Etude expérimentale de la fixation du ^{226}Ra par une algue planctonique, *Scenedesmus obliquus*

Élément d'explication du rôle primordial
de la chaîne alimentaire dans la contamination des poissons

V. BRUNO*, J.-Y. GAL*, B. DESCAMPS **

(Manuscrit reçu le 4 novembre 1988)

RÉSUMÉ

Le radium 226, élément radiotoxique naturel, doit être examiné en regard de la radioprotection de la population critique. La consommation de poissons vivant dans l'environnement aquatique des sites miniers contribue, en particulier, au transfert du ^{226}Ra à l'homme; une consommation annuelle de 10 kg de ces poissons correspondrait au maximum à 1 ou 2 % de la limite de la dose population. L'étude du transfert dans un écosystème simplifié (eau, sédiment, algue planctonique, daphnie, gammaride, chironome, carpe) dont le dernier maillon est un poisson susceptible d'être consommé par l'homme (la truite) est envisagée dans le but de mettre en évidence l'importance de cette voie trophique. Ce travail concerne la contamination par l'eau du premier maillon concerné, une algue planctonique ubiquiste : *Scenedesmus obliquus*. On montre que la capacité de fixation du radium par cette algue est maximale en début de croissance et que, dans tous les cas (concentrations en radium dans le milieu comprises entre 360 et 36 000 Bq.l^{-1} et différents moments de contamination de la culture en fonction du stade de son développement), le facteur de concentration atteint, après une période de contamination de 15 jours, une valeur d'équilibre proche de 10 000.

ABSTRACT

Radium 226, one of the most radiotoxic elements, sets radiation protection problems for the critical population. The consumption of fish living in the aquatic environment of mines contributes to the radium transfer to man; the consumption of fish could reach 1 or 2 % of the committed dose equivalent. The study of the transfer in a simplified aquatic ecosystem (water, sediment, planctonic algae, daphnid, gammarid, midge larvae, carp, trout) should clearly reveal the importance of the trophic way. This work presents water-to-algae contamination of an ubiquist species: *Scenedesmus obliquus*. The results show that algae fixation capacity is maximum when culture growth starts; in any case (various radium concentration in medium and different times of contamination according to growth rate) water-to-algae concentration factors reach an equilibrium value near 10 000 after 15 days.

* Laboratoire de chimie analytique, Université des sciences et techniques du Languedoc, place E. Bataillon, 34060 Montpellier Cedex.

** Commissariat à l'énergie atomique, IPSN/DERS, Service d'études et de recherches sur l'environnement, Laboratoire de radioécologie des eaux continentales, 13108 St-Paul-lez-Durance Cedex.

I. INTRODUCTION

Dans la liste des radiotoxiques [3], le radium 226 est classé, avec deux de ses descendants appartenant comme lui à la famille radioactive de l'uranium 238 — le plomb 210 et le polonium 210 — dans le groupe I des éléments les plus radiotoxiques. Il se situe au début du cycle du combustible nucléaire, au niveau de l'extraction et du traitement du minerai d'uranium. La voie liquide est une des voies d'accès à l'homme qu'il faut prendre en considération; en effet, ^{226}Ra est rejeté, après contrôle, dans l'environnement aquatique avec les effluents liquides des stations de traitement en chlorure de baryum associées, en France, à chaque usine de traitement du minerai. L'ingestion de poissons vivant en aval de ces stations de traitement peut représenter jusqu'à 2 % de la limite de la dose population [5, 12, 17].

Deux études hydrobiologiques ont été menées sur deux sites miniers français: celui de Lodève de 1981 à 1985 [4] et celui du Forez en 1986 et 1987. La principale conclusion de ces deux études concerne le facteur de concentration global des poissons ⁽¹⁾; il est d'environ 80 pour les poissons vivant en rivière (site de Lodève) alors qu'il est compris entre 165 et 1 100 pour ceux vivant dans un plan d'eau fermé (site du Forez). Des études expérimentales ayant montré que le facteur de concentration direct de la carpe est de l'ordre de 10, il apparaît alors clairement que la voie principale de contamination des poissons pour ce radionucléide est la voie trophique, c'est-à-dire la suite, plus ou moins longue, des maillons alimentaires aboutissant à ce poisson.

Nous présentons les résultats expérimentaux relatifs à la contamination d'une algue verte planctonique, *Scenedesmus obliquus*; ce maillon primaire étant la base de la pyramide aboutissant, *in fine*, aux poissons carnivores. Ce travail expérimental a été réalisé dans un laboratoire spécialement conçu pour utiliser le radium 226.

II. LE RÔLE ESSENTIEL DE LA VOIE TROPHIQUE POUR LE TRANSFERT DU RADIUM 226 AUX POISSONS

La notion de facteur de concentration (FC) permet de comprendre et de quantifier les importances relatives des deux voies de transfert du radium aux poissons: la voie directe, mettant seuls en jeu les échanges eau/poisson au niveau des branchies, et la voie trophique prenant en compte la chaîne alimentaire. Le FC est le rapport entre l'activité spécifique du poisson (en Bq/kg frais) et l'activité spécifique de l'eau (en Bq/l). Les mesures avec des poissons vivant *in situ* permettent le calcul du FC global, relatif à

⁽¹⁾ Rapport entre l'activité spécifique des poissons *in situ* (Bq.kg^{-1} frais) et l'activité spécifique de l'eau (Bq.l^{-1}). Il a deux composantes: le facteur de concentration direct, relatif aux échanges par les branchies, et le facteur de concentration dû à l'alimentation (on parle aussi de facteur de transfert).

ces deux voies, alors que le calcul du FC direct nécessite des études expérimentales de laboratoire ou de terrain ⁽¹⁾. Le tableau I récapitule les facteurs de concentration – globaux et directs – obtenus sur les sites de Lodève et du Forez et au laboratoire. Il amène trois observations :

- le FC global est largement supérieur au FC direct,
- le FC global est plus grand dans un espace clos (Forez) qu'en rivière (Lodève),
- le FC global est variable d'une espèce à l'autre.

TABLEAU I

Facteurs de concentrations globaux et directs obtenus en France pour le radium 226 chez des poissons d'eau douce

Lieux Esp.	Facteur de concentration global obtenu sur le terrain			Facteur de concentration direct obtenu expérimentalement			
	Lodève		Forez	En laboratoire			In situ (Forez)
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Anguille	56	57					
Barbeau	100	25					
Chevesne	175	65					
Goujon	150	120					
Carpe			165	5	1	6	7
Tanche	205		1 090				14
Gardon			945				12
Perche			240				
Rotengle			200				
Truite							10

Teneurs en radium dans l'eau: (1): 0,01 Bq/l; (2): 0,1 Bq/l; (3): 1 Bq/l; (4): 3 Bq/l; (5): 35 Bq/l; (6): 2 000 Bq/l; (7): 1 Bq/l.

On émet l'hypothèse que ces trois observations doivent s'expliquer par le rôle prépondérant de la voie trophique. Il faut signaler que cette explication a déjà été avancée et démontrée pour ^{137}Cs [10, 15].

On a choisi d'étudier un écosystème simplifié type, compromis entre la diversité des écosystèmes et la difficulté de mise en œuvre expérimentale. Il comprend les maillons suivants: l'eau, le sédiment, une algue planctonique (*Scenedesmus obliquus*), un micro-crustacé de pleine eau (la daphnie), un crustacé à vie benthique (le gammare), une larve d'insecte vivant dans le sédiment (le chironome), un poisson omnivore très largement répandu (la carpe) et enfin un poisson ichtyophage (la truite). L'étude globale concernera 10 échanges; ils sont répertoriés sur la figure 1. Le paragraphe III est relatif à l'échange ②, entre l'eau et cette algue verte planctonique.

⁽¹⁾ Implantation de cages flottantes sur le site du Forez pendant deux mois: l'alimentation des poissons étant assurée par granulés, la contamination se fait uniquement par les branchies.

Fig. 1. — Transferts impliqués dans la contamination des poissons par la voie trophique.

III. ÉTUDE DU TRANSFERT DU RADIUM ENTRE L'EAU ET UNE ALGUE PLANCTONIQUE

III.1. Matériel et méthodes

III.1.1. Présentation du "laboratoire radium"

D'une surface de 40 m², ce laboratoire est ventilé et en dépression constante afin d'évacuer rapidement le radon et ses descendants à vie courte susceptibles de se fixer sur les aérosols. Les expériences ont été réalisées dans une boîte à gants, d'une surface utile de 1 m², elle aussi ventilée et en dépression par rapport à la pièce principale ⁽¹⁾. Le contrôle radiologique du laboratoire est double : contrôle du gaz radon par une chambre différentielle de type CD 43 et contrôle de l'activité des aérosols piégés sur filtre grâce à un appareil — le DADA — conçu et fabriqué par le service technique du Centre d'études nucléaires de Cadarache (STEC).

III.1.2. La culture d'algues

L'espèce utilisée, *Scenedesmus obliquus*, est une chlorophycée choisie en raison de son importance écologique : elle se trouve dans la plupart des cours d'eau [2,9] et le genre *Scenedesmus* représente à lui seul 90 % de la population planctonique d'eau douce [13]. Les cultures sont réalisées dans

(1) Les conditions de travail difficiles et la petite surface de travail utile limitent le nombre d'expériences réalisables en même temps ; un temps d'équilibre de 15 jours, nécessaire avant toute mesure de la radioactivité, renforce encore le caractère particulier d'une recherche sur le radium 226.

des erlenmeyers contenant 3 l de milieu LCO (norme AFNOR T-90-304 (1980) stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min. L'apport de CO_2 est assuré par un bullage d'air; une agitation constante avec barreau aimanté évite la décantation des algues. La température est maintenue à 24°C et l'éclairement est dispensé selon un photopériodisme de 16 h de jour et 8 h de nuit, l'intensité lumineuse étant de l'ordre de 2 500 lux. Le volume d'inoculum algal ajouté au milieu de culture est calculé de façon à avoir une concentration initiale voisine de $1,7 \cdot 10^5$ cellules/ml.

Le suivi de la croissance des algues peut être réalisé de plusieurs façons: numération cellulaire directe à la cellule de Malassez et indirecte par densité optique, croissance pondérale (poids frais et/ou poids sec) et dosage des pigments chlorophylliens. Pour des raisons pratiques, nous avons choisi la numération cellulaire directe.

III.1.3. La contamination des cultures

Le milieu de culture est contaminé à partir d'une solution de RaCl_2 de concentration connue (11 600 Bq/ml). Le radium ayant tendance, comme beaucoup d'autres radionucléides, à se fixer sur les parois des récipients [1,14] nous avons réalisé une étude préliminaire avec des erlenmeyers en polyéthylène recommandés par SEBESTA et al [14]. Il s'est avéré que le barreau aimanté décollait de fines particules préjudiciables à l'homogénéité de la culture. Une autre expérience avec du verre siliconé n'a pas été non plus satisfaisante à cause de la non reproductibilité, d'un récipient à l'autre, du pourcentage de radium fixé sur les parois. Finalement, nous avons utilisé des erlenmeyers en verre de 3 l.

III.1.4. Prélèvements, mesures et calculs réalisés

A partir de prélèvements de 50 ml de culture filtrés à $0,45 \mu\text{m}$ on mesure en spectrométrie γ Nal la radioactivité des algues retenues sur le filtre et des cinq tubes de 10 ml constitués par le filtrat. D'autre part, à partir d'une numération cellulaire directe, nous avons évalué le poids sec des algues en tenant compte de la courbe reliant le nombre de cellules et le poids sec. Ces valeurs permettent de calculer le facteur de concentration (FC) exprimé en fonction du poids sec. Il est le résultat du rapport de la concentration dans les algues (en Bq/kg sec) par la concentration dans le filtrat (en Bq/l), à un instant donné.

III.2. Résultats et discussion

III.2.1. Etude du transfert pour différentes concentrations en radium

Dans le but de tester l'influence éventuelle de la concentration en radium dans le milieu sur le FC, nous avons choisi de contaminer le milieu avec la gamme de concentrations suivantes: 360, 3 600 et 36 000 Bq/l. Radium et inoculum algal sont ajoutés simultanément dans le milieu.

Les résultats relatifs à la radioactivité des algues et du milieu pour chacune des trois concentrations sont donnés dans la figure 2.

Fig. 2. — Cinétique de contamination des algues et évolution de la concentration en radium dans le milieu. La radioactivité des algues est rapportée au volume de milieu qui les contenait et exprimée en Bq/l.

L'allure générale des deux types de courbes est comparable pour les trois expériences: la concentration en radium dans le milieu décroît pendant environ deux jours pour atteindre une valeur d'équilibre relativement constante alors que celle des algues atteint rapidement – un jour environ – une valeur comprise entre 30 et 40 % de la concentration initiale.

Dans les trois cas, le FC des algues, exprimé en fonction du poids sec, atteint rapidement – en 48 h environ – un maximum de l'ordre de 75 000 (fig. 3). Il diminue ensuite progressivement, car le radium fixé dans les premiers jours est ensuite réparti entre un nombre de cellules de plus en plus grand: c'est le phénomène de dilution biologique. Une valeur d'équilibre de l'ordre de 10 000 apparaissant vers le 20^e jour dans les trois expériences, on en déduit, pour la gamme de concentrations dans le milieu étudiée – de 360 à 36 000 Bq/l – que le FC est indépendant de la concentration en radium dans ce milieu.

Fig. 3. – Evolution du facteur de concentration des algues, en fonction du poids sec, pour 3 concentrations en radium du milieu.

Certains auteurs [6-7, 16] enregistrent des valeurs de FC dépendantes de la concentration en radium dans le milieu: ces valeurs sont comprises entre 6 500 et 1 000 pour des concentrations dans le milieu allant respectivement de 30 à 37 000 Bq/l. Leurs valeurs de FC, un peu plus faibles que les nôtres, pourraient s'expliquer par un protocole d'échantillonnage différent: ils séparent les algues du milieu par centrifugation alors que nous utilisons la filtration à 0,45 μm . Le choix judicieux de la vitesse de centrifugation pourrait alors leur permettre de séparer les algues des précipités sur lesquels des ions Ra^{2+} ont pu se fixer, alors que notre méthode ne le permet pas: nos chiffres seraient donc un peu surestimés. Les contraintes de radioprotection imposées dans notre laboratoire nous empêchent d'employer la méthode de centrifugation.

III.2.2. Etude du transfert du radium en fonction du stade de développement de la culture d'algues

Le but est de tester l'influence du stade de développement d'une culture au moment de la contamination sur la capacité de fixation du radium par l'algue. Ces stades sont choisis de façon à représenter les étapes successives de la croissance des cultures, observées lors des expériences préliminaires destinées à établir la courbe de croissance type. Quatre cultures de *Scenedesmus* sont contaminées à raison de 36 000 Bq/l aux stades suivants :

- en début de culture : radium et inoculum sont ajoutés simultanément (culture C_0) ;
- durant la phase exponentielle rapide, au 5^e jour (culture C_5) ;
- durant la phase exponentielle lente, au 12^e jour (culture C_{12}) ;
- durant la phase stationnaire, au 24^e jour (culture C_{24}).

Lors de la contamination des cultures, la numération directe a donné les résultats suivants : $1,7 \cdot 10^5$ cellules/ml pour C_0 , 10^6 cellules/ml pour C_5 , $2,5 \cdot 10^6$ cellules/ml pour C_{12} , $2,2 \cdot 10^6$ cellules/ml pour C_{24} . En raison de l'exigüité de la boîte à gants, nous n'avons pu contaminer de culture en phase de décroissance ou de dégénérescence.

Pour l'évolution des facteurs de concentration en fonction du temps, il apparaît deux types de courbes (fig. 4). Les FC relatifs aux cultures C_0 et C_5 présentent un maximum en début d'expérience suivi d'une phase de décroissance qui s'explique par le phénomène de dilution biologique décrit

Fig. 4. — Evolution du facteur de concentration, en fonction du poids sec, pour 4 cultures contaminées à différents stades de leur développement.

précédemment. Les deux autres courbes (C_{12} et C_{24}) subissent une évolution différente : la phase de montée est plus lente, plus faible, mais durable, ce qui implique qu'il n'y a pas de phase de décroissance. On peut donc dire que les cultures jeunes (C_0 et C_5) ont des capacités de fixation plus grandes que les cultures âgées (C_{12} et C_{24}).

Une expérience de décontamination à l'EDTA (solution 0,01N) des cellules après 14 jours de contamination pour la culture C_{24} et après 26 jours pour les trois autres cultures indique que seulement 15 à 30 % du radium, non extrait à l'EDTA, est absorbé par les cellules et/ou fortement lié aux parois cellulaires alors que le reste, extrait à l'EDTA, est adsorbé sur les parois des algues.

III. CONCLUSION

Une culture d'algues en début de croissance fixe rapidement et fortement le radium (le FC atteindrait une valeur de l'ordre de 75 000) ; la culture vieillissant, le FC diminue pour atteindre, vers 20 jours, une valeur proche de 10 000. La dilution biologique est responsable de cette évolution. Le niveau de contamination du milieu (360 à 36 000 Bq/l) ne semble pas influencer, ni en forme ni en valeur, la courbe d'évolution du FC.

On a vérifié l'importance de l'âge de la culture en réalisant des contaminations à différents moments de son évolution (temps 0, 5, 12 et 24 jours) : plus la contamination est tardive, plus le FC est faible.

Dans tous les cas, le FC atteint, après une quinzaine de jours de contamination, une valeur voisine de 10 000. Ce chiffre témoigne de l'importance du maillon primaire, constitué par les algues planctoniques, dans le transfert de ^{226}Ra dans l'écosystème aquatique d'eau douce, dont les poissons sont le maillon ultime.

En aval de sites miniers français, on a pu montrer que la consommation annuelle de 10 kg (200 g hebdomadaire) de ces poissons n'entraînerait, pour la population susceptible de les consommer, au plus que 1 à 2 % de la limite de la dose population (5 mSv).

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'un financement partiel par la CCE DG. XII (contrat B16-B037F).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BENES P., OBDZALEK M., CEJCHANOVA M. — The physicochemical forms of traces of radium in aqueous solutions containing chlorides, sulfates and carbonates. *Radiochem. Radioanal. Letters*, 1982, 50 (4) 227-242.
- [2] CAPBLANCK J., DAUTA A. — Phytoplankton et production primaire de la rivière Lot. *Ann. Limnol.*, 1978, 14 (1/2) 85-112.
- [3] COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES. — Directive du Conseil, du 15 juillet 1980, portant modification des directives fixant les normes de base relatives à la protection sanitaire de la population et des travailleurs contre les dangers résultant des rayonnements ionisants. *J. Off. Comm. Europ.*, 17 sept. 1980, L246, 73 p.
- [4] DESCAMPS B. — Etude radioécologique du complexe minier de Lodève (France) 1981-1985. Rapport CEA-R-5409, 1987, 98 p.
- [5] DESCAMPS B., BAUDIN-JAULENT Y. — Transfer of radium-226 to fish in the aquatic environment of a french mining complex: assessment of radiation dose to man. In: *The cycling of long-lived radionuclides in the biosphere: observations and models*, Madrid, 15-19 Sept. 1986. Luxembourg: Communautés européennes, 1987, vol. 2, 17 p.
- [6] HAVLIK B. — Radium in aquatic food chains: radium uptake by fresh water algae. *Radiat. Res.*, 1971, 46, 490-505.
- [7] HAVLIK B., HANUSOVA J. — The uptake of ^{226}Ra by planktonic algae under conditions of continuous cultivation. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 1979, 7, 145-152.
- [8] JEFFREE R.A., SIMPSON R.D. — An experimental study of the uptake and loss of radium-226 by the tissue of the tropical fresh-water *Velesunio angasi* (Sowerby) under varying Ca and Mg water concentrations. *Hydrobiologia*, 1986, 139, 59-80.
- [9] JONES F.H. — The dynamics of suspended algal populations in the lower Wye catchment. *Water Res.*, 1984, 38 (1) 25-35.
- [10] LAMBRECHTS A. — Essai de modélisation du transfert du césium 137 dans les compartiments d'un écosystème d'eau douce simplifié. Rapport CEA-R-5268, 1984, 181 p.
- [11] MUTH H., RAJEWSKY B., HANTKE J., AVRAND K. — The normal radium content and the $^{226}\text{Ra}/\text{Ca}$ ratio of various food, drinking water, and different organs and tissues of the human body. *Health Phys.*, 1960, 2, 239-245.
- [12] ROPES S.K., WHICKER F.W. — A field study of Ra accumulation in trout with assessment of radiation dose to man. *Health Phys.*, 1985, 49 (2) 247-257.
- [13] ROUND F.E. — *The biology of the algae*. London: E. Arnold, 1970.
- [14] SEBESTA F., BENES P., SEDLACEK J., HAVLIK B. — Studies on the source, distribution, movement and deposition of radium in inland waterways and aquifers. In: *The behaviour of radium in waterways and aquifers*, IAEA-TECDOC-301, Vienna (Austria): AIEA, 1984.
- [15] SOMBRE L., FOULQUIER L., MYTTENAERE C. — Simulation de la contamination d'un écosystème dulcicole par du radiocésium rejeté en conditions accidentelles. In: *Impact des accidents nucléaires sur l'environnement*. 4^e Symposium international de radioécologie de Cadarache, 14-18 mars 1988. Saint-Paul-lez-Durance: CEA, DERS-SERE, C99-C106.
- [16] STARY J., KRATZER K., PRASILOVA J. — The accumulation of barium, radium and lead in algae. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 1984, 84 (1) 17-21.
- [17] SWANSON S.M. — Food-chain transfer of U-series in a northern Saskatchewan aquatic system. *Health Phys.*, 1985, 49 (5) 747-770.