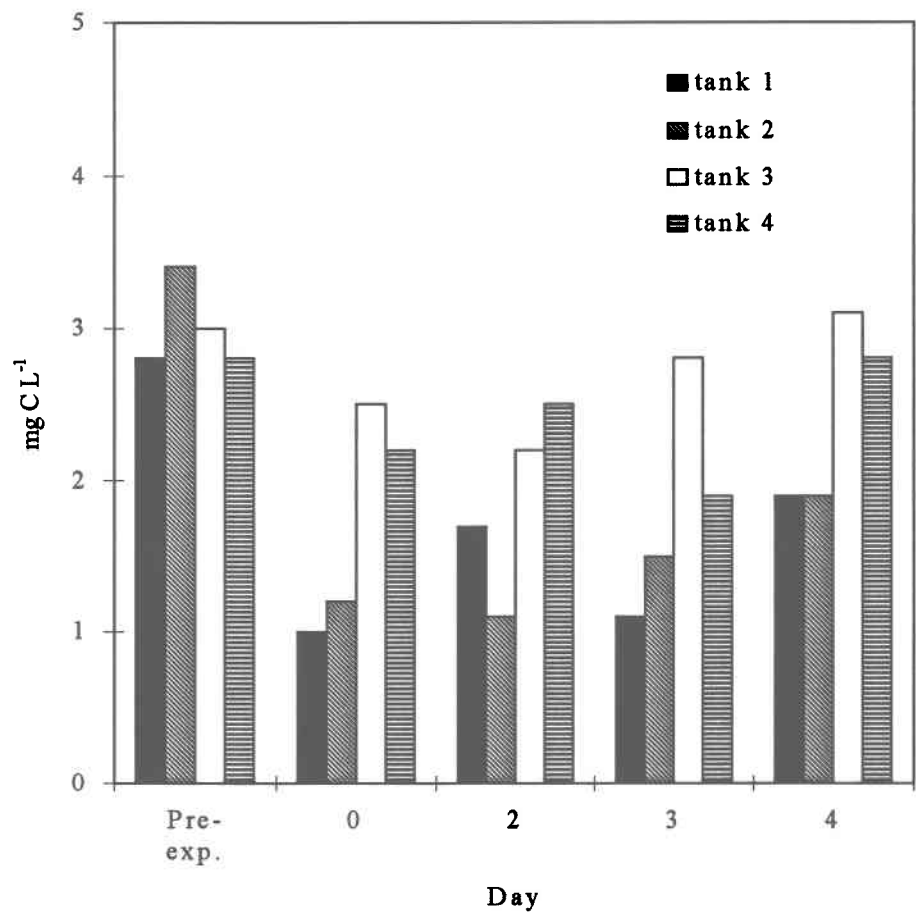


Figure 3-2. Measured daily concentrations of Experiment 1. Al_i ($\mu M \pm SD$) in bioassay tanks with FA in Experiment 1.

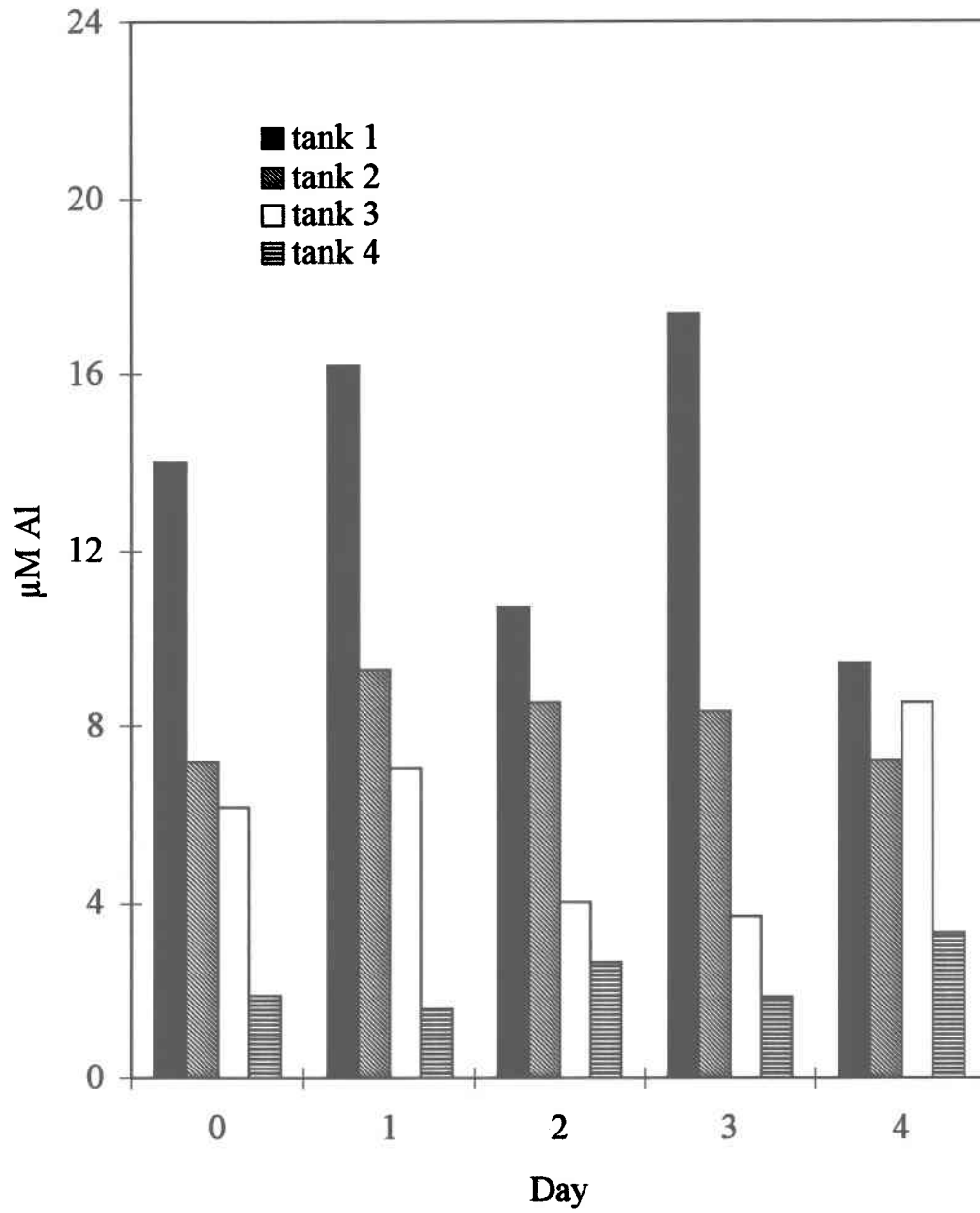
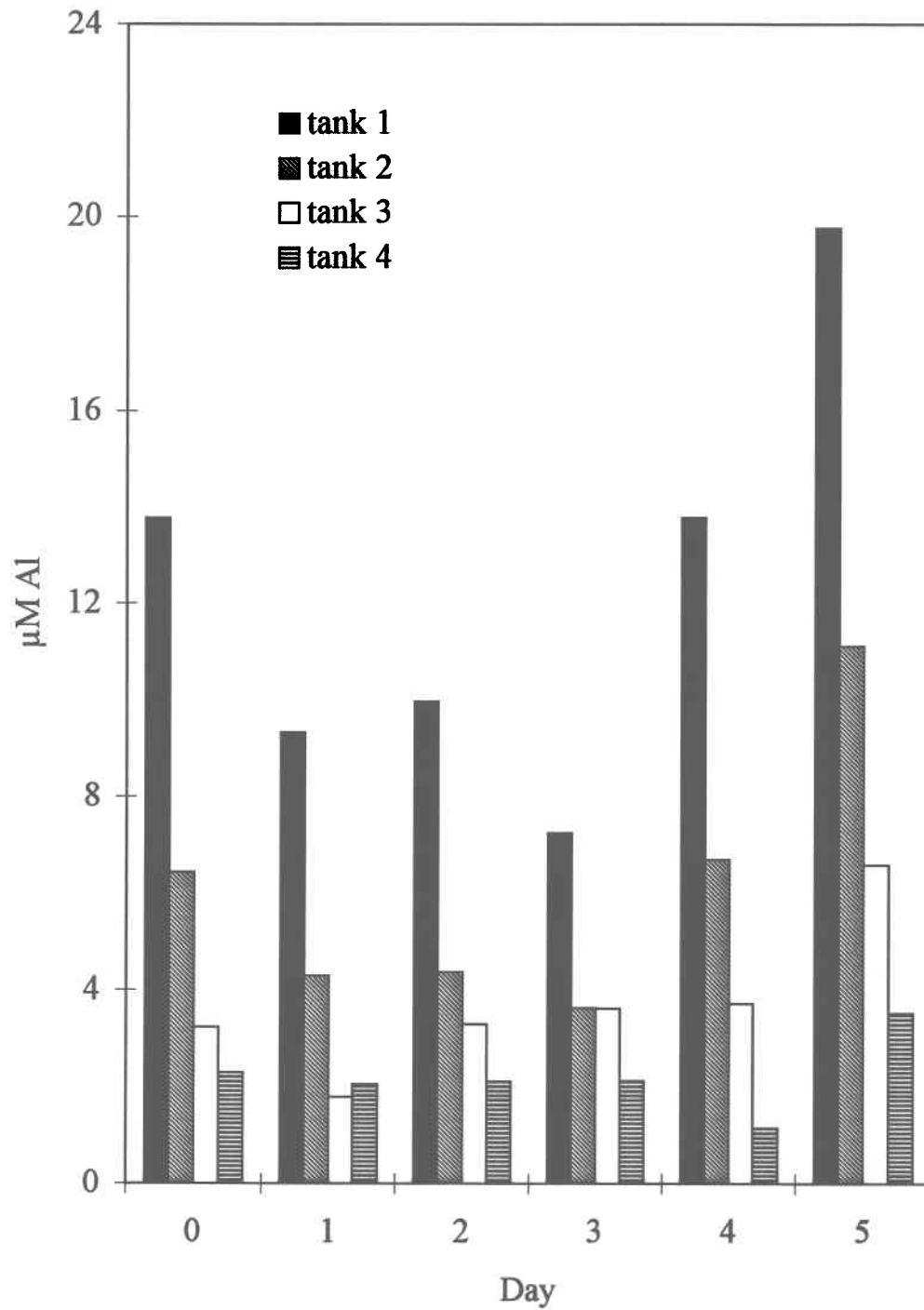


Figure 3-3. Measured daily concentrations of Al_i ($\mu M \pm SD$) in bioassay tanks with FA in Experiment 2.



ANNEXES

ANNEXE 1

**Aluminum complexation by a naturally occurring fulvic acid:
determination of conditional stability constants and
prediction of inorganic Al levels in synthetic acidic soft waters.**

(dans: R. van Coillie, Y. Roy, Y Bois, P.G.C. Campbell, P. Lundahl, L. Martel, M. Michaud P. Riebel et C. Thellen. Comptes rendus du vingtième colloque annuel de toxicologie aquatique: 17-21 octobre 1993, Québec, Québec. Rap. tech. can. sci. halieut. aquat. 1989. p. 208 - 220).

Robert Roy and Peter G.C. Campbell

INRS-Eau, Université du Québec,

C.P. 7500, Ste-Foy, Québec, CANADA G1V 4C7

ABSTRACT

During snowmelt, rivers on the Canadian Shield are subjected to a pulse of acidic water, including increased levels of Al and dissolved organic carbon (DOC). A significant proportion of this Al is complexed with DOC and these complexes do not appear to be implicated in the toxicity of Al observed with fish. In the context of toxicity bioassays, titration studies were conducted to determine the speciation of Al in acidic, organic, soft waters, representative of those in the Canadian Shield. Batch titration studies were done with a natural fulvic acid (FA) and a reconstituted soft water, at 10 °C. Studies involved 3 [FA] at pH 5.0 (5, 10 and 20 mg · L⁻¹) and one [FA], 10 mg · L⁻¹, at pH 4.5. Total [Al] ranged from 0 - 16.7 µM. Measurements of Al speciation used an automated colorimetric method to discern total (acid reactive) Al, organic monomeric Al and inorganic monomeric Al. Titration data were plotted as Langmuir isotherms and conditional stability constants (log K_C) and complexation capacities (CC) were determined. The CC and log K_C values of the various curves were statistically similar, with the exception of the 5 mg · L⁻¹ - pH 5.0 K_C. The experimentally determined CC and log K_C parameters and the chemical equilibrium modeling program MINEQL⁺ were used to predict inorganic Al concentrations at various [FA] in bioassays. There was relatively good agreement between the predicted and measured inorganic [Al]. The use of experimental titration data coupled with MINEQL⁺ equilibrium modeling allows for greater control of Al complexation in bioassay solutions.

INTRODUCTION

During periods of snowmelt, rivers on the Canadian Shield are subjected to a pulse of acidic water. Such acidic episodes have been monitored in rivers on Quebec's North Shore, such as the de la Trinité River; during spring runoff, the pH decreases while dissolved Al and dissolved organic carbon (DOC) levels increase (Hansen and Campbell, 1987; Campbell *et al.*, 1992). These rivers are an important habitat for Atlantic salmon (*Salmo salar*), in particular juvenile salmon at this time of year. In acidified environments, Al is known to cause toxicity to aquatic organisms (Leivestad *et al.*, 1987; Lacroix, 1989; Potts and McWilliams, 1987) and may pose a threat to these particular salmon populations.

Fulvic and humic acids account for approximately 50% of the DOC in these North Shore rivers, and a high proportion of the Al is present as dissolved organic complexes (Hansen and Campbell, 1987; Campbell *et al.*, 1992). Laboratory studies suggest that similar Al-organic complexes are not implicated in the toxicity of Al observed with fish (Lydersen *et al.*, 1990; Parkhurst *et al.*, 1990). As part of a study examining the toxicity of Al to Atlantic salmon, bioassays involving

exposure of juvenile fish to Al-organic solutions were contemplated. The experimental design required that we be able to predict the concentrations of inorganic Al in acidic waters containing different concentrations of DOC.

Batch titration studies were conducted to determine the complexation behavior of Al in acidic, organic, reconstituted soft waters, representative of those present on the Canadian Shield during snowmelt. The results were used in the chemical equilibrium program MINEQL⁺ (Schecher and McAvoy, 1991) to calculate the speciation of Al at various concentrations of fulvic acid and total Al.

MATERIALS AND METHODS

Titration studies were done with a soil fulvic acid (FA) that is available commercially (Ecolinc, Inc., Roxboro, Quebec) and has been well characterized (Langford *et al.*, 1983). All experiments were conducted using a reconstituted soft water, prepared by the addition of the following salts ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; mM) to deionized water: NaHCO_3 (12; 143); $\text{CaSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.5; 44); MgSO_4 (7.5; 62); KCl (0.5; 7).

Batch titrations:

Batch titrations were performed at three concentrations of fulvic acid (FA) at pH 5.0 (5, 10 and 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and one [FA] (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) at pH 4.5. Each titration series consisted of 21 incremental additions of Al and a control; each series was analyzed three times. For each [FA], an appropriate 2 L test solution was prepared by dilution of a concentrated stock solution in reconstituted soft water. The [FA] in the test solution was verified by absorbance at 400 nm, in comparison with a standard curve. The test solution was then apportioned into 22 containers, with 80 mL of solution in each. Amounts of a concentrated Al solution, ranging from 0 to 4 mL, were added; as necessary, reconstituted soft water was also added to complete the volume to 84 mL. The pH was adjusted to pH 5.0 or pH 4.5 and the solutions were equilibrated at 10° C for a minimum of 96 h prior to analysis. Final [Al] ranged from 0 - 9.4 μM at 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ FA, 0 - 14.1 μM at 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and 0 - 17.8 μM at 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ FA.

Al analysis:

Al was measured with an automated spectrophotometric technique (Rogeberg and Henriksen, 1985) based upon the reaction of monomeric Al with pyrocatechol violet (PCV). This method allows the differentiation of total monomeric Al (Al_{CV}) and organic monomeric Al (Al_O); inorganic monomeric Al (Al_i) is then estimated by the difference $Al_{CV} - Al_O$. A modification of the technique for our laboratory involved the determination of total, acid-reactive Al (Al_t). This involved the acidification (to pH 1.0 with concentrated trace metal grade HCl) of a 10 mL subsample, which was then left at room temperature for 48 h before analysis. Total acid-reactive Al measurements averaged 85% of nominal concentrations (range 80 - 96%).

Dialysis:

Dialysis bags (Spectra-Por 7, 1000 MWCO, for trace metal analysis) were rinsed in Millipore deionized water prior to use, filled with \approx 10 mL of inorganic synthetic soft water and clamped shut. They were then placed into the bioassay tanks (2 per basin) for a period of 96 h. Preliminary studies had shown that a period of 48 h was necessary to obtain an equilibrium for Al between the inside and outside of the bag. After 96 h, the bags were removed from the tanks, rinsed in deionized water and the contents were analyzed for inorganic Al as described above.

Titration analysis:

Total Al concentrations were initially plotted against bound Al in order to determine the degree of saturation of the ligand. Only those points falling on the rising limb, or the non-saturated portion of the curve, were used for plotting the isotherm curves. Langmuir isotherms were then determined by linear regression of Al_{free}/Al_{bound} versus Al_{free} (Pott *et al.*, 1985), according to the equation:

$$\frac{[Al_{free}]}{[Al_{bound}]} = \frac{1}{K_c \cdot CC} + \frac{[Al_{free}]}{CC} \quad (1)$$

Bound Al was calculated as Al_t - inorganic (free) Al. The complexation capacities (CC) and conditional stability constants (K_c) were determined from the isotherms as follows:

$$CC = \frac{1}{\text{slope}} \quad (2)$$

$$K_c = \frac{1}{CC \cdot \text{intercept}} \quad (3)$$

The CC values were normalized with respect to the fulvic acid concentration. The CC and K_c values were compared statistically using an analysis of variance with a significance level of 0.05. Significant differences among means were detected using the Student-Newman-Keuls *a posteriori* procedure.

Al speciation: determined from the Langmuir isotherms

The Langmuir equation, with the experimentally determined CC and K_c values, was used to calculate inorganic [Al] at various concentrations of total Al. The Langmuir relationship was transformed into a quadratic equation (eqⁿ 4) and solved for "R", and thus for Al_{free}:

$$R^2 + R \left(\frac{K'}{C'} - 1 + \frac{1}{C'} \right) + \left(-\frac{K'}{C'} \right) = 0$$

where:

$$R = \frac{Al_f}{Al_t}$$

$$K' = \frac{1}{CC \cdot K_c}$$

$$C' = \frac{Al_t}{CC}$$

$$\text{and } Al_f = Al_t \cdot R$$

Al speciation: MINEQL⁺ calculations:

Complexation constants used in chemical equilibrium models, such as MINEQL⁺, are derived from reactions involving the free metal ion. Our experimentally determined constants were

determined from measurements of total inorganic Al and thus had to be adjusted to account for the different proportions of Al^{3+} at our two pH values. We obtained estimates of the proportions of Al^{3+} present at pH 4.5 and pH 5.0 by running MINEQL⁺ in an inorganic matrix - in the absence of FA, with a range of [Al] from 0.37 to 9.3 μM . At pH 4.5, Al^{3+} is the predominant inorganic species (66%), while at pH 5.0, this proportion decreases to approximately 20%. The best Langmuir curve at each experimental condition was then selected and the free Al measurements were converted into estimates of $[\text{Al}^{3+}]$. The linear regressions were recalculated and "corrected" experimental $\log K_C$ values were obtained (Table A1-2).

The corrected experimental complexation constants were then entered into the chemical equilibrium program MINEQL⁺ to calculate the speciation of Al at different concentrations of FA. The program was run allowing for the precipitation of $\text{Al}(\text{OH})_3(\text{s})$ with micro-crystalline gibbsite as the controlling phase. Equilibrium constants ($\log K$) for the inorganic complexes of Al were taken from Schecher and Driscoll (1987): AlOH^{2+} : - 4.97; $\text{Al}(\text{OH})_2^+$: - 8.67, $\text{Al}(\text{OH})_4^-$: - 23.30; $\text{Al}(\text{OH})_3, \text{aq}$: -15.00; AlSO_4^+ : 3.02; $\text{Al}(\text{SO}_4)_2^-$: 4.92; $\text{Al}(\text{OH})_3 (\text{s})$: -8.35. The constants were corrected for a temperature of 10 °C.

RESULTS AND DISCUSSION

Langmuir curves:

Linear regression values (r^2) of the Langmuir curves ranged from 0.99 to 0.88 and there was close agreement in intercept and slope values among the replicates. Curves at FA concentrations of 5 and 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ were fairly linear, suggesting that the Al-FA complex could be modeled as 1:1 binding. At 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ FA, a moderately improved fit was obtained by plotting the data with a polynomial function. However, a single site model also adequately described these data. The accuracy of the fit was not notably improved using Scatchard plots.

The calculated $\log K_C$ and CC values at different [FA] are shown in Table A1-1. The CC values were all in the same range and there were no significant differences at different [FA], nor at the same [FA] at pH 4.5 and pH 5.0. In addition, with one exception, all of the conditional stability constants were not significantly different. The $\log K_C$ at the [FA] of 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ is slightly higher than the other values, and the K_C value is significantly different than the other values ($p > 0.01$). This difference may be related to the interference in the colorimetric technique caused by the

presence of organic matter (Royset and Sullivan, 1986). At low FA, this interference was negligible, allowing for accurate measurement of low concentrations of inorganic Al. At 10 and 20 mg·L⁻¹ FA, this interference made determination of free Al difficult at low concentrations and could have influenced the accuracy of our titration curves at [FA] > 5 mg·L⁻¹. However, our log K_C at 5 mg·L⁻¹ also differs from values reported in the literature (see below), and there is no obvious explanation for these differences.

With the exception of the pH 5.0 - 5 mg · L⁻¹ FA titration, our log K_C values are in agreement with estimates for Al-FA complexes at pH 5.0 (log K_C ≈ 5.5 - 6.0) reported in other studies (Potts *et al.*, 1985; Campbell *et al.*, 1992). Campbell *et al.* (1992) performed similar batch titrations with DOM from Quebec North Shore salmon rivers. They obtained log K_C values ranging from 6.17 - 6.23, and CC values ranging from 0.72 to 1.10, i.e. comparable to those found in this study, with the exception noted above. In this study, the affinity for Al, as represented by the conditional constants, is similar at the two pH values we tested (pH 5.0 and pH 4.5; Table A1-1). A lower log K_C might have been expected at the lower pH as more FA sites become protonated, thereby reducing complexation. However, at lower pH the [Al³⁺] also increases, which would favor complexation - the conditional constant reflects both of these competing processes (Campbell *et al.*, 1992).

The "corrected" log K_C values (expressed in terms of Al³⁺ rather than Al_i; Table A1-2) are greater than their corresponding values in Table A1-1. These higher log K_C values take into account the proportion of free ion at the two experimental pH values (66 % at pH 4.5, 20 % at pH 5.0). The CC values (not shown) are identical to those of the original curves, as no correction was employed for bound Al. We used the average CC values displayed in Table A1-1 in later calculations with the "corrected" log K_C values.

Al speciation calculations:

We verified these "corrected" constants by using them to calculate Al speciation in the presence of fulvic acid, and then comparing these results with those obtained directly from the Langmuir equation. First, for a given [FA], the experimentally determined constants in Table A1-1 were entered into the Langmuir equation and inorganic Al concentrations were calculated over a range of total Al from 0.37 - 7.4 μM ("equation" values in Tables A1-3 and A1-4). We compared these calculated values with the levels of Al_i actually measured at the same [Al_t] in the titration series

and obtained similar values (data not shown). In addition, we entered the "corrected" constants in Table A1-2 into MINEQL⁺ and calculated [Al_i] over the same range of Al_t, also shown in Tables A1-3 and 4. There is excellent agreement (all r² ≈ 0.99) between the two methods for predicting inorganic Al at pH 4.5 (10 mg·L⁻¹ FA, Table A1-3) and at pH 5.0 (5, 10 and 20 mg·L⁻¹ FA, Table A1-4).

MINEQL⁺ calculations: the effects of pH and [FA] on the binding of Al by FA

When the MINEQL⁺ calculations in Tables A1-3 and A1-4 are compared for the same [Al_t] and [FA], it is possible to judge the effects of pH on the complexation of Al. For example, for [Al_t] = 7.4 μM and at a [FA] of 10 mg·L⁻¹, the concentrations of inorganic Al are identical at pH 4.5 and pH 5.0 (1.8 μM). This difference in pH is evidently not sufficient to favor either of the competing processes mentioned previously (greater competition from increased [H⁺], increased complexation with increased [Al³⁺]).

Conditional constants determined at one ligand concentration are often used for the prediction of metal binding at other ligand concentrations. We attempted to evaluate this practice for Al and FA at a total Al concentration of 7.4 μM, by using the pH 5.0 - 10 mg·L⁻¹ conditional constant (log K_C = 6.54, Table A1-2) to calculate the concentration of bound Al at 5 and 20 mg·L⁻¹ FA. In Figure A1-1, these values are compared with the bound Al concentration calculated using the "specific" log K_C determined at these [FA] (log 7.27 at 5 mg·L⁻¹ FA; log 6.27 at 20 mg·L⁻¹ FA, Table A1-2), at the same [Al_t] of 7.4 μM. At [FA] of 20 mg·L⁻¹, both the "specific" and the pH 5.0 - 10 mg·L⁻¹ conditional constant result in similar values for bound Al (6.1 μM and 6.7 μM). In contrast, at a [FA] of 5 mg·L⁻¹, the predicted amount of bound Al is only 3.7 μM using the pH 5.0 - 10 mg·L⁻¹ conditional constant, as opposed to 5.2 μM obtained with the "specific" log K_C of 6.27. Given the known influence of Al:fulvic acid ratios on the strength of the Al-FA binding (e.g., Browne and Driscoll, 1993), it is clearly preferable not to use complexation constants to calculate Al speciation outside the range of conditions in which the constants were originally determined.

Inorganic Al in bioassays:

Finally, the MINEQL⁺ program with the corrected constants was used to determine the amount of Al to add to obtain constant [Al_i] at different [FA] in a bioassay with fish (Fig. A1-2). This assay, at pH 5.0, involved varying [FA] while attempting to maintain [Al_i] constant (figure A1-4).

Samples were taken directly from the bioassay tanks and analyzed colorimetrically as described in the methods ($Al_{cv} - Al_o$). The dialysis bag samples were also analyzed colorimetrically for inorganic (dialysable) Al at the end of the assay. There was relatively good agreement between the two sampling techniques used to determine inorganic Al experimentally. The predictions derived from the MINEQL⁺ calculations overestimated Al_i . These were static bioassays, without renewal of the solutions, and it is possible that losses of inorganic Al occurred, due to sorption to the containers and organisms. The MINEQL⁺ calculations did predict in nearly equivalent concentrations of Al_i at different $[Al_t]$, as observed experimentally, the critical factor in this experimental design.

CONCLUSIONS

In conclusion, we found the use of titration data coupled with MINEQL⁺ equilibrium modeling to be useful for the prediction of inorganic Al concentrations in acidic organic soft waters. The ability to compare expected and observed concentrations of Al allows for greater control of the complex changes in solution chemistry which may occur during bioassays. However, the use of models such as MINEQL⁺ should be done with caution. We suggest that the results of chemical equilibrium modeling be compared with titration data to verify the accuracy of the predictions. We also stress the importance of using free-ion concentrations for the calculation of conditional constants derived from titration data. This is particularly important for metals which undergo considerable changes in inorganic speciation with pH, and for which no reliable methods exists for direct measurement of the free-ion concentration. The use of actual titration data specific to our fulvic acid, as opposed to literature values, also contributed to the relatively good agreement we observed between measured and predicted inorganic Al.

REFERENCES

- Browne, B.A. and Driscoll, C.T. 1993. pH dependent binding of aluminum by fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* **27**: 915-922.
- Campbell, P. G. C., H.J. Hansen, B. Dubreuil and W. O. Nelson. 1992. Geochemistry of Quebec North Shore rivers during snowmelt: organic acid pulse and aluminum mobilization. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **49**: 1938-1952.
- Driscoll, C.T., J.P. Baker, J.J. Bisogni and C.L. Schofield. 1980. Effect of aluminum speciation on fish in dilute acidified waters. *Nature (Lond.)* **284**: 161-164.
- Hansen, H.J. and P.G.C. Campbell. 1987. Aluminium speciation in rivers on the Canadian precambrian shield (Cote-Nord du St-Laurent, Quebec) during snowmelt. pp. 372-379. *In*: Perry, R., R.M. Harrison, J.N.B. Bell and J.N. Lester, eds. *Acid Rain: Scientific and Technical Advances*. Selper Ltd. London.
- Lacroix, G. L. 1989. Ecological and physiological responses of Atlantic salmon in acidic organic rivers of Nova Scotia, Canada. *Water Air Soil Pollut.* **46**: 375-386.
- Langford, C.H., D.S. Gamble, A.W. Underdown and S. Lee. 1983. Interaction of metal ions with a well characterized fulvic acid. pp. 219-237. *In*: Christman, R.F and E. T. Gjessing, eds. *Aquatic and Terrestrial Humic Materials*. Ann Arbor Science Publishers. Ann Arbor, MI.
- Leivestad, H., E. Jensen, H. Kjartansson and L. Xingfu. 1987. Aqueous speciation of aluminium and toxic effects on Atlantic salmon. *Anns.Soc.R.Zool.Belg.* **117** (Suppl 1): 387-398.
- Lydersen, E., A.B.S. Poleo, I.P. Muniz, B. Salbu and H.E. Bjornstad. 1990. The effects of naturally occurring high and low molecular weight liorganic and organic species on the yolk-sack larvae of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) exposed to acidic aluminium-rich lake water. *Aquat.Toxicol.* **18**: 219- 229.
- Parkhurst, B.R., H.L. Bergman, J. Fernandez, D.D. Gulley, J.R. Hockett and D.A. Sanchez. 1990. Inorganic monomeric aluminum and pH as predictors of acidic water toxicity to brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* **47**: 1631-1640.
- Pott, D.B., J.J. Alberts and W. Elzerman. 1985. The influence of pH on the binding capacity and organic stability constants of aluminum and naturally-occurring organic matter. *Chem. Geol.* **48**: 293-304.
- Potts, W. T. W. and P. G. McWilliams, P. G. 1989. The effects of hydrogen and aluminium ions on fish gills. p. 201-220 *In*: *Acid Toxicity and Aquatic Animals*, Morris, R., E.W. Taylor, D.J. A. Brown and J. A. Brown, J. A., eds. Cambridge University Press, Cambridge. (Society for Experimental Biology Seminar Series; v. 34).

Rogeberg, E.J.S. and A Henriksen. 1985. An automated method for fractionation and determination of Al species in freshwaters. *Vatten* 41: 41-48.

Royset, O. and T.J Sullivan, 1986. Effect of dissolved humic compounds on the determination of aqueous aluminum by three spectrophotometric methods. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 27: 305-314.

Scherer, W.D. and C.T. Driscoll. 1987. An evaluation of uncertainty associated with aluminum equilibrium calculations. *Water Resour. Res.* 23: 525-534.

Schecher, W. D. and D. C. McAvoy. 1991. *MINEQL⁺*: A chemical equilibrium program for personal computers. Environmental Research Software, Hallowell, ME.

Table A1-1. Means (\pm S.D.) of $\log K_C$ and CC values determined from Langmuir plots of Al-FA titration data.

[FA], $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	pH	range of [Al], μM	$\log K_C$	CC ($\mu\text{moles Al} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ FA}$)
5	5.0	0.18 - 9.3	6.60 (0.08)	1.19 (0.10)
10	5.0	0.37 - 13.3	6.08 (0.18)	0.95 (0.16)
20	5.0	0.37 - 17.8	5.85 (0.18)	1.00 (0.08)
10	4.5	0.18 - 14.1	6.16 (0.19)	1.08 (0.12)

Table A1-2. Recalculated $\log K_C$ values obtained using estimates of $[Al^{3+}]$ for Al_{free} .

pH, [FA]	$\log K_C$
pH 5.0, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	7.37
pH 5.0, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6.54
pH 5.0, $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6.27
pH 4.5, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6.18

Table A1-3. Inorganic Al concentrations at pH 4.5 and a [FA] of $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Values for $[\text{Al}_i]$ were either calculated directly from the Langmuir equation ("equation") or obtained by using the MINEQL⁺ chemical equilibrium program with the constants from Table A1-1 (CC values) and Table A1-2 ("corrected" Log K_C values).

	Al_t ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Al_i (μM)	Al_i (μM) MINEQL ⁺	Al_i (μM) equation
	10	0.37	0.04	0.04
	20	0.74	0.09	0.08
	50	1.85	0.24	0.22
	70	2.60	0.36	0.33
	100	3.70	0.59	0.53
	120	4.44	0.76	0.70
	150	5.55	1.09	1.00
	200	7.41	1.81	1.68
	250	9.26	2.79	2.64

Table A1-4 . Inorganic Al concentrations at pH 5.0 and [FA] concentrations of 5, 10 and 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Values of $[\text{Al}_i]$ (μM) were either calculated directly from the Langmuir equation ("equation") or obtained by using the MINEQL⁺ chemical equilibrium program with the constants from Table A1-1 (CC values) and Table A1-2 ("corrected" Log K_C values).

Al_t		$5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$		$10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$		$20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	
$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	μM	MINEQL ⁺	equation	MINEQL ⁺	equation	MINEQL ⁺	equation
10	0.37	0.02	0.01	0.05	0.04	0.05	0.04
20	0.74	0.03	0.03	0.10	0.09	0.10	0.09
50	1.85	0.10	0.09	0.28	0.25	0.25	0.23
70	2.59	0.16	0.15	0.41	0.37	0.36	0.33
100	3.70	0.32	0.30	0.64	0.57	0.54	0.49
120	4.44	0.50	0.46	0.82	0.74	0.67	0.61
150	5.56	0.93	0.88	1.13	1.02	0.89	0.80
200	7.41	2.19	2.14	1.79	1.63	1.27	1.16
250	9.26	3.81	3.78	2.63	2.43	1.75	1.59

Figure A1-1. Bound Al calculated using MINEQL⁺ for three [FA] at pH 5.0, at a total Al of 7.4 μM . Bound was calculated with the $\log K_c$ specific for each [FA]. (solid bars, on left), and with the $\log K_c$ for 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ FA (= 6.54) to estimate bound Al at 5 and 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (open bar, on right).

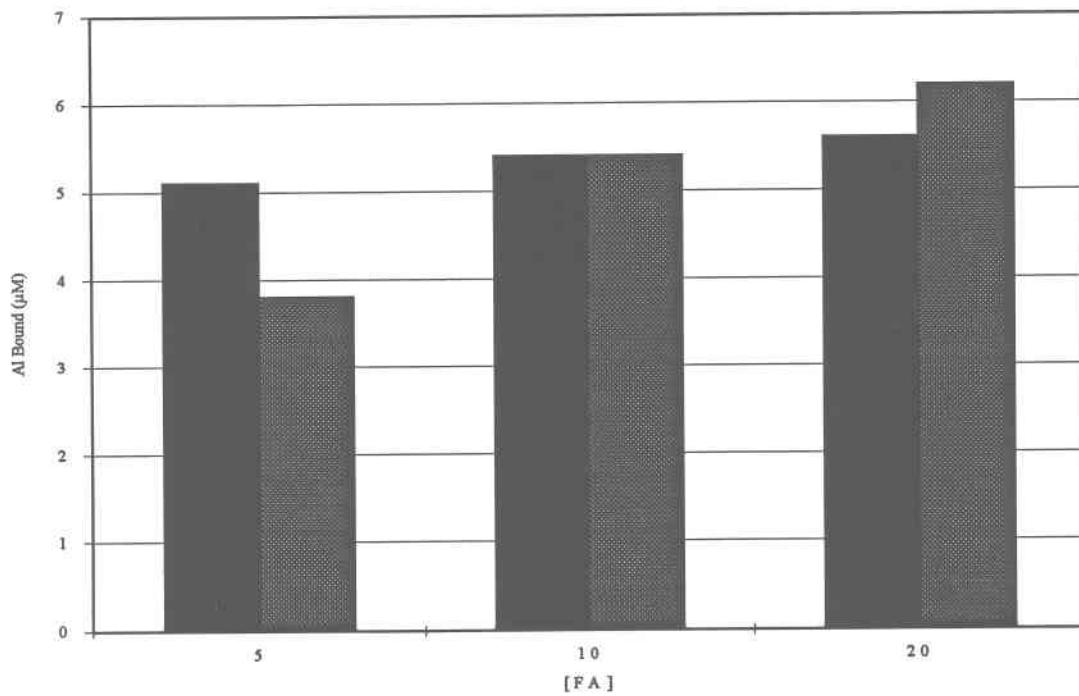
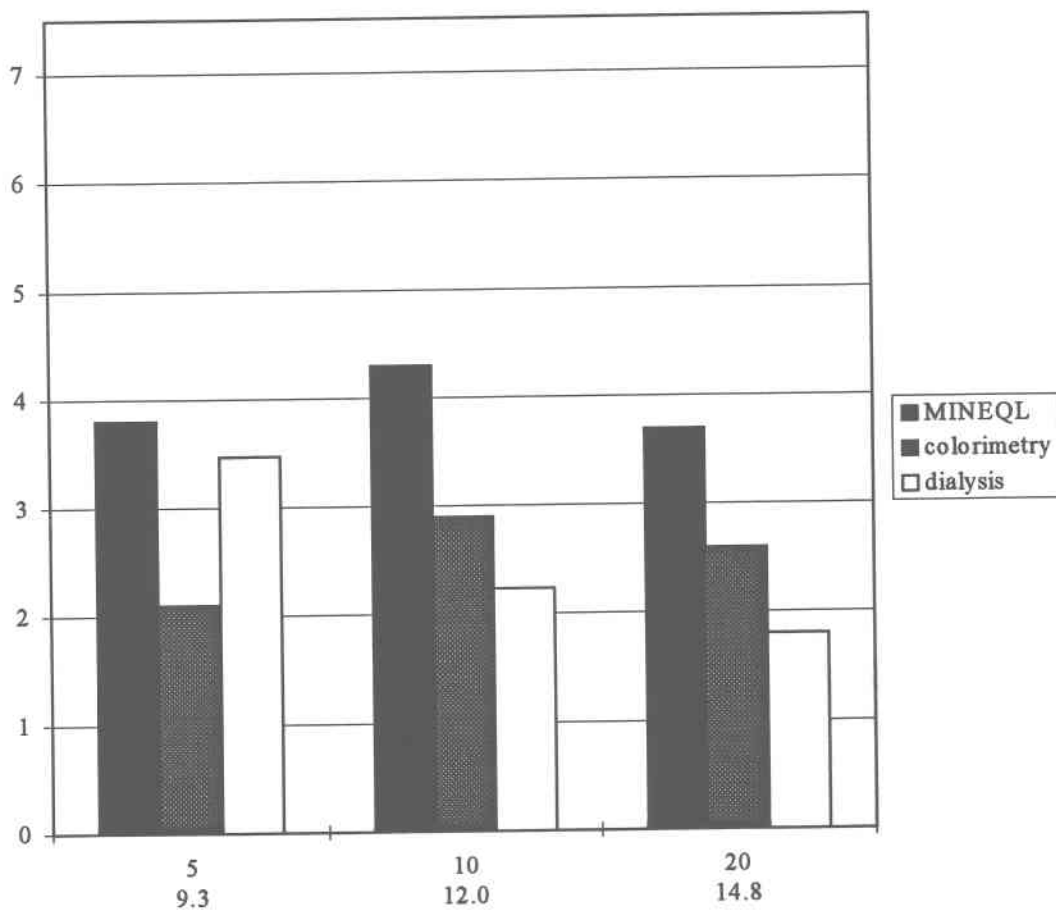


Figure A1-2. Inorganic Al concentrations (μM) in bioassay tanks at pH 5.0. $[\text{Al}_i]$ was measured in samples taken directly from the tanks (“colorimetry”, mean \pm SD) and on the contents of dialysis bags (“dialysis”). Predicted $[\text{Al}_i]$ (“MINEQL”) were calculated using MINEQL⁺ and the constants in Tables 1 and 2.



ANNEXE 2.

Analyse de l'Al réactif à l'acide par l'analyseur Technicon.

Collecte et conservation des échantillons:

Les teneurs en Al dissous total (l'Al réactif à l'acide) sont déterminées dans les échantillons préservés à l'acide. Tous les échantillons sont manipulés et entreposés à l'aide de matériel de laboratoire en polypropylène préalablement lavé à l'acide. Les échantillons destinés à la détermination du métal total sont conservés en ajoutant du HNO_3 de qualité 'métaux traces' pour obtenir une concentration finale de 0.1 M. Les échantillons sont conservés au moins 24 h à la température de la pièce avant l'analyse.

L'analyseur Technicon: montage et réactifs:

L'appareil Technicon (tubes, hélices de mélange en verre et plastique) est monté selon la méthode pour l'analyse de l'Al monomère. La préparation de l'indicateur violet de pyrocatechol (PCV) et de la solution de phenanthroline est identique. Le tampon est préparé selon la recette, sauf que le pH final est ajusté à pH 9.6-9.9. En général, il est préférable de préparer le tampon 24 h avant l'utilisation pour stabiliser le pH. Les ajustements finaux peuvent être faits avec du NaOH concentré (10 N), ou du HCl concentré. L'eau de rinçage est une solution de 0.1 N HNO_3 (préparée avec de l'acide ultra-pur). La même solution est utilisée pour préparer les standards.

L'analyseur Technicon: opération:

Avant de faire fonctionner l'appareil, il faut vérifier que la vanne de la colonne d'échange ionique soit bien fermée (pour ne pas être endommagée/changée par la solution acide). Faire fonctionner l'appareil pendant 15 à 20 minutes. Avant de réagir avec le tampon, l'indicateur doit avoir une

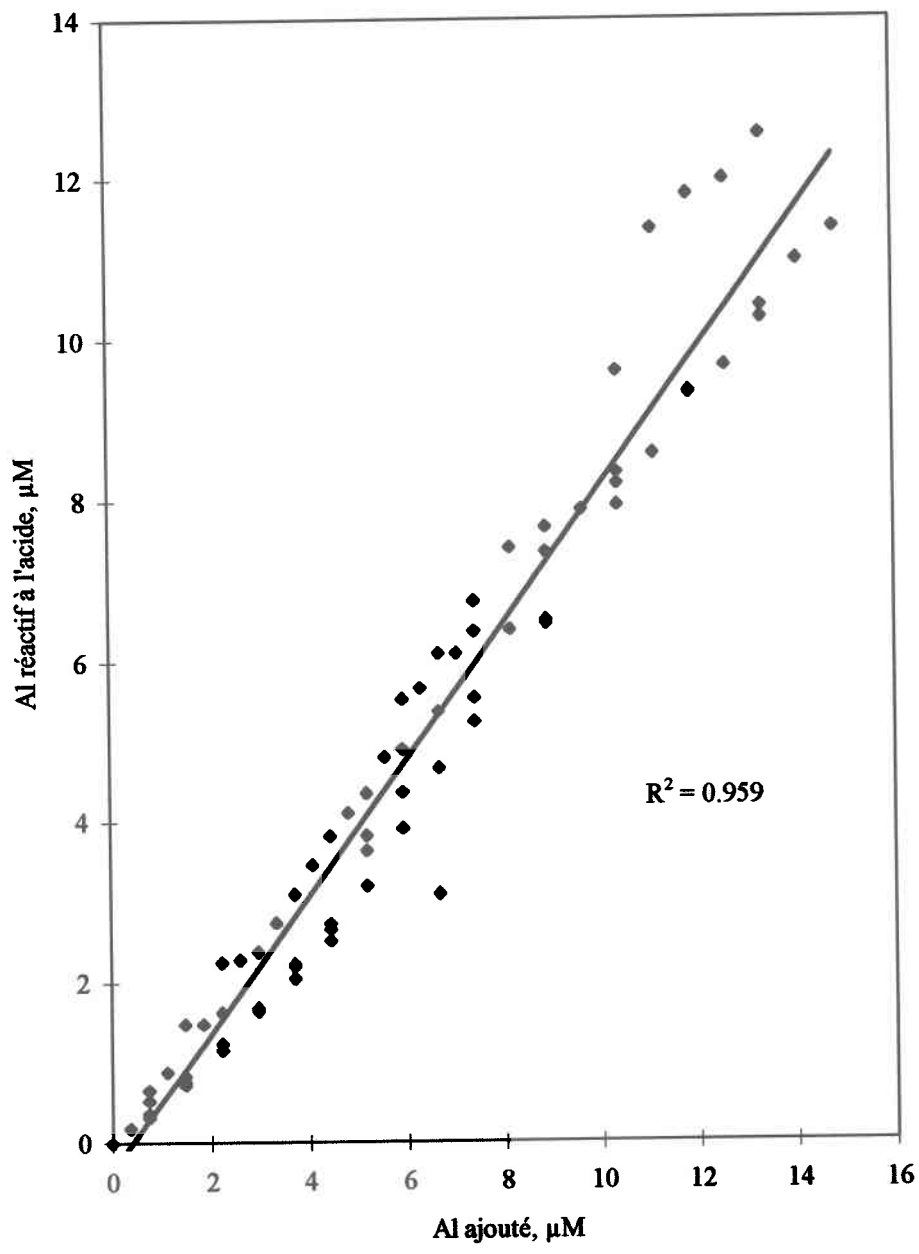
couleur violet-foncé, qui changera à une couleur jaunâtre avec le tampon. Détacher le tube qui entre dans le spectromètre et faire la collecte du liquide sortant du système de mélange, pendant 10 à 15 minutes. Mesurer le pH de ce liquide rapidement (3 à 5 minutes). Si le pH n'est pas entre pH 6.0 -6.1, ajuster le pH du tampon, par unités de 0.2 pH, avec du NaOH concentré (10 N), ou de l'acide chlorhydrique concentré. Continuer de mesurer le pH du tampon pendant 20 minutes, afin de le stabiliser. Dès que le pH du tampon est stable, repartir l'appareil et remesurer le pH de la solution à l'entrée du spectromètre.

Passer les standards, vérifier la relation linéaire, et faire passer les échantillons. Avant de fermer l'appareil, repasser les standards. Il est à noter que les solutions qui contiennent de la matière organique dissoute (MOD) peuvent causer une interférence. On peut corriger pour cette interférence en mesurant des solutions qui ont été préalablement additionnées d'EDTA à l'état solide (pour donner une concentration finale de 10 μM , suffisamment pour complexer tout l'aluminium et empêcher sa réaction avec le PCV).

Résultats:

La méthode a été utilisée pour quantifier l'Al total dans les solutions de titration (différentes concentrations d'acide fulvique avec ajout d'Al). Les mesures de l'Al total ont été corrigées pour l'interférence de l'acide fulvique, déterminée d'après les mesures obtenues avec les solutions sans ajout d'Al. Il y a une très bonne relation entre les concentrations nominales en Al et les mesures de l'Al total ($R^2 = 0.96$; Figure 1).

Figure A2-1. La relation entre les concentrations d'Al ajouté et les mesures de l'Al réactif à l'acide dans les solutions avec l'acide fulvique ($y = 0.85x - 0.35$).



ANNEXE 3

Relation entre la concentration de l'acide fulvique et les mesures de l'absorbance à 400 nm et du carbone organique total.

Introduction

La concentration en acide fulvique des solutions expérimentales a été déterminée par l'absorbance à 400 nm, et par les mesures de carbone organique total (COT). Des relations entre la concentration pesée de l'acide fulvique, l'absorbance à 400 nm, et les mesures de COT sont présentées.

Matériel et Méthodes

Préparation des solutions

Les solutions d'acide fulvique (AF) ont été préparées à l'aide d'un acide fulvique commercial (acide fulvique Laurentien, Ecolinc Inc., Roxboro, QC). L'acide fulvique en poudre a été pesé, à 0.01 g près, sur une balance Mettler. Une solution-mère de 20 mg·mL⁻¹ d'AF a ensuite été préparée avec de l'eau déminéralisée ultrapure. Cette solution-mère a été utilisée pour préparer des séries de concentrations d'Al, pour des études de titration. Les études de titration ont été faites avec des concentrations nominales d'acide fulvique de 2.5, 5, 10 et 20 mg·L⁻¹ et des ajouts d'Al. Les concentrations inférieures d'acide fulvique ont été préparées en diluant la solution-mère avec de l'eau ultrapure. Chaque série de titration a comporté de 16 à 24 béchers en polypropylène, contenant un volume de 100 mL. Après les ajouts d'Al, le pH de chaque bécher a été réglé au pH expérimental (pH 5.0 ou pH 4.5), avec de petites quantités de HNO₃ (0.1 N, de qualité 'métaux traces'). Par la suite, les couvercles ont été placés sur les béchers et ceux-ci ont été entreposés dans une chambre froide à 10 °C. Après une période de 24 h, le pH a été revérifié et ajusté au besoin. Les solutions ont reposé pendant un minimum de 48 h pour équilibrer l'Al-AF. Après

chaque étude de titration, des prélèvements ont été faits dans 4 à 5 béchers choisis au hasard, pour les mesures de carbone organique total (COT). L'absorbance des 4 à 5 solutions a été mesurée juste après l'étude. Les échantillons pour l'analyse du COT ont été entreposés à 4 °C dans l'obscurité avant d'être analysés.

Les échantillons pour la courbe standard (AF-absorbance; Figure 1) ont été préparés par M. Eric Fortin, un stagiaire du CEGEP St.Jean, pendant son séjour au laboratoire. M. Fortin a préparé des dilutions d'une solution-mère d'acide fulvique ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) et a pris les lectures d'absorbance de ces dilutions, dans la gamme entre 1 et $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AF.

L'absorbance à 400 nm.

L'absorbance des échantillons a été mesurée au moyen d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer, selon le mode d'emploi du manufacturier. Après une période de réchauffement, l'appareil a été mis à zéro avec un blanc (eau ultrapure). L'absorbance des échantillons a été comparée avec celle du blanc. L'absorbance de l'échantillon a été notée dès que la mesure se soit stabilisée.

Mesure du carbone organique total (COT):

La concentration initiale d'AF dans les bassins a été vérifiée en déterminant l'absorbance à 400 nm, par comparaison avec une courbe de calibration standard (Annexe 3). Au cours des expériences, des échantillons ont été pris pour déterminer le COT. Ces échantillons ont été conservés à 4°C dans l'obscurité, jusqu'au moment de l'analyse, dans les 72 h suivant la fin de l'expérience.

Le COT a été mesuré par photooxydation des échantillons pré-acidifiés et purgés de CO_2 ; le carbone inorganique produit par irradiation aux UV a été mesuré par dialyse automatisée par comparaison avec une solution standard de NaOH, suivi de conductimétrie. Cette méthode a une limite de détection de $0.1 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$.

Résultats

Le tableau A3-1 présente les mesures de COT et l'absorbance à 400 nm des solutions choisies après les études de titration, avec la concentration nominale de l'acide fulvique. Les relations entre la concentration de l'acide fulvique, l'absorbance, et le COT ont été quantifiées au moyen de régressions linéaires (tableau A3-2). On peut considérer qu'il y a une très bonne relation entre les variables [AF], [COT] et l'absorbance. Les valeurs R^2 ont varié entre 0.97 et 0.99 (tableau A3-2). La courbe standard (concentration en acide fulvique, absorbance) est linéaire, avec un R^2 de 0.99.

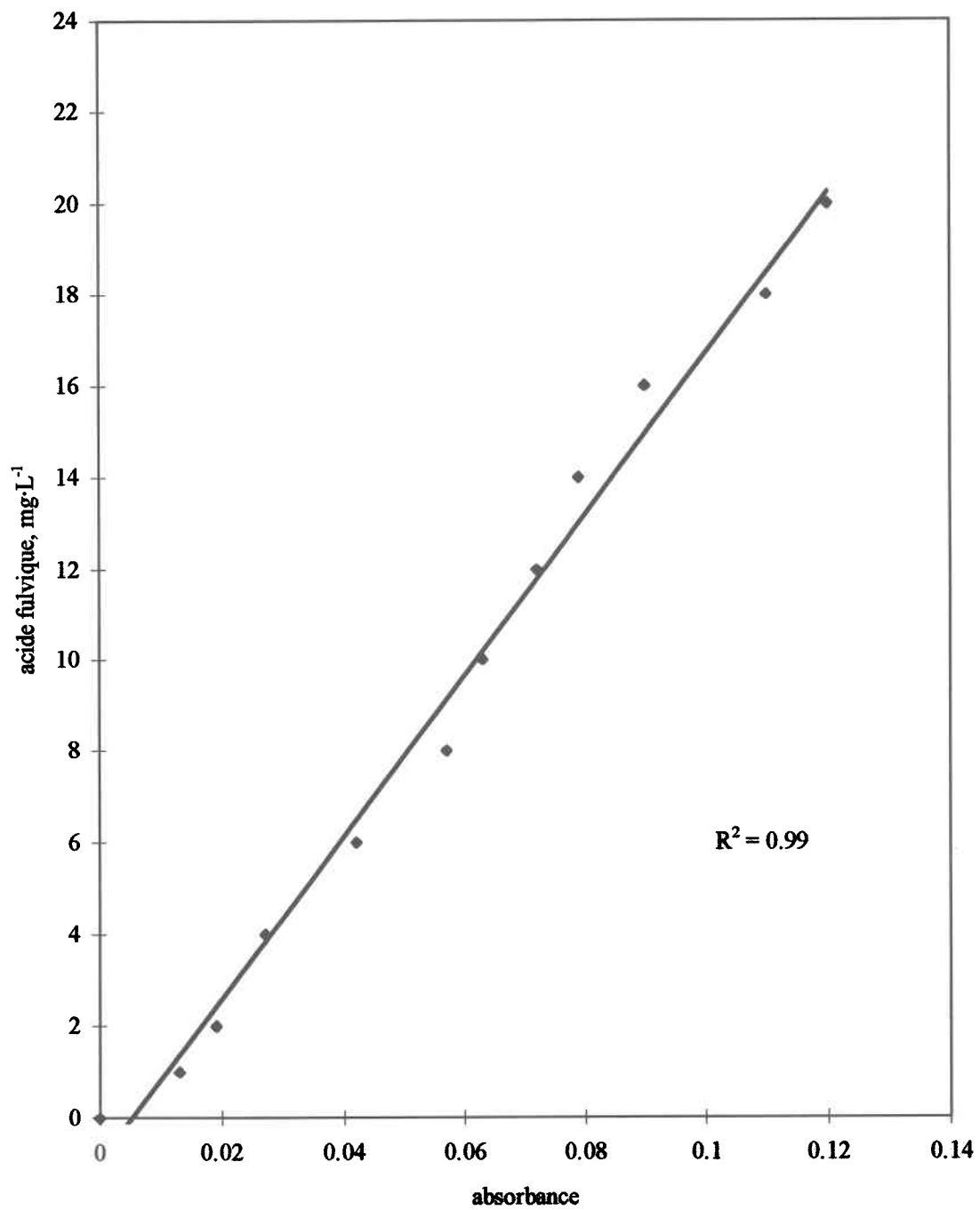
Tableau A3-1. Les mesures de COT et d'absorbance à 400 nm et les concentrations d'acide fulvique.

[FA], mg·L ⁻¹	COT, mg C·L ⁻¹	absorbance
2.5	1.46	0.008
2.5	1.51	0.009
2.5	1.03	0
5	2.17	0.022
5	1.73	0.022
5	2.17	0.029
5	1.73	0.024
5	1.95	0.022
10	3.64	0.044
10	3.60	0.046
10	3.64	0.045
10	3.60	0.046
10	3.62	0.044
10	3.83	0.049
10	3.60	0.052
10	2.94	0.048
20	6.63	0.107
20	6.00	0.115
20	6.00	0.117
20	6.63	0.109
20	6.32	0.114
20	6.82	0.115
20	6.78	0.114
20	6.82	0.118
20	6.72	0.114
20	6.80	0.112

Tableau A3-2. Relation entre la concentration en acide fulvique, le COT, et l'absorbance à 400 nm.

relation	équation	R ²
[AF], COT	$y = 3.25 - 1.46 (\text{mg C}\cdot\text{L}^{-1})$	0.98
[AF], absorbance	$y = 160.96 + 1.84 (\text{absorbance})$	0.99
COT, absorbance	$y = 48.63 + 1.07 (\text{absorbance})$	0.97

Figure A3-1. La relation entre la concentration en acide fulvique et l'absorbance à 400 nm.



ANNEXE 4

Détermination du temps minimum pour atteindre l'équilibre entre l'Al inorganique en solution et à l'intérieur des sacs à dialyse Spectra-Por 7.

Introduction

Les résultats d'une expérience préliminaire (tableau A4-1) indiquaient qu'une période de 24 h ne suffit pas pour atteindre l'équilibre entre l'intérieur des sacs à dialyse et les solutions contenant de l'acide fulvique. Durant ces essais préliminaires, les sacs à dialyse contenaient une quantité assez constante d'Al "organique monomère". Les buts des expériences étaient de:

1. quantifier le temps minimum nécessaire pour atteindre un équilibre entre l'Al à l'intérieur et à l'extérieur du sac.
2. déterminer si les complexes Al-AF peuvent traverser la membrane du sac à dialyse.
3. déterminer si l'acide fulvique peut traverser la membrane du sac à dialyse.

Les mesures faites pendant les expériences comprenaient la concentration en acide fulvique (par absorbance ou dosage du carbone organique total), l'Al total (réactif à l'acide; Al_t), et les formes monomères de l'Al (réactif avec l'indicateur violet de pyrocatechol - Al_{pcv} ; organique - Al_o ; et inorganique, Al_i). Les mesures ont été faites sur des échantillons prélevés dans les sacs à dialyse, et sur des solutions d'eau douce reconstituée (EDR) et d'EDR avec acide fulvique.

Matériel et Méthodes

Solutions EDR avec Al:

Les expériences ont eu lieu dans une chambre à température contrôlée à 10°C. Les solutions ont été préparées dans deux bassins de 20 L, un bassin contenant une solution d'EDR seulement, et l'autre une solution d'acide fulvique (concentration nominale de 10 mg·L⁻¹). Les volumes appropriés des solutions-mère d'Al (1000 ppm Al) et d'acide fulvique (20 mg·mL⁻¹ d'AF dans l'eau ultrapure) ont été ajoutés aux bassins. Dans l'expérience 1, la concentration nominale en Al était de 4.6 µM dans les deux bassins; dans l'expérience 2, elle était de 9.3 µM (solution acide fulvique) et 5.6 µM Al (solution EDR).

Les solutions ont reposé pendant un minimum de 24 h pour stabiliser le pH et équilibrer l'Al-AF. Le pH a été ajusté à 5.0, et, au besoin, il a été corrigé manuellement, en ajoutant de petites quantités de HNO₃ (2.0 N). Le pH moyen (écart-type) à l'expérience 1 était 4.9 (0.2), et à l'expérience 2, de 5.1 (0.2). Un système de pompes Masterflex a été utilisé pour agiter les solutions pendant les expériences.

Les sacs de dialyse de chaque bassin ont été échantillonnés pour l'analyse de l'Al et l'absorbance (expérience 1) ou le COT (expérience 2) après 24, 48, et 96 heures. Dans l'expérience 2, le contenu des sacs échantillonnés à 96 h s'est avéré contaminé et des prélèvements additionnels ont été faits après 120 h.

Analyse de l'Al

Tous les échantillons ont été manipulés et entreposés à l'aide de matériel de laboratoire en polypropylène préalablement lavé à l'acide. Les échantillons destinés à la détermination du métal total ont été préservés en ajoutant du HNO₃ de qualité 'métaux traces' pour obtenir une concentration finale de 0.1 M. Les échantillons pour l'analyse de l'Al total ont été conservés au moins 24 h à la température de la pièce avant l'analyse.

La détermination de l'Al dans les solutions a été faite par la méthode colorimétrique automatisée. Les échantillons destinés à la détermination de l'Al monomère ont été filtrés (0.4 μm) mais non acidifiés. Les teneurs en Al dissous total (l'Al réactif à l'acide) ont été mesurées séparément, sur les échantillons préservés à l'acide. Dans les deux expériences, un échantillon d'acide fulvique, sans Al, a été analysé pour quantifier l'interférence de l'acide fulvique avec les mesures d'Al.

Dialyse:

Les sacs à dialyse (Spectra-Por 7, pour sélectionner les molécules de poids moléculaire <1000 , qualité 'analyse des métaux traces') ont trempé pendant la nuit dans de l'eau déminéralisée ultrapure (expérience 1) ou dans une solution de 0.01% HNO_3 (expérience 2). Avant d'être placés dans les bassins, ils ont été remplis avec $\approx 10 - 15$ mL d'EDR et bien fermés. Ils ont ensuite été placés dans les bassins (9 par bassin dans l'expérience 1, 12 par bassin dans l'expérience 2), et y sont restés jusqu'à la fin du bioessai (96 h ou 120 h). À la fin de l'essai, les sacs ont été retirés des bassins et bien rincés à l'eau déminéralisée ultrapure pour enlever l'Al adsorbé. Le contenu a ensuite été transvidé dans des éprouvettes de polypropylène propres et analysé le jour même pour l'Al inorganique, sans toutefois faire de filtration.

Absorbance et COT:

Dans l'expérience 1, les concentrations en acide fulvique dans les bassins expérimentaux et dans les sacs à dialyse ont été déterminées par absorbance à 400 nm, par comparaison avec une courbe standard. La moyenne (\pm ET, n) des mesures dans les bassins expérimentaux avec AF a été de $10.0 (\pm 0.8, 3) \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Les mesures de l'absorbance des contenus des sacs à dialyse n'ont pas été différentes du témoin (eau ultrapure).

Dans l'expérience 2, la concentration en carbone organique total (COT) a été mesurée dans les échantillons prélevés des bassins expérimentaux et dans les contenus des sacs à dialyse.

Résultats et Discussion

Expérience 1:

Dans l'expérience 1, à cause de problèmes techniques avec l'analyseur Technicon, il n'a pas été possible de mesurer les concentrations en Al monomère dans les bassins EDR-AF. Les échantillons ont été entreposés à 4°C et ont été analysés 24 h après la fin de l'expérience (à 120 h). L'analyse faite au jour 0 a été considérée non-valide, parce que la concentration de l' Al_{pcv} dans le bassin EDR-AF était plus élevée que les mesures de l' Al_t . Le calcul des moyennes des mesures Al_{pcv} , Al_o et Al_i a été fait avec les mesures des jours 1, 2 et 4; ces échantillons avaient tous été analysés en même temps.

Après 96 heures, la concentration d' Al_{pcv} mesurée dans les sacs à dialyse dans la solution EDR-AF a été semblable à la concentration d' Al_{pcv} mesurée en solution (moyenne des jours 1, 2 et 4 tableau A4-2). Au jour 4, la concentration de l' Al_{pcv} mesurée dans les sacs à dialyse a été 80% de la concentration moyenne de l' Al_i mesurée en solution (0.8 μM Al_{pcv} et 1.0 Al_i , respectivement; tableau A4-2). Il est à noter que l'interférence de l'acide fulvique (2 μM "Al") a été plus élevée que celle observée dans les expériences antérieures et cette interférence n'a pas été considérée dans le calcul des concentrations en Al.

Dans le bassin EDR de l'expérience 1, la concentration en Al mesurée dans les sacs à dialyse au jour 4 a été identique à la concentration d'Al mesurée dans la solution (1.3 μM Al_{pcv} ; tableau A4-3). L'accord entre les mesures a été bon si l'on considère les moyennes. La moyenne des mesures dans les sacs à dialyse pour les jours 1 et 2 a été de 2.0 μM Al, comparé avec une moyenne pour l'Al en solution de 1.8 μM aux jours 1, 2 et 3 (tableau A4-3). D'après ces résultats, il semble qu'un délai minimum de 48 heures soit nécessaire pour l'atteinte d'un équilibre, entre l'intérieur des sacs à dialyse et la solution, même pour les solutions d'EDR sans AF.

Expérience 2:

Dans l'expérience 2, les concentrations en Al mesurées dans la solution EDR-FA suggèrent qu'une portion de l'Al ait été présente sous forme non-monomère. Les teneurs mesurées en Al_i ont été supérieures aux concentrations en Al_{pcv} (tableau A4-4). L'interférence de l'acide fulvique, mesurée avec une solution d'AF sans Al, a été de $0.7 \mu\text{M}$ "Al". Les mesures de l'Al total (réactif à l'acide) ont été corrigées pour cette absorbance de l'acide fulvique sans Al. Dans cette expérience, il n'y a pas eu d'interférence de l'acide fulvique sans Al avec les mesures d' Al_{pcv} .

Pendant l'étude, les teneurs en Al_{pcv} dans la solution ont varié de 3.4 à $5.2 \mu\text{M}$, possiblement à cause des changements de pH qui ont été notés pendant l'expérience. Pendant la nuit, le pH dans le bassin EDR-AF a augmenté à pH 5.2 au jour 2, et à pH 5.4 au jour 4. Dans les deux cas, le pH a été réajusté à pH 5.0 le matin suivant, mais l'augmentation temporaire du pH a possiblement causé une diminution dans la proportion d'Al monomère dans ce bassin.

Malgré ce changement de pH pendant l'expérience, une très bonne relation existe entre l'Al mesuré dans les sacs à dialyse et dans la solution. Après 5 jours, la teneur de l'Al dans les sacs à dialyse a été semblable à la teneur moyenne de l' Al_i mesurée en solution. Au jour 5, la concentration de l' Al_{pcv} dans les sacs à dialyse a été de $1.5 \mu\text{M}$; par comparaison, la moyenne des mesures de l' Al_i dans la en solution a été de $1.6 \mu\text{M}$ (tableau A4-4).

Le temps pour atteindre un équilibre pour l'Al entre l'intérieur des sacs à dialyse et la solution semble être de 48 heures à tout le moins (figure A4-1). Après 2 jours, il n'y a pas de différence significative entre la concentration de l'Al dans les sacs à dialyse et la moyenne des teneurs de l' Al_i mesurée dans la solution ($p > 0.05$, test -t; figure A4-1).

La présence de petites quantités d' Al_o à l'intérieur des sacs à dialyse a été notée dans les études antérieures. Dans les sacs à dialyse échantillonnés à l'expérience 1, les teneurs en Al_o ont été inférieures à la limite de détection ($0.1 \mu\text{M}$). Dans l'expérience 2, les teneurs en Al_o mesurées à l'intérieur des sacs à dialyse ont été de 0.3 à $0.4 \mu\text{M}$ (tableau A4-5). Cette petite quantité de "Al_o",

semblable aux mesures obtenues précédemment, a été constante pendant l'étude et on peut conclure que ces mesures sont un artefact. De plus, il n'y a pas eu de différence entre les teneurs moyennes en Al_i et en Al_{pcv} mesurées à l'intérieur des sacs à dialyse ($p > 0.05$, test- t).

Dans le bassin EDR sans AF, les concentrations en Al mesurées dans la solution suggèrent qu'une portion de l'Al était là aussi présent sous forme non-monomère. Les teneurs en Al_i mesurées ont été supérieures aux concentrations en Al_{pcv} (tableau A4-6). Il est aussi à noter que les teneurs en Al_i mesurées dans les sacs à dialyse ont été plus élevées que les concentrations en Al_{pcv} dans les sacs, et ont aussi été plus élevées que l' Al_i en solution (tableau A4-6). Il est possible que les sacs à dialyse aient été précontaminés avec de l'Al, malgré qu'ils aient trempé dans une solution de faible acidité avant l'expérience. Une autre explication est que ces mesures d' Al_i dans les sacs à dialyse peuvent être causés par un artefact semblable à celui qui indiquent la présence d' Al_0 à l'intérieur des sacs.

Par contre, il y a une bonne relation entre les mesures de l'Al dialysable et l' Al_i en solution. La moyenne des teneurs en l' Al_{pcv} mesurées dans les sacs à dialyse et la moyenne des concentrations en Al_i mesurées en solution ont été identiques ($5.5 \mu M$, tableau A4-6). De plus, l'atteinte d'un équilibre entre les sacs à dialyse et la solution EDR a été rapide dans cette solution avec des teneurs en Al plus élevées qu'à l'expérience 1. Il n'y a pas eu de différences significatives entre la moyenne de l' Al_i en solution et les mesures de l'Al dans les sacs à dialyse au jour 1, 2 ou 5 ($p > 0.05$, test- t , figure A4-2).

Les mesures du carbone organique total ($mg \cdot L^{-1}$) dans les solutions et à l'intérieur des sacs à dialyse ont révélé la présence de petites quantités de carbone dans les sacs à dialyse (tableau A4-7). Les concentrations en COT mesurées dans les sacs à dialyse ont été semblables dans les deux solutions (EDR et EDR-FA), et semblables au "bruit de fond" mesuré dans la solution EDR (tableau A4-7). De plus, les valeurs de COT mesurées dans les sacs à dialyse prélevés de la solution EDR-FA ont été inférieures aux teneurs mesurées dans la solution même. *On peut conclure que l'acide fulvique ne peut pas traverser la membrane des sacs à dialyse.*

Conclusions

D'après les résultats de cette étude, on peut conclure que:

- le temps pour atteindre un équilibre entre l'Al à l'intérieur des sacs à dialyse (pour sélectionner les molécules de poids moléculaire <1000) et dans une solution d'EDR-FA à pH 5.0 est d'environ 48 h.
- il est peut probable que les complexes Al-AF puissent traverser la membrane du sac à dialyse, parce que les teneurs en COT et Al_o mesurées dans les sacs à dialyse sont comparativement faibles.
- il est peu probable que l'acide fulvique puisse traverser la membrane du sac à dialyse parce que les teneurs en COT mesurées à l'intérieur des sacs sont semblables au "bruit de fond" déterminé dans une solution d'EDR seulement.

Finalement, on peut considérer les concentrations en Al mesurées à l'intérieur des sacs à dialyse, et dans les solutions EDR-AF, déterminées pendant les expériences avec des poissons en conditions statiques. Ces expériences ont été effectuées dans des bassins de 60 L à pH 5.0. Les mesures de l'Al dans la solution (Al_{pev}, Al_o, Al_i) ont été faites à chaque jour, et les contenus des sacs à dialyse ont été analysés après 120 h. En général, il y a une bonne relation entre les teneurs moyennes d'Al_i mesurées pendant les expériences, et les valeurs obtenues pour les prélèvements dans les sacs à dialyse ($R^2 = 0.90$; figure A4-3). On peut donc avoir confiance en la fiabilité de la méthode des sacs à dialyse pour faire le suivi des concentrations de l'Al inorganique dans des solutions contenant de l'acide fulvique.

Tableau A4-1. Concentrations en Al (μM) mesurées dans les solutions et à l'intérieur des sacs à dialyse (1000 MWCO) après 24 heures.

[AF] $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	sacs à dialyse			solution
	Al_{pcv}	Al_o	Al_i	Al_i
20	0.5	0.1	0.4	1.2
20	0.5	0.1	0.4	0.8
10	0.8	0.2	0.6	1.6
10	0.7	0.1	0.6	1.8

Tableau A4-2. Concentrations en Al (μM) mesurées dans la solution EDR-AF dans l'expérience 1. Les moyennes ont été calculées avec les mesures de 24, 48 et 96 h.

Jour	solution				sacs à dialyse
	Al_t	Al_{pcv}	Al_o	Al_i	Al_{pcv} moyenne (ET, n)
0	4.2	(4.8)	(1.1)	(3.7)	
1	3.2	2.8	1.5	1.3	0.1 (0.1, 3)
2	4.4	3.1	2.6	0.5	1.1 (0.4, 3)
4	4.7	3.5	2.3	1.2	0.8 (0.1, 2)
moyenne (ET)	4.1 (0.6)	3.1 (0.3)	2.1 (0.5)	1.0 (0.4)	

Tableau A4-3. Concentrations en Al (μM) mesurées dans la solution EDR dans l'expérience 1.

jour	solution		sacs à dialyse
	Al_t	Al_{pcv}	Al_{pcv} moyenne (ET, n)
0	3.8		
1	2.7	2.5	0.4 (0.4, 3)
2	4.1	1.5	2.3 (0.7, 2)
4	4.2	1.3	1.3 (0.2, 4)
moyenne (ET)	3.7 (0.6)	1.8 (0.5)	

Tableau A4-4. Concentrations en Al mesurées dans la solution EDR-FA dans l'expérience 2. Les mesures de l'Al total (réactif à l'acide) ont été corrigées pour l'absorbance de l'acide fulvique sans Al (un blanc de 0.7 μM "Al").

heure	solution				sacs à dialyse
	Al_t	Al_{pcv}	Al_o	Al_i	Al_{pcv} moyenne (ET, n)
0	9.2	5.1			
1	8.7	5.2	3.5	1.7	0.5 (0.05)
2	8.9	4.2	3.1	1.1	1.1 (0.05)
3		4.8	2.8	2.0	
4	8.8	3.4	2.3	1.1	
5	8.8	4.9	2.6	2.3	1.5 (0.2)
moyenne (ET)	8.9 (0.2)	4.6 (0.6)	2.9 (0.5)	1.6 (0.5)	

Tableau A4-5. Concentrations moyennes (ET) en Al (μM) mesurées à l'intérieur des sacs à dialyse dans la solution EDR-AF dans l'expérience 2 (n = 3).

Jour	Al_t	Al_{pcv}	Al_o	Al_i
1	1.0 (0.8)	0.5 (0.04)	0.3 (0.05)	0.2 (0.01)
2	1.3 (0.9)	1.1 (0.05)	0.4 (0.02)	0.7 (0.1)
5	1.1 (0.8)	1.5 (0.2)	0.4 (0.1)	1.0 (0.2)
moyenne	1.1 (0.1)	1.0 (0.4)	0.4 (0.1)	0.6 (0.4)

Tableau A4-6. Concentrations en Al (μM) mesurées dans la solution EDR dans l'expérience 2.

Jour	solution		sacs à dialyse	
	Al _t	Al _{pcv}	Al _t	Al _{pcv} moyenne (ET, n)
0	6.7	5.8		
1	6.3	5.1	7.0	6.6 (0.04, 3)
2	6.3	5.0	8.3	5.8 (1.5, 3)
3	6.8	6.1		
4	6.2	5.5	8.2	
5		5.5		4.1 (0.8, 4)
Moyenne (ET)	6.5 (0.2)	5.5 (0.4)	7.8 (0.6)	5.4 (1.4)

Tableau A4-7. Concentrations de carbone organique total (mg·L⁻¹) dans les solutions et à l'intérieur des sacs à dialyse dans l'expérience 2.

Jour	EDR-AF		EDR	
	solution	sac à dialyse	solution	sac à dialyse
0	3.7		0.7	
1	3.3	0.5	0.6	0.7
2	3.0	1.0	0.6	0.7
4	3.0	1.6	0.8	0.8
moyenne (ET)	3.2 (0.3)	1.0 (0.4)	0.7 (0.1)	0.7 (0.1)

Figure A4-1. Concentrations d'Al mesurées (moyenne \pm ÉT, n = 4) à l'intérieur des sacs à dialyse dans une solutions d'EDR avec l'AF. Les blocs avec le même symbole ne sont pas différents (p >0.05).

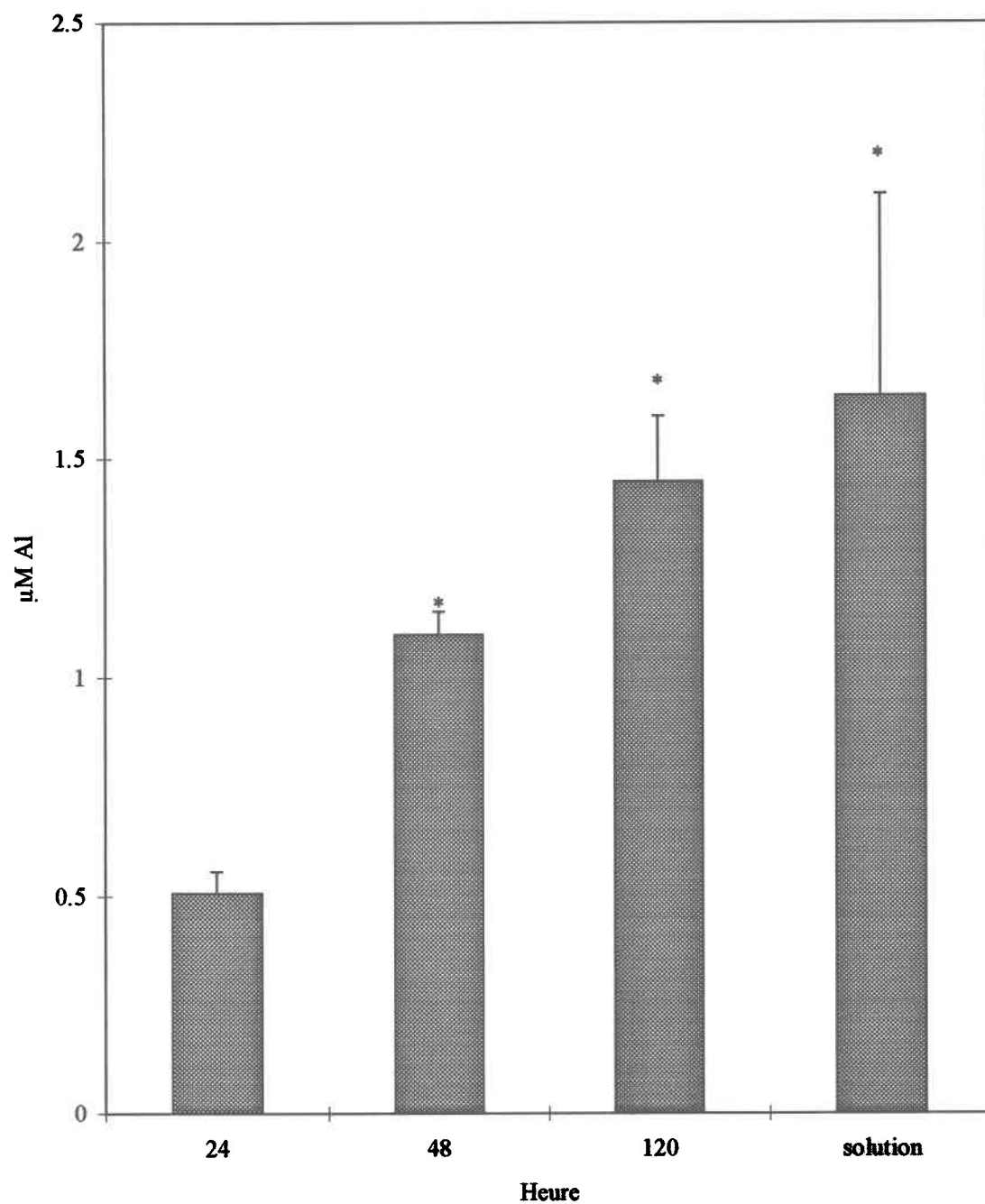


Figure A4-2. Concentrations d'Al mesurées (moyenne \pm ET , $n = 4$) à l'intérieur des sacs à dialyse dans une solution d'EDR. Les blocs avec le même symbole ne sont pas différents ($p > 0.05$).

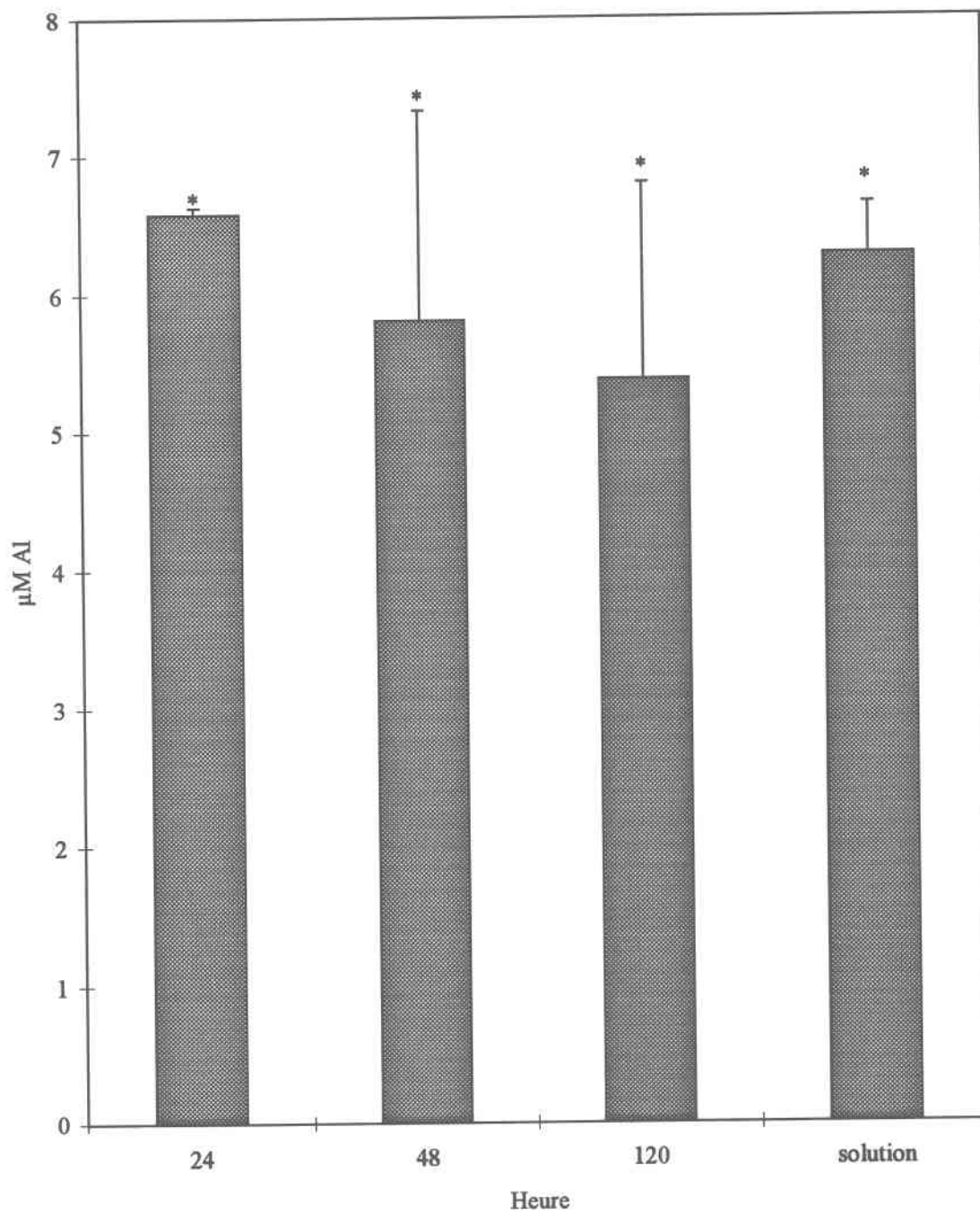
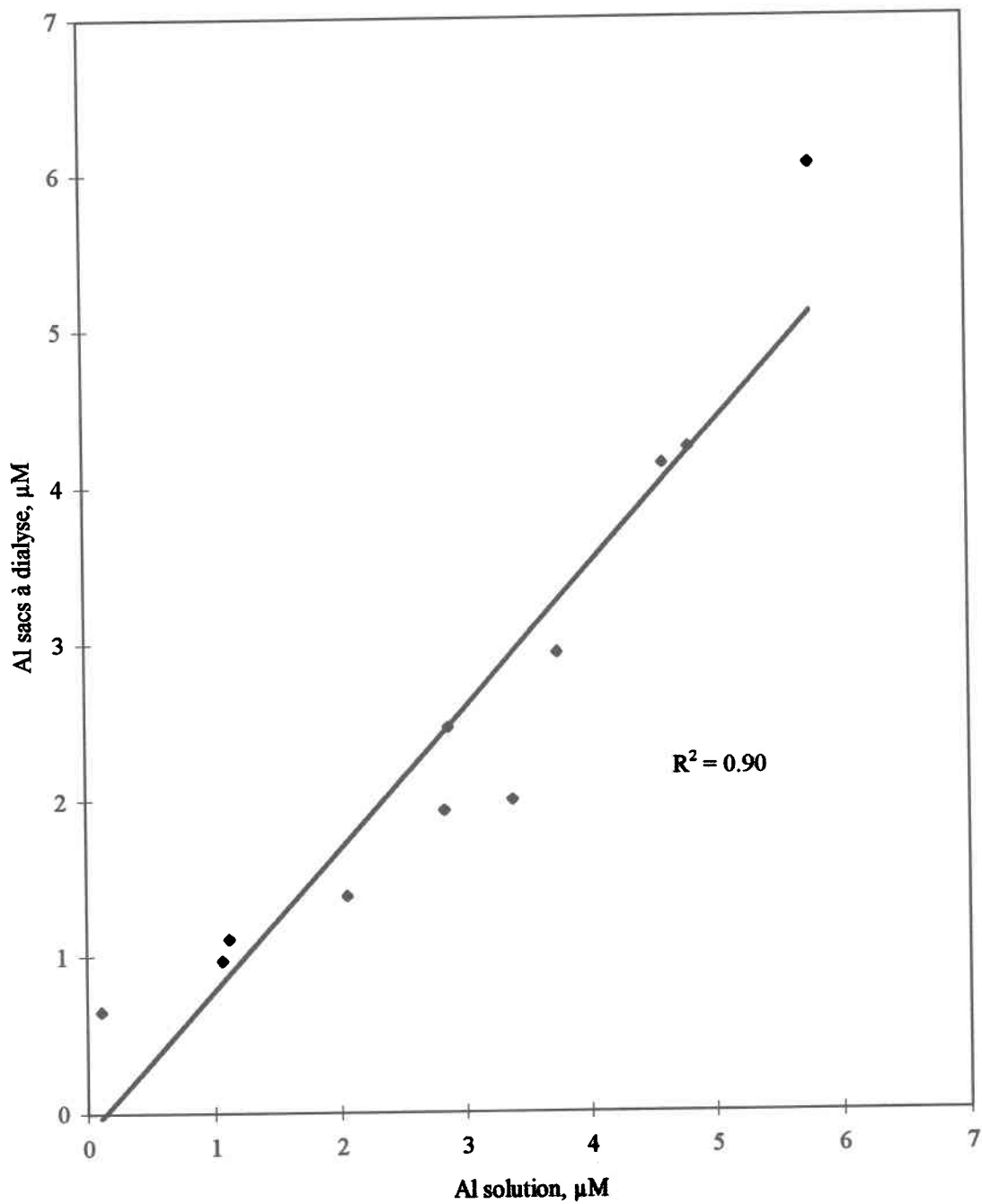


Figure A4-3. La relation entre les concentrations en Al mesurées dans les solutions EDR-AF et à l'intérieur des sacs à dialyse.



ANNEXE 5.

La spéciation du Zn dans des solutions d'acide fulvique naturel:
essais avec les sacs à dialyse et les colonnes à résine d'échange ionique.

Introduction

L'objectif général des expériences était de déterminer si le zinc forme des complexes avec la matière organique dissoute (MOD) dans des eaux douces à faible pH. Premièrement, une technique de dialyse a été utilisée pour vérifier cette hypothèse. À cause de leur poids moléculaire élevé, les complexes Zn-MOD ne devraient pas traverser la membrane de dialyse; de plus, si ces complexes constituaient une proportion appréciable du Zn total, on devrait retrouver moins de Zn à l'intérieur du sac que dans la solution. Au cas où la quantité des complexes Al-MOD serait réduite en présence de Zn, la quantité d'Al dialysable et d'Al inorganique devrait être différente pour les solutions d'Al avec et sans Zn. Un objectif secondaire dans ces expériences de dialyse était de déterminer si la formation hypothétique de ces complexes Zn-MOD interfère avec la formation de complexes Al-MOD.

Une deuxième méthode simple pour séparer les formes échangeables ou "labiles" des formes non-échangeables ou "non-labiles" est de mettre la solution en contact avec une résine d'échange d'ions. La résine utilisée pour l'analyse des formes de l'Al monomère (marque Amberlite de forme Na^+) a été choisie pour ces expériences. La préparation de la résine a été identique à celle faite pour l'analyse de l'Al.

Les expériences avec les colonnes d'échange ionique ont été accomplies par Madame Nathalie Savard, qui a été récipiendaire d'une bourse d'été de l'INRS, pour les étudiants au premier cycle. Madame Savard a poursuivi ces expériences comme projet de recherche pendant l'été 1993.

Méthodes

Préparation des solutions

Les solutions ont toutes été préparées dans des contenants de polypropylène préalablement lavés à l'acide, avec de l'eau douce synthétique (EDR). Les concentrations en métaux (Al, Zn) ont été préparées avec les ajouts de solutions-mère (Zn: 10 mg·L⁻¹ préparée avec ZnSO₄·7H₂O, Fisher Scientifique, Montréal; Al: 10 mg·L⁻¹ en Al, préparée avec un standard AAS, pH < 4.0). Les solutions expérimentales ont été entreposées à 10°C pour 24 h avant les manipulations.

Les solutions d'acide fulvique (AF) ont été préparées avec un acide fulvique commercial (acide fulvique Laurentien, Ecolinc Inc., Roxboro, QC).

Expériences avec les sacs à dialyse.

Une solution-mère de 10 mg·L⁻¹ AF a été préparée dans 3 L d'EDR. Le pH a été ajusté à 5.0, et la solution-mère a été séparée en trois portions de 1 L. De petites quantités de solutions de Zn et d'Al ont été ajoutées pour obtenir les concentrations nominales suivantes:

1. 2.0 µM Zn.
2. 2.0 µM Zn avec 11 µM Al.
3. 11.0 µM Al.

Le pH des solutions a été ajusté à 4.8 ± 0.1. Les sacs à dialyse (Spectra-Por 7, pour sélectionner les molécules de poids moléculaire <1000, de qualité analytique "métaux traces") ont été rincés à l'eau déminéralisée ultrapure, remplis avec ≈ 10 - 15 mL d'EDR, puis bien fermés. Un sac à dialyse a été placé dans chacune des solutions.

Après une période de 32 heures, les sacs à dialyse et les échantillons provenant des solutions ont été prélevés, pour l'analyse des métaux.

Expériences avec les colonnes d'échange ionique

Une quantité de résine Amberlite, identique à celle utilisée pour la spéciation de l'Al par méthode colorimétrique (appareil Technicon) a été préparée selon la méthode pour l'Al. Un volume de 10 mL a été introduit dans une colonne en verre (1 cm de diamètre, 20 cm de longueur) propre. Les colonnes ont été rincées avec de l'EDR à pH 5.0 et il a été vérifié que le pH de la solution n'a pas changé après le passage dans la colonne. Cinq colonnes ont été préparées, une pour chacune des solutions suivantes:

1. 2 μM Zn, solution EDR, avec 2.0 μM Al.
2. 2 μM Zn, solution EDR-AF (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).
3. 2 μM Zn, solution EDR-AF (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'acide fulvique), avec 9.3 μM Al.
4. 2 μM Zn, solution EDR-AF (20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'acide fulvique).
5. 2 μM Zn, solution EDR-AF (20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'acide fulvique), avec 9.3 μM Al.

Les solutions de Zn (250 mL) ont traversé les colonnes Amberlite à un débit de 2 - 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et ont été ensuite collectées. Après avoir vérifié que le pH des solutions n'ait pas changé au cours du passage dans la colonne, celles-ci ont été acidifiées à pH 1.0 (avec 0.1 % de HNO_3 de qualité Ultrapure). Par la suite, la colonne a été rincée avec 10 mL de 2.0 N HNO_3 Ultrapur et 10 mL d'eau ultrapure, pour collecter la fraction liée à la résine. Cet éluat a été collecté et le pH ajusté à un pH de 1.0 avec 2.0 N NH_4OH , si nécessaire.

La première solution collectée peut être considérée comme la fraction de Zn lié par des complexes organiques. Les éluats représentent le Zn échangeable (= l'ion libre, Zn^{2+} , plus les complexes labiles). Les solutions collectées ont été analysées pour le Zn par l'absorption atomique à la flamme.

oAnalyses des métaux

Al

L'Al monomère a été mesuré dans les expériences de dialyse (dans la solution et à l'intérieur des sacs à dialyse). Les échantillons ont été entreposés à 10°C avant l'analyse par le Technicon. La méthode colorimétrique automatisée différencie l'Al monomère total (Al_{pcv}) de l'Al monomère organique (Al_O), à l'aide d'une colonne à échange ionique. L'Al monomère inorganique (Al_i) est alors estimé en faisant la différence $Al_{cv} - Al_O$.

Zn

Des échantillons destinés à l'analyse du Zn ont été préservés par acidification, puis analysés par absorption atomique (flamme air-acétylène), avec une limite de détection de 0.1 μM (5 $\mu g \cdot L^{-1}$).

Résultats et Discussion

Expériences avec les sacs à dialyse.

Les quantités de Zn à l'intérieur et à l'extérieur des sacs ont été équivalentes (tableau A5-1). Ceci indique que l'équilibre a été atteint au cours des 32 h de l'essai. Ces données suggèrent deux possibilités: à pH 4.8, le Zn reste sous forme ionique et ne forme pas de complexe avec AF; ou encore le Zn ne forme que des entités de p.m. suffisamment faible pour traverser la membrane de dialyse.

Il semble que le passage de l'Al inorganique à travers la membrane n'est pas affecté par la présence de Zn. Les teneurs en Al mesurées à l'intérieur des sacs à dialyse dans les solutions 2 (Al + Zn) et 3 (Al seulement) ont été semblables (1.3 et 1.0 μM , respectivement).

Les teneurs mesurées en Zn ont été inférieures aux concentrations nominales, peut-être à cause de l'imprécision du pipettage (les ajouts ont été faits à partir de solutions-mères concentrées pour ne pas trop changer la solution). Une contamination de Zn a été observée dans la solution #3 qui ne devait contenir que de l'Al.

Les analyses d'Al n'ont pu être effectuées qu'après un délai de 10 jours. Il est possible que ce délai ait affecté la récupération d'Al total dans les solutions et dans les sacs de dialyse (tableau A5-2). Les teneurs en Al mesurées à l'intérieur des sacs à dialyse ont été moindre que l'Al inorganique mesuré dans la solution. Les études antérieures ont révélé que le temps pour l'atteinte d'une équilibre entre la solution et l'intérieur des sacs à dialyse peut être plus de 48 h. Les mesures d'Al_{pcv} ont été inférieures à la valeur nominale de 11 µM, ce qui suggère qu'une quantité de l'Al total a été présent sous forme non-monomère.

Ce premier essai avec l'Al dans une solution d'AF Laurentien a révélé la possibilité qu'une solution d'AF peut causer une interférence avec la mesure de l'Al par colorimétrie. Il n'y a pas eu de véritable mesure de "Al total" car la méthode acide-réactif n'avait pas encore été adaptée à notre appareillage. La faible récupération de l'Al monomère n'était pas prévue, mais a donné lieu à des améliorations dans la mesure de l'Al en milieu acide.

Expériences avec les colonnes d'échange ionique

Les résultats des expériences avec les colonnes d'échange ionique ont révélé que >95% de la solution de Zn a été retenu par la colonne (concentrations à la sortie de la colonne de 0.08 et 0.03 µM, comparativement à la concentration nominale en Zn de 2 µM). La fraction retenue par la colonne est indiquée comme "Zn lié" dans le tableau A5-3. Il en ressort que le Zn ne forme pas de complexes avec l'acide fulvique, ou que le Zn est très faiblement lié au complexe, et le métal peut être libéré par le colonne d'échange ionique. La récupération de Zn dans des éluviats, collectés avec le passage d'une solution acide, a varié de 80 à 110 % (Zn "libre", 1.6 à 2.2 µM, tableau A5-3). La récupération de Zn a été plus élevée avec les solutions contenant de l'acide fulvique (95 à 110 % à 10 et 20 mg·L⁻¹ AF), comparée à la solution d'EDR seulement (80%).

Tableau A5-1. Les concentrations en Zn (μM) mesurées à l'intérieur (int) et à l'extérieur (ext) des sacs à dialyse après 32 h.

Solution	[Zn] int	[Zn] ext
1. Zn	1.3	1.3
2. Al + Zn	1.6	1.3
3. Al	0.2	0.1

Tableau A5-2. Concentrations en Al (μM) mesurées en solution et à l'intérieur des sacs à dialyse après 32 h.				
Solution	Al_{pcv}	Al_o	Al_i	Al_{pcv} (sacs à dialyse)
1. Zn	NIL	-	-	-
2. Al + Zn	6.6	2.8	3.8	1.3
3. Al	6.7	2.7	4.0	1.0

Tableau A5-3. Concentrations en Zn (n = 1) mesurées dans les solutions collectées après un passage par les colonnes d'échange ionique.

Solution	Fraction Zn	Zn (µM)	% Zn
1	Zn lié	0.08	4
2	Zn lié	0.03	2
1	élutriat	1.6	80
2	élutriat	2.1	105
3	élutriat	2.1	105
4	élutriat	1.8	90
5	élutriat	2.2	110

ANNEXE 6

Calculs des CL-50 par la méthode Spearman-Kärber

pour les expériences de mélanges Al-Zn.

Experiment. 1 pH 4.5						
Al only						
tank:	1	3	5	7	9	
Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	398.7	262.3	184.0	168.35	91.3	
ln concentration	5.9882	5.5695	5.2149	5.1260	4.5142	
number of fish	10	10	10	10	10	
number dead	9	5	2	0	0	
mortality proportion	0.9	0.5	0.2	0	0	
alpha = 10%						
adjusted concentrations	5.9882	5.5695	5.2149	5.1705		
mid point of concentrations	5.7788	5.3922	5.1927			
adjusted proportion	1	0.5	0.125	0		
relative frequency	0.5	0.375	0.125	0		totals:
relative frequency X midpoint	2.8894	2.0221	0.6491			1
LC50 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	260.0					5.5606
LC50 (uM)	9.6					
Al + Zn						
tank:	2	4	6	8	10	
Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	402.1	259.8	184.1	170.3	92.6	
ln concentration	5.9967	5.5599	5.2155	5.1376	4.5283	
number of fish	10	10	10	10	10	
number dead	10	6	6	0	0	
mortality proportion	1	0.6	0.6	0	0	
alpha = 0						
midpoint of concentrations	5.7783	5.3877	5.1765	5.1376		totals:
relative frequency	0.4	0	0.6	0		1
relative frequency X midpoint	2.3113	0	3.1059	0		5.4172
LC50($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ($\mu\text{g L-1}$):	225.3					
LC50 (uM)	8.3					

Experiment 2, pH 4.5					
Al					
tank:	1	3	5	7	9
Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	412.2	322.2	229.8	162.5	98.6
ln concentration	6.0216	5.7752	5.4372	5.0907	4.5911
number of fish	10	10	9	11	10
number dead	8	6	3	1	0
mortality proportion	0.8	0.6	0.3333	0.0909	0
alpha = 20%					
adjusted concentrations	6.0215	5.7752	5.4372	5.2466	
midpoint of concentrations	5.8983	5.6062	5.3419	5.2466	
adjusted proportions	1	0.6667	0.2222	0	
relative frequency	0.3333	0.4444	0.2222	0	totals:
relative frequency X midpoint	1.9661	2.4916	1.1871	0	1
exp(total) = LC50 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	282.8				5.6448
LC50 (uM)	10.5				
Al + Zn					
tank:	2	4	6	8	10
Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	415.5	330.4	246.1	165.3	98
ln concentration	6.0295	5.8003	5.5057	5.1078	4.5850
number of fish	10	10	9	10	10
number dead	10	10	3	1	0
mortality proportion	1	1	0.3333	0.1	0
alpha = 0					
midpoint of concentrations	5.6530	5.3067	4.8463	4.5850	totals
relative frequency	0.6667	0.2333	0.1	0	1
relative frequency X midpoint	3.7689	1.2382	0.4846	0	5.4916
exp(total) = LC50 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	242.6				
LC50 uM	9.0				

Experiment 3, pH 4.8						
Al						
Tank:	1	3	5	7	9	11
Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	156.0	133.9	99.8	54.3	44.0	0
ln concentration	5.0499	4.8971	4.6032	3.9945	3.7842	
number of fish	10	10	10	10	10	10
number dead	10	8	5	3	3	0
mortality proportion	1	0.8	0.5	0.3	0.3	0
adjusted proportions	1	0.8	0.4	0.4	0.3	0
alpha= 0						
mid point of concentrations	4.9735	4.7501	4.2988	3.8893	3.4687	totals
relative frequency	0.2	0.3	0.2	0	0.3	1
relative frequency X midpoint	0.9947	1.4250	0.8598	0	1.0406	4.3201
exp (total) = LC50 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	75.2					
LC50 (μM)	2.8					
Al + Zn						
tank:	2	4	6	8	10	12
Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	150.0	134.5	93.0	56.0	46.0	37.8
ln concentration	5.0106	4.9016	4.5326	4.0253	3.8286	3.6319
number of fish	10	10	10	10	10	10
number dead	10	9	5	2	1	0
mortality proportion	1	0.9	0.5	0.2	0.1	0
alpha = 0						
mid point of concentrations	4.9561	4.7171	4.2790	3.9270	3.7303	totals:
relative frequency	0.1	0.4	0.3	0.1	0.1	1
relative frequency X midpoint	0.4956	1.8868	1.2837	0.3927	0.3730	4.4319
exp (total) = LC50 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	84.1					
LC50 (μM)	3.1					

Experiment 4, pH 4.8						
Al only						
tank:	1B	1A	3	5	7	9
Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	142.3	136.1	115.2	102.6	84.07	69.38
ln concentration	4.9579	4.9134	4.7467	4.6308	4.4316	4.2396
number of fish	10	10	10	9	10	10
number dead	10	5	2	3	0	1
mortality proportion	1	0.5	0.2	0.3333	0	0.1
corrected proportions (Abbott's formula)	1	0.5	0.2667	0.2667	0.05	0.05
alpha = 5%						
adjusted concentrations	4.9535	4.9134	4.7467	4.6308	4.4316	
adjusted proportions	1	0.5	0.2407	0.2407	0	
mid point of concentrations	4.9334	4.8300	4.6887	4.5312	4.3356	totals
relative frequency	0.5	0.2593	0	0.2407	0	1
relative frequency X midpoint	2.4667	1.2522	0	1.0909		4.8098
exp (total) = LC50($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	122.7					
uM	4.5					
Al + Zn						
tank:	2	4	6	8	10	
Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	138.93	116.2	103.6	84.1	69.4	
ln concentration	4.9340	4.7553	4.6405	4.4320	4.2409	
number of fish	10	10	10	10	10	
number dead	10	8	4	1	0	
mortality proportion	1	0.8	0.4	0.1	0	
alpha = 0						
midpoint of concentrations	4.8446	4.6979	4.5363	4.3359	4.2399	totals
relative frequency	0.2	0.4	0.3	0.1	0	1
relative frequency X midpoint	0.9689	1.8792	1.3609	0.4336		0 4.6426
exp (total) = LC50($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	103.8					
LC50 (uM)	3.8					

Exp. 5 pH 5.2						
Al						
tank:	1	3	5	7	9	
Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	62.0	57.2	54.0	46.9	38.1	
ln concentration	4.1271	4.0467	3.9888	3.8478	3.6407	
number of fish	10	10	10	10	10	
number dead	10	8	4	1	0	
mortality proportion	1	0.8	0.4	0.1	0	
alpha = 0						
midpoint of concentrations	4.0869	4.0178	3.9183	3.7443	3.6407	totals
relative frequency	0.2	0.4	0.3	0.1	0	1
relative frequency X mid	0.8174	1.6071	1.1755	0.3744	0	3.9744
exp (total) = LC50 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	53.2					
LC50 (μM)	2.0					
Al+Zn						
tank	2	4	6	8	10	contro 1
Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	64	61.6	53.2	36.14	31.74	11.9
ln concentration	4.1589	4.1207	3.9741	3.5874	3.4576	2.4765
number of fish	10	10	10	10	10	10
number dead	9	10	7	1	3	0
mortality proportion	0.9	1	0.7	0.1	0.3	0
corrected proportions (Abbott's formula)	0.95	0.95	0.7	0.2	0.2	0
alpha =10%						
adjusted concentrations	4.0913	3.9741	3.5874	3.4576	2.4765	
adjusted proportions	1.0	0.75	0.125	0.125	0	
midpoint of concentrations	4.0327	3.7807	3.5225	2.9671	2.4765	totals:
relative frequency	0.25	0.625	0	0.125	0	1
relative frequency X midpoint	1.0082	2.3630	0	0.3709	0	3.7420
exp (total) = LC50($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	42.2					
LC50 (μM)	1.6					

Exp. 6 pH 5.2					
Al					
tank:	1B	1	3	5	7
Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	61.1	56.3	48.1	40.3	32.4
ln concentration	4.1125	4.0307	3.8733	3.6963	3.4782
number of fish	10	10	10	10	10
number dead	10	7	3	0	0
mortality proportion	1	0.7	0.3	0	0
alpha = 0					
midpoint of concentrations	4.0716	3.9520	3.7848	3.5873	totals
relative frequency	0.3	0.4	0.3	0	1
relative frequency X mdpoint	1.2215	1.5808	1.1354	0	3.9377
exp (total) = LC50($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	51.3				
LC50 (μM)	1.9				
Al +Zn					
tank:	2	4	6	8	10
Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	54.8	47.6	39.5	33.5	31.1
ln concentration	4.0041	3.8623	3.6772	3.5108	3.4368
number of fish	10	10	10	10	10
number dead	9	3	3	0	0
mortality proportion	0.9	0.3	0.3	0	0
alpha = 10%					
adjusted proportions:	1	0.25	0.25	0	
midpoint of concentrations	3.9332	3.7698	3.5940	3.4738	totals:
relative frequency	0.75	0	0.25	0	1
relative frequency X midpoint	2.9499	0	0.8985	0	3.8484
exp (total) = LC50($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	46.9				
LC50 (μM)	1.7				