

Université du Québec
INRS-Eau

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

Par
Robert L. Roy

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

31 mars 1997

AVANT-PROPOS

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

REMERCIEMENTS

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

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

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

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

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

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

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

RÉSUMÉ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

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

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

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

TABLE DES MATIÈRES

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

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