

Université du Québec  
INRS- Eau, Terre et Environnement

**INTERACTIONS DE L'ARGENT (AG) AVEC LES ALGUES D'EAU DOUCE  
EN PRÉSENCE DE MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE  
NATURELLE.**

Par  
Céline Porcher

Mémoire présenté  
pour l'obtention  
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Sciences de l'Eau

Jury d'évaluation

Président du Jury  
et examinateur interne

Claude Fortin, INRS-ETE

Examineur externe

Patsy Thompson  
Commission canadienne de sûreté  
nucléaire

Directeur de recherche

Peter G.C. Campbell, INRS-ETE

© droits réservés de *Céline Porcher*, 2004.



## Résumé

---

Le cycle géochimique de l'argent a été fortement perturbé par les activités humaines, mais les effets écotoxicologiques de cette mobilisation sont peu connus. On peut s'attendre à ce que les effets de l'argent sur les organismes aquatiques dépendent entre autres de sa concentration dans le milieu et de sa spéciation, c'est-à-dire de sa répartition entre différentes formes chimiques. Ce projet visait à évaluer la disponibilité des formes organiques de ce métal pour la prise en charge par deux algues d'eau douce, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata*. Ces dernières étaient exposées en laboratoire à des systèmes contenant un radio-isotope de l'argent ( $^{110m}\text{Ag}$ ) en présence de matière organique dissoute naturelle (MOD; acides humiques isolés de la rivière Suwannee, GA-FL, E.U.A. (SRHA)).

Pour réaliser ces expériences nous avons d'abord mis au point une technique d'échange ionique (TEI) afin de mesurer la concentration d'argent libre ( $\text{Ag}^+$ ) dans les milieux d'exposition en présence ou en absence de la MOD. La sélectivité de la TEI pour l'ion libre de l'argent, l' $\text{Ag}^+$ , a été testée avec un ligand inorganique, le  $\text{Cl}^-$ , dont les constantes de complexation avec l'argent sont connues et fiables. Nous avons augmenté la concentration en chlorures pour une concentration fixe d'Ag totale. Au fur et à mesure que les concentrations des chloro-complexes ( $\text{AgCl}^0$ ;  $\text{AgCl}_2^{-1}$ ) augmentaient dans le milieu, la concentration en  $\text{Ag}^+$  diminuait. Les résultats expérimentaux furent comparés avec les prédictions calculées par un modèle

d'équilibres chimiques MINEQL+ (v.4.5). À fortes concentrations de chlorure, les chloro-complexes neutres ( $\text{AgCl}^0$ ) contribuent à la fraction d' $\text{Ag}^+$  dans le dosage de l'ion libre avec la TEI. Il pourrait donc y avoir formation d'un complexe ternaire, résine-Ag-Cl.

Nous avons ensuite mesuré la concentration d' $\text{Ag}^+$  en présence d'acides humiques de la rivière Suwannee; ces résultats indiquent que la MOD naturelle complexe fortement l'argent. La courbe de titrage établie à partir de ces résultats indique l'existence d'au moins deux types de sites (fort et faible) de complexation de l'argent au sein des molécules d'acides humiques. Partant de ces résultats, nous avons préparé des milieux d'exposition contenant des concentrations variables de l'ion  $\text{Ag}^+$ , sans ou avec les acides humiques. Ces milieux ont été utilisés pour étudier la prise en charge (uptake) de l'argent par les deux algues : *C. reinhardtii* et *P. subcapitata*. Pour une concentration en  $\text{Ag}^+$  libre donnée, et pour un temps d'exposition fixe, les deux algues accumulent davantage d'argent en présence de la MOD qu'en milieu inorganique, une tendance qui va à l'encontre des prédictions du Modèle du Ligand Biotique («Biotic Ligand Model» (BLM) ou Modèle de l'Ion Libre (MIL)). Ces derniers prédisent que la prise en charge est proportionnelle à la concentration en  $\text{Ag}^+$ , en absence ou en présence d'un complexe (MOD), pourvu que la concentration en  $\text{Ag}^+$  soit identique dans les deux milieux. Cette prise en charge accrue ne serait pas attribuable à un taux d'approvisionnement en Ag plus élevé en présence de SRHA mais plutôt à un effet direct de la MOD naturelle sur les algues. Nous avons considéré trois mécanismes

possibles pour expliquer ces résultats : (1) la concentration en  $\text{Ag}^+$  est peut-être sous-estimée dans les milieux d'exposition; (2) la mesure opérationnelle d'Ag intracellulaire comprend aussi une contribution d'un complexe ternaire (MOD-Ag-algue) adsorbé à la surface algale; (3) l'adsorption de MOD à la surface algale pourrait modifier la charge de surface et/ou entraîner au changement au niveau du fonctionnement des transporteurs membranaires, ce qui conduirait à une vitesse de transport plus élevée de leur part. C'est ce dernier mécanisme qui nous semble le plus plausible.

A l'échelle environnementale, la forte affinité de la MOD naturelle pour l'Ag et la faible concentration en Ag dissous font que la concentration en  $\text{Ag}^+$  dans le milieu est minime. D'après nos résultats, à ces concentrations environnementales, la différence de prise en charge (sans/avec MOD) dans le milieu est plutôt faible. On peut donc conclure que l'application du MIL est relativement bonne.



Etudiante



Directeur de recherche



## Avant – propos

---

Ce mémoire par article se compose de deux sections. La première partie est la synthèse de mes travaux de recherche ainsi qu'une partie de leur conclusion. La deuxième section contient un article qui a été écrit dans le cadre de ma maîtrise, pour soumission à une revue scientifique appropriée. Voici une brève description de la contribution des auteurs de l'article :

Céline Porcher

- Planification des expériences
- Montage expérimental
- Réalisation des expériences
- Collecte des données
- Compilation des données
- Interprétation des résultats
- Rédaction de l'article

Peter Campbell

- Conception du projet
- Interprétation des résultats
- Correction finale de l'article



## Remerciements

---

La réalisation de cette étude a nécessité la collaboration de plusieurs personnes, de près ou de loin, que je tiens à remercier.

Une première pensée va à mon directeur de recherche M. Peter G.C. Campbell pour ses conseils, la qualité de son encadrement et sa disponibilité qui m'ont beaucoup aidée durant ma maîtrise. Un merci tout particulier à M. Claude Fortin pour ses judicieux conseils tout au long de ce projet.

Une pensée toute spéciale va au personnel du laboratoire de l'INRS – ETE qui est toujours disponible pour répondre à nos moindres interrogations, tout spécialement Michelle Bordeleau, Sébastien Duval, Pauline Fournier et Lise Rancourt. Les nombreuses heures passées au laboratoire ont été des plus amusantes grâce à la présence d'Emmanuelle Bonneris, Amiel Boulemant, Lisa Kraemer, Lucie Laforte et Gérald Côté. La présence d'une horde d'amis a rendu la vie étudiante des plus agréables, en particulier Alex, Anne, Guillaume, Frank et Céline.

Je tiens à remercier particulièrement mes parents pour leur encouragement et leur soutien inconditionnel autant moral que financier tout au long de mon cheminement universitaire. Je tiens aussi à remercier mon propre entourage pour avoir su être au rendez-vous lorsque c'était le temps de relâcher la pression. Je pense à vous Gen, Ge, Jo, Caro, Dadou et JF. Jess, Alex et Claire vous avez été plus que des colocataires. Je garde de beaux souvenirs de notre cohabitation. Ma dernière pensée va à Louis pour sa présence, ses conseils, son aide et pour avoir enduré mes longs séjours au laboratoire ainsi que mon humeur!

Ce projet de recherche a été rendu possible grâce aux supports financiers du Réseau canadien des Centres de Toxicologie (RCCT) et de Kodak Canada.

# Table des matières

---

Résumé.....	iii
Avant – propos .....	vii
Remerciements .....	ix
Table des matières .....	xi
Liste des figures .....	xv
Liste des tableaux .....	xvii
Liste des abréviations .....	xix
<b>1 Introduction .....</b>	<b>1</b>
1.1 L'argent dans l'environnement.....	1
1.1.1 Sources et caractéristiques .....	1
1.1.2 Spéciation aquatique .....	2
1.2 Matière organique dissoute naturelle (MOD) .....	2
1.2.1 Description et origine.....	2
1.2.2 Processus environnementaux.....	6
1.3 Modèle de l'ion libre .....	7
1.3.1 Définition.....	7
1.3.2 Le MIL et la MOD .....	9
1.4 Prise en charge et biodisponibilité de l'Ag chez les algues .....	13
1.4.1 En absence de MOD.....	13
1.4.2 En présence de MOD .....	17
1.4.2.1 Chez les bivalves .....	18
1.4.2.2 Chez les poissons.....	19
1.5 Problématique.....	22
1.5.1 Les limites du MIL.....	22
1.5.2 Le défi des SH .....	22
1.6 Objectifs et hypothèses .....	24

<b>2</b>	<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>25</b>
2.1	Produits, réactifs et conservation.....	25
2.2	Organismes: culture et croissance.....	27
2.3	Comptage des algues .....	31
2.4	Dosage des radio-éléments .....	32
2.5	La technique d'échange ionique.....	33
2.5.1	Théorie.....	33
2.5.2	Le montage expérimental.....	35
2.5.3	Méthodologie de la TEI.....	37
2.5.4	Détermination des paramètres .....	39
2.5.5	Validation de la technique avec un ligand inorganique : le chlorure.....	40
2.6	Titrage de la MOD naturelle .....	41
2.7	Expériences de prise en charge.....	42
2.7.1	Préparation des milieux d'exposition .....	42
2.7.2	Méthodologie de la prise en charge.....	43
<b>3</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>49</b>
3.1	État stationnaire et élution.....	49
3.2	Coefficient de distribution.....	50
3.3	Test de fiabilité: le chlorure .....	51
3.4	Titrage de la MOD .....	53
3.5	Effet de la MOD sur la résine .....	54
3.6	Prise en charge de l'argent: effet de la MOD .....	56
3.6.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (temps variable) .....	59
3.6.2	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (temps variable) .....	60
3.6.3	Temps fixe .....	63
<b>4</b>	<b>Discussion</b> .....	<b>65</b>
4.1	Paramètres de la TEI.....	65
4.2	Sélectivité de la résine.....	65
4.3	Titrage de la MOD.....	66

4.4	Effet de la MOD sur la résine .....	69
4.5	Prise en charge de l'Ag .....	70
4.5.1	Temps variable .....	70
4.5.2	Temps fixe .....	71
<b>5</b>	<b>Article .....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Annexes .....</b>	<b>121</b>
A-1:	Protocole de la technique d'échange ionique .....	121
A-2:	Protocole pour la prise en charge algale .....	123
A-3:	Concentrations d'Ag dans les milieux d'exposition .....	124



## Liste des figures

Figure 1.1	Structure représentative de la matière organique dissoute (MOD) naturelle proposée par Schulten & Schnitzer (1993).....	5
Figure 1.2	Diagramme du modèle de l'ion libre (MIL).....	8
Figure 1.3	Schéma du MIL à concentration fixe (A) et temps fixe (B).....	10
Figure 2.1	Courbes de croissance de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (A) et <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (B) dans le milieu MHSM à pH 7.....	31
Figure 2.2	Schéma du montage expérimental de la technique d'échange ionique (Fortin, 1996).....	36
Figure 2.3	Schéma de la colonne de la résine pour la TEI (Fortin, 1996).....	37
Figure 2.4	Schéma de la méthodologie employée pour mesurer la prise en charge de l'argent par des algues unicellulaires (adapté de Fortin, 1998). .....	45
Figure 3.1	Profil d'atteinte d'un état stationnaire entre l'Ag et la résine. ....	49
Figure 3.2	Profils d'élution de l'Ag avec une solution de thiosulfate de 200 $\mu\text{M}$ en fonction du temps et de la concentration d'argent dans la solution aqueuse (n=3).....	50
Figure 3.3	Courbe de titrage d'une solution d'acide humique de la Suwannee (5 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ ) en fonction de la concentration d'Ag totale à pH 7 (n=4). 54	
Figure 3.4	Concentrations d'Ag <sup>+</sup> mesurées (nM) lors du titrage du SRHA d'après la fig. 3.3 (●) et dans les milieux d'exposition pour les expériences de prise en charge (□) (n=3).....	58
Figure 3.5	Cinétique de prise en charge de l'Ag par <i>C. reinhardtii</i> .....	60
Figure 3.6	Cinétique de prise en charge de l'Ag par <i>P. subcapitata</i> .....	61
Figure 3.7	Prise en charge de l'Ag à temps fixe (25 min) par <i>C. reinhardtii</i> .(A) et <i>P. subcapitata</i> (B). Les symboles noirs indiquent l'absence et les blancs la présence de SRHA (5 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Dans les milieux sans SRHA la concentration en Ag total est identique à la concentration en Ag <sup>+</sup> . Chaque symbole représente une expérience .....	63

Figure 4.1	Modélisation des résultats de titrage du SRHA par l'Ag. ....	69
Figure 4.2	Schéma de la présence d'un complexe Ag-AH à la surface algale. ....	73
Figure 4.3	Schéma des interactions Ag-algues possibles en présence de la matière organique dissoute naturelle (MOD). La voie (i) représente la complexation de l'argent en solution, conduisant à une baisse de la concentration en Ag <sup>+</sup> libre. La voie (ii) correspond à l'adsorption de la MOD sur la cellule, qui influence la charge superficielle de l'algue (iia) ou qui influence les transporteurs d'Ag (iib). La voie (iii) représente la formation d'un complexe ternaire à la surface algale, ce qui pourrait contribuer à une surestimation de l'argent intracellulaire.....	74

## Liste des tableaux

---

Tableau 1.1	Propriétés chimiques des SH et leurs rôles dans divers enjeux environnementaux (adapté de Tipping, 2002 et de Campbell <i>et al.</i> , 1997).....	4
Tableau 1.2	Synthèse des valeurs de CE <sub>50</sub> (nM) pour l'inhibition de la croissance des algues par l'argent. ....	15
Tableau 2.1	Composition et proportions des solutions mères servant à la préparation du milieu de culture MHSM.....	30
Tableau 2.2	Concentrations molaires (sauf indication contraire) des cations et anions composant le milieu de culture MHSM et les solutions utilisées lors des expériences de prise en charge.....	44
Tableau 3.1	Coefficients de distribution ( $\lambda$ ) pour l'interaction Ag-résine.....	51
Tableau 3.2	Pourcentage d'Ag <sup>+</sup> mesuré avec la TEI (n=4) et modélisé par MINEQL+ en fonction de la concentration de chlorure.....	52
Tableau 3.3	Concentrations en carbone organique dissous (COD ; mg C•L <sup>-1</sup> ) dans les solutions d'exposition avec de la MOD avant et après leur passage sur la résine.....	55
Tableau 3.4	Coefficients de distribution $\lambda$ (L•g <sup>-1</sup> ) pour une solution étalon de 10 nM avant et après le passage d'une solution contenant de l'AH.....	55
Tableau 3.5	Concentrations d'Ag (nM) visées et mesurées dans les milieux d'exposition pour les expériences de prise en charge dans le temps à concentration d'Ag fixe.....	58



## Liste des abréviations

---

$\lambda$ :	coefficient de distribution
AF:	acide fulvique
AH:	acide humique
BCF :	<i>bioconcentration factor</i>
CE <sub>50</sub> :	concentration ayant un effet sur 50 % de la population testée
Chl a:	chlorophylle a
CL <sub>50</sub> :	concentration inhibant la croissance à 50 %
COD :	carbone organique dissous
CPM:	comptes par minute
DPM:	désintégrations par minute
EDTA :	acide éthylènediamine-tétraacétique
FC :	facteur de concentration
FDA :	diacétate de fluorescéine
HDPE:	polyéthylène de haute densité
HSM :	<i>High salt medium</i>
IHSS:	<i>International Humic Substances Society</i>
K <sub>ads</sub> :	constante d'équilibre chimique d'adsorption
K <sub>c</sub> :	constante d'équilibre chimique conditionnelle
kDa :	kiloDalton
K <sub>m</sub> :	concentration à laquelle le transport membranaire est saturé à 50% par un élément
L:	ligand
MHSM:	<i>Modified high salt medium</i>
MIL :	modèle de l'ion libre
MOD :	matière organique dissoute
m <sub>r</sub> :	masse de résine
M <sup>z+</sup> :	ion métallique libre
M <sub>El</sub> :	ion métallique libre dans l'éluant suite à l'éluion de la résine
NIST:	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NTA :	acide nitrilotriacétique
PC:	polycarbonate
PP:	polypropylène
R:	résine échangeuse d'ions
S(II-):	espèces de soufre réduit
SH:	substances humiques
SRHA:	<i>Savannee River humic acid</i>
TEI :	technique d'échange ionique
TFE :	tetrafluoroéthylène
USEPA:	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UTCC:	<i>University of Toronto Culture Collection</i>
V:	volume
WHAM:	<i>Windermere humic aqueous model</i>



# 1 Introduction

---

## 1.1 L'argent dans l'environnement

### 1.1.1 Sources et caractéristiques

L'argent (Ag) est un élément qu'on retrouve en faible concentration dans la croûte terrestre,  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Cependant, diverses activités anthropiques ont perturbé son cycle biogéochimique. Les émissions des fonderies et de la combustion du charbon ont entraîné une augmentation des concentrations en argent dans les écosystèmes terrestres et aquatiques via les dépôts atmosphériques (Purcell et Peters, 1998). A cela s'ajoutent les effluents miniers, industriels et municipaux. L'industrie de l'image et de la photographie contribue environ pour la moitié de ces rejets (US PHS, 1990). L'argent est essentiel pour cette dernière car il a la propriété de réagir à la lumière. De plus, ce métal est reconnu pour son excellente conductivité électrique et thermique. Il est donc utilisé dans les composantes électriques et électroniques. Il est aussi malléable et esthétique sous sa forme métallique. On s'en sert donc pour fabriquer des bijoux et de l'argenterie (Purcell et Peters, 1998).

Pour étudier le comportement des ions métalliques de l'argent, il est important de connaître la chimie de coordination et sa signification pour la spéciation en milieu aquatique. L'argent est classé dans la catégorie des cations de type B ou « mous ». Les cations  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{Ag}^+$ , appartenant à ce groupe, ont de 10 à 12 électrons périphériques. Ils se lient préférentiellement avec des atomes donneurs de soufre (S),

d'iode (I), de brome (Br) ou de chlore (Cl) (Sigg *et al.*, 1992), et avec ces atomes ils forment de fortes liaisons de coordination, avec un partage d'électrons à caractère covalent.

### **1.1.2 Spéciation aquatique**

La concentration moyenne en argent dans les eaux douces de surface se situe aux environs de  $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (Eisler, 1996). Sa spéciation, c'est-à-dire sa répartition parmi les différentes formes chimiques de l'Ag, dépend des autres ions présents dans les eaux. Il formera principalement des complexes avec des ligands inorganiques (chlorure, thiosulfate, sulfures) et des ligands organiques simples (acides aminés, notamment la cystéine) et complexes (substances humiques). De récentes observations ont montré la présence d'espèces de soufre réduit (S(II)) métastables, à des concentrations nanomolaires, dans le milieu aquatique (Bowles *et al.*, 2003). Compte tenu de ces observations, et de la faible concentration d'Ag dans le milieu aquatique, l'ion monovalent,  $\text{Ag}^+$ , ne sera présent qu'à de très faibles concentrations. De plus, ces espèces de S(II-) liées à un métal, pourraient s'associer avec la MOD. Selon Smith *et al.* (2002), il est clair que les métaux mous forment des noyaux qui semblent se lier avec d'autres métaux et ligands présents, selon leurs propriétés de coordination. De plus, ils pourraient occuper des espaces dans les polymères composant les substances humiques (SH).

## **1.2 Matière organique dissoute naturelle (MOD)**

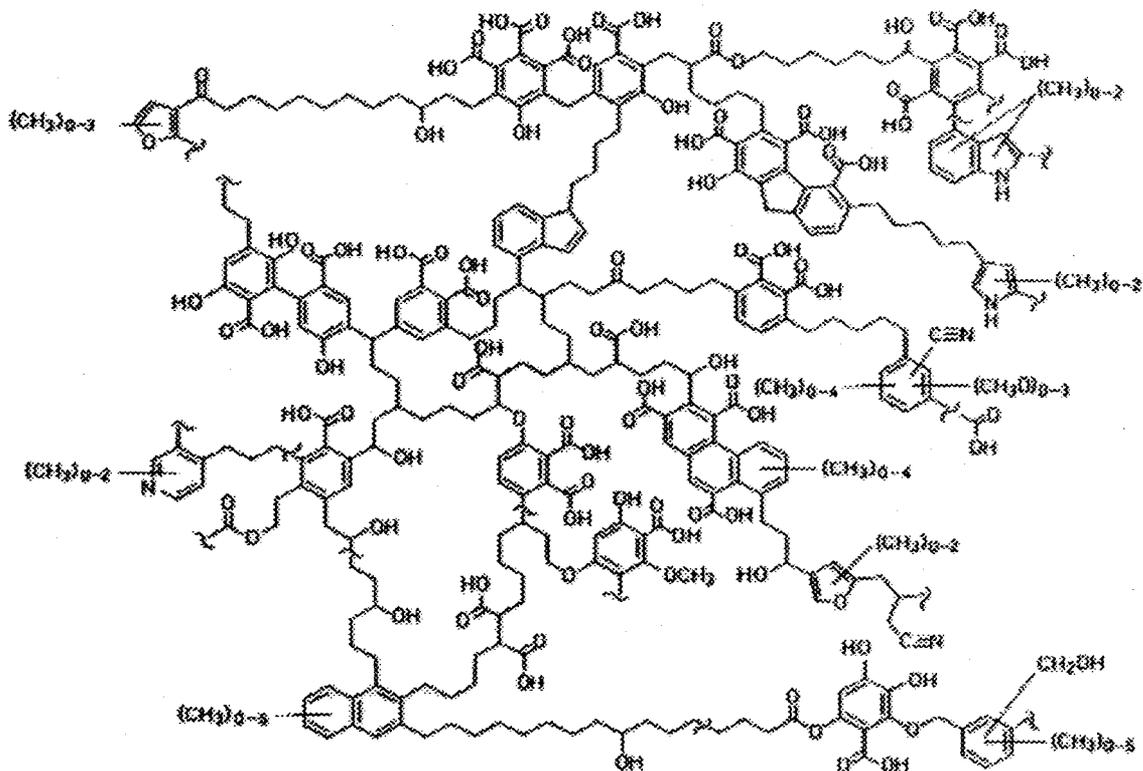
### **1.2.1 Description et origine**

La MOD est principalement composée de substances humiques (SH), le pourcentage pouvant varier de 50 % à 80 % selon le milieu (Buffle, 1988). Il s'agit d'hétéropolymères organiques complexes (fig. 1.1) qui proviennent de la décomposition de plantes, d'animaux et de microorganismes. Ce sont des composés persistants et abondants qu'on trouve dans les sols, les eaux souterraines et les eaux de surface, sous formes dissoutes ou particulières. La composition élémentaire des SH est généralement constituée d'environ 50 % de carbone, 30-40 % d'oxygène, 5 % d'hydrogène et d'environ 1 % d'azote (Tipping, 2002). Certaines analyses révèlent aussi la présence de soufre (< 1 %) (Thurman et Malcolm, 1995). Leur structure n'est pas définie, mais, on sait que ces macromolécules possèdent divers groupements fonctionnels; on y trouve (en ordre décroissant) des groupements carboxyliques, phénoliques et alcooliques de même que des cétones et des quinones. De par leur complexité et leur diversité fonctionnelle, les SH interviennent dans plusieurs processus environnementaux (tableau 1.1).

**Tableau 1.1.: Propriétés chimiques des SH et leurs rôles dans divers enjeux environnementaux (adapté de Tipping, 2002 et de Campbell *et al.*, 1997).**

Enjeux	Rôles SH	Propriétés chimiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acidification des eaux</li> <li>• Contrôle des nutriments</li> <li>• Déchets radioactifs</li> <li>• Métaux lourds</li> <li>• Pesticides, xénobiotiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Complexation <math>H^+</math>, <math>Ca^{2+}</math>, <math>Mg^{2+}</math>, <math>Fe^{3+}</math> et <math>M^{z+}</math></li> <li>• Formation de complexes ternaires (p.e., SH-Fe-phosphate)</li> <li>• Réactions redox</li> <li>• Transport et biodisponibilité de micronutriments (Fe, P) et des contaminants</li> <li>• Adsorption de composés organiques hydrophobes</li> <li>• Influence sur la biodisponibilité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acides faibles (groupements carboxyliques et phénoliques)</li> <li>• Polyfonctionnels</li> <li>• Polyélectrolytes</li> <li>• Surfactant</li> <li>• Domaines hydrophobes (chaînes aliphatiques et noyaux aromatiques)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pénétration de la lumière</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absorption et atténuation de la lumière</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chromophores (électrons <math>\pi</math> excitables)</li> </ul>

Les SH aquatiques sont des polymères qui peuvent être classifiées en trois fractions. Il y a les acides humiques (AH), qui sont insolubles à un pH inférieur à 2 mais se dissolvent à des pH supérieurs à celui-ci. Les acides fulviques (AF), quant à eux, restent en solution pour tous pH, alors que l'humine est insoluble à travers la gamme de pH (McKnight et Aiken, 1998). L'AF est plus soluble car il contient plus de groupements carboxyliques et phénoliques et a un poids moléculaire plus faible que l'AH (Thurman, 1985). Les SH aquatiques proviennent de sources externes ou internes à l'écosystème aquatique, c'est-à-dire allochtones ou autochtones (McKnight et Aiken, 1998).



**Figure 1.1** Structure représentative de la matière organique dissoute (MOD) naturelle proposée par Schulten & Schnitzer (1993).

Le paramètre opérationnel qui permet d'évaluer la présence des SH dans le milieu aquatique est le carbone organique dissous (COD). Il s'agit d'un dosage de tout le carbone organique associé à des molécules qui passent à travers une membrane filtrante (normalement de porosité 0,45  $\mu\text{m}$ ). La concentration en SH dans les eaux de surface peut atteindre des concentrations de 100  $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$  selon la nature du bassin versant, le climat, la saison et les intrants anthropiques (Tipping, 2002). La valeur moyenne serait de 5  $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$  (Thurman, 1985).

### 1.2.2 Processus environnementaux

Dans les eaux naturelles, les SH peuvent agir comme tampon acide-base, comme réservoir de nutriments et/ou comme ligand (tableau 1.1). En effet, la capacité à complexer les cations en solution est une caractéristique physico-chimique importante des SH. Cette dernière propriété est surtout due à la présence au sein de la macromolécule de groupements carboxyliques. Les atomes de soufre et d'azote présents ont aussi été identifiés comme atomes donneurs (Tipping, 2002). Ces réactions de complexation, le type de ligand organique (AH ou AF), la charge, le rayon et la concentration du métal, le pH, la force ionique et/ou la compétition offerte par d'autres cations ont tous une influence sur la spéciation chimique d'un métal donné dans les eaux naturelles (Tipping, 2002).

Les SH sont aussi des surfactants (Visser, 1982). Leur structure complexe est composée à la fois de domaines hydrophiles et hydrophobes (fig. 1.1). Elles peuvent donc s'accumuler à l'interface air-eau et s'adsorber à des surfaces hydrophobes (Tipping, 2002). Les SH peuvent s'adsorber aux parois algales (Campbell *et al.*, 1997; Parent *et al.*, 1996, Vigneault *et al.*, 2000). Cette interaction directe entre les algues et la MOD peut influencer la perméabilité membranaire de la cellule algale et la formation de complexes de surface algues-métaux. Conséquemment, les SH peuvent jouer divers rôles, parfois contradictoires, dans la prise en charge et/ou la toxicité des métaux.

## **1.3 Modèle de l'ion libre**

### **1.3.1 Définition**

Pour expliquer l'influence de la spéciation d'un métal sur sa prise en charge par un organisme, on se réfère habituellement à ce qu'on appelle le Modèle de l'Ion Libre (MIL). Suite à des études en milieu synthétique contrôlé sur divers métaux (Cu >>Cd, Zn, Pb), il a été montré que la réponse de l'organisme suivait la concentration de l'aquo ion ou de l'ion libre dans le milieu d'exposition. Par « réponse » on entend ici la bioaccumulation du métal ou encore l'effet biologique induit par le métal une fois accumulé (effet positif : micronutrition; effet négatif : toxicité). Grâce à ces résultats, Morel (1983) a établi un modèle décrivant les interactions entre les métaux et les organismes vivants (fig. 1.2). Ce modèle repose sur un certain nombre de préceptes:

- la membrane plasmique est le site principal des interactions métal-organisme;
- l'équilibre entre le métal en solution et la membrane est plus rapide que l'expression de la réponse biologique chez l'organisme;
- la réponse biologique est proportionnelle à la concentration du complexe métal-membrane au site de transport du métal;
- la concentration des sites biologiques (ligands) est présente en excès, de sorte que leur concentration libre ne varie pas de façon significative, même si la concentration de l'ion libre dans la solution varie;

- pendant l'exposition au métal, la nature de la surface biologique n'est pas modifiée (Campbell, 1995; Campbell et Couillard, 2003).

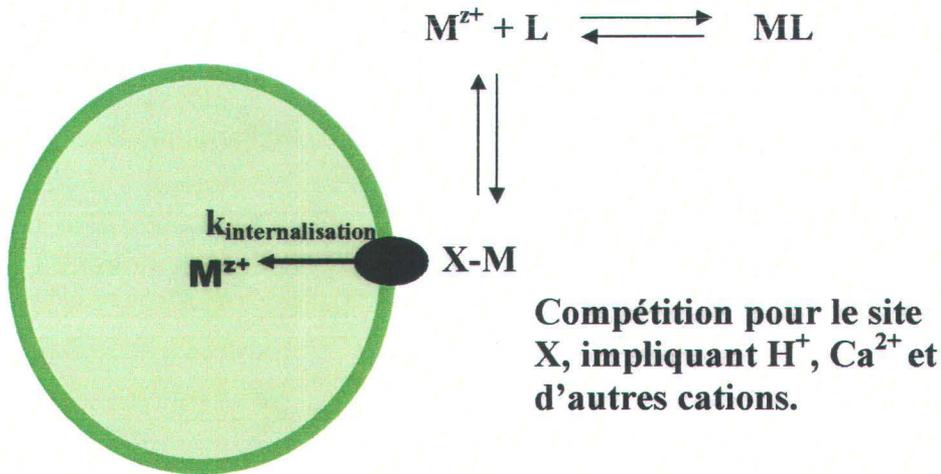
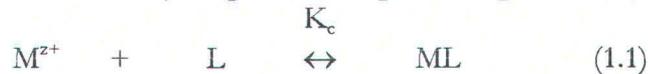


Figure 1.2 Schéma représentant les interactions métaux-algues tel que décrit par le MIL.

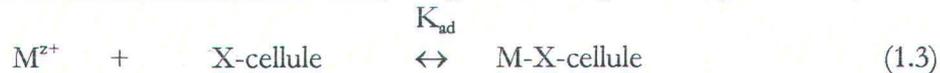
Si toutes ces conditions sont respectées, le MIL prédit que la prise en charge sera directement proportionnelle à l'activité de l'ion libre (équation 1.4). Examinons les réactions de l'ion libre en solution et avec la membrane (X-cellule) :

- équilibre en solution (charges omises pour simplification)



$$K_c = \frac{[ML]}{[M^{z+}][L]} \quad (1.2)$$

- réaction de  $M^{z+}$  à la surface cellulaire (charges omises pour simplification)



$$\{M\text{-X-cellule}\} = K_{ad} \{X\text{-cellule}\} [M^{z+}] \quad (1.4)$$

Il est important de noter que non seulement le métal d'intérêt est en équilibre avec la membrane (équation 1.3) mais il est aussi en compétition avec les autres espèces cationiques présentes (y compris les protons) pour les sites de complexation à la surface (fig. 1.2). Ces espèces cationiques peuvent donc moduler la réponse biologique de l'organisme en faisant concurrence au métal étudié pour les sites de complexation.

### **1.3.2 Le MIL et la MOD**

D'après le MIL, une baisse de la concentration en ion libre en solution résulterait en une diminution de la réponse de l'organisme. De façon similaire, l'ajout de ligands dans le milieu d'exposition entraînerait la complexation du métal, et réduirait sa biodisponibilité. Selon ce raisonnement, le rôle des SH se limiterait à celui d'un ligand, et elles protégeraient les organismes aquatiques contre les métaux toxiques en réduisant la concentration de l'ion libre. Par exemple, Thompson et Côté (1985) ont observé que la présence d'AH réduisait l'effet toxique du cuivre sur la croissance de la biomasse et les taux de production primaire de populations de chlorophycées et de diatomées de la rivière Saguenay.

Le MIL prédit donc que la réponse biologique engendrée par le métal libre,  $M^{z+}$ , présent en solution est indépendante de la présence ou de l'absence de complexes métalliques; pour une concentration de  $M^{z+}$  identique, la réponse biologique sera également identique (fig. 1.3 B). Dans un cas similaire, où des milieux avec et sans ligand sont comparés, pour une même  $[M^{z+}]$  et un temps d'exposition fixe, la réponse biologique devrait être aussi semblable (fig. 1.3 A). Généralement, la réponse

biologique, telle que la prise en charge, atteint un état stationnaire (courbure dans les graphes, fig. 1.3) qui correspond soit à une diminution du taux de prise en charge, soit à une même vitesse d'entrée et de sortie du métal dans la cellule.

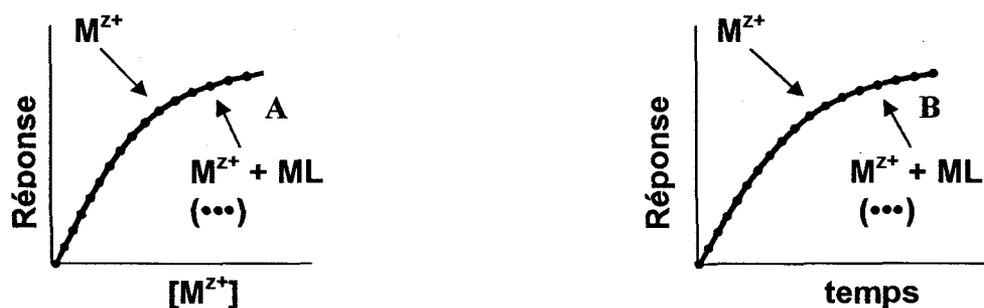


Figure 1.3 Schéma des designs expérimentaux possibles selon le MIL à temps fixe (A) et à concentration fixe (B).

Ces prédictions sont-elles conformes aux données expérimentales? Les études faisant mention de l'effet de la MOD sur la prise en charge d'un métal sont en général de nature qualitative (Campbell, 1995). Ces recherches ne tiennent pas compte de la spéciation chimique du métal en présence de MOD. Il est donc impossible de savoir si la diminution de la biodisponibilité suit la décroissance de la concentration en ion libre (Campbell et Couillard, 2003). L'absence de constantes de complexation fiables due à l'hétérogénéité des molécules de SH et la complexité des réactions ajoute à la difficulté d'étudier quantitativement l'influence de la MOD sur la biodisponibilité des métaux. En principe on pourrait contourner l'absence de constantes de complexation en mesurant la concentration de l'ion métallique libre (plutôt que de le calculer).

Cependant, les techniques disponibles pour doser les ions métalliques libres sont souvent compromises par la présence même de la MOD. Par conséquent les études quantitatives sont plutôt rares. Il y a quelques recherches quantitatives, qui ont été menées sur des systèmes algues-métaux, mais les conclusions ne montrent aucun consensus sur l'effet des SH sur la réponse biologique (Campbell, 1995). Deux exemples illustrant ce manque de consensus sont présentés ci-dessous.

Parent *et al.* (1996) ont étudié l'inhibition de la croissance de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* par l'aluminium. En fixant la concentration en  $Al^{3+}$  libre à 6  $\mu M$ , ils obtenaient une inhibition de 71 %. Cependant, lorsque l'algue était exposée à cette même concentration en  $Al^{3+}$  mais en présence de l'AF (5,5 mg C $\cdot$ L $^{-1}$ ), cette inhibition disparaissait. Leurs résultats ont aussi montré que l' $Al^{3+}$  seul provoquait une diminution de la perméabilité de la membrane cellulaire vis-à-vis du sorbitol (soluté non-polaire, assimilé par diffusion passive). Par contre, si on ajoutait de l'AF, tout en maintenant constante la concentration en  $Al^{3+}$  libre (par ajout d'aluminium), la perméabilité membranaire redevenait normale. En effet, c'était l'Al qui provoquait une diminution de la perméabilité membranaire, et l'AF qui la restaurait. Donc, dans cette étude, la MO joue un double rôle. Elle complexe l'aluminium, en plus de réduire l'action toxique de ce métal sur la perméabilité membranaire de la cellule algale.

Vigneault (2000) a exposé les algues vertes *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata* à différentes concentrations de Cd libre en présence d'AH et d'AF de la

rivière Suwannee, ou encore en présence de l'acide nitrilotriacétique (NTA), et ceci sur de courtes périodes ( $t < 60$  min). Le NTA est un ligand synthétique communément utilisé comme tampon dans les études de bioaccumulation et de toxicité des métaux chez les algues. Les membranes algales sont imperméables au NTA seul et à ses complexes métalliques. Vigneault (2000) a comparé les taux de prise en charge de Cd en l'absence et en présence de ligands ainsi que l'effet des SH par rapport au NTA. Ses résultats ont montré que la présence de ligand n'avait aucune influence sur la prise en charge pour une même concentration de Cd libre,  $Cd^{2+}$ , dans les milieux d'exposition, et ce pour chaque espèce d'algues. L'augmentation de la concentration cellulaire de Cd était liée à la concentration du  $Cd^{2+}$  dans le milieu. Pour une même  $[Cd^{2+}]$ , peu importe le ligand utilisé pour tamponner le Cd, le taux de prise en charge était identique pour les milieux avec du NTA, de l'AH ou de l'AF de la rivière Suwannee. Cette étude est donc en accord avec les prédictions du MIL, qui suppose que la MOD dans le milieu ne fait que complexer le métal présent et n'interfère pas avec la cellule algale.

En résumé, le MIL suggère que la réponse biologique engendrée par un métal dissous est fonction de la concentration de son ion métallique libre ( $M^{z+}$ ). Cette dernière est à son tour influencée par la concentration total du métal, la concentration et la nature des ligands présents en solution. Toutefois, le MIL limite le rôle du ligand à celui d'un simple complexant présent dans le milieu qui ne fait que diminuer la concentration de l'ion métallique. Cependant, certaines études suggèrent que la présence d'AH ou de MOD dans le milieu auraient un effet sur la membrane cellulaire. À la lumière de ces

résultats, le MIL ne peut pas s'appliquer de façon universelle à toutes les conditions présentes dans les eaux douces naturelles. Le système Ag-MOD sera-t-il une exception au MIL?

#### **1.4 Prise en charge et biodisponibilité de l'Ag chez les algues**

Dans les systèmes aquatiques, le phytoplancton forme la base de la chaîne alimentaire. Il est donc important de s'intéresser à la prise en charge de l'Ag par les algues, une porte d'entrée pour ce contaminant dans la chaîne trophique. A titre d'exemple, Hook et Fisher (2001) ont exposé du zooplancton à des formes particulières (algues contaminées en argent) et/ou à de l'Ag sous forme dissoute dans le milieu d'exposition. D'après leurs résultats, les cladocères d'eau douce, *Ceriodaphnia dubia* et *Simocephalus* sp., ne sont pas très sensibles à l'Ag aqueux; aucun effet toxique n'était évident pour des concentrations inférieures à 100 nM. Des effets sous létaux tels qu'une baisse de production d'œufs et un ralentissement du développement ovarien se sont cependant révélés après assimilation d'algues contaminées à l'Ag, lesquelles n'ont subi qu'une exposition de 0,5 nM Ag aqueux. Il importe donc de considérer la prise en charge de l'argent par les algues et les conditions physico-chimiques qui peuvent l'influencer en l'absence et en présence de MOD.

##### **1.4.1 En absence de MOD**

Garnier et Baudin (1989) ont constaté que l'accumulation de  $P^{110m}Ag$  par l'algue *Scenedesmus obliquus* en culture axénique était forte. Cependant, leur étude ne mentionne

pas les concentrations d'Ag utilisées. Ils ont aussi déterminé un facteur de bioconcentration (BCF) de  $1,8 - 25 * 10^5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (poids sec) sur la base de la radioactivité mesurée chez les algues ainsi que dans l'eau. Les auteurs ont suggéré que l'accumulation était due à l'adsorption à la surface de la cellule plutôt qu'à une prise en charge.

Stary *et al.* (1983) ont déterminé une constante de demi-saturation d'environ  $5 \mu\text{M}$  ( $K_m$  : concentration à laquelle le transport membranaire est saturé à 50 % par un élément) en terme d'Ag total nominal présent dans la solution d'exposition. Il s'agit d'une valeur très élevée, qui correspond probablement à une sorption à la surface de l'algue, plutôt qu'à un transport trans-membranaire.

Le USEPA (1987) a déterminé les concentrations d'argent nécessaires pour inhiber à 50 % la croissance de diverses algues pendant une période de 96 h ( $CE_{50}$ ). Chez l'algue *Selenastrum capricornutum* et la diatomée *Skeletonema costatum*, les résultats étaient de 24 nM et  $1,6 \mu\text{M}$ , respectivement (concentrations nominales). La croissance des algues a été suivie à l'aide de mesures de la Chl *a* comme paramètre cible. Cette différence de la  $CE_{50}$  est soit le résultat d'une plus faible sensibilité de la diatomée à concentration intracellulaire égale ou à une plus faible prise en charge de l'Ag par la diatomée. L'information disponible ne permet pas d'élucider cette question.

Une comparaison plus large a été établie par Fortin (2000), qui a compilé des valeurs de CE<sub>50</sub> rapportées dans la littérature scientifique (tableau 1.2). Soulignons que la plupart des espèces étudiées proviennent du milieu marin. Dans de tels cas les tests de toxicité sont réalisés dans de l'eau de mer artificielle, riche en ions chlorure. Dans ces milieux, l'argent est fortement complexé par les chlorures, ce qui expliquerait les valeurs de CE<sub>50</sub> plutôt élevées, puisqu'elles sont exprimées en [Ag] dissous ou [Ag] nominal et non pas en [Ag<sup>+</sup>].

**Tableau 1.2. Synthèse des valeurs de CE<sub>50</sub> (nM) pour l'inhibition de la croissance des algues par l'argent.**

Algues	CE <sub>50</sub>	Référence
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	25100	Fisher <i>et al.</i> 1984*
<i>Emiliana huxleyi</i>	316	Fisher <i>et al.</i> 1984*
<i>Oscillatoria woronichinii</i>	79	Fisher <i>et al.</i> 1984*
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	1260	Fisher <i>et al.</i> 1984*
<i>Scenedesmus acutiformis</i>	190	Stokes 1981
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	70	Stokes 1981
<i>Ditylum brightwellii</i>	> 550	Canterford et Canterford 1980*
<i>Selenastrum capricornutum</i>	24	USEPA 1987
<i>Skeletonema costatum</i>	1200 – 1600	USEPA 1987
<i>Selenastrum capricornutum</i>	59	Turbak <i>et al.</i> 1986
<i>Nostoc muscorum</i>	34	Rai et Raizada 1985*

\* Tests effectués dans de l'eau de mer

L'influence de ligands inorganiques dans les milieux d'exposition sur la prise en charge de l'Ag a aussi été étudiée. L'effet de l'ion chlorure a été mesuré chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* pour des courtes périodes d'exposition (Fortin et Campbell, 2000). Les algues étaient exposées à une concentration fixe d'Ag<sup>+</sup>, 8 nM, mais avec différentes concentrations d'ions Cl<sup>-</sup>. Les résultats ont montré une augmentation par un facteur de 4 de la prise en charge en fonction de la concentration de Cl<sup>-</sup> ([Cl<sup>-</sup>] de 5 μM à 4 mM), même si [Ag<sup>+</sup>] n'a pas changé. Les auteurs ont attribué cette augmentation à un taux de prise en charge très rapide par *C. reinhardtii*, qui a pour effet de diminuer la concentration en Ag dans la couche limite qui entoure la cellule algale (la phycosphère). Dans un tel cas, la vitesse de prise en charge de l'Ag est limitée par la vitesse de diffusion du métal, de la solution d'exposition jusqu'à la surface algale, à travers la phycosphère. L'effet des ions Cl<sup>-</sup> disparaît lorsque la concentration d'Ag est supérieure à 10<sup>-7</sup> M (Fortin et Campbell, 2000) et elle devient négligeable aussi lorsque l'on teste des algues autres que *C. reinhardtii* qui assimilent l'argent plus lentement et ne créent pas de limitation diffusive (Lee *et al.*, 2004).

Reinfelder et Chang (1999) ont aussi étudié l'influence du chlorure sur la prise en charge de l'Ag par une diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* sur une période de 0 à 4 h à pH 6. Leurs résultats montrent que l'accumulation est rapide dès la première heure et atteint ensuite un état stationnaire. Cette accumulation est d'autant plus rapide qu'il y a de chloro-complexes neutres ([Cl<sup>-</sup>] = 5 mM, [Ag] = 50 pM, AgCl<sup>0</sup> = 66 % et Ag<sup>+</sup> = 12.3 %) en solution. De cette même façon, le taux de prise en charge est plus élevé en

présence de chloro-complexes. Leurs conclusions sont basées sur un coefficient de partage octanol-eau plus élevé à des concentrations de chlorures où l'espèce  $\text{AgCl}^0$  est dominante et sur des profils de cinétique d'accumulation dont la pente est plus abrupte dans ces mêmes conditions. Ces auteurs suggèrent, à partir de leurs résultats, qu'il y a diffusion passive du chloro-complexe neutre  $\text{AgCl}^0$  et que ceci peut jouer un rôle important dans l'accumulation de l'Ag par le phytoplancton.

L'influence de l'anion thiosulfate a aussi été étudiée par Fortin et Campbell (2001). Cet anion est très présent dans les effluents de l'industrie photographique. La prise en charge a été évaluée dans les mêmes conditions expérimentales que Fortin et Campbell (2000). La concentration d' $\text{Ag}^+$  était de 10 nM et celle de thiosulfate de 0,11  $\mu\text{M}$ . Les résultats ont montré que la prise en charge était 2 fois plus élevée que pour celle à la plus grande concentration de chlorure (4 mM). De plus, si l'ion sulfate était retiré du milieu d'exposition, cette augmentation passait à un facteur d'environ 4 par rapport au milieu avec chlorure. Les auteurs ont conclu que le complexe Ag-thiosulfate était transporté à travers la membrane algale et que le sulfate agissait comme un inhibiteur de ce transport.

#### **1.4.2 En présence de MOD**

D'après nos recherches bibliographiques, l'effet de la MOD sur la prise en charge de l'Ag chez les algues d'eau douce n'a pas encore fait l'objet d'études. Cependant, d'autres organismes aquatiques ont été étudiés.

### 1.4.2.1 Chez les bivalves

Une étude conduite par Roditi *et al.* (2000) sur la moule zébrée (*Dresseina polymorpha*) a montré que la moule prenait en charge des métaux par absorption de complexes métalliques impliquant de la matière organique dissoute (MOD) dérivé de la culture de diatomées. Les expositions d'une durée de 4 h se faisaient dans de l'eau filtrée de la rivière Hudson et la prise en charge a été suivie à l'aide de radio-isotopes ( $^{14}\text{C}$  et  $^{110\text{m}}\text{Ag}$ ). Le  $^{14}\text{C}$  servait de traceur pour calculer l'efficacité d'absorption du COD. Ils ont aussi comparé les fractions de MOD de poids moléculaire faible ( $< 1$  kDa) ou élevé ( $>1$  kDa). Les concentrations d'Ag utilisées étaient 0,38 – 0,49 nM. L'absorption de la forme dissoute de l'Ag augmentait par un facteur de 8,7 en présence de MOD de poids moléculaire élevé. Les auteurs ont conclu que l'Ag peut être transporté dans la moule lorsque la MOD est absorbée.

L'effet de la MOD sur la prise en charge de l'Ag a également été évalué chez l'huître américaine *Crassostrea virginica* par Guo *et al.* (2001). A l'aide de radio-isotopes, ils ont testé quatre différentes concentrations de MOD (0, 0,5, 5, 10  $\text{mg C}\cdot\text{L}^{-1}$ ), extraite de l'eau prélevée dans la baie de Galveston (Galveston, Texas, E.U.A.), lors d'expositions de courte durée en eau salée à laquelle on avait ajouté de l'Ag. Les auteurs ne mentionnent pas l'activité ou la concentration utilisée. Les résultats suggèrent que le taux de prise en charge de l'Ag, ainsi que la facteur de concentration (FC poids sec :  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} = \text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ ), augmentent avec la [MOD]. Le FC passe d'environ 1 400 en absence de MOD à environ 4 800 pour une concentration de 5  $\text{mg C}\cdot\text{g}^{-1}$ . Pour ces

mêmes conditions, le taux de prise en charge passe de  $67,1 \pm 3,4 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  à  $261 \pm 13 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Les auteurs concluent que les résultats ne concordent pas avec le MIL. Cependant, on ne connaît pas l'activité de l'ion libre pour les différentes conditions d'exposition. Il est donc impossible de déterminer le lien avec l'activité de l'ion libre. Ils avancent l'hypothèse que cette augmentation soit liée à l'absorption de la MOD et/ou résulte d'une interaction des métaux à la surface des cellules suite à une charge de surface plus négative en présence de MOD.

#### 1.4.2.2 Chez les poissons

Janes et Playle (1995) ont exposé des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à  $100 \text{ nM}$  d'Ag dans un milieu synthétique pendant 2-3 h. Ils ont déterminé qu'une concentration de  $24 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$  dans le milieu était suffisante pour prévenir l'accumulation d'Ag à la surface des branchies. La MOD avait été extraite par ultrafiltration de l'eau prélevée d'une zone humide près de Grand Valley (Ontario, Canada). Dans ce cas-ci, la MOD avait un effet protecteur global, mais les auteurs n'ont pas dosé l'ion  $\text{Ag}^+$  libre et donc ils n'ont pas pu déterminer si le MIL était respecté. Ils ont cependant calculé une constante de complexation conditionnelle à partir de leurs paramètres expérimentaux ( $\log K_c \text{ Ag-DOC} = 9$ ), en utilisant les branchies comme « détecteur » d' $\text{Ag}^+$  libre.

Dans d'autres recherches menées sur la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, et sur le mené tête de boule *Pimephales promelas*, Bury *et al.* (1999) ont évalué l'effet de différents paramètres (chlorure, calcium, MOD) sur la mortalité (résultats exprimés comme

valeurs de CL<sub>50</sub> pour 96 h). Les organismes ont été exposés dans de l'eau synthétique à des concentrations de MOD entre 0,3 – 5,8 mg C•L<sup>-1</sup>. Les résultats indiquent que la valeur de CL<sub>50</sub>, exprimée en termes d'Ag total, augmente par un facteur de 2,7 à 4,1 en présence de la MOD, tandis qu'elle diminue lorsque exprimée comme Ag<sup>+</sup>, et ceci, pour les deux espèces étudiées. Soulignons que *P. promelas* est plus sensible à l'argent que *O. mykiss*. Il est donc possible d'après ces valeurs qu'une proportion des complexes Ag-DOC contribue à la toxicité, en interagissant à la surface des branchies. Cependant, les valeurs pour Ag<sup>+</sup> étant basées sur des calculs effectués à l'aide du logiciel MINEQL+, il y a donc une incertitude sur la validité de ces résultats. Par contre, si on tient compte seulement des valeurs de CL<sub>50</sub> basées sur l'Ag totale, la MOD a un effet protecteur.

Brauner et Wood (2002) ont étudié l'influence de l'Ag sur le développement (exposition chronique) de la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*) en présence de MOD (acide humique Aldrich). Ils ont évalué l'influence de l'Ag sur la survie des embryons (œufs) en présence de la MOD. Dans un milieu contenant 12 mg C•L<sup>-1</sup> et 10 µg•L<sup>-1</sup> d'Ag total ([Ag]<sub>dissous</sub> 4,7 µg•L<sup>-1</sup>), le % de mortalité journalière a baissé d'un facteur de 2 par rapport au témoin. De plus, l'AH a été responsable d'une perturbation de la régulation ionique en inhibant la prise en charge du Na<sup>+</sup>. La MOD sous forme d'AH semble donc avoir un effet protecteur sur la mortalité des embryons due à la toxicité de l'Ag mais affecte la régulation ionique. Le taux de croissance des larves était réduit dans les milieux contenant de la MOD, le poids et la longueur des organismes étant plus petits

que les témoins, de 30 % et de 25 %, respectivement. Cependant, à cause de leur protocole expérimental, il est difficile de savoir s'il s'agit d'un effet direct de la MOD ou d'un manque de transport d'oxygène vers les larves couvertes de particules d'AH. Ces dernières se trouvaient dans le fond des chambres d'exposition, et ont été recouvertes d'une fine pellicule à cause de la présence de matière organique non dissoute. Conséquemment, cette ambiguïté atténue la portée de ces résultats.

Dans une autre étude, Erickson *et al.* (1998) ont étudié les effets de la MOD sur la toxicité de l'argent dans des bioessais avec *P. promelas*. L'addition d'AH (Aldrich) au milieu d'exposition synthétique a augmenté la  $CL_{50}$  (96 h) de 350 % et de 430 % pour 2,5 mg C•L<sup>-1</sup> et 10 mg C•L<sup>-1</sup>, respectivement. Une fois de plus, la MOD semble avoir un effet protecteur. Cependant, la concentration d'Ag libre dans les milieux n'est pas connue. Leurs résultats obtenus avec les milieux synthétiques (sans/avec MOD) concordent avec ceux obtenus avec des eaux naturelles. La valeur de  $CL_{50}$  était supérieure par un facteur de 10 pour l'eau de la rivière St-Louis (WI, EUA) par rapport à l'eau du robinet du laboratoire. La qualité physico-chimique des deux eaux était similaire, à l'exception de la concentration en matière organique, l'eau de la rivière étant enrichie par rapport à l'eau du robinet.

En guise de conclusion, on constate qu'un certain nombre d'études ont essayé d'évaluer l'effet de la MOD sur la toxicité de l'Ag. Cependant, leurs résultats sont souvent incomplets à cause d'un manque d'information sur la spéciation du métal

(surtout par l'absence de valeurs fiables sur la concentration en  $\text{Ag}^+$ ) et, dans certains cas, par la présence de matière organique particulaire. Dans ces circonstances, l'applicabilité ou non du MIL pour le système MOD-Ag reste en suspend.

## **1.5 Problématique**

### **1.5.1 Les limites du MIL**

L'élaboration du MIL est basée principalement sur des résultats obtenus en laboratoire dans des conditions contrôlées utilisant des milieux artificiels définis. Il est donc difficile d'extrapoler ce modèle jusqu'aux eaux naturelles, surtout que les études intégrant la MOD comme paramètre expérimental sont plutôt rares et les résultats, équivoques. En général, les conclusions sont de nature qualitative; elles ne considèrent pas la spéciation du métal en présence de la MOD (Campbell, 1995).

### **1.5.2 Le défi des SH**

Les SH sont des hétéropolymères complexes difficiles à caractériser. Leur structure et leurs groupements fonctionnels ne sont pas bien définis, et par conséquent leurs propriétés de complexation non plus. Notre incapacité à modéliser correctement les interactions entre acides humiques ou fulviques et divers métaux limite l'utilisation de modèles de spéciation chimique pour définir les milieux d'exposition (Tipping, 1998). Avec un ligand organique simple (p.e., : la glycine), pour lequel on connaît les constantes d'acidité ( $\text{L}^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{HL}$ ) et les constantes de complexation ( $\text{L}^- + \text{M}^{z+} \leftrightarrow \text{ML}^{(z-1)+}$ ),

on peut ajouter le ligand au milieu d'exposition et calculer la spéciation du métal avec confiance, à l'aide de modèles d'équilibre. Grâce à ces modèles, on peut donc manipuler les milieux d'exposition, en jouant avec divers paramètres ( $[H^+]$ ,  $[M_T]$ ,  $[Ca]$ ,  $[L]$ , ...), tout en contrôlant la spéciation du métal qui nous intéresse (Twiss *et al.*, 2001). Avec les SH, par contre, on ne peut faire de telles simulations avec autant de confiance.

Dans le cas de l'Ag, les constantes conditionnelles sont rares, d'autant plus que la complexation de ce métal avec des substances humiques n'a été que très peu étudiée. Il est donc difficile, voire impossible, d'utiliser des logiciels de spéciation comme MINEQL+ (Schecher et McAvoy, 1992) ou WHAM (Tipping, 2002) pour calculer avec confiance la spéciation d'un métal comme l'argent en présence des SH. Il faut plutôt discriminer expérimentalement entre l'aquo ion et les autres complexes dissous présent en solution. Pour ce faire, nous avons exploré la possibilité d'adapter une technique d'échange ionique (chapitre 2) avec une résine pour différencier entre l'argent libre et les autres complexes d'argent, ce qui nous permettrait de quantifier l'effet de la MOD naturelle.

De plus, le rôle que jouent les SH dans le milieu ne se limite pas à complexer les métaux présents. La MOD est impliquée dans divers processus biogéochimiques (section 1.2.1). Il est donc possible que la présence d'acides humiques ou fulviques

dans un système contenant de l'argent et des algues unicellulaires conduise à des effets dépassant la simple complexation du métal présent.

## **1.6 Objectifs et hypothèses**

L'objectif principal de ma recherche était de déterminer si la prise en charge de l'Ag par des algues vertes unicellulaires en présence de matière organique dissoute naturelle suivait les prédictions du modèle de l'ion libre. Cependant, pour réaliser ce but, il a fallu auparavant adapter la technique d'échange ionique (TEI; voir chapitre 2) pour doser l'Ag libre en solution, pour permettre de caractériser la spéciation de l'Ag en présence d'acides humiques.

Pour évaluer le MIL de manière efficiente, les cibles biologiques ont été exposées dans des milieux où la spéciation chimique était définie. La prise en charge a été évaluée en absence et en présence de la MOD: a) pour un temps fixe et pour des concentrations croissantes d'Ag libre; et b) en fonction du temps pour une concentration d'Ag libre fixe.

Les expériences ont été conçues pour vérifier l'hypothèse suivante : que la prise en charge de l'argent par une algue unicellulaire est proportionnelle à la concentration d'argent libre dans le milieu, peu importe la présence ou non de ligands. En d'autres termes, la présence ou non de SH ne devrait avoir aucun effet sur la prise en charge du métal pour une concentration identique d'Ag<sup>+</sup>. Selon ce modèle conceptuel, la MOD ne fait que complexer l'Ag, et n'a aucune interaction directe avec la cellule algale.

## 2 Matériel et méthodes

---

### 2.1 Produits, réactifs et conservation

Tous les contenants utilisés pour préparer et conserver les solutions étaient faits de polypropylène (PP), de polyéthylène haute densité (HDPE) ou de tétrafluoroéthylène (TFE). Ce dernier possède une faible capacité d'adsorption et était utilisé pour les solutions d'argent (Ag) en concentrations traces. Tous les contenants et autres matériels nécessaires (embouts de pipettes, pinces, unité de filtration, etc.) étaient trempés dans un bain d'acide nitrique (15 % v/v) pendant 24 h, rincés sept fois avec de l'eau ultra-pure (résistivité  $\sim 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) et séchés sous une hotte à flux laminaire avant leur utilisation. Le port de gants sans poudre en nitrile (*Fisher*) ainsi que la préparation des expériences sous la hotte à flux laminaire visaient à minimiser le risque de contamination. Les réactifs utilisés étaient tous de grade analytique ou supérieur pour limiter leur contamination en métaux traces. L'Ag radioactif ( $^{110\text{m}}\text{Ag}$ ,  $408,4 \text{ mCi}\cdot\text{mmol}^{-1}$ ) provenait du Risø National Laboratory à Roskilde au Danemark. Toutes les solutions d'Ag étaient acidifiées ( $\text{pH} < 2$ ) avec de l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) et conservées à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  dans l'obscurité. La matière organique naturelle utilisée était sous forme d'acides humiques de la rivière Suwannee (GA/FL, E.U.A.) et provenait de l'International Humic Substances Society (IHSS, # 1S101H). L'acide humique était enveloppé dans du papier d'aluminium pour prévenir la photo-oxydation et conservé dans un dessiccateur.

Les sels nécessaires à la préparation des solutions mères, de culture et expérimentales étaient pesées à l'aide d'une balance analytique (METLER PM 460) tandis que les volumes étaient prélevés avec des pipettes *Finnpipette* (Labsystems) préalablement calibrées. Chaque solution était stérilisée par filtration sur des membranes filtrantes de 0,2 µm en polycarbonate (PC) (Poretics). Par contre, les solutions mères d'acide humique étaient filtrées sur des membranes de 0,4 µm pour obtenir la fraction dissoute. La filtration permettait aussi d'enlever les particules abiotiques qui pouvaient adsorber les métaux en solution ou causer un biais lors du comptage des algues. La quantité nécessaire du standard d'acide humique était solubilisée dans une solution de NaOH 0,01 M. Pour exprimer la concentration des substances humiques en mg C•L<sup>-1</sup>, nous avons utilisé le contenu en carbone (50 %) rapporté par l'IHSS. Toutes ces solutions étaient conservées à l'obscurité à 4 °C.

Les mesures de pH se faisaient avec un pH-mètre PHM 240 de précision ±0.01 (*MeterLab*, Radiometer Analytical, France) muni d'une électrode ORION (électrode combinée verre/gel, # 9206BN, *Fisher*). Le pH-mètre était calibré quotidiennement avec des tampons de pH 4 et 7 (VWR). L'électrode était rangée dans une solution de conservation composée de 200 mL de tampon pH 7 et de 1 g de chlorure de potassium (KCl). Elle était aussi régulièrement nettoyée avec une solution de pepsine et d'acide nitrique pour permettre une meilleure lecture des valeurs de pH et augmenter sa longévité.

## **2.2 Organismes: culture et croissance**

Les organismes utilisés pour les expériences d'exposition étaient des algues vertes unicellulaires. Deux algues ont été étudiées : *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (Chlorophycée) (UTCC 11) et *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophytum) (UTCC 37, anciennement *Selenastrum capricornutum*). Les souches provenaient de la collection d'algues de l'Université de Toronto (UTCC). *C. reinhardtii* est une algue motile (2 flagelles) ayant un diamètre moyen entre 4 et 5 µm. Il s'agit d'une espèce qui a fait l'objet de nombreuses études, notamment en écotoxicologie. *P. subcapitata* est une algue en forme de croissant d'environ 3 µm de longueur. Son utilisation est grandement répandue comme organisme cible dans les essais de toxicité. L'espèce est aussi commune en eau douce en Amérique du Nord.

Les algues ont été cultivées de façon axénique dans notre laboratoire. La méthode de culture et les conditions de croissance étaient identiques pour les deux espèces. Les algues étaient cultivées dans des Erlenmeyers en polycarbonate (PC) de 250 mL, dans 100 mL de solution inorganique MHSM (modified high salt media, tableau 2.1) à un pH neutre (pH=7). Ce milieu, inspiré du milieu HSM (high salt media: force ionique de 6 meq•L<sup>-1</sup>) décrit par Macfie et al. (1994), a été utilisé par Fortin et Campbell (2000). Les solutions mères utilisées pour la préparation des milieux de culture étaient conservées dans des bouteilles de polypropylène préalablement autoclavées. Les solutions de culture une fois préparées étaient autoclavées à 121 °C pendant 15 min; après une période de 24 h de refroidissement, on ajoutait une solution d'éléments

traces. Il fallait procéder ainsi pour éviter que certains métaux se précipitent pendant ou après l'étape d'autoclavage (Price *et al.*, 1989). Ensuite, le pH était ajusté à  $7,0 \pm 0,1$  avec une solution de NaOH (0,5 M ou 0,1 M).

Les lots de cultures algales étaient maintenus dans une chambre de croissance (CONVIRON, Winnipeg, Canada) sous luminosité constante  $130 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$  avec des tubes fluorescents de type «blanc froid» avec une agitation permanente de 50 rpm à une température de 20 °C. Les cultures étaient maintenues de façon hebdomadaire en transférant  $\sim 2 \text{ mL}$  de «vieille» culture dans un nouveau milieu frais et stérile. Ce transfert se faisait sous la hotte à flux lumineuse en dessous de la flamme sur un comptoir préalablement stérilisé avec de l'éthanol. L'absence de contamination bactérienne des milieux était vérifiée périodiquement en plaçant  $\sim 1,5 \text{ mL}$  de culture d'algues sur une gélose nutritive (Dicto-BactoAgar); ces boîtes de Pétri étaient incubées à 21 °C pendant 72 h.

La croissance des algues se produit en 3 phases : latence, exponentielle et stationnaire (fig. 2.1). En général, il y a d'abord une phase de latence (i) qui peut varier entre 0 et 24 h selon l'état physiologique des algues transplantées. Des algues vigoureuses c'est-à-dire en phase exponentielle s'adapteront rapidement et rentreront dans la phase suivante rapidement tandis que des algues plus « vieilles » (p.e. en phase de latence) auront un laps de temps plus long pour s'adapter à leur nouvel environnement. Une fois adaptée aux conditions de croissance, les algues rentreront dans la phase

exponentielle (ii) pendant laquelle le taux de croissance ( $\mu$ ) est d'environ 2 divisions cellulaires par jour. Cette période où la population double dure environ 24 à 48 h. Finalement, après quelques jours de croissance, une phase stationnaire s'établit (iii), stade pendant lequel la densité cellulaire reste constante. Une carence dans certains nutriments essentiels disponibles et/ou la présence élevée de déchets métaboliques toxiques dans le milieu et/ou la diminution de la luminosité à cause de la densité algale élevée seraient à l'origine de cette phase. Ces changements entraînent un état stationnaire entre la division cellulaire et la mort des cellules et/ou une absence de division cellulaire mais le maintien des activités métaboliques. Ultiment, la mort des cellules sera plus élevée et la culture disparaîtra.

**Tableau 2.1 : Composition et proportions des solutions mères servant à la préparation du milieu de culture MHSM<sup>1</sup>.**

<b>Composantes<sup>2</sup></b> (dilution pour milieu MHSM)	<b>Sels</b>	<b>Concentrations (g•L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fournisseurs</b>
<b>Ammonium</b> (5 mL•L <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	15,0	Omega
	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	4,00	Omega
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	3,21	BDH
<b>Phosphates</b> (250 µL•L <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	29,6	BDH
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	57,6	BDH
<b>AAP</b> (1 mL•L <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	186 mg•L <sup>-1</sup>	ACP
	MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	415 mg•L <sup>-1</sup>	Fisher
	FeCl <sub>3</sub> •6H <sub>2</sub> O	160 mg•L <sup>-1</sup>	BDH
	Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O	300 mg•L <sup>-1</sup>	Fisher
	Zn <sup>4</sup> (1 g•L <sup>-1</sup> )	1,59 mg•L <sup>-1</sup>	Fisher
	Co <sup>4</sup> (1 g•L <sup>-1</sup> )	0,64 mg•L <sup>-1</sup>	Fisher
	Mo <sup>4</sup> (1 g•L <sup>-1</sup> )	2,88 mg•L <sup>-1</sup>	Fisher
	Cu <sup>4</sup> (1 g•L <sup>-1</sup> )	4,47 µg•L <sup>-1</sup>	Fisher
<b>KNO<sub>3</sub> (1 M)</b> (4 mL•L <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>		101,11	Omega
<b>NaOH (0,1 M)</b> (1 mL•L <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>		4,00	BDH

<sup>1</sup> Pour la composition finale voir tableau 2.2.

<sup>2</sup> Chaque solution était filtrée à 0,2 µm.

<sup>3</sup> Volume de solution mère nécessaire pour préparer le milieu de culture.

<sup>4</sup> Etalon pour absorption atomique dans une matrice de HNO<sub>3</sub>.

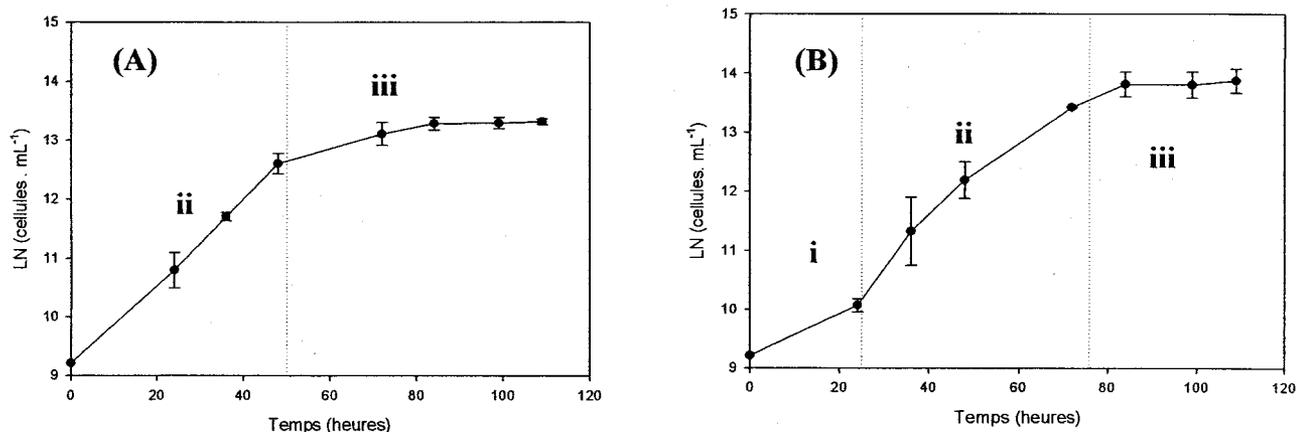


Figure 2.1 : Courbes de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* (A) et *Pseudokirchneriella subcapitata* (B) dans le milieu MHSM à pH 7.

### 2.3 Comptage des algues

Les courbes de croissance et les volumes nécessaires pour obtenir les concentrations désirées d'algues dans les milieux d'exposition étaient établis à partir des mesures de densités algales. Ces dernières ainsi que la superficie des algues étaient déterminées à l'aide d'un compteur de particules (Coulter Counter Multisizer 3, Beckman FL, E.U.A.). Pour évaluer ces paramètres, une dilution de 1:10 dans une solution isotonique (Isoton) était effectuée. L'échantillon était passé trois fois dans un tube d'ouverture 70  $\mu\text{m}$  pendant 24,4 s. Grâce à ces deux paramètres, il nous était possible de normaliser la concentration cellulaire d'Ag chez les algues pour la surface totale ( $\text{m}^2$ ) exposée, ce qui facilite des comparaisons inter-espèces.

## **2.4 Dosage des radio-éléments**

Tous les échantillons, sauf ceux à base d'eau, étaient introduits dans un compteur bêta ( $\beta$ ) (Wallac 1414) pour la mesure d'Ag radioactif ( $^{110m}\text{Ag}$ ), après ajout d'un liquide à scintillation (5 mL, Eco-Lume, ICN). L'activité d'Ag des échantillons aqueux (5 mL) était mesurée au compteur gamma ( $\gamma$ ) (Wallac 1480, Perkin-Elmer Life Sciences, Turku, Finlande). Malgré un meilleur pourcentage d'efficacité (95 %) pour le compteur  $\beta$ , on utilisait le compteur  $\gamma$  (22 %) pour les échantillons aqueux. En effet, le cocktail à scintillation nécessaire pour compter les émissions  $\beta$  est instable pour certaines proportions eau : solvant organique, se dissociant en deux phases (Fortin, 2000). L'efficacité était déterminée en passant des dilutions de la solution d'argent radioactif ( $n=3$ ) d'activité connue. Le temps de comptage pour le compteur  $\gamma$  était généralement de 15 min pour obtenir une erreur inférieure à 1 % sur l'activité totale de l'Ag. Pour des échantillons avec des activités plus faibles, le temps de comptage était augmenté pour avoir une erreur inférieure à 5 %. Pour le compteur  $\beta$  le temps était de 10 min pour une erreur inférieure à 2 %. L'entière fenêtre (1 à 1024 keV) était utilisée pour mesurer les désintégrations dans le spectre  $\beta$ . Pour le spectre  $\gamma$ , la fenêtre choisie se situait entre 329 keV et 987 keV avec un pic principal à 658 keV et un pic secondaire à 885 keV.

Pour passer de comptes par minute (CPM) à des concentrations d'Ag une série d'équations était nécessaire. Premièrement, les CPM étaient transformés en

désintégrations par minute (DPM) en les divisant par l'efficacité du compteur, sauf pour le compteur  $\beta$  car ceci est directement fait par le logiciel d'exploitation. Ils étaient ensuite corrigés pour la décroissance radioactive selon l'équation (2.1) :

$$N = N_0 * e^{\frac{-0,693 * t}{t_{1/2}}} \quad (2.1)$$

où N est l'activité à un temps t,  $N_0$  est l'activité initiale et  $t_{1/2}$  est la demi-vie du radio-isotope ( $^{110m}\text{Ag}$ : 249,8 jours). Finalement, les DPM étaient transformés en nanomoles, en utilisant l'activité spécifique ( $\text{GBq}\cdot\text{g}^{-1}$ ) tel que spécifié par le fournisseur et la masse molaire de l'élément ( $m_{\text{Ag}}$ :  $107,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

## **2.5 La technique d'échange ionique**

### **2.5.1 Théorie**

Pour mesurer la concentration d' $\text{Ag}^+$  en présence de matière organique dissoute, la technique d'échange ionique (TEI) miniaturisée développée par Fortin et Campbell (1998) a été utilisée. Cette méthode consiste à passer un volume suffisant de la solution à doser à travers une résine échangeuse de cations pour atteindre l'état d'équilibre entre la solution et la résine. Cette technique est basée sur certaines hypothèses découlant de principes théoriques d'équilibres chimiques et d'échanges entre un métal  $M^{z+}$  présent en solution et une résine.

Une réaction d'équilibre (2.2) s'établit entre le métal  $M^{z+}$  en solution en présence d'une résine échangeuse d'ions sous forme sodique (RNa) pour laquelle on peut définir une

constante d'équilibre  $K_{IE}^c$  (2.3). Cependant, il s'agit d'une constante conditionnelle, dont la valeur est sensible au pH et à la force ionique auxquels elle est évaluée.



$$K_{IE}^c = \frac{[R_zM] [Na^+]^z}{[M^{z+}] [RNa]^z} \quad (2.3)$$

En présence d'une forte concentration d'électrolyte tel que le  $NaNO_3$ , la concentration de sodium en solution et sur la résine ne sera pas affectée de façon importante par l'échange de l'ion métallique  $M^{z+}$ , présent à une concentration dite « trace ». C'est-à-dire, pour un pH et une force ionique constants, on peut re-définir une nouvelle constante  $\lambda_{o,i,pH}$  ( $L \cdot g^{-1}$ ), en regroupant les termes constants de l'équation (2.3):

$$\lambda_{o,i,pH} = K_{IE}^c \frac{[RNa]^z}{[Na^+]^z} = \frac{[R_zM]}{[M^{z+}]} \quad (2.4)$$

Cette constante s'appelle le coefficient de distribution du métal entre une résine et la concentration du métal sous sa forme libre en solution. La concentration métallique liée à la résine  $R_zM$  peut être évaluée expérimentalement en lixiviant la résine avec un volume  $V$  d'acide fort pour déloger tous les ions métalliques en place. L'éluat récupéré peut ensuite être dosé pour obtenir la concentration en  $M^{z+}$  ( $[M_{El}]$ ). Donc, en ayant ces paramètres et connaissant la quantité de résine utilisée ( $m_r$ ), on peut calculer  $[R_zM]$  avec l'équation (2.5):

$$[R_zM] = \frac{[M_{EI}] * V}{m_r} \quad (2.5)$$

En combinant les équations (2.4) et (2.5) on obtient une relation entre la concentration du métal lié à la résine et la concentration de l'ion libre en solution:

$$[M^{z+}] = \frac{[M_{EI}] * V}{\lambda * m_r} \quad (2.6)$$

De plus, en passant des solutions ne contenant aucun ligand et ayant une concentration en métal libre connue, le coefficient de distribution est facilement déterminé à l'aide de l'équation (2.6). Ainsi, une fois ce paramètre établi, il est possible de déterminer la concentration de l'ion  $M^{z+}$  dans des échantillons de concentration inconnue en dosant  $[M_{EI}]$ .

### **2.5.2 Le montage expérimental**

L'équipement nécessaire pour le montage expérimental de la TEI consistait en une pompe péristaltique Minipuls (Gilson), d'une valve rotative à six canaux (Milton Roy) et d'une colonne de résine Dowex 50W-X8, 50-100 mesh (sulfonic acid functional groups, Sigma) (fig. 2.2). Tous les tuyaux et les connexions étaient en TFE sauf ceux en Tygon (Technicon vert-vert) qui reliaient la sortie de la valve à la colonne via la pompe. Une boîte en acrylique 20x20x20 cm (M. Plastique, QC, Canada) servait de support à la valve et protégeait les solutions contre les dépôts de poussière. Le pH était mesuré en continu à la sortie du montage.

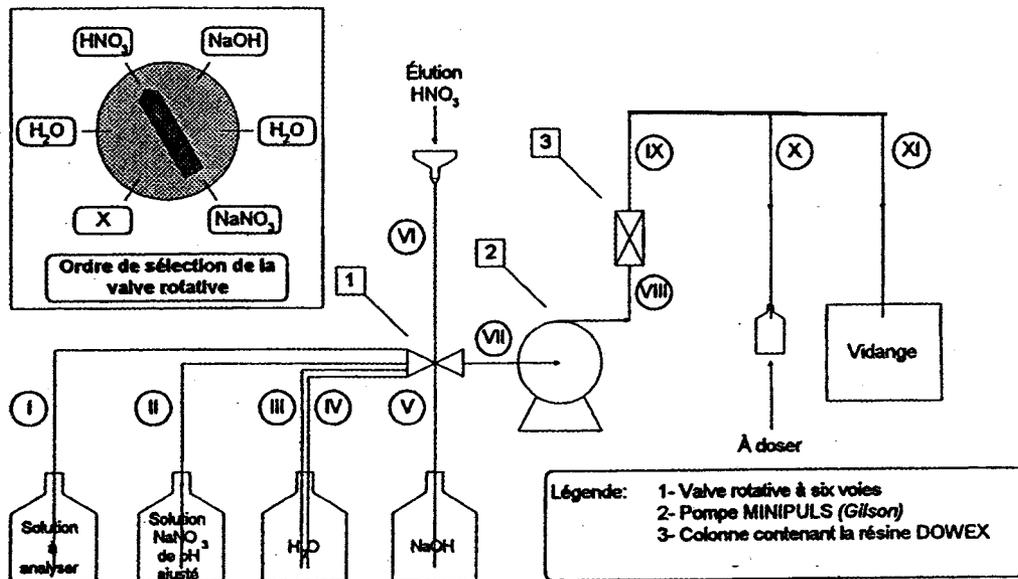


Figure 2.2 Schéma du montage expérimental de la technique d'échange ionique (Fortin, 1996)

La fabrication des colonnes est l'étape la plus délicate dans l'assemblage du montage. Il s'agissait d'insérer deux supports de verre poreux et la résine dans un tube TFE sensible à la chaleur (Cole-Parmer 06851-10). Ce tube a la particularité qu'une fois chauffé à une température supérieure à 327°C, son diamètre se réduit de 1,93 mm à 1,25 mm, ce qui permet de retenir les supports en place. La résine était introduite dans le tube une fois que le premier support tenu en place à l'aide d'un brûleur avait refroidi. Le deuxième support était installé de la même façon mais en prenant bien soin de protéger la résine de la flamme par un morceau de papier d'aluminium. Finalement, les extrémités de la colonne étaient rétrécies pour s'insérer dans les tubes Tygon, pour une longueur totale de 9 cm (fig. 2.3). Le poids sec de la résine dans chaque colonne, entre

7 et 8 mg, était mesuré précisément avec une microbalance Sartorius (Edgewood, NY, E.U.A.).

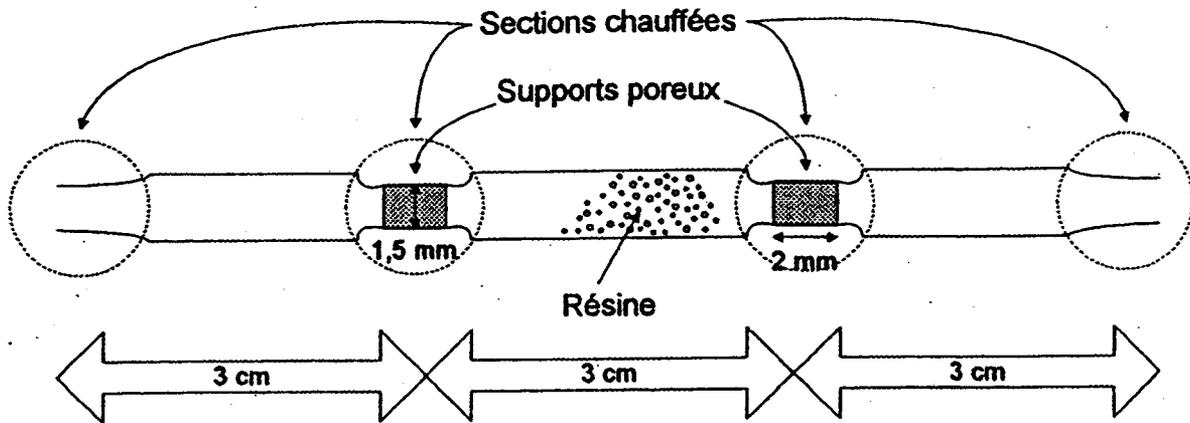


Figure 2.3 Schéma de la colonne de la résine pour la TEI (Fortin, 1996)

### 2.5.3 Méthodologie de la TEI

Avant chaque utilisation, le montage était « nettoyé » avec de l'acide nitrique 1,5 M suivi d'un rinçage à l'eau ultra-pure; chaque étape durait 15 min à un débit d'environ 3 mL•min<sup>-1</sup>. Toutes les étapes ultérieures étaient effectuées à un débit de 5 mL•min<sup>-1</sup>, soit 900 unités sur le cadran de la pompe. La séquence de dosage du métal commençait par un rinçage à l'eau ultra-pure pendant 4 min suivi de la conversion de la résine sous la forme sodique (Na<sup>+</sup>) en passant une solution de NaOH (0,1 M) pendant 2 min. Cette étape était suivie d'un autre rinçage de 4 min à l'eau ultra-pure. La résine était ensuite rincée avec une solution d'électrolyte fort (NaNO<sub>3</sub> = 0,01 M) ajustée à un pH de 7, jusqu'à ce que le pH se stabilise à cette valeur (environ 5 min). Avant son passage dans la colonne, la solution à doser avait été ajustée par l'ajout d'un volume suffisant de

$\text{NaNO}_3$  (2 M) pour obtenir une force ionique finale de  $0,01 \text{ eq} \cdot \text{L}^{-1}$ . L'échantillon était passé pendant 48 min, soit un volume de 240 mL ( $48 \text{ min} \times 5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Ce volume était suffisant pour atteindre l'état d'équilibre entre la résine et la solution. Pour s'assurer que cet état était bien respecté, trois échantillons de 5 mL étaient recueillis à l'aide d'une pipette électronique Mandel Scientific (1-10 mL, Rainin instrument Co) à l'entrée et la sortie du montage; ces échantillons étaient comparés pour vérifier que la concentration en Ag dans la solution à mesurer était égale à celle à la sortie de la résine. De l'eau ultra-pure était ensuite passée rapidement (15 s; pour minimiser la perturbation du changement de force ionique causé par l'eau). Cette étape délogeait le restant de solution de l'espace interstitiel pour éviter de contaminer l'éluant. Après avoir vidé la colonne avec de l'air, la solution éluante était passée pendant 20 min à  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Tous les échantillons étaient récoltés dans des contenants de polystyrène (Diluvials) avant d'être mis dans des flacons à scintillation pour le compteur  $\gamma$ . Pour chaque dosage effectué avec la TEI, une solution contrôle d'argent de concentration connue et ne contenant aucun ligand était passée dans la colonne avant et après la solution à mesurer pour s'assurer que la résine n'avait pas été altérée pendant le passage des échantillons, c'est-à-dire que le coefficient de distribution,  $\lambda$ , est resté constant.

#### **2.5.4 Détermination des paramètres**

Avant de commencer à doser nos échantillons, il a fallu déterminer : i) le volume nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre entre la résine et la solution expérimentale ; ii) la nature de l'éluant, son volume ; et iii) le coefficient de distribution  $\lambda$ .

Le volume nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre (i) entre l'ion métallique présent et la résine et le coefficient de distribution (iii) ont été déterminés parallèlement. Plusieurs solutions ( $n \geq 3$ ) avec des concentrations d' $\text{Ag}^+$  connues (5, 10, 50 et 100 nM) à un pH de 7 ont été passées dans la colonne pour évaluer  $\lambda$ ; pendant cette période des échantillons de 5 mL étaient pris à la sortie du montage à chaque intervalle de 20 mL de solution passée jusqu'à concurrence de 320 mL. Pour ces conditions expérimentales, il fallait 240 mL de solution pour atteindre l'état d'équilibre. Finalement, des résultats préliminaires indiquaient que le lessivage (ii) habituel avec  $\text{HNO}_3$  n'enlevait pas complètement tout l'Ag lié à la résine, ce qui aurait conduit à une sous-estimation de la concentration d' $\text{Ag}^+$ . La solution d'éluant d'acide nitrique (1,5 M) fut donc remplacée par une solution de thiosulfate (200  $\mu\text{M}$ ;  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , EM Science). Cet anion a une grande affinité pour l'argent, ce qui facilitait l'éluant. Des courbes d'éluant ont été établies pour déterminer le volume de la solution de thiosulfate nécessaire pour lixivier tout le métal lié à la résine. Un échantillon d'environ 2,5 mL était prélevé à la sortie du montage à chaque 5 min pendant une période de 50 min. Le volume d'éluant était déterminé de façon précise en pesant les ampoules à

scintillation, à l'aide d'une balance analytique (METTLER PM 240), avec et sans la solution éluante, avant de les envoyer au compteur.

### **2.5.5 Validation de la technique avec un ligand inorganique : le chlorure**

Pour plusieurs réactions de complexation de l'argent (p.e.,  $\text{Ag}^+ + \text{L}^- \leftrightarrow \text{AgL}$ ), on connaît les constantes de formation pour le complexe. C'est le cas du chlorure, un ligand naturel inorganique dont les réactions de complexation ont été étudiées et pour lequel les constantes de formation peuvent être considérées comme fiables. Pour évaluer la fiabilité de la TEI pour l'argent, les concentrations théoriques d' $\text{Ag}^+$  libre à l'équilibre étaient comparées avec celles mesurées en laboratoire. Le logiciel de spéciation chimique MINEQL+ (v.4.5, Environmental Research Software, Halowell, ME, EUA) a été utilisé pour calculer la spéciation de l'Ag dans les milieux expérimentaux. De plus, la validation avec le chlorure permettait de s'assurer que la résine ne forme pas de complexe ternaire, même en présence de chloro-complexes dissous. Nous avons testé diverses concentrations de chlorure ajouté au milieu sous forme de sel NaCl ultra-pur (EM Science). La concentration d'Ag totale était de 10 nM pour chaque expérience alors que les concentrations de  $\text{Cl}^-$  utilisées étaient 0,005 mM, 0,001 M, 0,002 M et 0,003 M. Parallèlement à l'augmentation d'ions chlorure dans le milieu, la concentration d'ions libre  $\text{Ag}^+$  diminuait et celle du chloro-complexe  $\text{AgCl}^0$  augmentait. La force ionique de la solution était gardée constante en diminuant la concentration de l'ion  $\text{NO}_3^-$  au fur et à mesure que celle de  $\text{Cl}^-$  augmentait.

## **2.6 Titrage de la MOD naturelle**

Contrairement au cas des chlorures, pour les réactions de l'argent avec la matière organique dissoute naturelle on ne dispose pas des constantes de formation thermodynamiques. Il était donc impossible de prédire d'avance la spéciation de l'Ag en présence de matière organique en solution. Par conséquent, il fallait utiliser notre technique d'échange ionique (voir section 2.5) pour déterminer la concentration d'Ag libre en présence de la MOD. Le titrage en lot des acides humiques de la rivière Suwannee (IHSS) avec l'Ag a été effectué à une concentration de  $5 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$ . Trois répétitions ont été effectuées pour chaque concentration d'Ag total, 50, 60, 85, 100, 150, 200 et 300 nM. Les solutions étaient laissées à équilibrer pendant 24 h dans l'obscurité avec une agitation permanente de 30 rpm à la température de la pièce (20 °C) avant leur passage dans la colonne. Le pH était ajusté à 7 et vérifié avant l'expérience.

La solution mère d'AH de la rivière Suwannee avait été préparée dans une solution de NaOH (0,01 M), et agitée (30 rpm) pendant une période de 24 h à l'abri de la lumière, pour faciliter la dissolution des acides humiques. La solution était ensuite filtrée sur des membranes filtrantes de  $0,4 \mu\text{m}$  en PC (Poretics) pour enlever toute particule présente, et conservée à l'abri de la lumière, à une température de 4 °C, pour une période maximale de cinq jours.

## **2.7 Expériences de prise en charge**

### **2.7.1 Préparation des milieux d'exposition**

Toutes les solutions étaient préparées 24 h avant l'expérience et laissées à équilibrer. Les solutions d'acides humiques étaient conservées à l'abri de la lumière pour éviter la photo-oxydation de la matière organique. Le pH était ajusté à 7 et vérifié avant l'expérience. Un grand volume était préparé pour chaque solution d'exposition (solution C, tableau 2.2), 1350 mL et 1850 mL, pour la solution témoin (sans MOD) et la solution d'acide humique, respectivement. Suite au temps d'attente, un volume de 150 mL était mis dans des bouteilles en TFE pour les expositions sans MOD (témoins) et dans des bouteilles en plastique HDPE pour les expositions avec la matière organique. Le matériel HDPE était privilégié pour minimiser les interactions hydrophobes entre la paroi des bouteilles en TFE et la MOD en solution. De plus, un échantillon de 500 mL de la solution témoin était mis de côté pour servir de référence lors du dosage de l'argent avec la technique d'échange ionique.

Les algues ont été exposées à trois différentes concentrations d'Ag<sup>+</sup> libre, soit 10, 30 et 50 nM, et ce, en présence ou en absence d'acide humique de la rivière Suwannee. La concentration de matière organique dissoute était de 5 mg C•L<sup>-1</sup>. Des solutions additionnelles étaient nécessaires pour les expériences de prise en charge (tableau 2.2). Une solution simplifiée du milieu de culture algale sans argent (solution B, tableau 2.2) était utilisée pour le rinçage initial et la re-suspension des algues; une même solution

mais avec un excès d'argent froid (Ag stable; 100 nM) était nécessaire pour le rinçage final (solution D, tableau 2.2), après récolte des algues exposées (fig. 2.4). Une solution de 250 mL avec la même concentration d'acide humique (solution E, tableau 2.2) que les milieux d'exposition mais sans Ag était aussi préparée dans un Erlenmeyer pour pré-exposer les algues à la matière organique dissoute.

### **2.7.2 Méthodologie de la prise en charge**

Le design expérimental utilisé est basé sur les prédictions du MIL (section 1.3.2, figs. 1.3 et 1.4). On a premièrement évalué la prise en charge dans le temps pour une même concentration fixe d'Ag<sup>+</sup>, en absence ou en présence d'AH. La deuxième approche consiste à exposer un même lot d'algues, pour une période de temps fixe, à différentes concentrations d'Ag<sup>+</sup> avec et sans MOD.

Un Erlenmeyer contenant un milieu de culture frais et stérile (100 mL) était inoculé avec ~ 3 mL d'une culture algale en phase exponentielle. Les algues étaient laissées à croître pendant 48 h (phase exponentielle) et récoltées ( $P \leq 10$  cm Hg) sur un filtre en polycarbonate d'une porosité de 2  $\mu$ m (Poretics). Elles étaient re-suspendues pendant 90 min dans une solution simplifiée sans ou avec des acides humiques (tableau 2.2, solution E : 5 mg C•L<sup>-1</sup>). Cette pré-exposition devait permettre d'acclimater les cellules aux milieux d'exposition, autant celui contenant de la matière organique que celui des témoins qui n'en contenait pas. Les algues étaient à nouveau récoltées par

filtration et rincées cinq fois avec 10 mL d'une solution simplifiée, ne contenant ni phosphates, ni métaux (solution B, voir aussi figure 2.4).

**Tableau 2.2 : Concentrations molaires (sauf indication contraire) des cations et anions composant le milieu de culture MHSM et les solutions utilisées lors des expériences de prise en charge.**

Composants	A MHSM Culture	B MHSM Rinçage	C MHSM Exposition	D MHSM R. final	E SRHA Pré-expo
NH <sub>4</sub>	9,37 x 10 <sup>-4</sup>	9,37 x 10 <sup>-4</sup>	9,37 x 10 <sup>-4</sup>	9,37 x 10 <sup>-4</sup>	9,37 x 10 <sup>-4</sup>
Cl	5,98 x 10 <sup>-6</sup>		5,98 x 10 <sup>-6</sup>		5,98 x 10 <sup>-6</sup>
K	4,22 x 10 <sup>-3</sup>	4,22 x 10 <sup>-3</sup>	4,22 x 10 <sup>-3</sup>	4,22 x 10 <sup>-3</sup>	4,22 x 10 <sup>-3</sup>
PO <sub>4</sub>	1,37 x 10 <sup>-4</sup>				
CO <sub>3</sub>	atm.	atm.	atm.	atm.	atm.
NO <sub>3</sub>	5,07 x 10 <sup>-3</sup>	5,07 x 10 <sup>-3</sup>	5,07 x 10 <sup>-3</sup>	5,07 x 10 <sup>-3</sup>	5,07 x 10 <sup>-3</sup>
SO <sub>4</sub>	8,12 x 10 <sup>-5</sup>	8,12 x 10 <sup>-5</sup>	8,12 x 10 <sup>-5</sup>	8,12 x 10 <sup>-5</sup>	8,12 x 10 <sup>-5</sup>
Mg	8,12 x 10 <sup>-5</sup>	8,12 x 10 <sup>-5</sup>	8,12 x 10 <sup>-5</sup>	8,12 x 10 <sup>-5</sup>	8,12 x 10 <sup>-5</sup>
Ca	6,80 x 10 <sup>-5</sup>	6,80 x 10 <sup>-5</sup>	6,80 x 10 <sup>-5</sup>	6,80 x 10 <sup>-5</sup>	6,80 x 10 <sup>-5</sup>
Na	1,02 x 10 <sup>-4</sup>	1,02 x 10 <sup>-4</sup>	1,02 x 10 <sup>-4</sup>	1,02 x 10 <sup>-4</sup>	1,02 x 10 <sup>-4</sup>
BO <sub>3</sub>	3,01 x 10 <sup>-6</sup>				
Mn	2,10 x 10 <sup>-6</sup>				
EDTA	8,06 x 10 <sup>-6</sup>				
Fe	5,92 x 10 <sup>-7</sup>				
MoO <sub>4</sub>	3,00 x 10 <sup>-8</sup>				
Zn	2,43 x 10 <sup>-8</sup>				
Co	1,09 x 10 <sup>-8</sup>				
Cu	7,04 x 10 <sup>-11</sup>				
Ag stable			variable	100 x 10 <sup>-9</sup>	
<sup>110m</sup> Ag			variable		
AH (mg·L <sup>-1</sup> )			10*		10

\* Concentration lorsque présent dans les milieux d'exposition.

Cette étape permettait d'enlever les autres métaux en solution et les ligands présents dans le milieu de croissance, qui étaient susceptibles de modifier la spéciation de l'argent dans le milieu d'exposition.

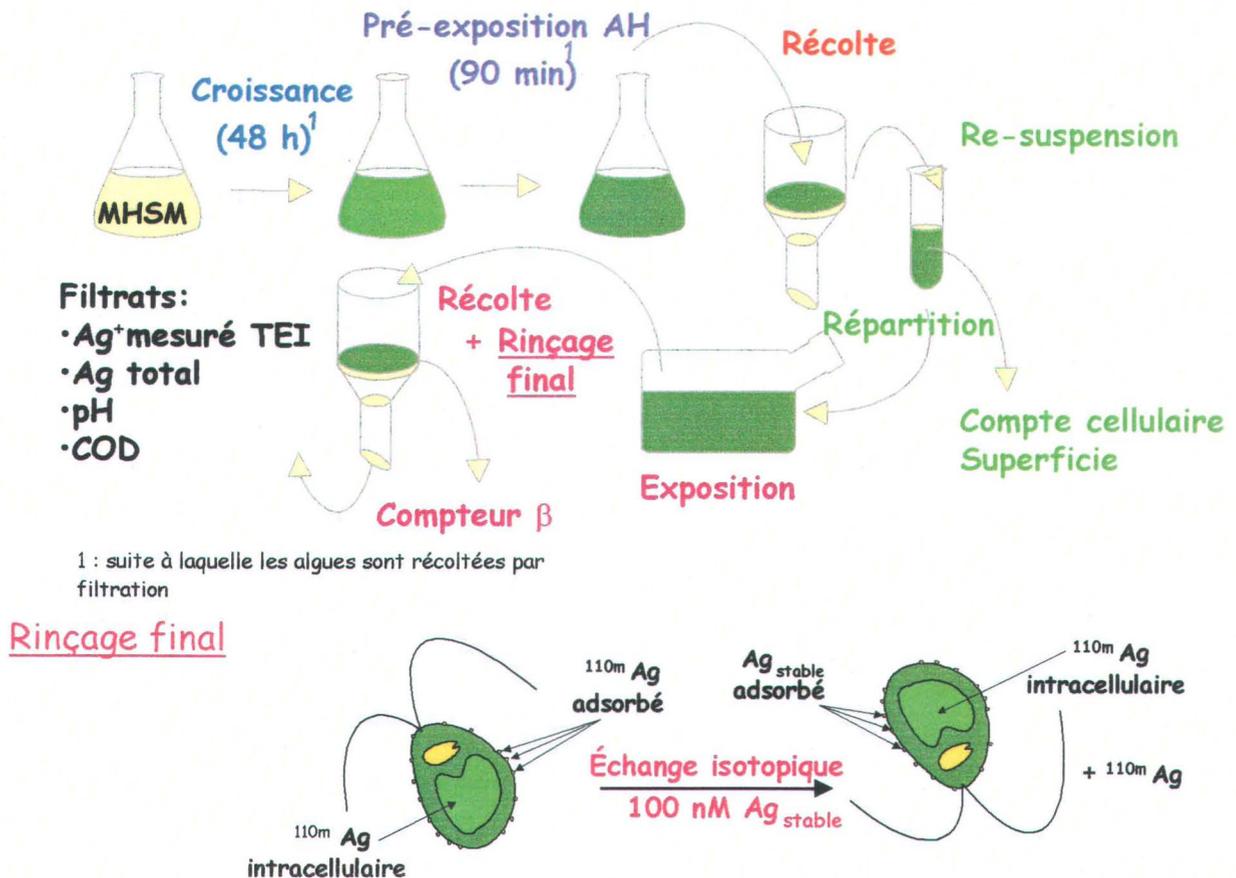


Figure 2.4. Schéma de la méthodologie employée pour mesurer la prise en charge de l'argent par des algues unicellulaires.

Les algues étaient ensuite re-suspendues dans 10 mL de cette même solution simplifiée. Le nombre d'algues et leur superficie moyenne étaient rapidement déterminés à l'aide du compteur de particules (section 2.3). Une fois cette étape terminée, les algues étaient distribuées dans les bouteilles d'exposition et diluées avec le milieu C (voir tableau 2.2) jusqu'à une densité algale de 10 000 cell•mL<sup>-1</sup> (*C. reinhardtii*) et de 20 000 cell•mL<sup>-1</sup> (*P.*

*subcapitata*). Ces densités algales ont été dictées par deux facteurs: il fallait avoir suffisamment d'algues pour que l'accumulation d'Ag radioactif soit détectable au compteur  $\beta$ , sans toutefois entraîner une réduction de l'Ag dissous dans le milieu d'exposition par une trop forte prise en charge de ce métal (Fortin, 2000). Les milieux témoins et d'exposition étaient inoculés avec le même lot d'algues pour minimiser les variations intergénérationnelles. Des temps d'exposition de courte durée (9, 25, 40 min) étaient privilégiés pour minimiser la croissance algale durant l'expérience, et pour éviter des perturbations de la spéciation chimique de l'Ag par la production de produits extracellulaires. Les expositions étaient réalisées à la température ambiante du laboratoire (22 °C), sous un faible régime lumineux de  $\sim 7 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , et avec une agitation constante 80 rpm. Pour chaque expérience, il y avait un minimum de 3 réplicats. Chaque expérience était répétée deux fois. Le pH était de  $7,0 \pm 0,1$ .

Une fois le temps d'exposition écoulé, les algues étaient récoltées sur deux filtres de polycarbonate de 2  $\mu\text{m}$  superposés. Le deuxième filtre servait à évaluer le bruit de fond causé par l'adsorption de l'argent sur la membrane filtrante. La différence entre les deux filtres représentait donc la portion du métal prise en charge par les algues. Une fois la récolte terminée, les algues étaient rincées quatre fois avec 10 mL de solution simplifiée contenant un excès d'argent froid (tableau 2.2, solution D) pendant une période de 6 min. Cette étape critique permettait de désorber l'argent chaud ( $^{110\text{m}}\text{Ag}$ ) faiblement lié à la surface des algues par échange isotopique avec de l'argent froid (Ag stable; dilution 1:10 d'un étalon de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  dans une matrice de 5 %  $\text{HNO}_3$ ,

*Fisher*) (Fortin, 2000). Finalement, les filtres étaient individuellement envoyés au compteur  $\beta$ .

Tous les filtrats (100 mL) étaient récupérés pour les solutions d'exposition contenant de l'acide humique tandis que seulement un filtrat par période de temps l'était pour les solutions témoins. Les filtrats étaient dosés avec la technique d'échange ionique pour déterminer la concentration d'Ag libre. Un échantillon (3,5 mL) était prélevé de chaque filtrat récupéré pour mesurer l'argent total afin d'évaluer la perte d'Ag par adsorption sur l'unité de filtration. De plus, la densité cellulaire et le pH étaient vérifiés dans chaque bouteille d'exposition. Pour chaque expérience, la concentration en carbone organique dissous était mesurée (Shimadzu TOC – 5000A, Kyoto, Japon) dans la solution d'exposition maîtresse avant de la répartir entre les bouteilles d'exposition. A cela s'ajoutaient des mesures de COD pour un des trois filtrats récupérés pour chaque temps d'exposition.



### 3 Résultats

---

#### 3.1 État stationnaire et élution

Pour une concentration en Ag de 6 nM, le volume nécessaire pour atteindre un état stationnaire avec la résine est d'environ 200 mL (fig 3.1). Nous avons toutefois, par précaution, utilisé un volume de 240 mL pour une solution de  $\text{NaNO}_3$  avec une force ionique de 0,01 M et pour un débit de  $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

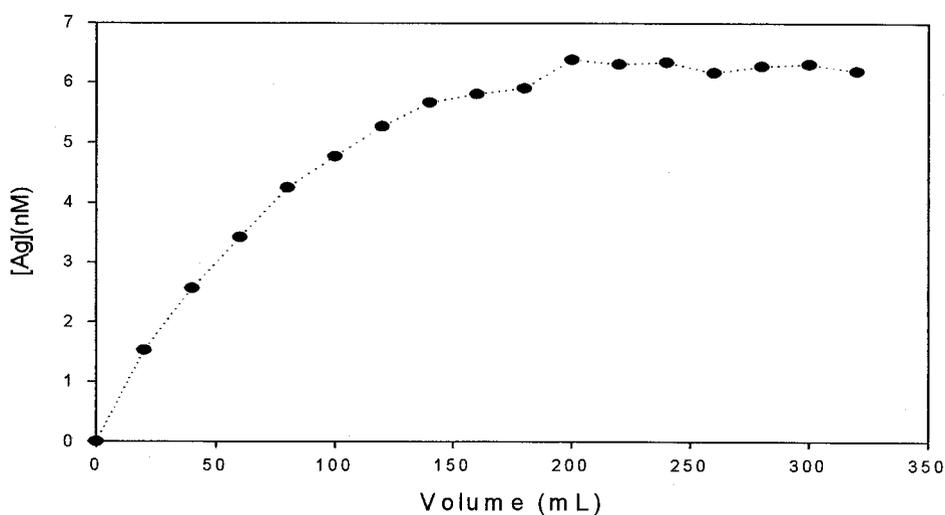
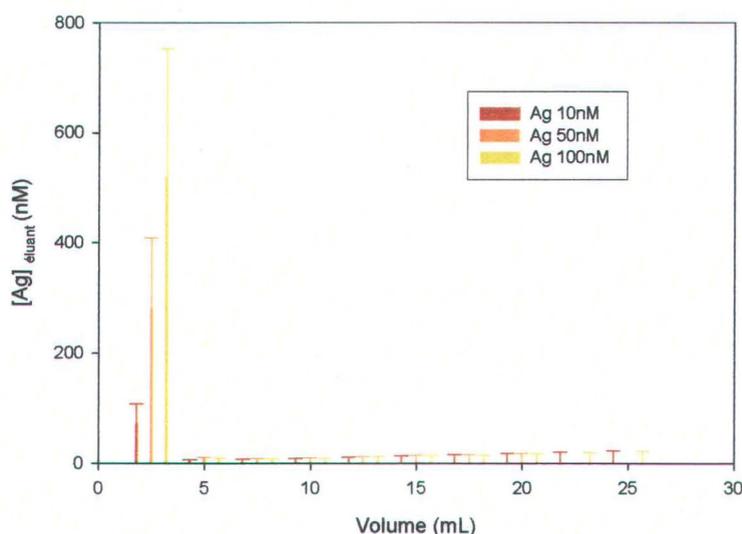


Figure 3.1 Profil d'atteinte d'un état stationnaire entre l'Ag et la résine.

Les courbes d'élution (fig. 3.2) indiquent qu'un volume de 10 mL d'une solution de thiosulfate ( $200 \mu\text{M}$ ) est suffisant pour lixivier la colonne avec un débit de  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , et ce pour n'importe quelle concentration d'argent. Le thiosulfate a remplacé l'acide nitrique communément utilisé comme éluant; le thiosulfate a une forte affinité

pour le métal argent ( $\log K_{\text{AgS}_2\text{O}_3} = 8.82$ ) et par conséquent il enlève efficacement l'argent lié à la résine.



**Figure 3.2** Profils d'élution de l'Ag avec une solution de thiosulfate de  $200 \mu\text{M}$  en fonction du volume et de la concentration initiale d'argent dans la solution aqueuse ( $n = 3$ ) pour un débit de  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### 3.2 Coefficient de distribution

Les coefficients de distribution ont été déterminés à un pH de 7. Les résultats initiaux ont démontré que le coefficient diminuait avec l'augmentation de la concentration d'Ag (tableau 3.1). Pour contrer cette variabilité, nous avons passé à chaque dosage, un étalon ( $[\text{Ag}^+] = 10 \text{ nM}$ ) sans aucun ligand avec une concentration d'argent connue avant et après l'échantillon à mesurer. Ceci nous a permis d'obtenir un coefficient pour chaque dosage, en plus de s'assurer que les billes de résines n'étaient pas altérées par le passage des solutions.

**Tableau 3.1 Coefficients de distribution ( $\lambda$ ) pour l'interaction Ag-résine.**

[Ag <sup>+</sup> ] (nM)	Coefficient de distribution $\lambda$ (L • g <sup>-1</sup> ) moy (min – max*)
5	3,55 (3,02 – 4,07)
10	<b>3,54 (3,33 – 3,74)</b>
50 & 100	<b>2,31 (2,13 – 2,48)</b>

\*IC 95 %

### **3.3 Test de fiabilité: le chlorure**

Cette expérience avait pour objectif de vérifier la sélectivité de la résine pour l'ion libre Ag<sup>+</sup> en présence de chloro-complexes, AgCl<sup>0</sup> (aq) et AgCl<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Les résultats obtenus montrent une diminution de la concentration en Ag<sup>+</sup> au fur et à mesure que la concentration en chlorures augmente. Les valeurs mesurées demeurent cependant supérieures aux concentrations en Ag<sup>+</sup> théoriques calculées à l'aide du logiciel MINEQL+ (tableau 3.2). Par contre, on remarque que la résine suit la tendance, qu'elle sélectionne moins d'Ag<sup>+</sup> au fur et à mesure que la proportion de chloro-complexes augmente.

**Tableau 3.2** Pourcentage d'Ag<sup>+</sup> mesuré avec la TEI (n=4) et modélisé par MINEQL+ en fonction de la concentration de chlorure.

[Cl <sup>-</sup> ]	[Ag] <sub>mesuré</sub>	TEI (%)	MINEQL+ (%)	AgCl <sup>0</sup>	AgCl <sub>2</sub>
		Ag <sup>+</sup>	Ag <sup>+</sup>		
0,005 mM	12 nM	100 ± 7.5 <sup>6</sup>	99	0	0
0,001 M	08 nM	84 ± 7	36	59	5
0,002 M	12 nM	50 ± 4	21	67	12
0,003 M	12 nM	39 ± 1	14	18	68

<sup>6</sup> Valeur moyenne ± écart-type

### **3.4 Titration de la MOD \***

Une fois la méthode testée avec les chlorures, le titrage de la MOD a été effectué avec l'argent pour déterminer les concentrations d'argent libre en présence de 10 mg•L<sup>-1</sup> d'acide humique de la rivière Suwannee à pH 7 ([Cl<sup>-</sup>] = 0.005 mM). La figure 3.3 illustre les résultats de ces titrages (n = 4). L'absence de constante de complexation pour la réaction entre l'acide humique et l'Ag empêche de comparer les résultats expérimentaux avec ceux d'un modèle de spéciation chimique tel que WHAM (Tipping, 1998). Néanmoins, la courbe de titrage est caractéristique de celle d'un ligand avec deux types de site de complexation. L'acide humique de la rivière Suwannee complexe à peu près tout l'argent présent en solution jusqu'à ce que la concentration totale en Ag atteigne 50 nM.

---

\* Cette partie est approfondie dans l'article Porcher et Campbell (section 2).

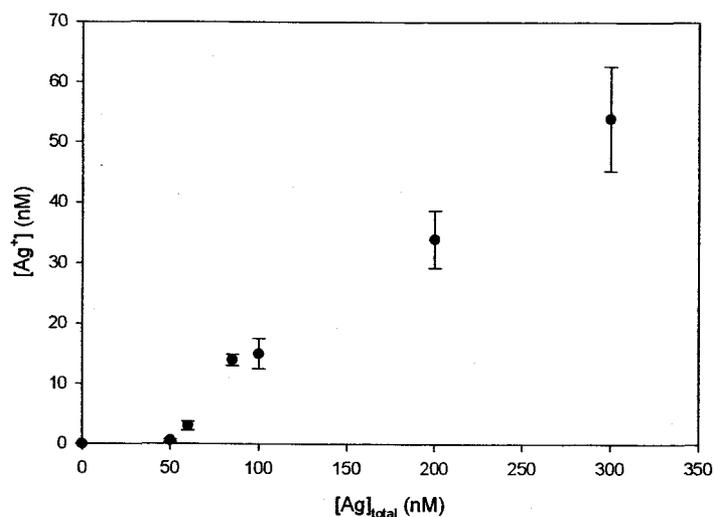


Figure 3.3 Courbe de titrage d'une solution d'acide humique de la rivière Suwannee ( $5 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ ) en fonction de la concentration d'Ag totale à pH 7 ( $n = 4$ ).

### 3.5 Effet de la MOD sur la résine

Pour évaluer si la MOD s'adsorbait sur la résine, les concentrations de carbone à l'entrée et à la sortie sur plusieurs pas de temps (0, 9, 25 et 40 min) étaient mesurées (tableau 3.3). De plus, une solution étalon de 10 nM d'Ag était passée avant et après la solution à titrer, pour laquelle le coefficient de distribution était déterminé à chaque passage. A ce moment, deux lots de résine de poids similaires (résine A : 7,238 mg et E : 7,385 mg) étaient utilisés en parallèle dans le montage de TEI. Les résultats montrent que les coefficients ne sont pas affectés par le passage d'une solution contenant du SRHA (tableau 3.4). La sélectivité de la résine pour l'Ag n'est pas affectée par la MOD.

**Tableau 3.3 Concentrations en carbone organique dissous (COD ; mg C·L<sup>-1</sup>) dans les solutions d'exposition avec de la MOD avant et après leur passage sur la résine à différents pas de temps (9, 25, 40 min).**

Dat e	21/1 0	27/1 0	28/1 0	14/0 1	17/0 1	19/0 1	27/0 1	29/0 1	01/0 2	05/0 2	09/0 2	11/0 2
t=0	6,32	5,29	6,67	n.d. <sup>7</sup>	5,8	5,4	6	5,5	5,7	5,6	6,1	5,9
t=9	6,19	5,69	6,2	6	5,7	5,6	5,4	5,8	5,7	5,8	5,8	6,1
t=25	6,25	6,62	6,45	5,6	5,9	5,4	5,9	5,6	5,6	6,3	5,7	5,7
t=40	6,26	5,92	6,33	5,1	5,7	5,4	6	5,6	5,5	7	5,9	5,9

**Tableau 3.4 Coefficients de distribution  $\lambda$  (L·g<sup>-1</sup>) pour une solution étalon d'Ag de 10 nM avant et après le passage d'une solution contenant de l'AH.**

date	[Ag <sup>+</sup> ] (nM)	Résine A		Résine E	
		avant	après	avant	Après
29 / 06	11 nM	1,74	1,99	1,28	1,52
30 / 06	11 nM	2,46	2,52	2,03	2,29
02 / 07	11 nM	n.d. <sup>7</sup>	2,10	n.d. <sup>7</sup>	1,59
04 / 07	11 nM	2,63	2,54	1,86	1,81
11 / 07	10 nM	1,97	2,04	1,57	1,49
	Moyenne	2,20	2,27	1,69	1,78

<sup>7</sup> Non-disponible

### **3.6 Prise en charge de l'argent: effet de la MOD\***

Deux designs expérimentaux ont été utilisés pour déterminer l'influence de la MOD sur la prise en charge de l'argent. Le premier regardait la cinétique d'accumulation pour une concentration d'Ag libre fixe tandis que le deuxième consistait à exposer les algues à différentes concentrations d'Ag<sup>+</sup> pour une période de temps fixe. L'accumulation intracellulaire d'argent a été étudiée pour trois concentrations nominales d'Ag<sup>+</sup> (10, 30, 50 nM) sur deux espèces d'algues vertes unicellulaires (*C. reinhardtii* et *P. subcapitata*). Les conditions expérimentales sont regroupées dans le tableau 3.5. Les concentrations d'Ag<sup>+</sup> mesurées avec la TEI dans le milieu d'exposition avec l'AH sont utilisées pour la présentation des résultats. Pour la mesure de la prise en charge, l'écart type est sur la moyenne de trois mesures. Les figures 3.5 et 3.6 illustrent les résultats des cinétiques de prise en charge tandis que 3.7 A et B sont les expériences réalisées à temps fixe, pour *C. reinhardtii* et *P. subcapitata*, respectivement.

Lorsqu'on compare les concentrations totales d'Ag dissous visées et mesurées, on remarque une bonne reproductibilité, la variation n'est que de 10 à 15 % selon le cas. Cependant, il y a une grande différence entre les concentrations d'Ag<sup>+</sup> anticipées (fig. 3.3) et mesurées avec la TEI (tableau 3.5) plus la concentration totale en Ag augmente (fig. 3.4). En effet, la comparaison des intervalles de confiance à 95 % sur la pente entre les résultats de titrage en lot et ceux des milieux d'exposition ont montré une

---

\* Cette partie est approfondie dans l'article Porcher et Campbell (section 2).

différence significative avec des valeurs de 0,218 (0,195 - 0,240) et de 0,480 (0,389 - 0,570), respectivement. Cependant, les valeurs obtenues sur l'axe des x lorsque  $y = 0$  ne sont pas significativement différentes. Ces dernières sont de 35,4 (21 - 48) et de 77,4 (42 - 104) pour les résultats des expériences de titrage en lot et les concentrations présentes dans les milieux d'exposition, respectivement. Par conséquent, il s'est avéré difficile de reproduire la même concentration d'Ag<sup>+</sup> en absence et présence d'AH. L'approche expérimentale qui devait étudier une seule concentration d'Ag<sup>+</sup> à la fois n'est pas applicable. De plus, il devient difficile de reproduire des conditions expérimentales identiques pour chaque espèce d'algues. Il est donc préférable d'étudier la prise en charge de l'Ag pour une période de temps fixe (25 min) mais exposer les algues à différentes concentrations d'Ag<sup>+</sup> simultanément.

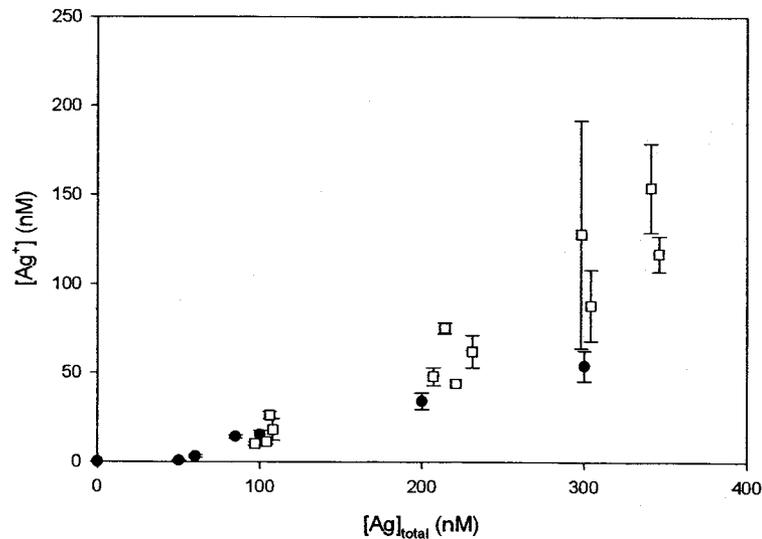
**Tableau 3.5 Concentrations d'Ag (nM) visées et mesurées dans les milieux d'exposition pour les expériences de prise en charge dans le temps à concentration d'Ag fixe (n= 3).**

$[\text{Ag}]_{\text{d totale}} \text{ visée}$	$[\text{Ag}]_{\text{d totale}} \text{ mesurée}$	$[\text{Ag}^+] \text{ anticipée}^8$	$[\text{Ag}^+] \text{ mesurée}^9$
100	97	15	$10 \pm 1$
	108	15	$18 \pm 6$
	104	15	$11 \pm 1$
	106	15	$26 \pm 2$
200	207	35	$48 \pm 5$
	221	40	$44^{10}$
	214	35	$75 \pm 3$
	231	40	$62 \pm 9$
300	304	55	$88 \pm 20$
	341	65	$154 \pm 25$
	298	55	$128 \pm 64$
	346	65	$117 \pm 10$

<sup>8</sup>  $[\text{Ag}^+]$  anticipée en fonction de la courbe de titrage moyenne (fig. 3.3)

<sup>9</sup> Valeur moyenne (n=3)  $\pm$  écart-type

<sup>10</sup> n=2



**Figure 3.4** Concentrations d'Ag<sup>+</sup> mesurées (nM) lors du titrage du SRHA d'après la fig. 3.3 (●) et dans les milieux d'exposition pour les expériences de prise en charge (□) (n = 3).

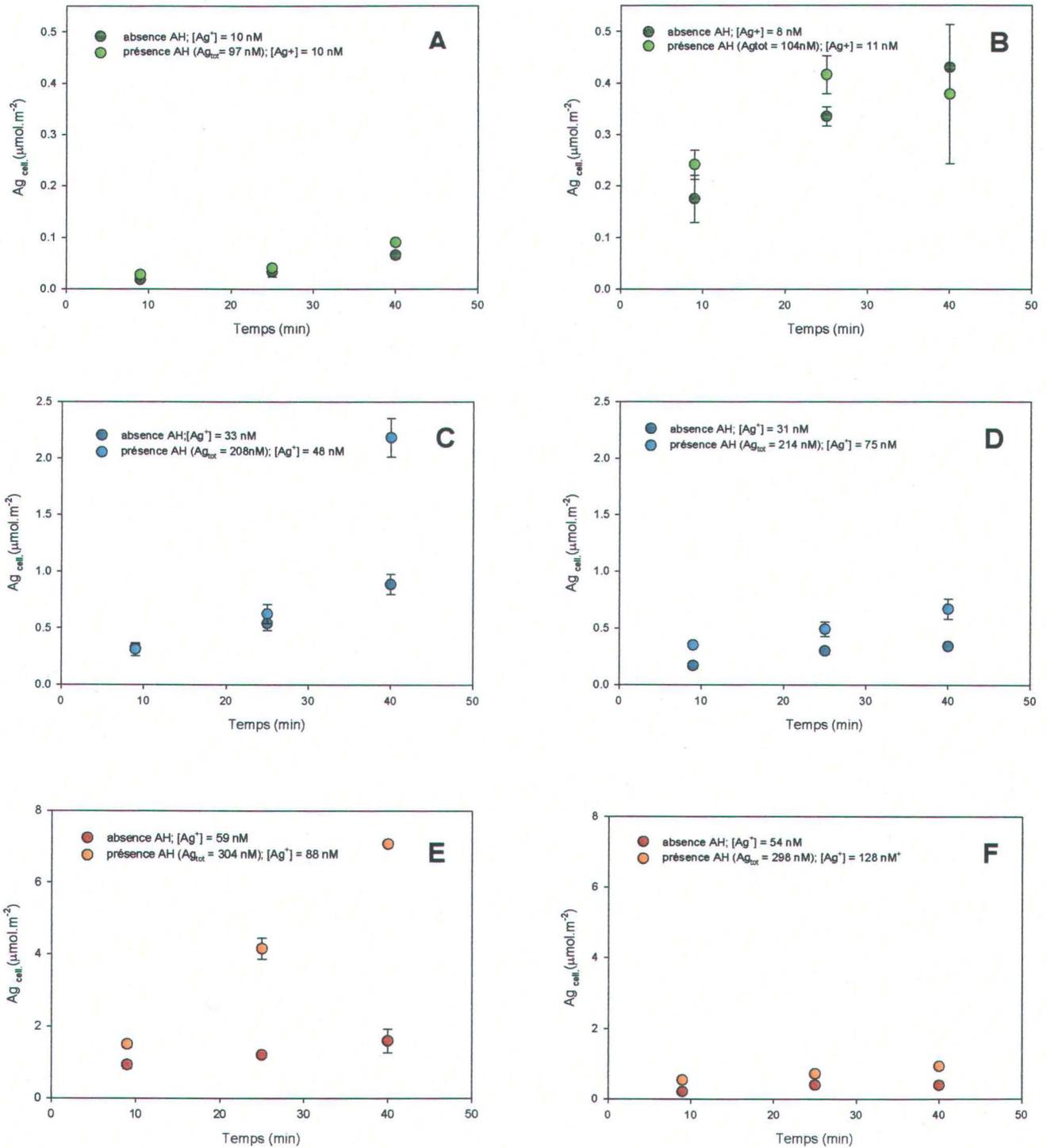
### **3.6.1 Chlamydomonas reinhardtii (temps variable)**

Lorsqu'on examine les courbes de prise en charge pour une concentration d'Ag<sup>+</sup> donnée sans AH, on remarque que les valeurs absolues varient d'un essai à l'autre (A-B, C-D et E-F). Par contre, dans tous les cas (sauf fig. 3.5 : A), on voit une courbe typique de prise en charge, c'est-à-dire qu'elle a une tendance à plafonner en fonction du temps. Il y a aussi une prise en charge plus élevée dans les milieux d'exposition qui contiennent de la MOD. L'écart en concentration cellulaire d'Ag avec et sans AH est plus important à des [Ag] plus élevées ainsi qu'aux temps plus long de 40 min (fig. 3.5 : série de gauche). Cependant, pour les bioessais C-D et E-F la concordance entre [Ag<sup>+</sup>] dans les témoins et [Ag<sup>+</sup>] dans les solutions avec SRHA n'était pas réussie de sorte que

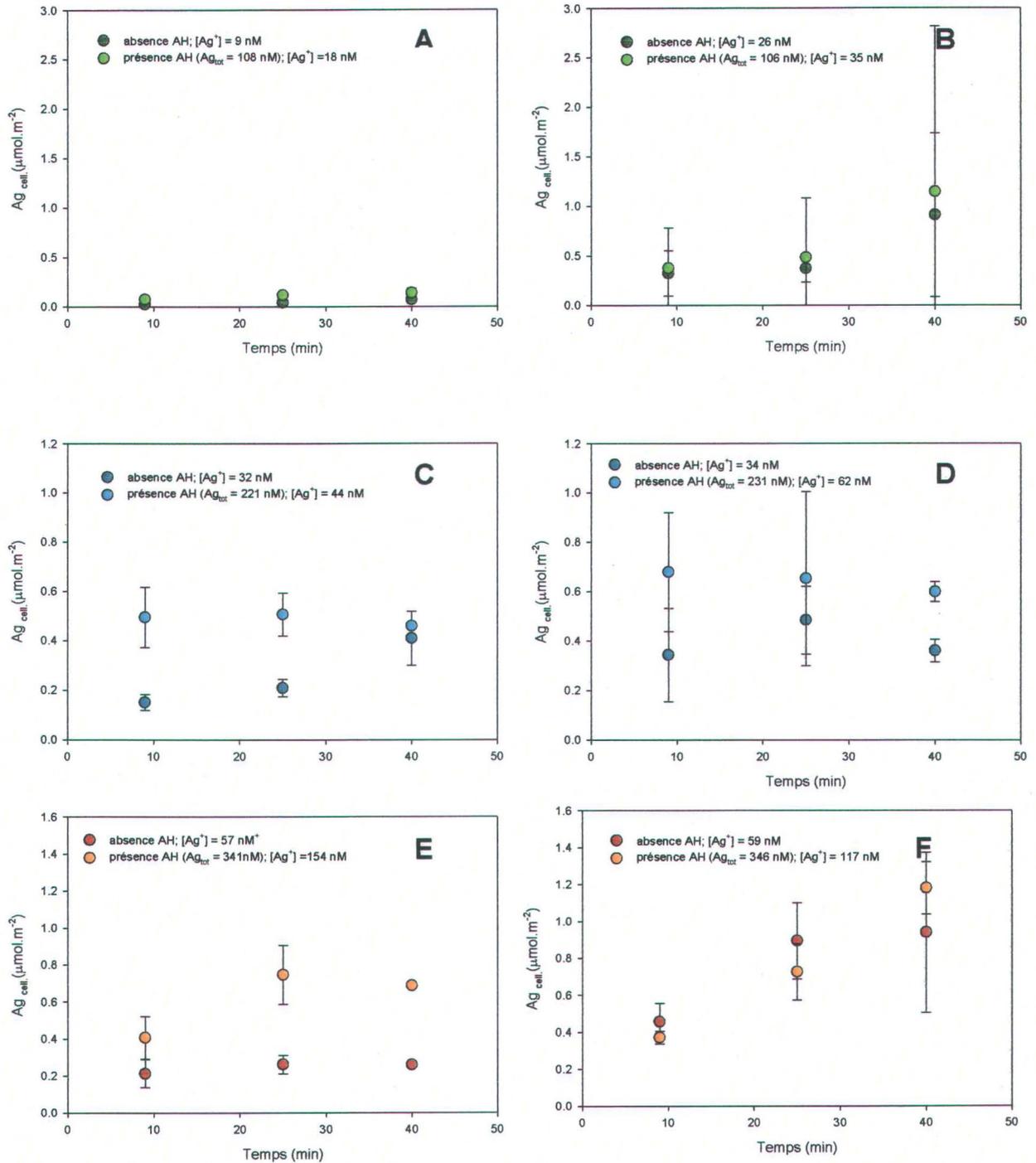
l'on ne peut vraiment conclure à une augmentation réelle de la biodisponibilité de l'Ag en présence de la MOD.

### **3.6.2 Pseudokirchneriella subcapitata (temps variable)**

Comme on a pu le constater chez *C. reinhardtii*, les courbes de prise en charge en absence de SRHA pour une concentration d'Ag<sup>+</sup> donnée tendent à plafonner dans le temps (sauf fig. 3.6 : D). Les valeurs absolues de concentration cellulaire d'Ag sont similaires pour tous les bioessais sauf le B. On remarque aussi que la prise en charge augmente avec la présence de MOD sauf pour les temps 9 et 25 min du bioessai F. On constate aussi que l'écart en concentration d'Ag cellulaire entre les milieux avec et sans MOD reste similaire sauf au temps 40 min des bioessais C et E. Une fois de plus, la concordance entre la [Ag<sup>+</sup>] chez les témoins et les milieux avec AH dans tous les cas n'est pas réussie (tableau 3.5). Il est donc difficile de conclure à une augmentation de la disponibilité de l'Ag en présence d'AH de la rivière Suwannee.



**Figure 3.5** Cinétique de prise en charge de l'Ag par *C. reinhardtii* en absence et en présence de SRHA ( $5 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ ) en fonction du temps ( $n=3$ ).



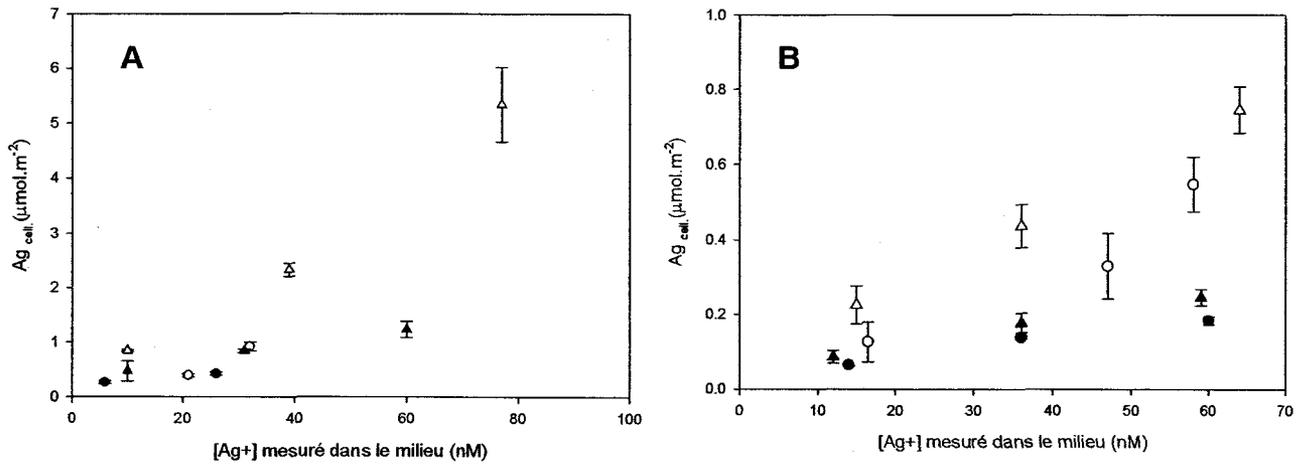
**Figure 3.6** Cinétique de prise en charge de l'Ag par *P. subcapitata* en absence et en présence de SRHA ( $5 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ ) en fonction du temps ( $n=3$ ).

### 3.6.3 Temps fixe\*

Tel qu'anticipé, chez les deux espèces d'algues, l'accumulation d'Ag est d'autant plus élevée que la concentration en Ag<sup>+</sup> augmente dans le milieu d'exposition. Cependant, en comparant les deux courbes de réponse on constate que la prise en charge est plus importante en présence d'acide humique de la rivière Suwannee (fig. 3.7 A et B). Cette observation est appuyée par une comparaison statistique des pentes entre les milieux avec et sans MOD pour chaque espèce étudiée. Les intervalles de confiance à 95 % sur la pente ne se chevauchent pas. Les valeurs obtenues pour *C. reinhardtii* sont de 0,018 (0,010 - 0,025) en absence de SRHA et de 0,069 (0,059 - 0,08) en présence de SRHA. Pour *P. subcapitata*, les valeurs sont de 0,003 (0,002 - 0,004) et de 0,01 (0,007 - 0,013) en absence et en présence de MOD, respectivement. De plus, la différence en concentration cellulaire d'argent entre la présence et l'absence de SRHA s'accroît avec une concentration d'Ag<sup>+</sup> plus élevée dans le milieu. Il faut aussi souligner que la concentration cellulaire en Ag est plus élevée chez *C. reinhardtii* que chez *P. subcapitata*.

---

\* Cette partie est approfondie dans l'article Porcher et Campbell (section 2)



**Figure 3.7** Prise en charge de l'Ag à temps fixe (25 min) par *C. reinhardtii* (A) et *P. subcapitata* (B). Les symboles noirs indiquent l'absence et les blancs la présence de SRHA (5 mg C · L<sup>-1</sup>). Dans les milieux sans SRHA la concentration en Ag total est identique à la concentration en Ag<sup>+</sup>. Chaque symbole représente une expérience.

## 4 Discussion

---

### 4.1 Paramètres de la TEI

Le coefficient de distribution  $\lambda$  diminue au fur et à mesure que la  $[Ag^+]$  augmente dans la solution (tableau 3.1). La résine n'est pas nécessairement un produit homogène. Il peut possiblement y avoir des sites à plus forte affinité pour l' $Ag^+$  qui se remplissent au début du passage de la solution dans la colonne. Par conséquent, dans un cas où la  $[Ag^+]$  est faible ce seront surtout les sites à forte affinité qui capteront l' $Ag$  présent et le coefficient sera plus élevé tandis que dans le cas contraire, où la concentration d' $Ag$  est élevée, les sites à faible affinité seront mis à contribution, et le coefficient global sera plus petit. Par ailleurs, si le coefficient diminuait de jour en jour au sein d'une même colonne, on pourrait parler d'un vieillissement de la résine. Cependant, ceci ne semble pas être le cas ici (tableau 3.4).

L'absence d'études similaires pour l'argent dans la littérature limite les possibilités de comparaison et de contre vérification. Cependant, les résultats obtenus par Fortin (1996) et Fortin et Caron (2000) pour le Cd, un proche voisin de l'argent dans le tableau périodique, avec la TEI utilisé ici, concordaient bien avec les coefficients rapportés par d'autres utilisateurs (Chan, 1996).

## **4.2 Sélectivité de la résine**

Les résultats expérimentaux de spéciation obtenus dans le système Ag-Cl pour vérifier la sélectivité de la résine pour l'ion libre  $\text{Ag}^+$  ne concordent pas exactement avec ceux modélisés à l'aide du logiciel MINEQL+. La quantité d'Ag capté par la résine diminue au fur et à mesure que la concentration des chloro-complexes augmente en solution mais la résine capte plus d'Ag qu'anticipé. Il existe une bonne corrélation entre  $[\text{Ag}^+]$  mesurée avec la TEI et  $[\text{Ag}]$  modélisée ( $R^2=0,85$ ;  $n=4$ ;  $p<0,001$ ). Le résidu calculé à partir de l'équation ( $\text{Ag}_{\text{TEI}}=1,236*\text{Ag}_{\text{modèle}}$ ) montre une forte corrélation avec le chloro-complexe neutre ( $\text{AgCl}^0$ ) (Corrélation de Pearson,  $r=0,784$ ;  $n=16$ ;  $p=0,001$ ) tandis qu'il n'y a aucune corrélation entre le résidu et le chloro-complexe  $\text{AgCl}_2^-$  ( $r=0,246$ ,  $n=16$ ,  $p>0,05$ ). Ces observations suggèrent que des chloro-complexes neutres contribuent à la concentration d' $\text{Ag}^+$  mesurée. Soulignons que la concentration en chlorure dans nos milieux d'exposition n'était que de  $6 \mu\text{M}$ ; à cette concentration la proportion du complexe  $\text{AgCl}^0$  est négligeable ( $\sim <1 \%$ ) et donc cette interférence ne devrait pas influencer les dosages d' $\text{Ag}^+$  dans les milieux d'exposition. Le complexe anionique  $\text{AgCl}_2^-$  n'interagirait pas avec la résine, étant elle-même chargée négativement.

## **4.3 Titration de la MOD\***

Les résultats indiquent que l'acide humique de la rivière Suwannee a une forte affinité pour le métal Ag. La courbe de titration est typique d'un ligand qui possède deux sites de complexation (Mota et Correia dos Santos, 1995) : un premier groupe de sites avec un

---

\* Cette partie est approfondie dans l'article Porcher et Campbell (2003) (section 2).

pouvoir de complexation élevé pour l'Ag, suivi d'un deuxième groupe de sites d'affinité plus faible qui complexeront le métal une fois le premier groupe de sites occupés, au fur et à mesure que la concentration totale augmente. L'argent est un métal mou et forme de préférence des complexes avec des groupements fonctionnels renfermant le soufre réduit (thiols; sulfures : Martell *et al.*, 2001). Une étude par Fortin et Campbell (1998) a montré que les acides fulviques avaient une plus grande affinité pour le Cd que pour le Zn indiquant la présence de sites de haute affinité, tels que des thiols, pour les métaux mous. Parmi les SH, les acides humiques aquatiques ont le pourcentage le plus élevé de soufre (0,82 %) (Thurman et Malcom, 1981). Xia *et al.* (1998) ont montré que 55 % du soufre dans le SRHA se retrouvait sous forme réduite, c'est-à-dire comme thiols ou sulfures. Malgré leur concentration absolue plutôt faible, ces groupements fonctionnels joueraient un rôle d'importance dans la complexation de l'argent par les acides humiques (Smith *et al.* 2002), surtout lorsque la concentration ambiante du métal est relativement faible. Si l'on calcule, d'après les pourcentages mentionnés dans la littérature, la concentration en groupement SH<sup>-</sup> dans nos milieux d'exposition, on obtient une valeur d'environ 59 nM. Cette valeur est cohérente avec nos résultats de titrage qui indique que tout l'argent présent en solution est complexé jusqu'à ce que la concentration totale atteigne 50 nM.

Il nous est impossible de comparer les résultats expérimentaux avec ceux du logiciel de spéciation WHAM car il n'existe pas de constante de complexation fiable pour la réaction entre le métal Ag et l'acide humique. La complexation de l'Ag par les acides

humiques ou fulviques n'a pas été grandement étudiée, et par conséquent les constantes de complexation conditionnelles sont plutôt rares. Cependant, on peut calculer la capacité de complexation du SRHA pour l'Ag (i.e.  $9 \mu\text{mol Ag} \cdot \text{g C}^{-1}$ ) pour les sites à forte affinité. Pour une solution de  $5 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ , la pente de la courbe de titrage (fig. 3.3) après une concentration d'Ag totale de  $50 \text{ nM}$  et de  $5 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$  est relativement constante mais très différente d'une pente de type 1 :1. Elle a plutôt une pente de  $1/5$ , ce qui indique que des sites à faible affinité contribuent à la complexation de l'Ag. Malgré l'ajout de  $300 \text{ nM}$  d'Ag, la courbe de titrage demeure presque linéaire; ces sites à faible affinité ne sont donc pas encore tous saturés. Nos résultats de titrage ont été modélisés par le Dr S. Smith de l'Université McMaster (fig. 4.1). Sa modélisation, basée sur un ligand à un site, a permis de calculer un  $\log K=6.8$ . Cependant, tel que discuté ci-haut, notre courbe de titrage suggère plutôt la présence de deux types de sites. La constante de complexation conditionnelle calculée par Smith s'appliquerait surtout aux sites à faible affinité. Selon Smith (communication personnelle), leurs travaux avec l'Ag et la MOD ont donné des résultats similaires aux nôtres. Leur recherche porte sur la matière organique naturelle présente dans les eaux du Hamilton Harbour (Lac Ontario, ON, Canada) et le dosage de l'Ag<sup>+</sup> libre s'effectue avec une électrode sélective (Smith *et al.*, 2003).

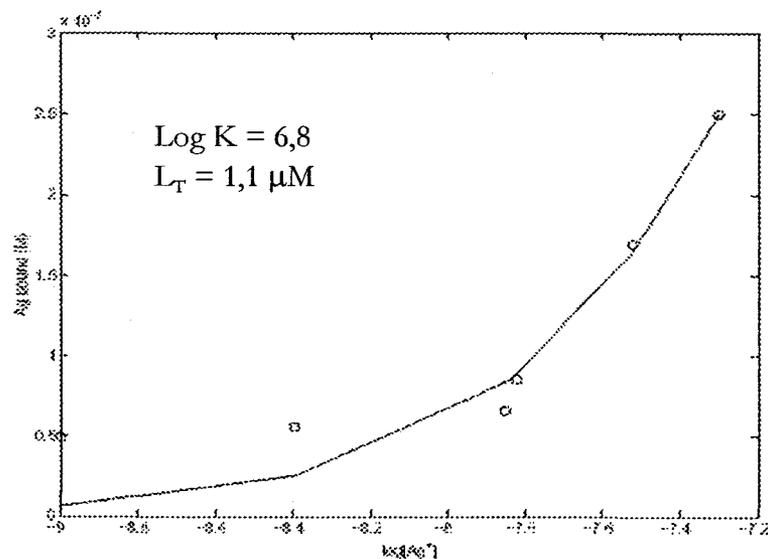


Figure 4.1 Modélisation des résultats de titrage du SRHA par l'Ag.

#### 4.4 Effet de la MOD sur la résine

La présence de MOD dans les solutions ne devrait pas affecter les propriétés de la résine échangeuse. En effet, il n'y a pas de différence significative entre les coefficients de distribution pour une résine prétraitée à la MOD et une sans traitement (Fortin et Caron, 2000; Fortin, 1996). De plus, Fortin (1996) a exposé en lot la résine Dowex à une concentration de  $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  d'acide humique de type Laurentien à un très faible pH pendant 8 h pour favoriser l'adsorption de la matière organique. Les résultats n'ont montré aucune adsorption de la matière organique sur la résine. Ces résultats ont aussi été reproduits par Fortin et Caron (2000) pour une concentration en carbone beaucoup plus élevée ( $\sim 4 \text{ g C} \cdot \text{L}^{-1}$ ; lixiviat organique).

Dans la présente étude, l'AH ne semble pas s'adsorber à la résine et ne modifie pas les propriétés échangeuses de la résine. En effet, la concentration en carbone dissous (COD) mesurée dans la solution avant son passage dans la colonne et après son passage dans la colonne n'était pas différente (test Student par paires,  $t=-0,828$ ;  $n=33$ ;  $p>0,05$ ) (tableau 3.3). De plus, les coefficients de distribution ( $\lambda$ ) pour une solution étalon compilés dans le tableau 3.4 ne sont significativement pas différents avant et après le passage sur la résine de la solution contenant de la MOD (test Student par paires, résine A :  $t=-1,042$ ;  $n=4$ ;  $p>0,05$  et résine E :  $t=-1,014$ ;  $n=4$ ;  $p>0,05$ ).

## **4.5 Prise en charge de l'Ag**

### **4.5.1 Temps variable**

Nos taux de prise en charge en fonction du temps en milieu synthétique sans aucun ligand pour une concentration totale en argent de 10 nM sont inférieurs à ceux rapportés dans la littérature pour des conditions expérimentales identiques. Par exemple, les taux de prise en charge obtenus chez *C. reinhardtii* dans un milieu inorganique sans aucun ligand (fig. 3.5, A et B) sont de 25 (A) à 3 (B) fois plus faibles que ceux rapportés par Fortin et Campbell (2000), pour les mêmes conditions expérimentales (pH, force ionique, concentration d'Ag). La prise en charge en fonction du temps est presque linéaire pour des concentrations en  $Ag^+$  inférieures à 10 nM, mais, elle semble atteindre un plateau lorsque les concentrations dans le milieu d'exposition sont supérieures à 10 nM. Dans le cas de *P. subcapitata* (fig. 3.6, A), les taux

de prise en charge sont 5 fois moins élevés que ceux rapportés par Lee *et al.* (2004) pour cette espèce.

Bien que nous n'ayons aucune explication pour ces écarts, lorsqu'on compare les figures 3.5 pour *C. reinhardtii* et 3.6 pour *P. subcapitata*, on remarque qu'il y a une grande variabilité entre les essais pour un même design expérimental. Il s'est avéré très difficile de reproduire les mêmes concentrations d'Ag libre d'une expérience à une autre dans le temps, ce qui rend ardu la comparaison entre les résultats cinétiques obtenus. Nous avons donc conclu qu'il serait préférable d'étudier la prise en charge pour un temps fixe avec différentes concentrations d'Ag libre en présence de SRHA (cf. fig. 1.3). Ce design minimise l'influence des paramètres difficiles à contrôler, tels que la concentration en carbone organique dissous et les variations algales intergénérationnelles. En maîtrisant plus facilement ces conditions, l'évaluation du facteur à étudier (présence/absence de la MOD) est facilitée. Nous allons donc concentrer nos efforts de discussion sur les expériences réalisées à temps fixe.

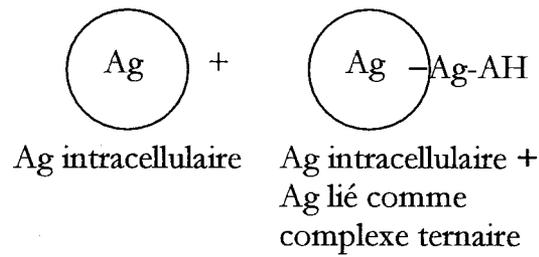
#### **4.5.2 Temps fixe\***

Nos taux de prise en charge à temps fixe (25 min) pour nos deux espèces d'algues, en milieu synthétique sans aucun ligand (figs. 3.7 A et B), pour une concentration d'Ag<sup>+</sup> de 10 nM, sont comparables à ceux rapportés dans la littérature par Fortin et Campbell (2000) et Lee *et al.* (2004). Les valeurs sont approximativement de 0,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$  et 0,15  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$  pour *C. reinhardtii* et *P. subcapitata*, respectivement.

---

\* Cette section est approfondie dans l'article Porcher et Campbell (2003) (section 2).

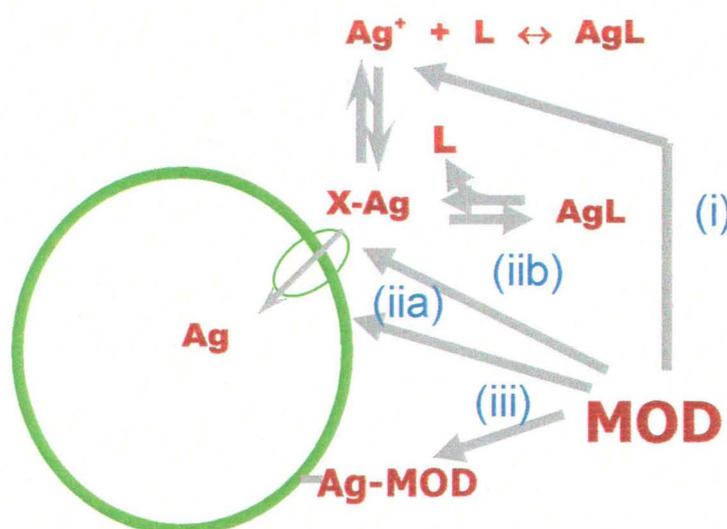
Lorsqu'on examine les courbes de réponse (prise en charge de l'argent versus  $[Ag^+]$  dans le milieu d'exposition), on remarque que pour *C. reinhardtii* la courbe de réponse de prise en charge augmente en présence d'AH (fig. 3.7A). Pour maintenir la  $[Ag^+]$  à des niveaux comparables dans les deux types de milieu (sans/avec MOD), il fallait ajouter davantage d'Ag en solution pour ceux avec de la MOD. De plus, *C. reinhardtii* a un taux de prise en charge plus élevé que les autres chlorophycées (Lee *et al.*, 2004). Par conséquent, si jamais la diffusion entre la solution et la surface algale était l'étape limitant la prise en charge, alors le taux d'approvisionnement en Ag serait plus élevé dans le milieu avec de la MOD. Cette situation a déjà été étudiée pour le système argent/chlorure (Fortin et Campbell, 2000). Pour vérifier si tel était le cas dans notre système, nous avons repris les mêmes expériences avec l'algue *P. subcapitata* qui est reconnue pour avoir un taux de prise en charge plus lent, et pour laquelle la diffusion à travers la phycosphère n'est pas limitant (Lee *et al.*, 2004). Les résultats montrent que cette dernière avait aussi une prise en charge plus élevée en présence de MOD (fig. 3.7B). La diffusion ne peut donc pas expliquer l'augmentation de prise en charge d'Ag en présence d'AH. Trois autres explications de cette augmentation de la prise en charge ont été considérées : (i) Il est possible que la plus grande concentration d'« Ag cellulaire » en présence d'AH soit le produit de la présence à la surface algale de complexes Ag-AH adsorbés (fig. 4.2); (ii). Il se pourrait aussi que notre dosage de  $Ag^+$  en présence de SRHA sous-estime la  $[Ag^+]$  réelle; et (iii). Il y a peut être aussi des possibilités d'interactions du SRHA au niveau de la cellule algale (membrane cellulaire).



**Figure 4.2. Schéma de la présence d'un complexe Ag-AH à la surface algale.**

D'après le MIL, la présence d'un ligand tel que la SRHA ne devrait pas affecter la prise en charge de l'argent pour une même concentration d'ion libre dans le milieu (Campbell, 1995). La pensée populaire veut que la présence de MOD complexe le métal présent, et ainsi diminue la biodisponibilité de ce métal pour les organismes présents (fig 4.3, i). Dans un tel cas, la MOD n'agit pas directement sur la prise en charge du métal par la cellule. Cependant, nos résultats indiquent un effet de la MOD. Il est donc possible pour les acides organiques d'influencer directement la cellule algale (fig. 4.3). Les molécules de SRHA peuvent s'adsorber à la surface des algues, en modifiant la charge de surface et/ou en entraînant des changements au niveau de la physiologie de l'algue (fig. 4.3, iia). A cela s'ajoute la possibilité que l'adsorption d'AH sur la membrane cellulaire entraîne une augmentation de la charge négative à la surface algale. Ce changement dans la charge superficielle aurait pour effet d'attirer plus d'ions  $\text{Ag}^+$  près de la cellule algale. Cette augmentation de la concentration en  $\text{Ag}^+$  conduirait à un transport d'Ag plus important et, par conséquent, il y aurait une plus grande concentration intracellulaire d'Ag (fig 4.3, voie iib). Il peut aussi y avoir une

contribution de complexes ternaires à la surface algale (fig. 4.3, voie iii). En effet, la présence de tels complexes près de la surface algale pourrait constituer une réserve d'Ag près de la membrane, permettant le transfert du métal Ag vers le site biotique de « complexation » sur la membrane plasmique, surtout si son affinité pour l'Ag est plus élevée que celle du SRHA.



**Figure 4.3** Schéma des interactions Ag-algues possibles en présence de la matière organique dissoute naturelle (MOD). La voie (i) représente la complexation de l'argent en solution, conduisant à une baisse de la concentration en Ag<sup>+</sup> libre. La voie (ii) correspond à l'adsorption de la MOD sur la cellule, qui influence la charge superficielle de l'algue (iia) ou qui influence les transporteurs d'Ag (iib). La voie (iii) représente la formation d'un complexe ternaire à la surface algale, ce qui pourrait contribuer à une surestimation de l'argent intracellulaire.

Aucune étude quantitative n'a pu être trouvée dans la littérature faisant mention de l'influence de la MOD sur la prise en charge de l'Ag par les algues. Par contre, Slaveykova *et al.* (2003) ont aussi constaté une augmentation de la prise en charge d'un

métal (le Pb) par *Chlorella kessleri*, une espèce d'algue verte unicellulaire, en présence d'acide fulvique de la rivière Suwannee. D'autres études suggèrent que des complexes AH-Ag contribuent à la toxicité du métal argent envers les poissons. Bury *et al.* (1999), en travaillant sur la truite arc-en-ciel *O. mykiss* et le mené tête de boule *P. promelas*, ont remarqué une augmentation de la CL<sub>50</sub> exprimée en termes d'Ag total mais une diminution lorsque basée sur Ag<sup>+</sup>. Cependant, les CL<sub>50</sub>(Ag<sup>+</sup>) sont basées sur des résultats modélisés à partir de MINEQL+, et ne sont pas des valeurs mesurées d'Ag libre dans le milieu. Par contre, si la CL<sub>50</sub> basée sur l'Ag libre diminue en présence de MOD, il se pourrait que des complexes Ag-DOC interagissent à la surface des branchies.

Les SH sont reconnues comme des surfactants naturels qui peuvent s'adsorber à des surfaces biologiques (Campbell *et al.*, 1997). La perméabilité membranaire de *P. subcapitata* vis-à-vis d'une sonde moléculaire, la diacétate de fluorescéine (FDA), est augmentée en présence de SRHA (Vigneault *et al.*, 2000). Ce phénomène est atténué à pH 7 par rapport au pH 5, à cause d'une déprotonation de la surface algale à un pH plus élevé entraînant une répulsion électrostatique entre la surface et les molécules de MOD. Cependant, l'adsorption est quand même observée à pH 7 quoique plus faible (Parent *et al.*, 1996). Conséquemment, la présence de SRHA peut avoir une interaction directe sur les cellules algales et possiblement modifier ainsi la prise en charge de l'Ag (Porcher et Campbell (2003), section 2).



## 5 Conclusion

---

On sait que le métal argent est reconnu comme un élément très toxique et que son cycle biogéochimique a été altéré par diverses activités anthropiques, entraînant une augmentation de sa concentration dans les écosystèmes aquatiques. Il existe quelques études sur sa spéciation chimique dans les eaux douces, mais les relations entre cette spéciation (rôle important de la matière organique naturelle) et la biodisponibilité de l'argent sont peu connues. Nous avons donc étudié l'effet de la MOD, un ligand organique complexe omniprésent dans les milieux aquatiques, sur la prise en charge de l'Ag par des algues vertes unicellulaires.

Le modèle de l'ion libre (MIL) lie ensemble la spéciation d'un métal et sa prise en charge par un organisme. Il stipule que la bioaccumulation par l'organisme suit la concentration de l'ion libre dans le milieu d'exposition. De plus, il considère que la présence de MOD dans le milieu influencerait la prise en charge, en complexant l'Ag présent, et en diminuant la présence d'argent libre,  $Ag^+$ . Par contre, pour une même concentration d' $Ag^+$  dans deux milieux différents (avec/sans MOD), il ne devrait y avoir aucune différence dans la prise en charge.

Cependant, l'hétérogénéité et la polyfonctionnalité des molécules de substances humiques qui composent la MOD complexifient les études sur leur influence en milieu aquatique. En effet, nos connaissances sur les constantes de complexation entre l'Ag et

la MOD ne sont pas complètement fiables. Il est donc difficile de définir la spéciation de l'Ag dans les milieux d'exposition, et de quantifier l'influence de la MOD sur la prise en charge de l'Ag.

L'objectif de cette étude consistait à déterminer : (1) la spéciation organique de l'argent en présence d'acide humique de la rivière Suwannee et (2) son influence sur la prise en charge de l'Ag par des algues vertes unicellulaire d'eau douce. Pour ce faire, nous avons premièrement mis au point une technique d'échange ionique pour mesurer la concentration d'Ag<sup>+</sup> en présence d'acide humique pour diverses concentrations d'Ag totale. Deuxièmement, nous avons exposé séparément les algues, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata*, à des milieux d'exposition contenant un radio-isotope de l'argent (<sup>110m</sup>Ag), avec et sans matière organique, pendant de courtes périodes (< 1 h). L'hypothèse à vérifier était que la prise en charge de l'argent en présence de MOD dans le milieu respectait les prédictions du MIL c'est-à-dire que la prise en charge en absence et présence de MOD serait identique pour une même concentration d'Ag<sup>+</sup> libre.

### **5.1 Spéciation organique de l'Ag**

La spéciation de l'argent en présence de MOD a été quantifiée par le biais de titrage en lot. La concentration d'Ag<sup>+</sup> libre était mesurée après 24 h, le temps que l'équilibre entre l'acide humique et l'Ag soit atteint. Différentes concentrations d'Ag totale ont été utilisées. Les résultats ont montré que l'AH a une grande affinité pour le métal Ag. La courbe de titrage du SRHA est caractéristique de celle d'un ligand avec deux sites de

complexation, un avec un très fort pouvoir de complexation suivi d'un plus faible. L'argent est un métal mou qui formera des liaisons préférablement avec des atomes de S. De plus, la caractérisation du SRHA a montré qu'il possède des groupements sulfures réduits (S<sup>-</sup>). Il semble donc probable que l'interaction de l'argent avec les sites à forte affinité implique une complexation avec de tels groupements.

## **5.2 Prise en charge de l'Ag en présence de MOD**

L'effet de la MOD sur la prise en charge algale a fait l'objet de deux designs expérimentaux. Il y en avait un pour étudier la cinétique d'accumulation tandis que le deuxième se faisait à temps fixe. Il est clair d'après nos résultats qu'il est difficile de reproduire exactement les mêmes conditions expérimentales d'exposition pour étudier la prise en charge dans le temps. Il est donc préférable de privilégier les expériences qui se déroulent à temps fixe pour comparer différentes concentrations d'Ag<sup>+</sup>. Ce design limite les différences intergénérationnelles chez les algues, en concentration d'AH et en concentration d'Ag totale dans les milieux.

Il est clair qu'une plus grande présence d'ions libres d'Ag dans le milieu entraîne une bioaccumulation plus élevée chez les deux espèces d'algues étudiées, *C. reinhardtii* et *P. subcapitata*. De plus, pour une concentration donnée d'Ag<sup>+</sup> libre, la présence de MOD naturelle augmente la prise en charge de l'Ag. L'augmentation de la prise en charge de l'argent en présence de MOD s'est manifestée chez les deux algues testées, y compris

celle qui accumule l'argent relativement lentement. La prise en charge accrue n'est donc pas le résultat d'une augmentation du taux de diffusion de l'argent ( $\text{Ag}^+$  + ses complexes labiles) à travers la phycosphère. Il serait souhaitable d'étudier s'il s'agit d'un changement physiologique au niveau de la cellule algale et/ou de la charge de surface suite à de l'adsorption par l'AH, ou encore, une contribution de complexes Ag-AH adsorbé à la surface algale.

### **5.3 Perspectives**

Afin de pouvoir généraliser l'effet de la MOD naturelle sur la prise en charge algale par les métaux, des recherches additionnelles seraient nécessaires. Cette étude n'est qu'un simple pas dans cette direction. Il serait intéressant d'évaluer l'influence de la MOD à d'autres pH, à d'autres concentrations de MOD et avec différentes sources et types de substances humiques. Ce type d'étude quantitative est primordial pour évaluer et améliorer l'applicabilité du MIL à des eaux naturelles. De plus, l'impact du mécanisme d'adsorption de l'AH sur la surface algale au niveau de la biodisponibilité de métaux essentiels (p.e., le cuivre) pour la croissance pourrait aussi être une voie à explorer. De meilleures connaissances entraîneront une définition appropriée des critères de qualité, en plus de mieux évaluer le risque écologique dans les écosystèmes aquatiques.

## 6 Bibliographie

---

- Bowles, K. C., Ernste, M. J. et Kramer, J. R. 2003. Trace sulfide determination in oxic freshwaters. *Anal. Chim. Acta.*, 477 : 113-124.
- Brauner, C. J. et Wood, C. M. 2002. Effect of long-term silver exposure on survival and ionoregulatory development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos and larvae, in the presence and absence of added dissolved organic matter. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.*, 133: 161-173.
- Buffle, J. 1988. *Complexation Reactions in Aquatic Systems: an analytical approach*. Chichester, UK: Ellis Horwood. 692 p.
- Bury, N. R., Galvez, F. et Wood, C. 1999. Effects of chloride, calcium, and dissolved organic carbon on silver toxicity: comparison between rainbow trout and fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 56-62.
- Campbell, P. G. C. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. Dans A. Tessier et D.R. Turner (Eds), *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons. p. 45-102.
- Campbell, P. G. C. et Couillard, Y. 2003. Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques. Dans E. Pelletier, P.G.C. Campbell et F. Denizeau (Eds.), *Ecotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Québec, Canada: Presses de l'Université du Québec. sous presse.
- Campbell, P. G. C., Twiss, M. R. et Wilkinson, K. J. 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.*, 54: 2543-2554.
- Canterford, G. S. et Canterford, D. R. 1980. Toxicity of heavy metals to the marine diatom *Ditylum brightwellii* (West) Grunow: Correlation between toxicity and metal speciation. *J. Mar. Biol. Ass.*, 60: 227-242.
- Chan, D. Y. 1996. Communication personnelle à C. Fortin.
- Eisler, R. 1996. Silver hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. Biological Science report 32. Washington, D.C., U.S.A: U.S. Department of the Interior, National Biological Service. 44 p.

- Erickson, R. J., Brooke, L. T., Kahl, M. D., Venter, F. V., Harting, S., Markee, T. P. et Spehar, R. 1998. Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 572-578.
- Fisher, N. S., Bohé, M. et Teyssié, J-L. 1984. Accumulation and toxicity of Cd, Zn, Ag, and Hg in four marine phytoplankters. *Mar. Eco. Prog. Ser.*, 18: 201-213.
- Fortin, C. 1996. Méthode analytique de mesure de l'ion métallique libre ( $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) par échange ionique. Mémoire de maîtrise, INRS-Eau. Ste-Foy, QC, Canada.
- Fortin, C. 2000. Mécanismes de prise en charge et toxicité de l'argent chez une algue verte en relation avec la spéciation chimique. Thèse de doctorat, INRS-Eau. Ste-Foy, QC, Canada.
- Fortin, C. et Campbell, P. G. C. 2000. Silver uptake by the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, in relation to chemical speciation: influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 2769-2778.
- Fortin, C. et Campbell, P. G. C. 2001. Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: role of anion transporters in metal uptake. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 2214-2218.
- Fortin, C. et Caron, F. 2000. Complexing capacity of low-level radioactive waste leachates for  $^{60}Co$  and  $^{109}Cd$  using an ion-exchange technique. *Anal. Chim. Acta.*, 410: 107-117.
- Fortin, C. et Campbell, P. G. C. 1998. An ion-exchange technique for free-metal ion measurements ( $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ): Applications to complex aqueous media. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 73: 173-194.
- Garnier, J. et Baudin, J. P. 1989. Accumulation and depuration of  $^{110m}Ag$  by a planktonic alga, *Scenedesmus obliquus*. *Water Air Soil Poll.*, 45: 287-299.
- Guo, L., Hunt, B. J., Santschi, P. H. et Ray, S. M. 2001. Effect of dissolved organic matter on the uptake of trace metals by American oysters. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 885-893.
- Hook, S. E. et Fisher, N. S. 2001. Sublethal effects of silver in zooplankton: importance of exposure pathways and implications for toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 568-574.
- Janes, N. et Playle, R. C. 1995. Modeling silver binding to gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 14: 1847-1858.

- Lee, D-Y., Fortin, C. et Campbell, P. G. C. 2004. Influence of chloride on silver uptake by two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 1012-1018.
- Martell, A et Smith, R. 2001. Critically selected stability constants of metal complexes, NIST (Database 46, Version 6). Gaithersburg, MD, U.S.A: U.S. Department of Commerce.
- McKnight, D. M. et Aiken, G. R. 1998. Sources and age of aquatic humus. Dans *Aquatic Humic Substances*, vol. Ecological Studies Vol. 133, D.O. Hessen et L.J. Tranvik (Eds.). Berlin: Springer-Verlag. p. 9-39.
- Morel, F. M. M. 1983. Principles of Aquatic Chemistry. New York, NY, USA.: John Wiley & Sons.
- Mota, A. M. et Correia dos Santos, M. M. 1995. Trace metal speciation of labile chemical species in natural waters: electrochemical methods. Dans *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. A. Tessier et R.D. Turner (Eds). New York: John Wiley & Sons Ltd. p.205-258.
- Parent, L., Twiss, M. R. et Campbell, P. G. C. 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.
- Price, N. M., Harrison, J. G., Hering, R. J., Hudson, P. M., Palenik, B. et Morel, F. M. M. 1989. Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. *Biol. Oceanogr.*, 6: 443-461.
- Purcell, T. W. et Peters, J. J. 1998. Sources of silver in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 539-546.
- Rai, L. C. et Raizada, M. 1985. Effect of nickel and silver ions on survival growth, carbon fixation and nitrogenase activity in *Nostoc muscorum*: Regulation of toxicity in EDTA and calcium. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 31: 329-338.
- Roditi, H. A., Fisher, N. S. et Sanudo-Wilhelmy, S. A. 2000. Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. *Nature*, 407: 78-80.
- Schecher, W. D. et McAvoy, D. C. 1992. MINEQL+: a software environment for chemical equilibrium modeling. *Comput. Environ. Urban Syst.*, 16: 65-76.
- Schulten, H. R. et Schnitzer, M. A. 1993. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*, 80: 29-30.

- Sigg, L., Stumm, W. et Behra, P. 1992. Chimie des milieux aquatiques: chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. Paris: Masson. 391p.
- Slaveykova, V. I., Wilkinson, K. J., Ceresa, A. et Pretsch E. 2003. Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 1114-1121.
- Smith, D. S., Bell, R. A. et Kramer, J. R. 2002. Metal speciation in natural waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal binding sites. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.*, 133: 65-74.
- Smith, D. S., Bell, R. A. et Kramer, J. R. 2003. Determination of strong ligands sites in natural waters by competitive ligand titration with silver. *Environ. Sci. Technol.*, soumis.
- Sary, J., Kratzer, K. et Prasilova, J. 1983. Systematic study of the cumulation of elements on algae. *Toxicol. Environ. Chem.*, 7:47-61.
- Stokes, P. M. 1981. Multiple metal tolerance in copper tolerant green algae. *Plant Nutr.*, 3: 667-678.
- Thompson, P-A et Côté, R. 1985. Influence de la spéciation du cuivre sur les populations phytoplanctoniques naturelles de la rivière du Saguenay, Québec, Canada. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 70: 711-731.
- Thurman, E. M. 1985. Organic geochemistry of natural waters. Dordrecht: Dr. W. Martinus Nijhoff. Junk publishers. 497 p.
- Thurman, E. M. et Malcolm, R. L. 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 15: 463-466.
- Thurman, E. M. et Malcom, R. L. 1995. Nitrogen and amino acids in fulvic and humic acids from the Suwannee river. Dans *Humic substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, Properties and Proposed Structures*. R.C. Everett, D.M. Leenheer, D.A. McKnight et K.A. Thorn (Eds.). Denver, CO, USA.: US Geological Survey. P. 55-66.
- Tipping, E. 1998. Humic ion-binding Model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. *Aquat. Geochem.*, 4: 3-48.
- Tipping, E. 2002. Cation binding by humic substances. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 434 p.
- Turbak, S. C., Olson, S. B., et McFeters, G. A. 1986. Comparison of algal assay systems for detecting waterborne herbicides and metals. *Wat. Res.*, 20: 91-96.

- Twiss, M. R., Errécalde, O., Fortin, C., Campbell, P. G. C., Jumarie, C., Denizeau, F., Berkelaar, E., Hale, B. et van Rees, K. 2001. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. *Chem. Speciat. Bioavailab.*, 13: 9-23.
- U.S. Public Health Services (PHS). 1990. Toxicological profile for silver. Agency for Toxic Substances and Disease Registry TP-90-24.
- US EPA. 1987. Ambient life water quality criteria for silver. Rapport No. 440/5-87-011. Duluth, MN, USA: Office of Research and Development. 104 p.
- Vigneault, B. 2000. Interactions des substances humiques dissoutes avec les algues unicellulaires - Mécanismes et implications. Thèse de doctorat, INRS – Eau. Ste-Foy, QC, Canada.
- Vigneault, B., Percot A., Lafleur M., et Campbell P. G. C. 2000. Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 34: 3907-3913.
- Visser, S. A. 1982. Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin. *Rev. Franc. Sci. Eau.*, 1: 285-296.
- Xia, K. Weesner, F., Bleam, W. F., Bloom, P. R., Skylberg, U. L. et Henke, P. A. 1998. XANES studies of oxidation states of sulfur in aquatic and soil humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 62: 1240-1246.



## 7 Article

---

Influence de la matière organique dissoute naturelle sur la prise en charge de l'argent (Ag) par deux algues vertes unicellulaires d'eau douce.

Céline I. Porcher et Peter G.C. Campbell

INRS-Eau, Terre et Environnement

Université du Québec

2800 rue Einstein, C.P. 7500

Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 4C7

Auteur correspondant: Peter G.C. Campbell

INRS-ETE, Université du Québec, C.P. 7500, Sainte-Foy,  
Québec, Canada G1V 4C7

Phone : 418-654-2538

Fax : 418-654-2600

E-mail : [peter\\_campbell@inrs-ete.uquebec.ca](mailto:peter_campbell@inrs-ete.uquebec.ca)

## Résumé

Le cycle géochimique de l'argent a été perturbé par des activités anthropiques. Malgré cela nous avons relativement peu de connaissances sur ses effets écotoxicologiques. L'amplitude de ces effets dépendra grandement de la spéciation de l'argent. Les ligands présents dans l'environnement tels que le chlorure, des espèces de soufre réduit et la MOD naturelle sont susceptibles d'influencer la spéciation. Ce projet met l'accent sur la présence de MOD (acides humiques). Nous avons exposé deux espèces d'algues vertes unicellulaires, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata*, à une concentration donnée d'Ag<sup>+</sup> libre, en présence ou en absence d'acides humiques de la rivière Suwannee, et évalué sa prise en charge. Pour mesurer l'ion libre Ag<sup>+</sup>, nous avons adapté une technique d'échange ionique. Une fois la résine calibrée pour l'Ag, nous avons mesuré l'argent libre en présence d'acide humique. Les résultats pour des concentrations d'Ag totale entre 5 à 100 nM et une concentration réaliste de carbone (5 mg C•L<sup>-1</sup>) indiquent que la MOD possède une forte affinité pour l'Ag. La courbe de titrage indique deux types de sites de complexation (affinités fortes et faibles) chez les molécules d'acides humiques. Ces titrages nous ont permis de définir les conditions d'exposition pour les expériences de prise en charge. Nous avons constaté que pour une concentration d'Ag<sup>+</sup> libre et une période d'exposition fixe, les deux espèces d'algues accumulent plus d'Ag en présence de MOD par rapport à un milieu inorganique. Cette réponse est contraire aux prédictions du Modèle du Ligand Biotique (BLM) qui prévoit que la prise en charge de l'Ag en fonction de la concentration de l'ion libre devrait être la même en présence ou en absence de MOD. Cette

augmentation ne semble pas être le résultat d'une limite diffusionnelle de l'Ag sur sa prise en charge, mais plutôt une interaction directe de la MOD naturelle sur l'algue.

Effect of natural dissolved organic matter on silver uptake by two  
green unicellular freshwater algae.

Céline I. Porcher and Peter G.C. Campbell

INRS-Eau, Terre et Environnement  
Université du Québec  
2800 rue Einstein, C.P. 7500  
Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 4C7

Corresponding author: Peter G.C. Campbell

INRS-ETE, Université du Québec, C.P. 7500, Sainte-Foy,  
Québec, Canada G1V 4C7  
Phone : 418-654-2538  
Fax : 418-654-2600  
E-mail : [peter\\_campbell@inrs-ete.uquebec.ca](mailto:peter_campbell@inrs-ete.uquebec.ca)

## Abstract

The geochemical cycle of silver has been perturbed by anthropogenic activities, but we know relatively little about its ecotoxicological effects. The amplitude of any such effects will be strongly influenced by silver speciation. Natural ligands likely to influence the speciation of silver in the environment include chloride, reduced sulfur species and natural dissolved organic matter (DOM); the present study focuses on natural DOM (humic acid). The experimental design involved exposing two green algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata* (formerly known as *Selenastrum capricornutum*), to a fixed free  $\text{Ag}^+$  concentration, in the presence or absence of Suwannee River humic acid. To measure free  $\text{Ag}^+$  we used an equilibrium ion exchange technique to measure free silver in the presence of humic acid. Results for solutions containing 5-100 nM Ag and realistic organic carbon concentrations (5 mg  $\text{C}\cdot\text{L}^{-1}$ ) indicate that the natural DOM has two types of complexation sites for silver: a small number of high affinity sites, and a higher number of sites with lower affinity for silver. The results of these titration experiments allowed us to define appropriate exposure conditions for the algal uptake experiments. For a given free  $\text{Ag}^+$  concentration and a fixed exposure period, both test algae accumulate more silver in the presence of DOM than in the corresponding inorganic medium. This unexpected trend is inconsistent with the «Biotic Ligand Model» or BLM, which predicts that the silver uptake *versus*  $[\text{Ag}^+]$  response curve should be the same in the presence or absence of DOM. The increase observed in the presence of DOM does not appear to be related to a diffusional limitation on silver uptake, but rather suggests a direct

interaction of the natural DOM with the algae, involving as sorption at the algal surface.

## Introduction

Silver is naturally present in the earth's crust at very low concentrations, but over the years its biogeochemical cycle has been disturbed by different anthropogenic activities (Purcell and Peters, 1998). As a result of mining wastes, industrial photoprocessing discharges and sewage treatment plant inputs, silver concentrations in the aquatic ecosystem have increased since pre-industrial times. However, to evaluate the environmental risk associated with this biogeochemical perturbation, one must take into account not only the increase in silver concentration but also its chemical form (Kramer *et al.*, 2002). Silver speciation in natural waters is strongly influenced by the presence of simple inorganic ligands such as chloride, thiosulfate and reduced sulfur species as well as by organic ligands such as simple thiols (cysteine) and natural dissolved organic matter (DOM). Earlier work in our laboratory has concentrated on the effects of chloride (Fortin and Campbell 2000; Lee *et al.*, 2004) and thiosulfate (Fortin and Campbell, 2001) on silver bioavailability. In the present study we have investigated the effect of DOM.

Natural dissolved organic matter is omnipresent in the freshwater environment with concentrations normally varying between 1-15 mg C·L<sup>-1</sup> (Thurman, 1985). Recalcitrant humic substances such as humic and fulvic acids are the major components of DOM (generally 50-80%; Buffle, 1988). They range in size from small (molecular weight <1,000) to relatively large (molecular weight >100,000) macromolecules and possess a variety of largely oxygen-containing functional groups: carboxylic acid and phenolic

groups dominate, with minor contributions from quinone, ketone, amine and perhaps sulfhydryl groups (Thurman, 1985). Humic substances have been implicated in many biogeochemical processes, including metal redox reactions, photochemical transformations, nutrient cycling and metal complexation – it is this latter property that is of particular interest to us in the present study. By analogy with the results obtained with other metals, the presence of humic substances should decrease silver bioavailability in solution, by complexing the metal and decreasing the free-ion activity to which aquatic organisms tend to respond (Campbell, 1995). The free-ion activity model, or the related biotic ligand model (BLM), predicts that silver uptake and/or toxicity should vary as a function of the concentration of the free  $\text{Ag}^+$  ion in solution, provided other environmental variables such as pH and hardness are kept constant (Gorsuch *et al.*, 2002).

The objective of the present study was to establish if Ag-DOM complexes are indeed biologically unavailable, as would be predicted by the BLM, and to determine if the effect of DOM on Ag bioavailability is limited to the complexation of Ag in solution. We worked with *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, two unicellular green algae for which we had already measured the uptake of free  $\text{Ag}^+$  in simple inorganic exposure media (Fortin and Campbell, 2000; Lee *et al.* 2004). To determine if the BLM correctly predicts the bioavailability of silver in the presence of DOM, it is essential to be able to distinguish between free and complexed silver in solution. Making this distinction is a serious technical challenge when working with

DOM, since these heterogeneous molecules do not have thermodynamically defined complexation constants (Tipping, 2002) and as a result the calculation of metal speciation in the presence of DOM is not straightforward. The situation with silver is particularly tenuous, since complexation of this metal by humic or fulvic acids has not been widely studied and even conditional complexation constants are scarce. We chose to adapt an ion-exchange technique that we had developed earlier for Cd and Zn (Fortin and Campbell, 1998). We then exposed the two algae to different concentrations of free  $\text{Ag}^+$ , either in the presence or absence of DOM, and determined short-term uptake of silver as a function of  $[\text{Ag}^+]$ .

## Material and Methods

### *Reagents and plasticware*

All plasticware was soaked in 15%  $\text{HNO}_3$  for at least 24 h followed by seven rinses with ultrapure water (Millipore, resistivity 18  $\text{M}\Omega\text{cm}$ ) and dried under a laminar flow hood before use. Tetrafluoroethylene (TEF) bottles were used for silver-only exposure experiments. Culture and exposure solutions were made with salts of analytical grade or better. Radioactive silver ( $^{110\text{m}}\text{Ag}$ , 408.4  $\text{mCi}\cdot\text{mmol}^{-1}$ ) was purchased from Risø National Laboratory (Roskilde, Denmark). All silver stock solutions were acidified and stored in the dark at 4°C. Standard humic acids (#1S101H) isolated from the Suwannee River (GA/FL, USA) were purchased from the International Humic Substances Society (IHSS).

### *Algal growth conditions*

The test algae were purchased from the University of Toronto Culture Collection (UTCC) and cultured axenically in our laboratory. *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (UTCC 11) is a euryhaline unicellular motile green alga. *Pseudokirchneriella subcapitata* (formerly *Selenastrum capricornutum*) (UTCC 37) is a crescent-shaped non-motile green alga. Each alga was grown in 100 mL of a defined inorganic medium (pH=7) held in 250-mL polycarbonate Erlenmeyer flasks. The culture medium, referred to here as the modified high salt medium (MHSM, ionic strength 6 meq·L<sup>-1</sup>), was originally described by Macfie *et al.* (1994) and subsequently modified by Fortin and Campbell (2000). All stock solutions were filtered (0.2 µm polycarbonate membrane, Poretics) and stored at 4°C in previously autoclaved bottles. The culture solution was autoclaved before adding the trace metal mix to prevent metal precipitation. Batch cultures were maintained in a growth chamber (CONVIRON) under constant light at 130 µmol photons·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (Cool White Fluorescent Tubes), with rotary agitation at 50 rpm and a temperature of 20 °C. Cultures were maintained by transferring 2 mL of culture to a new, fresh and sterile medium every week. Bacterial contamination was checked periodically by plating onto nutrient agar (Dicto-Bacto Agar).

### *Measuring free Ag<sup>+</sup> using an ion-exchange technique*

To quantify free Ag<sup>+</sup> in presence of dissolved organic matter, we used a miniaturised ion-exchange technique (IET) as developed by Fortin and Campbell (1998). The

method involves passing a sufficient amount of the solution to be measured through a cation ion-exchange column so as to reach a steady-state between the solution and the resin. The technique uses the sodium form of a Dowex 50W-X8, 50-100 mesh cationic resin (sulfonic acid functional groups; Sigma). Preliminary experiments were conducted to determine the conditions needed to obtain a steady-state for our experimental conditions. To ensure that the resin remained predominantly in the sodium form, sufficient  $\text{NaNO}_3$  was added to the solutions to be analysed so as to obtain a final ionic strength of 0.01 M. Under these conditions, about 240 mL had to be passed through the resin to attain steady-state. The resin was then rinsed with deionised water (1.25 mL) to remove the solution remaining in the interstices of the resin, and the water in the interstices was pushed out of the column by a positive air pressure. The column was then eluted with 20 mL of thiosulfate solution (200  $\mu\text{M}$ ). Thiosulfate was chosen as the eluant instead of the normal acidic solution (1.5 M  $\text{HNO}_3$ ) because thiosulfate has a high affinity for silver ( $\log K_{\text{AgS}_2\text{O}_3} = 8.82$ ) and in preliminary trials proved to be more effective in removing the Ag bound to the resin. A pH meter (PHM 240 Radiometer Analytical) with a glass gel combination electrode (Fisher) was used to monitor the eluant pH ( $\text{pH}=7 \pm 0.1$ ).

#### *IET and Ag: inorganic and organic media*

The resin selectivity for free  $\text{Ag}^+$  was first tested in the presence of  $\text{Cl}^-$ , a ligand for which the silver complexation constants are already established, to ensure that the resin

binds free  $\text{Ag}^+$  selectively in the presence of various aqueous chloro-complexes ( $\text{AgCl}^0$ ;  $\text{AgCl}_2^{-1}$ ). The experimental data were compared to the predicted values calculated with the chemical equilibrium model MINEQL+ (v. 4.5) (Schecher and MacAvoy, 1992), using an updated thermodynamic database (<http://www.inrs-ete.quebec.ca/activities/groupe/bioge/personal.htm>). The thermodynamic data were derived from the default database supplied with the MINEQL+ software (v.4.5), but were updated by comparison with the National Institute of Standards and Technology Critical Stability Constants of Metal Complexes Standard Reference Database (Martell *et al.*, 2001). Four experiments were carried out. For all solutions total Ag was held constant (10 nM) whereas  $\text{Cl}^-$  concentrations were 0.005 mM, 0.001 M, 0.002 M or 0.003 M;  $\text{Cl}^-$  was added as NaCl (ultrapure, EM Science). With the increase in  $\text{Cl}^-$ , free  $\text{Ag}^+$  decreased and  $\text{AgCl}^0$  increased.

Once the resin had been calibrated with respect to free  $\text{Ag}^+$ , titration experiments were performed to determine how much total Ag to add to obtain a desired free  $\text{Ag}^+$  concentration in the presence of natural DOM. Stock solutions of Suwannee River humic acid ( $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were prepared in a NaOH solution (0.01 M), left to agitate in the dark at room temperature for 24 h to ensure dissolution, and then filtered through  $0.4 \mu\text{m}$  polycarbonate filters. The SRHA stock solution was kept for a maximum of 14 days. The filtered stock solution was used to prepare the HA experimental solution (final pH = 7). The humic acid concentration was always approximately  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , yielding values of  $\sim 5 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$  dissolved organic carbon. Total Ag concentrations were

varied between 10 and 300 nM in a batch titration mode (1000 mL volume for each batch), and after 24 h equilibration at room temperature the solutions were analysed for free Ag<sup>+</sup> with the ion-exchange technique. The total <sup>110m</sup>Ag activity in the exposure solutions, and the activity of the solutions eluted from the resin, were counted on a Wallac 1480 gamma counter (window range: 329 – 987 keV) for 15 min to obtain an error < 1% (Perkin-Elmer Life Sciences, Turku, Finland).

#### *Ag uptake experiments*

For each alga and Ag concentration tested, the experimental procedures were identical. Algal cells were initially inoculated into a new, fresh and sterile medium and allowed to grow for 48 h to attain their mid-exponential growth phase. They were then harvested on 2- $\mu$ m polycarbonate filter membranes (47 mm diameter; Poretics) using a vacuum pressure of  $\leq$  10 cm Hg. Harvested cells were rinsed five times with 10 mL of sterile simplified culture medium (no trace metals, no phosphate) and resuspended in 10 mL of the same medium. Size distribution, average surface area and cell density were rapidly measured on this cell suspension using a Coulter Multisizer 3 particle counter (70  $\mu$ m orifice tube). These measurements were used to calculate the volume of the inoculum to be added to the prepared exposure solutions. The algal cells were then exposed to various experimental conditions for a short time period (see below). Short exposure durations minimise the possibility of cell division, which would increase cell density, and limit the release of metal-binding peptides that could affect silver

speciation in the exposure solution. Low cell densities were also used to minimise the impact of the algae on the exposure conditions: 10,000 cells·mL<sup>-1</sup> and 20,000 cells·mL<sup>-1</sup> for *C. reinhardtii* and *P. subcapitata*, respectively. For those experiments in which the algae were to be exposed to silver in the presence of humic acid, the algal cells were pre-exposed to a simplified culture solution containing 5 mg C·L<sup>-1</sup> of SRHA without Ag for 90 min prior to the uptake experiments. The objective was to acclimatize the cells to the DOM.

The uptake experiments were conducted in the laboratory under a low light regime and at an ambient temperature of 22 °C. The incubation flasks (250 mL) were placed on a rotary plate (80 rpm) to prevent settling of the algal cells. At the end of the incubation period, the cells were recovered on two superimposed polycarbonate filters (2 µm) and rinsed four times with 10 mL of simplified culture medium containing 100 nM non-radioactive Ag. The purpose of this rinse was to remove any <sup>110m</sup>Ag bound to the algal surface (Fortin and Campbell 2000, 2001). The <sup>110m</sup>Ag activity of each filter was then determined with a Wallac 1414 beta counter (window range: 1 – 1024 keV) for 10 min using Eco-Lume scintillation cocktail (ICN). Total counts after 10 min were sufficiently high to ensure a counting error < 2 %. Passive retention of radioactive silver by the polycarbonate filters was corrected for by counting the lower filter and subtracting its activity from that of the upper filter. Values were then normalized for the total surface area of the algae to facilitate the comparison between species that have different cell sizes. A minimum of three replicates was used unless otherwise noted.

Control and humic acid exposure experiments were conducted simultaneously using the same batch of algae to eliminate the effects of differences between algal generations. The filtrates of the exposure solutions containing humic acid were collected and the free  $\text{Ag}^+$  concentration was measured using the IET.

The experimental procedure was designed to determine the uptake of Ag by algal cells at different free silver concentrations, in either the presence or absence of SRHA, for a fixed time period (25 min). These experiments were carried out at nominal  $[\text{Ag}^+] = 10, 30$  and  $50 \text{ nM}$ . For the control solutions (no SRHA), the total Ag concentrations were very similar to the free silver concentrations (i.e., minimal silver complexation). The total Ag concentrations for the corresponding humic acid containing solutions were a  $100, 200$  and  $300 \text{ nM}$ . All experiments were conducted at a  $\text{pH} = 7 \pm 0.1$ .

## Results and Discussion

### *Silver speciation in the presence of DOM*

Suwannee River humic acid has a strong affinity for Ag (Fig. 1). The titration curve suggests metal binding to a ligand with two types of complexation sites (Mota and Correia dos Santos, 1995). The sites with a high binding strength for Ag will complex the metal first, whereas the weaker sites will be filled subsequently as the total Ag concentration increases. Based on the titration curve, the concentration of strong

binding sites is about 10 nmol Ag • mg C<sup>-1</sup>. Beyond this complexation capacity, the concentration of free Ag<sup>+</sup> increases more or less linearly as the dissolved Ag concentration increases from 50 to 300 nM. Note however that the slope of this part of the titration curve is not 1, but rather ~0.2, indicating the presence of a second class of weaker binding sites (log K ~ 5.7 ± 0.3).

Silver is a soft metal known to form very strong complexes with ligands containing reduced sulfur functional groups (log K=12-15), approximately 10<sup>10</sup> times stronger than for ligands with N or O donor groups (log K= 3-6, <2, respectively) (Bell and Kramer, 1999). Xia *et al.* (1998) showed that aquatic humic substances contained appreciable reduced organic S (thiols-sulfide), with 55% of the total S in SRHA present in reduced form. Even though these reduced sulfur functional groups are present at relatively low concentrations compared to O and C, they may play a disproportionate role in complexing soft trace metals present at trace concentrations (Smith *et al.*, 2002).

Many recent studies have suggested that reduced sulfur groups are involved in the binding of Ag to natural DOM. Schafer *et al.* (1998) studied the removal of Ag in publicly owned treatment works (POTWs) and its fate in the receiving waters downstream. Their results showed a strong linear relationship between effluent DOC and the fraction of “dissolved” Ag; 92% of this Ag was associated with colloidal particles (<0.4 μm). The properties of the colloids were not investigated, but the authors suggested the presence of sulfur, which is known to be present in high

concentrations in POTW effluents. The presence of colloidal Ag has also been linked to DOM by Wen *et al.* (2002), who collected river water samples at five sites in Colorado and noted that more than 60% of the silver passing a 0.1- $\mu\text{m}$  filter was associated with macromolecular organic matter. The percentage abundance of colloidal Ag was similar to that of dissolved organic carbon, suggesting that DOM plays a major role in determining Ag speciation. Herrin *et al.* (2001) also studied Ag speciation in natural surface waters, using a batch competing ligand approach, and demonstrated the presence of ligands with high affinity for Ag that allowed less than 10% of total dissolved Ag to associate with the Chelex resin. These ligands ( $[\text{L}] \sim 0.5 \text{ nM}$ ) were thought to be molecules containing thiol functionalities because of their high conditional stability constant ( $10^{14}$ - $10^{16}$ ).

Given the strong affinity of silver for natural DOM, and the low dissolved Ag concentrations normally encountered in the freshwater environment ( $< 1 \text{ nM}$ ), it is clear that very little free  $\text{Ag}^+$  should be present in typical surface waters. Can we thus conclude that silver will be unavailable to phytoplankton? To test this prediction, we have used the titration curve for SRHA (Fig. 1) to prepare exposure media in which the total silver concentration slightly exceeded the binding capacity of the strong sites, such that both free  $\text{Ag}^+$  and complexed Ag-DOM co-existed in solution. Silver uptake in these media was then compared to uptake in DOM-free media, over the same free  $\text{Ag}^+$  concentration range.

### *Influence of DOM on uptake*

Preliminary time-course experiments showed that silver uptake was readily measurable after an exposure period  $> 9$  min. We chose to measure intracellular Ag after a fixed time of 25 min. Uptake was measured over a range of 10 – 80 nM of free  $[Ag^+]$ . The results, as expected, showed an increase in intracellular Ag with increasing  $[Ag^+]$  (Fig. 2, series A). The absolute values determined after 25 min in the absence of DOM were similar to the values reported for this species by Fortin and Campbell (2000, 2001). The values for intracellular Ag as a function of  $[Ag^+]$  in the presence of SRHA (Fig. 2, series B) also increased. However, the response was above the control curve obtained in the absence of DOM. In other words, Ag uptake is greater than anticipated in the presence of SRHA.

The BLM predicts that metal uptake should remain the same in the presence or absence of a metal-complexing ligand such as DOM, provided that the free-metal ion concentration remains constant (Campbell, 1995). However, our results suggest an increase in uptake in the presence of SRHA. In our experiments, we had to add extra silver to the media containing DOM in order to maintain the free  $Ag^+$  concentration in the desired range. Thus, total  $[Ag]$  in the media with SRHA (series B) was higher than in the inorganic controls (series A) (e.g., when  $[Ag^+] = 40$  nM, total dissolved  $[Ag] \sim 215$  nM). Earlier work had showed that diffusion of Ag and its labile complexes from the bulk solution to the algal surface could under certain conditions be the rate limiting

step in Ag uptake by *C. reinhardtii* (Fortin and Campbell, 2000). For such conditions, increasing labile Ag species in the bulk solution would lead to a greater concentration gradient across the phycosphere, and an increased rate of supply of Ag to the algal surface. To determine if this was also occurring in the presence of labile Ag-DOM complexes, we repeated the experiments with a second algal species, *P. subcapitata*. Silver uptake by this species is slower than for *C. reinhardtii*, and in Ag-Cl systems there was no evidence for diffusional limitation of Ag uptake (Lee *et al.*, 2004).

*P. subcapitata* was exposed to free  $[Ag^+]$  over the range of 10 – 70 nM in the absence or presence of SRHA (Fig. 3, series A or B). Once again the results showed an increase in intracellular  $[Ag]$  in the presence of DOM. It follows that faster diffusion from the bulk solution to the algal surface cannot be invoked as the sole explanation for our greater than expected Ag uptake in the presence of DOM. We have considered three other possible explanations: (i) free  $[Ag^+]$  is underestimated in the media containing SRHA; (ii) our estimates of intracellular Ag include a contribution from a ternary surface complex (DOM-Ag-alga); (iii) the DOM affects the algal surface charge and increases the effective concentration of  $Ag^+$  close to the algal surface.

If our ion-exchange technique underestimates free  $[Ag^+]$  (X-axes in Figs. 2 & 3), the points corresponding to the series B (SRHA present) would be shifted to the right. However, the relatively shallow slope of the Ag uptake curve, and the natural tendency for these curves to reach a plateau as the exposure concentration increases, would

require an unrealistically high underestimate of the  $[Ag^+]$  to align all the points onto a single response curve.

Our estimate of intracellular silver is operationally defined. It is based on the use of an excess of non-radioactive Ag to remove all surface-bound Ag at the end of the 25 min exposure period. Preliminary tests with algal cells exposed to  $Ag^+$  in the absence of SRHA showed that this treatment removes surface-bound Ag effectively. It is possible that in the presence of natural DOM Ag may form a ternary surface complex (alga-Ag-DOM), and that the radioactive Ag bound in this manner does not exchange completely with the non-radioactive Ag during the isotopic exchange rinse.

A more probable explanation for our results would be that DOM interacts directly with the algal cell affecting its surface charge and/or membrane fluidity. Humic substances are natural surfactants because of their amphiphilic character and they tend to adsorb to natural surfaces (Campbell *et al.*, 1997). Vigneault *et al.* (2000) studied the effect of natural DOM on the permeability of *P. subcapitata* and reported that uptake of fluorescein diacetate at pH 5 by passive diffusion increased in the presence of Suwannee River humic substances, the effect being greater for humic acid than for fulvic acid. The adsorption of humic substances at the cell surface is influenced by pH. At neutral pH, the deprotonation of the cell surface increases electrostatic repulsion between the DOM and the algal surface (Parent *et al.*, 1996; Campbell, 1997). Nonetheless, even though the sorption of humic substances is less at pH 7 than at

lower pH values, we suspect they may still affect metal-membrane interactions at neutral pH.

A recent study conducted by Slaveykova et al. (2003) looked at the influence of SRFA on Pb uptake by green alga, *Chlorella kessleri*. They also observed a greater than expected metal uptake in the presence of natural DOM, and considered several possible explanations for such a trend. No contributions from labile or hydrophobic Pb-SRFA complexes were found, and direct biological effects on algal physiology were discounted. The authors suggest that changes in algal surface charge, due to the presence of adsorbed SRFA, could at least partly account for the greater than expected uptake of Pb. According to this mechanism, the algal surface would become more negatively charged as a result of the adsorption of DOM, and consequently the surface concentration of  $\text{Ag}^+$  would be higher than in the absence of DOM. As a result of these changes, the transporters involved in the uptake of cationic Ag would 'see' a higher concentration of free  $\text{Ag}^+$  and the silver uptake rate would increase in the presence of DOM. More speculatively, if the association of DOM at the algal surface affected membrane fluidity, it might also affect the affinity ( $K_m$ ) or maximum uptake rate ( $V_{\max}$ ) of the cation transporters involved in  $\text{Ag}^+$  uptake.

There is some precedent for greater-than-expected availability of metals, especially Cu, in the presence of natural DOM (Giesy *et al.*, 1983; Borgmann and Charlton, 1984; Winner, 1984; Erickson *et al.*, 1996). For Ag, a study by Bury *et al.* (1999) suggested that

LC<sub>50</sub> values for fathead minnows and rainbow trout were lower in the presence of HA than in an inorganic media when expressed as Ag<sup>+</sup>, but higher when based on total Ag. In other words, a given concentration of Ag<sup>+</sup> was more toxic in the presence of humic acid than in its absence. The authors suggested a direct interaction of Ag-DOC complexes at the gill surface.

### *Environmental implications*

Recent investigations of silver behavior in freshwater receiving environments, downstream from known anthropogenic sources (Kramer *et al.*, 1999; Schafer *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2002), indicate that dissolved Ag concentrations are normally less than 1 nM. At such environmental concentrations, Ag should be almost completely complexed by the dissolved organic matter present. Hence, in situ samples would tend to cluster in the lower left-hand sectors of Figures 2 and 3 (very low ambient free [Ag<sup>+</sup>]). At these extremely low values, the effects of the enhanced Ag bioavailability that we have demonstrated would be minimal. In other words, the Ag present in contaminated receiving waters would be bound by reduced sulfur-containing inorganic and organic ligands, and this decrease in bioavailability would mask the increase in uptake generated by the presence of DOM.

### **Acknowledgements**

This work was supported by research funds provided by Kodak Canada, the Canadian Network of Toxicology Centres, and the Natural Sciences and Engineering Research

Council of Canada. We thank V. Hiriart-Baer and C. Fortin for their helpful advice.

P.G.C. Campbell is supported by the Canada Research Chair Program.

## References

- Bell, R.A. and Kramer, J.R. 1999. Structural chemistry and geochemistry of silver-sulfur compounds: Critical review. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 9-22.
- Borgmann, U. and Charlton, C.C. 1984. Copper complexation and toxicity to *Daphnia* in natural waters. *J. Great Lakes Res.* **10**: 393-398.
- Buffle, J. 1988. *Complexation Reactions in Aquatic Systems: an analytical approach*. Ellis Horwood, Chichester, UK: pp. 1-692.
- Bury, N.R., Galvez, F., and Wood, C.M. 1999. Effects of chloride, calcium, and dissolved organic carbon on silver toxicity: Comparison between rainbow trout and fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 56-62.
- Campbell, P.G.C. 1995. Interactions between trace metals and organisms: critique of the free-ion activity model. *In Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. Edited by A. Tessier and D. Turner.* J. Wiley & Sons, Chichester, UK pp. 45-102.
- Campbell, P.G.C., Twiss, M.R., and Wilkinson, K.J. 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.* **54**: 2543-2554.
- Erickson, R.J., Benoit, D.A., Mattson, V.R., Nelson, H.P., and Leonard, E.N. 1996. The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 181-193.

- Fortin, C. and Campbell, P.G.C. 2001. Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: role of anion transporters in metal uptake. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 2214-2218.
- Fortin, C. and Campbell, P.G.C. 2000. Silver uptake by the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, in relation to chemical speciation: influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**: 2769-2778.
- Fortin, C. and Campbell, P.G.C. 1998. An ion-exchange technique for free-metal ion measurements ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ): applications to complex aqueous media. *Internat. J. Environ. Anal. Chem.* **72**: 173-194.
- Giesy, J.P., Newell, A.D., and Leverssee, G.J. 1983. Copper speciation in soft, acid, humic water: Effects on copper bioaccumulation by and toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae). *Sci. Total Environ.* **28**: 23-36.
- Gorsuch, J.W., Janssen, C.R., Lee, C.M. and Reiley, M.C. (Editors). 2002. Special Issue: The Biotic Ligand Model for Metals - Current Research, Future Directions, Regulatory Implications. *Comp. Biochem. Physiol.* **133C**: 1-343.
- Herrin, R.T., Andren, A.W., Shafer, M.M. and Armstrong, D.E. Determination of silver speciation in natural waters.1. Binding strength of silver ligands in surface freshwaters. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 1959-1966.
- Kramer, J.R., Adams, N.W.H., Manolopoulos, H., and Collins, P.V. 1999. Silver at an old mining camp, cobalt, Ontario, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 23-29.

- Kramer, J.R., Gaboury, B., Bowles, K.C., DiToro, D.M., Herrin, R.T., Luther III, G.W., Manolopoulos, H., Robillard, K.A., Schafer, M.M. and Shaw, J.R. Environmental Chemistry of Silver. *In* Silver in the Environment: Transport, Fate and Effects. *Edited by* A.W. Andren and T.W. Bober. SETAC Press, Pensacola, FL, USA. pp. 1-26.
- Lee, D.-Y., Fortin, C. and Campbell, P.G.C. 2004. Influence of chloride on silver uptake by two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**: 1012-1018.
- Macfie, S.M., Tarmohamed, Y. and Welbourn, P.M. 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **27**: 454-458.
- Martell, A.E., Smith, R.M. and Motekaitis, R.J. 2001. NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database, Ver 6.0. U.S. Department of Commerce, Gaithersburg, MD.
- Mota, A.M. and Correia dos Santos, M.M. 1995. Trace metals speciation of labile chemical species in natural waters: electrochemical methods. *In* Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. *Edited by* A. Tessier and D. Turner. J. Wiley & Sons, Chichester, UK pp. 205-258.
- Parent, L., Twiss, M.R. and Campbell, P.G.C. 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.

- Purcell, T.W. and Peters, J.J. 1998. Sources of silver in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**: 539-546.
- Schecher, W.D. and McAvoy, D.C. 1992. MINEQL+: a software environment for chemical equilibrium modeling. *Comput. Environ. Urban Syst.* **16**: 65-76
- Schafer, M.M., Overdier J.T., and Armstrong D. E. 1998. Removal, partitioning, and fate of silver and other metals in wastewater treatment plants and effluent-receiving streams. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**: 630-641.
- Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., Ceresa, A., and Pretsch, E. 2003. Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environ. Sci. Technol.* **37**: 1114-1121.
- Smith, D.S., Bell, R.A. and Kramer, J.R. 2002. Metal speciation in natural waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal bonding sites. *Comp. Biochem. Physiol.* **133C**: 65-74.
- Tipping, E. 2002. Cation binding by humic substances. Cambridge, UK.: Cambridge University Press; pp. 1-434.
- Thurman, E.M. 1985. Organic Geochemistry of Natural Waters. Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publishers (Kluwer Academic Publishers Group), Dordrecht, Netherlands.
- Vigneault, B., Percot, A., Lafleur, M., and Campbell, P.G.C. 2000. Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 3907-3913.

Wen, L-S., Santschi, P.H., Gill, G.A., and Tang, D. 2002. Silver concentrations in Colorado, USA, watershed using improved methodology. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**: 2040-2051.

Winner, R.W. 1984. The toxicity and bio-accumulation of cadmium and copper as affected by humic acid. *Aquat. Toxicol.* **5**: 267-274.

Xia, K., Weesner, F., Blears, W.F., Bloom, P.R., Skylberg, U.L. and Henke, P.A.. 1998. XANES studies of oxidation states of sulfur in aquatic and soil humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **62**: 1240-1246.

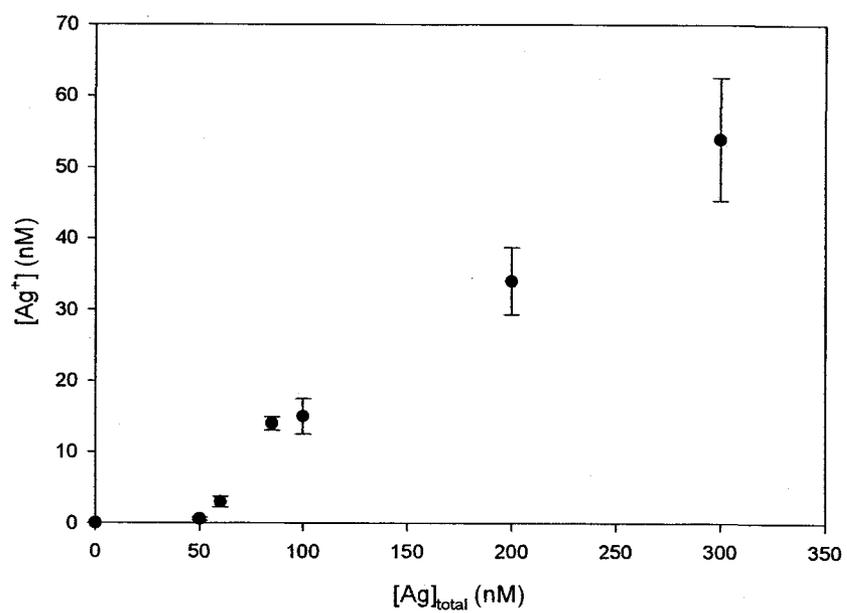


Figure 1 Titration curve for a Suwannee River humic acid solution ( $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) with Ag at pH 7 ( $n=4$ ).

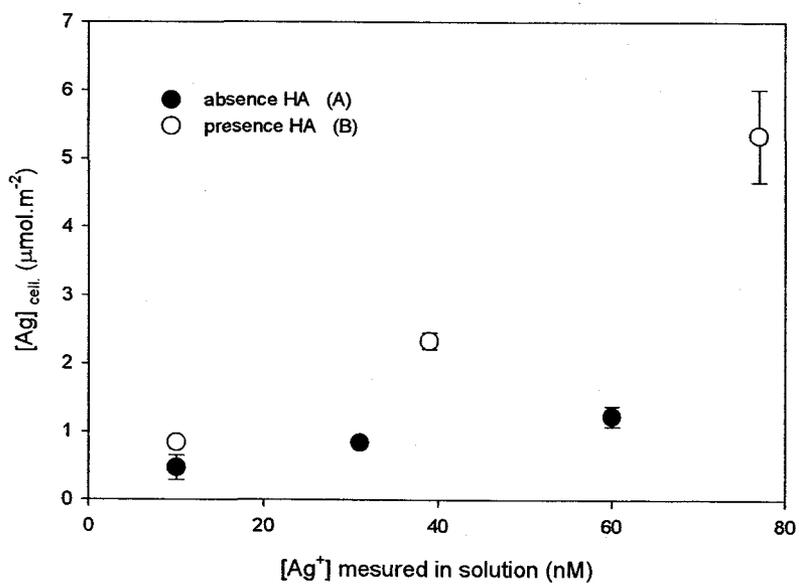


Figure 2 Ag uptake for *C. reinhardtii* for a fixed exposure period (25 min). Note that the X-axis refers to free Ag<sup>+</sup> concentrations as measured in the culture filtrates at the end of the exposure experiments.

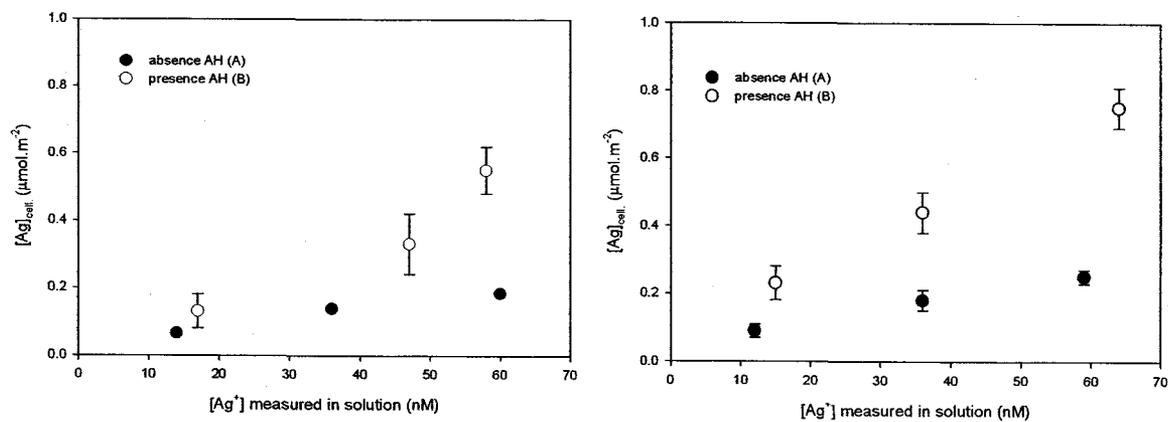


Figure 3. Ag uptake by *P. subcapitata* for a fixed exposure period (25 min). Note that the X-axis refers to free  $Ag^+$  concentrations as measured in the culture filtrates at the end of the exposure experiments. Each graph represents a separate experiment.



## 8 Annexes

---

### A-1: Protocole de la technique d'échange ionique

#### Préparation de la résine

##### 1. Préparation préliminaire

- Mettre à l'étuve la résine dans un contenant HDPE : 60°C pendant 24 h (réserver l'étuve à l'avance afin de la monopoliser pour éviter toute contamination)
- Mettre le tube rétractant et 2 supports poreux dans l'acide pour 24 h, rincer 7x avec de l'eau ultra-pure et sécher sous la hotte à flux laminaire
- Peser rapidement la résine (éviter l'humidité) avec la microbalance (7-8 mg)

**BIEN NOTER LE POIDS (VITAL POUR LES CALCULS)**

##### 2. Préparation de la colonne

- Une fois pesée, mettre dans un contenant de polystyrène (Dilu-Vial) propre avec de l'eau ultra-pure Milli-Q
- Insérer un support poreux dans le tube rétractant
- Chauffer (327°C) pour rétrécir le tube pour retenir le support
- Pipetter la résine dans la colonne
- Insérer le deuxième support poreux dans le tube à 3 cm du premier
- Recouvrir avec un papier d'aluminium la résine pour protéger de la chaleur
- Chauffer pour rétrécir le tube pour retenir le support
- Chauffer les extrémités de la colonne

## Dosage avec la TEI

La pompe péristaltique doit avoir les 4 leviers sur le haut fermés avant de commencer.

Placer le tuyau dans le deuxième levier à partir d'en haut.

### 1. Avant l'expérience

- i. Rincer la colonne avec  $\text{HNO}_3$  à vitesse réduite (cadran = 500) pendant 10 min
- ii. Rincer avec de l'eau à vitesse réduite pendant 10 min
- iii. Ajuster la vitesse à 5 ml/min (cadran = 900)

### 2. Étapes à suivre pour l'expérience

- Pomper de l'air (accès  $\text{HNO}_3$ ) pendant quelques minutes pour vider la colonne
- $\text{H}_2\text{O}$  4 min
- $\text{NaOH}$  2 min (régénère la résine d'ions  $\text{Na}^+$ )
- $\text{H}_2\text{O}$  4 min
- $\text{NaNO}_3$  2 min (équilibre le pH)
- $\text{NaNO}_3 + \text{Ag}^+$  volume nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre
- $\text{H}_2\text{O}$  15 sec
- Air seul vider
- $\text{S}_2\text{O}_3$ , lorsque atteint la colonne **réduire** la vitesse (**90 = 0.5 ml/min**) et collecter l'éluant dans HDPE de 4 ml (peser avant et après)

### 3. Après expérience

Voir partie 2 (avant expérience).

## **A-2: Protocole pour la prise en charge algale**

### **Pré-exposition**

- Récolter les algues en phase exponentielle par filtration
- Rincer 5x avec 10 mL de solution simplifiée
- Resuspendre dans 10 mL de milieu simplifié: mettre le filtre dans un tube Falcon et mélanger lentement
- **Rapidement** compter algues
  - a. 0,1 mL de solution « algale », 9,9 mL d'ISOTON
  - b. noter nombre de cellules et la surface moyenne
- Répartir les algues dans les flacons d'exposition

### **Exposition des algues**

Selon le design expérimental souhaité

### **Post-exposition des algues**

- Récolter les algues sur 2 filtres superposés
- Rincer 4x avec 10 mL de solution de rinçage simplifié avec de l'argent non-radioactif sur une période de 6 min
- Mettre un filtre par fiole de scintillation avec 5 mL de liquide de scintillation.

### A-3: Concentrations d'Ag dans les milieux d'exposition

Tableau A3.1. Concentrations d'Ag<sup>+</sup> (nM) et d'Ag dissous dans les solutions d'exposition de SRHA (5 mg C•L<sup>-1</sup>) mesurées avec la TEI et les concentrations d'Ag total (nM) et libre (nM) pour chaque expérience, regroupées par espèce algale.

Expérience	[SRHA] (mg C•L <sup>-1</sup> )	<i>C. reinhardtii</i>		<i>P. subcapitata</i>	
		[Ag <sup>+</sup> ]	[Ag] <sub>d</sub>	[Ag <sup>+</sup> ]	[Ag] <sub>d</sub>
1	0	10	10	9	9
	5	10	97	18	108
2	0	8	8	35	35
	5	11	104	26	106
3	0	33	33	32	32
	5	48	207	44	221
4	0	31	31	34	34
	5	75	214	62	231
5	0	59	59	57	57
	5	88	304	154	341
6	0	54	54	59	59
	5	128	298	117	346