

Université du Québec  
INRS – Eau, Terre et Environnement

**EXPOSITION AUX MÉTAUX TRACES, TOXICITÉ ET BIOTURBATION CHEZ  
LES LARVES D'INSECTES AQUATIQUES *CHAOBORUS FLAVICANS*  
(DIPTERA) ET *HEXAGENIA LIMBATA* (EPHEMEROPTERA) : ÉTUDE DES  
ASPECTS COMPORTEMENTAUX**

Par  
Anne Gosselin  
(B.Sc. Biologie)

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

Jury d'évaluation

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Examineur externe        | Claude Rouleau<br>Institut Maurice-Lamontagne<br>Pêches et Océans Canada |
| Examineur interne        | Peter G.C. Campbell<br>INRS – Eau, Terre et Environnement                |
| Directeur de recherche   | Landis Hare<br>INRS – Eau, Terre et Environnement                        |
| Codirecteur de recherche | André Tessier<br>INRS – Eau, Terre et Environnement                      |

Février 2004



## AVANT-PROPOS

Ce mémoire de type «par articles» comporte deux parties distinctes. La première partie est constituée d'une synthèse de l'état des connaissances liées au sujet de recherche; cette partie comprend également une description de la problématique et des objectifs de la recherche effectuée, de même qu'un aperçu des méthodes, résultats et conclusions. La deuxième partie du mémoire est constituée de trois articles : un premier publié dans *Journal of the North American Benthological Society*, un deuxième publié dans *Environmental Toxicology and Chemistry* et le troisième en préparation pour soumission.

La contribution des auteurs des articles s'établit comme suit :

- 1) Gosselin, A. et L. Hare (2003). Burrowing behavior of *Chaoborus flavicans* larvae and its ecological significance. *J. N. Amer. Benthol. Soc.*, 22(4): 575-581.
- 2) Gosselin, A. et L. Hare (2004). Effect of sedimentary cadmium on the behavior of a burrowing mayfly (Ephemeroptera, *Hexagenia limbata*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(2): 383-387.

Anne Gosselin :  
- Conception du projet  
- Réalisation des expériences  
- Traitement des données  
- Rédaction initiale des articles

Landis Hare :  
- Conception du projet  
- Rédaction finale des articles

- 3) Gosselin, A., L. Hare, A. Tessier et L. Rancourt. Use of a novel microsensor for flow measurements in the burrows of small aquatic invertebrates. en préparation pour soumission

Anne Gosselin:  
- Conception du projet  
- Réalisation des expériences  
- Traitement des données  
- Rédaction initiale de l'article

Landis Hare :  
- Conception du projet  
- Rédaction finale de l'article

André Tessier :  
- Conception du projet  
- Rédaction finale de l'article

Lise Rancourt :  
- Contribution à la réalisation des expériences et au traitement des données



## REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement mon directeur de recherche, Landis Hare, pour ses conseils judicieux, sa grande disponibilité, son souci du détail et son enthousiasme perpétuel face à la découverte. Je remercie également mon codirecteur, André Tessier, pour ses conseils lors de l'élaboration de ce projet de recherche et pour ses précieux commentaires sur les différentes formes écrites issues du projet, soient la synthèse et les articles constituant ce mémoire.

Pour leur aide lors des sorties sur le terrain et pour leur contribution aux travaux de laboratoire et aux analyses chimiques, je tiens à remercier Pierre Marcoux, de même que Louis Croisetière, Jord Orvoine, René Rodrigue, Pauline Fournier, Michèle G. Bordeleau, Lise Rancourt, Céline Porcher, Stéphane Picher, Annick Michaud et Alexandre Poulain.

Pour ses précieuses explications et le partage de son expérience relativement aux études comportementales des «bibittes», je remercie particulièrement Céline Gallon. Des conseils techniques grandement appréciés m'ont également été donnés par Marie-Noële Croteau, Louis Croisetière, Anik Giguère, Janick Lalonde et José Sarica.

Finalement, merci à mes collègues de travail et amis qui ont rendu mémorable ce séjour à la maîtrise : Alexandre pour sa complicité et son soutien ainsi que Amiel, Céline, François, Gérald, Guillaume, Renaud, Simon et compagnie pour leur inclination à prendre la vie du bon côté.

Ce projet de recherche a été rendu possible grâce au support financier du Metals in The Environment Research Network, du Fonds québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec et du Chapitre Saint-Laurent SRA-SETAC.



## RÉSUMÉ

Les activités anthropiques perturbent le cycle des métaux dans l'environnement et sont à l'origine de leur présence à des concentrations élevées dans les milieux aquatiques. Dans ces milieux, les métaux peuvent être accumulés à divers degrés par les organismes vivants, en partie selon leur exposition relative aux compartiments «colonne d'eau» et «sédiments» d'un lac ou d'une rivière. Une fois accumulés, les métaux ont le potentiel d'induire divers effets toxiques chez les organismes. Par ailleurs, les activités de bioturbation et de bioirrigation des animaux peuvent influencer les flux de métaux à l'interface sédiment-eau. Ces divers aspects (exposition, toxicité et accumulation) ont été étudiés dans ce mémoire en mettant l'accent sur le comportement animal.

L'exposition potentielle aux métaux sédimentaires de la larve migratrice *Chaoborus flavicans* (Diptera) et la bioturbation des sédiments par cette larve ont été évaluées en utilisant deux techniques soient une caméra vidéo sensible aux rayons infrarouges et une caméra pour la radiographie. Le jumelage de ces techniques a permis d'observer que les larves s'enfouissent dans la zone anoxique des sédiments et qu'elles sont de ce fait potentiellement exposées aux métaux traces s'y trouvant, ainsi qu'à d'autres composés d'importance écologique. De plus, les larves ont un impact non négligeable sur le mélange des sédiments superficiels.

L'effet d'un métal, le cadmium, sur le comportement de la nymphe fousseuse *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera) a été étudié en utilisant les deux types de caméras mentionnées ci-dessus. Il a été montré que ce métal, à des concentrations semblables à celles mesurées dans les lacs en région minière, n'a pas d'effet sur le comportement des nymphes, autant au niveau de l'intensité de leur activité fousseuse qu'au niveau du temps alloué à chacune de leurs activités comportementales.

La bioirrigation des sédiments attribuable à l'activité de *Hexagenia limbata* a été quantifiée à l'aide d'un nouveau microsenseur permettant de mesurer de faibles courants d'eau circulant dans des micro-environnements, tel le tunnel d'un invertébré comme *H. limbata*. Cette espèce a le potentiel d'influencer substantiellement les flux d'éléments à travers l'interface sédiment-eau.





# TABLE DES MATIÈRES

|  |           |
|--|-----------|
| AVANT-PROPOS.....  | III       |
| REMERCIEMENTS .....  | V         |
| RÉSUMÉ .....   | VII       |
| TABLE DES MATIÈRES.....  | IX        |
| LISTE DES FIGURES .....  | XI        |
| <b>1. INTRODUCTION.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 LES MÉTAUX TRACES DANS LES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES.....   | 1         |
| 1.2 INTERACTIONS ENTRE LE COMPORTEMENT ET LES MÉTAUX .....   | 3         |
| 1.2.1 <i>Exposition aux métaux</i> .....   | 3         |
| 1.2.2 <i>Effets des métaux sur le comportement</i> .....   | 3         |
| 1.2.3 <i>Bioturbation et biogéochimie des métaux</i> .....   | 5         |
| 1.3 LES INSECTES CHAOBORUS ET HEXAGENIA .....  | 6         |
| 1.3.1 <i>Le diptère Chaoborus flavicans</i> .....  | 6         |
| 1.3.2 <i>L'éphémère Hexagenia limbata</i> .....  | 8         |
| 1.4 PROBLÉMATIQUES DE RECHERCHE.....   | 9         |
| <b>2. LE COMPORTEMENT FOUSSEUR DE LA LARVE CHAOBORUS FLAVICANS ET SA SIGNIFICATION ÉCOLOGIQUE.....</b>                     | <b>11</b> |
| 2.1 OBJECTIFS .....  | 11        |
| 2.2 MÉTHODES.....  | 11        |
| 2.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION .....  | 12        |
| <b>3. EFFET DU CADMIUM SÉDIMENTAIRE SUR LE COMPORTEMENT DE HEXAGENIA LIMBATA .....</b>                                     | <b>15</b> |
| 3.1 OBJECTIFS .....  | 15        |
| 3.2 MÉTHODES.....  | 15        |
| 3.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION .....  | 16        |
| <b>4. MESURE DU COURANT D'EAU DANS LES TUNNELS CREUSÉS PAR HEXAGENIA LIMBATA EN UTILISANT UN NOUVEAU MICROSENSEUR.....</b> | <b>19</b> |
| 4.1 OBJECTIFS.....   | 19        |
| 4.2 MÉTHODES.....  | 19        |
| 4.2.1 <i>Microsenseur</i> .....  | 19        |
| 4.2.2 <i>Calibration du microsenseur</i> .....   | 20        |
| 4.2.3 <i>Mesure du courant dans le tunnel d'Hexagenia</i> .....  | 20        |
| 4.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION .....  | 21        |
| <b>5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>   | <b>23</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>6. ARTICLE #1 .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>7. ARTICLE #2 .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>8. ARTICLE #3 .....</b>   | <b>79</b> |



## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1.</b> <i>Chaoborus flavicans</i> , immobile au-dessus des sédiments.....   | 7  |
| <b>Figure 2.</b> a) Nymphes de l'éphémère <i>Hexagenia limbata</i> et b) tunnel creusé dans le sédiment par celle-ci.....         | 8  |
| <b>Figure 3.</b> Vue schématique de l'intérieur de l'extrémité du microsenseur utilisé pour mesurer les vitesses de courants..... | 19 |



# **1. INTRODUCTION**

---

## **1.1 Les métaux traces dans les écosystèmes aquatiques**

Les activités humaines perturbent grandement le cycle des métaux dans l'environnement. Plus particulièrement, la production pyrométallurgique des métaux non ferreux constitue une source majeure d'émissions atmosphériques de métaux tels le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn) [Nriagu et Pacyna 1988]. Les retombées atmosphériques représentent un apport important de ces métaux pour les écosystèmes aquatiques où ils sont principalement associés à la phase solide des sédiments. En effet, de fortes concentrations de métaux sont mesurées dans les sédiments des lacs situés dans des régions minières comme Rouyn-Noranda (Québec) et Sudbury (Ontario) [Arafat 1985; Paquin et Prairie 1996; Hare et Tessier 1998].

Certains de ces métaux (ex. : Cu et Zn) sont essentiels au métabolisme des organismes vivants, alors que d'autres (ex. : Cd), sauf exception, n'ont aucune fonction biologique connue. Dans les deux cas, les métaux entraînent des effets délétères lorsque la quantité accumulée par un organisme excède sa capacité de détoxification ou d'excrétion [Chapman et Wang 2000; Leland et Kuwabara 1985]. Cette capacité à détoxifier les métaux dépend de divers mécanismes, tels liaison des métaux à des protéines de faible poids moléculaire ou séquestration des métaux à l'intérieur de granules. Parmi les métaux non essentiels, le Cd est reconnu comme étant l'un des plus toxiques. Une pléiade d'effets létaux et sous létaux dus au Cd ont été documentés pour de nombreuses espèces aquatiques [Wright et Welbourne 1994], justifiant sa présence sur la liste des substances prioritaires d'Environnement Canada.

Le suivi du niveau de contamination en métaux des écosystèmes aquatiques de même que l'évaluation de leurs effets sur le biota peut se faire par diverses approches. En ce qui concerne le niveau de contamination, il peut être déterminé soit en mesurant les concentrations en métaux dans l'eau et les sédiments, soit en mesurant la concentration en métaux dans un organisme choisi. S'il existe une relation entre la concentration en métaux dans l'organisme et celle dans le milieu environnant (eau ou sédiments), il devient alors

possible d'utiliser cet organisme comme biomoniteur. Afin d'établir une telle relation de façon mécanistique plutôt qu'empirique, il est utile de connaître le compartiment à partir duquel les animaux accumulent les métaux, c'est-à-dire soit la colonne d'eau, soit les sédiments, ou les deux. Ces deux compartiments comprennent des métaux autant en phase dissoute qu'en phase particulaire. De plus, il est important de connaître les voies d'entrée des métaux dans l'animal à l'étude, comme par exemple l'ingestion de nourriture riche en métaux et/ou la prise en charge de métaux via les organes respiratoires (branchies, peau, etc.). Un exemple de biomoniteur est la larve du diptère *Chaoborus punctipennis* [Hare et Tessier 1996; Croteau et al. 1998] pour laquelle la principale source d'accumulation du cadmium présent dans la colonne d'eau est la consommation de proies zooplanctoniques [Munger et Hare 1997]. L'accumulation des métaux par cet insecte lorsqu'il séjourne dans le compartiment sédimentaire est moins bien connue.

Pour ce qui est de l'évaluation des effets des métaux sur le biota, ceux-ci sont surtout mesurés en laboratoire par le biais de tests de toxicité réalisés sur l'eau ou les sédiments, dans des conditions standardisées et en utilisant des espèces prédéterminées. Actuellement, la plupart des tests mesurent des réponses sévères (ex. : mortalité et baisse de croissance) suite à des expositions de courte durée au(x) contaminant(s), alors que peu de tests existent afin de mesurer des réponses associées à une toxicité chronique [Burton 1991; Leland et Kuwabara 1985]. Un exemple de test communément utilisé pour évaluer la toxicité des sédiments est celui réalisé avec les nymphes de l'éphémère *Hexagenia limbata* [Burton 1991; Ingersoll 1995]; les critères d'effets mesurés dans ce test sont la croissance et la survie des individus. Ce test est entre autres utilisé dans le cadre de l'application du Sediment Quality Triad [Borgmann et al. 2001], une procédure d'évaluation des sédiments composée de trois volets, soient des analyses chimiques du sédiment, un examen de la composition des communautés benthiques et des mesures de la toxicité du sédiment par le biais d'essais standardisés [Chapman 1990].

## 1.2 Interactions entre le comportement et les métaux

### 1.2.1 Exposition aux métaux

Tel que mentionné précédemment, les animaux peuvent accumuler les métaux à partir des deux compartiments d'un lac, soient la colonne d'eau et les sédiments. Ainsi, les animaux accumulent les métaux selon qu'ils sont plus ou moins en contact avec l'un ou l'autre de ces compartiments. Dans le cas des animaux prédateurs, leurs proies accumulent elles-mêmes leurs métaux selon leur exposition relative aux compartiments sus mentionnés. Ceci dit, le comportement des animaux peut influencer grandement leur degré d'exposition à ces compartiments, et donc aux métaux qui s'y trouvent.

Pour le compartiment sédimentaire, compte tenu que les concentrations en métal dissous peuvent différer grandement entre l'eau interstitielle anoxique et l'eau oxique normalement retrouvée dans la colonne d'eau et dans les premiers millimètres sous l'interface sédiment-eau, l'exposition relative des animaux benthiques à ces deux sources dépend de certains aspects de leur comportement tels leur profondeur d'enfouissement, leur rythme de fouissage, le taux d'irrigation de leur tunnel et leur mode d'alimentation [Warren et al. 1998]. Par exemple, le biomoniteur *Chaoborus* s'enfouit dans les sédiments durant le jour afin d'échapper aux prédateurs. Selon sa profondeur d'enfouissement et selon qu'il irrigue ou non un tunnel, la larve sera plus ou moins exposée aux métaux présents dans l'eau surnageante et dans l'eau interstitielle oxique et anoxique. Ces aspects du comportement de *Chaoborus* dans les sédiments sont peu documentés.

### 1.2.2 Effets des métaux sur le comportement

Les changements comportementaux peuvent représenter les toutes premières réponses d'un organisme suivant son exposition à un contaminant [Rand 1985]. De ce fait, ces réponses ont le potentiel d'être beaucoup plus sensibles que les critères aigus, telle la mortalité, et peuvent ainsi servir d'indicateurs précoces d'effets toxiques. Par ailleurs, les changements comportementaux causés par les contaminants sont susceptibles d'affecter le *fitness* global

d'un individu, compromettant à long terme sa capacité à se maintenir dans un environnement pollué [Wiederholm 1984].

Le Cd a été rapporté à quelques reprises dans la littérature comme causant des modifications comportementales chez des invertébrés marins et d'eau douce. McGreer [1979] et Pynnönen [1996] ont observé, respectivement, que l'activité fouisseuse du bivalve *Macoma balthica* et de l'isopode *Saduria entomon* était inhibée par le Cd présent dans des sédiments contaminés. De plus, l'isopode évitait ces sédiments lorsque confronté à ceux-ci de même qu'à des sédiments témoins. Chez les insectes, des patrons comportementaux anormaux ont été observés par Heinis et al. [1990] pour des larves de chironomides exposées au Cd dissous. Gerhardt [1990] a quant à lui rapporté une diminution de l'activité locomotrice chez l'éphémère *Baetis rhodani* en présence de Cd dans l'eau d'exposition; cependant, l'autre espèce étudiée dans cette expérience (*Leptophlebia marginata*) ne manifestait aucun effet.

D'autres études indiquent toutefois que le Cd peut demeurer sans effet pour les animaux. Ainsi, Olla et al. [1988] n'ont observé aucune différence significative entre des polychètes non contaminés et contaminés en Cd relativement à leur activité de fouissage et à leur comportement d'alimentation, et ce pour des concentrations en Cd sédimentaire susceptibles d'être mesurées dans des environnements marins pollués. En milieu lacustre, des larves de chironomides ont colonisé des sédiments fortement contaminés en Cd avec la même abondance que des sédiments témoins [Hare et Shooner 1995]. Cette observation fut répétée pour de nombreuses autres larves d'insectes (dont *H. limbata*) et pour un amphipode [Warren et al. 1998; Hare et al. 2001].

Les nymphes de l'éphémère *Hexagenia* vivent dans des tunnels qu'elles creusent dans les sédiments. Elles se nourrissent de la matière organique présente dans les sédiments et accumulent de cette façon le Cd, et d'autres métaux, qui y sont associés comme en témoignent les fortes concentrations en métaux mesurées dans son tractus intestinal [Hare et al. 1991]. Les nymphes présentent donc un fort potentiel d'accumulation du Cd sédimentaire et sont de ce fait sujettes à en subir les effets délétères. Aucune étude portant



sur l'effet direct du Cd (ou d'un autre métal) sur le comportement des nymphes de ce genre n'a été réalisée jusqu'à ce jour.

### 1.2.3 Bioturbation et biogéochimie des métaux

Le terme «bioturbation» réfère à la perturbation du sédiment sous l'action d'organismes benthiques. Ceux-ci, de par leurs déplacements et leurs activités d'alimentation et de fouissage, provoquent le mélange, aussi bien vertical qu'horizontal, des sédiments. À cela peut être ajoutée leur activité de bioirrigation, laquelle modifie également le sédiment notamment en ce qui a trait aux phénomènes de diffusion et d'oxydo-réduction. De façon plus spécifique, la présence des animaux benthiques peut entraîner le retour à l'interface sédiment-eau de sédiments enfouis, de concert avec les contaminants y étant associés, et l'enfouissement partiel de sédiments superficiels (et des contaminants associés). De plus, les sédiments récemment déposés peuvent être resuspendus par l'activité de certains animaux. Les animaux fouisseurs permettent également le prolongement vertical de la zone oxygène sous la surface des sédiments de par l'irrigation des tunnels qu'ils creusent. Cela contribue à augmenter la surface de contact sédiment-eau, et modifie de ce fait le flux des éléments majeurs et des éléments traces.

De nombreux exemples tirés de la littérature illustrent comment les animaux benthiques influencent la biogéochimie des sédiments. Aller et Yingst [1978] ont observé une mobilisation du Fe, du Mn et du Zn dans la paroi des tunnels construits par le polychète *Amphitrite ornata*, cela en grande partie dû à l'intense activité de décomposition s'y déroulant. Étudiant également des polychètes, Davey et al. [1990] ont mesuré de plus fortes concentrations dissoutes de Fe, Mn, Cu,  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{NO}_2^-$ , mais de plus faibles concentrations de Ni et Cd, dans l'eau qui était expulsée des tunnels par les vers comparativement à l'eau échantillonnée au-dessus de sédiments non perturbés. En eau douce, les oligochètes, les larves de chironomides et les bivalves unionides augmentent les flux d'ammonium, bicarbonate, nitrate, chlorure et silice des sédiments vers l'eau surnageante [Matisoff et al. 1985; Soster et al. 2001].

Dans le but de quantifier la bioirrigation ainsi que le flux des éléments à travers la paroi des tunnels, il est utile de connaître le débit d'eau circulant dans ces tunnels. Très peu de connaissances existent à ce sujet pour les invertébrés d'eau douce. Ceci est attribuable en partie aux faibles dimensions de leurs tunnels et aux faibles déplacements d'eau dans leur tunnel en termes de vitesse de courant. En effet, les sondes qui existent actuellement pour mesurer les courants circulant dans les tunnels (ex. : thermistors et sondes électromagnétiques) sont impossibles à utiliser pour étudier les invertébrés de petite taille à cause de leur manque de sensibilité, de leur grand format et de la nécessité à utiliser un tunnel artificiel sur lequel elles peuvent être connectées.

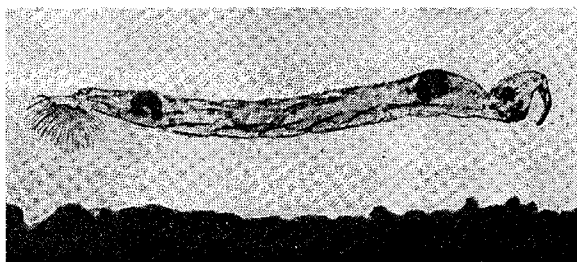
Les nymphes de *Hexagenia limbata* sont abondantes dans plusieurs lacs nord-américains et sont reconnues comme étant d'important agents de bioturbation des sédiments de par leur activité de fouissage [Charbonneau et Hare 1998]. De plus, elles irriguent de façon quasi continue les tunnels qu'elles creusent [Wang et al. 2001]. Elles sont donc susceptibles d'influencer fortement les processus biogéochimiques se déroulant au niveau des sédiments, et du même coup le cycle des contaminants, dont les métaux, s'y retrouvant. Il serait intéressant de quantifier la bioirrigation due à cette espèce afin d'estimer son impact sur la géochimie des sédiments.

## **1.3 Les insectes *Chaoborus* et *Hexagenia***

### **1.3.1 Le diptère *Chaoborus flavicans***

Les larves appartenant au genre *Chaoborus* (ordre Diptera) sont les plus communes parmi les insectes planctoniques. Elles habitent les étangs, les lacs et les cours d'eau d'ordre élevé. Elles se tiennent à l'horizontale dans la colonne d'eau et saisissent, à l'aide de leurs antennes préhensiles, les proies zooplanctoniques qu'elles détectent dans leur environnement immédiat. Elles sont elles-mêmes la proie de nombreuses espèces de poissons dont elles évitent la prédation en étant presque totalement transparentes (sauf pour les sacs à air) (Figure 1), ainsi qu'en effectuant des migrations verticales journalières. Ces migrations sont possibles grâce à l'ajustement du volume d'air contenu dans leurs sacs à

air, lesquels permettent aux larves de contrôler leur flottabilité [Wallace et Anderson 1996]. Les larves montent dans la colonne d'eau durant la nuit afin de se nourrir de zooplancton et la plupart des espèces (dont *C. flavicans*) regagnent le fond du lac (l'hypolimnion ou les sédiments) durant le jour afin d'échapper aux poissons. Les principaux facteurs régulant ces migrations sont l'intensité de la lumière, la concentration en oxygène et la présence de substances excrétées par les poissons [Teraguchi et Northcote 1966; LaRow 1970; Tjossem 1990].

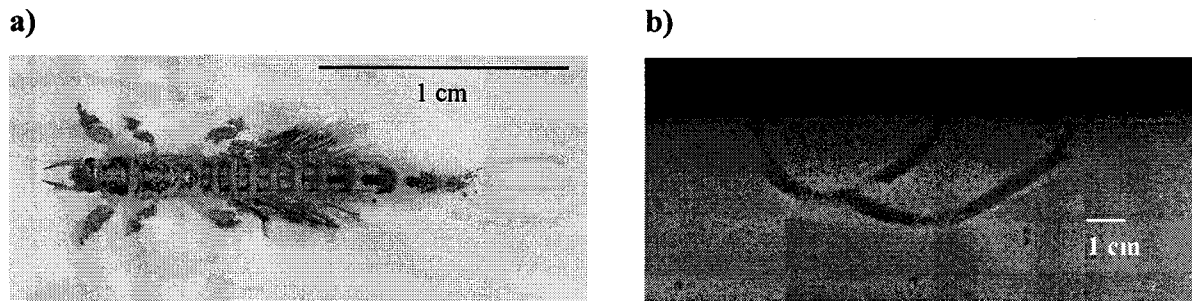


**Figure 1.** *Chaoborus flavicans*, immobile au-dessus des sédiments ([Jónasson 1972]). Les deux sacs à air (points noirs aux extrémités) permettent à la larve de contrôler sa flottabilité.

Tel que mentionné précédemment, des éléments du comportement de *C. flavicans* au niveau du compartiment benthique demeurent mal connus. En effet, le mouvement d'entrée des larves dans les sédiments, de même que le mouvement de sortie, ne sont pas décrits dans la littérature. Pourtant, ces mouvements journaliers à travers l'interface sédiment-eau ont le potentiel de jouer un rôle non négligeable en termes de bioturbation, particulièrement pour les plans d'eau supportant de fortes densités de larves. Le mélange des sédiments superficiels qui pourrait être occasionné par les larves migratrices modifierait de façon plus ou moins importante, selon l'ampleur de la perturbation, les flux d'éléments de même que le potentiel redox à l'interface sédiment-eau. Par ailleurs, les larves, une fois enfouies, sont plus ou moins exposées aux conditions physico-chimiques de l'eau interstitielle anoxique, dépendamment de leur comportement. En effet, les larves seront plutôt exposées à l'eau surnageante si elles irriguent un tunnel les reliant à ce compartiment. Elles seraient alors en contact avec l'oxygène de la colonne d'eau et ne seraient pas exposées aux concentrations parfois élevées de sulfure d'hydrogène et de métaux mesurées dans l'eau interstitielle anoxique.

### 1.3.2 L'éphémère *Hexagenia limbata*

Bien que l'adulte de l'éphémère *Hexagenia* ne vive qu'à peine quelques jours, le stade larvaire peut quant à lui durer jusqu'à deux ans selon la température du milieu. Les larves aquatiques des insectes hémimétaboles comme *Hexagenia* (Figure 2a) sont couramment appelées «nymphes» étant donné leur haut niveau d'adaptation à la vie sub-aquatique. Les nymphes creusent des tunnels dans les sédiments littoraux des habitats lentic et lotique (Figure 2b) et elles sont répandues et abondantes dans plusieurs de ces habitats en Amérique du Nord. Elles sont toutefois absentes des plans d'eau fortement eutrophisés en raison de leur grande sensibilité à l'hypoxie [Winter et al. 1996]. Du fait qu'elles irriguent fréquemment leurs tunnels à l'aide de leurs branchies, les nymphes sont considérées par certains entomologistes comme ayant adopté un mode d'alimentation de type «filtreur» [Brittain 1982]. Cependant, d'autres les considèrent comme étant des «collecteurs – rassembleurs» [Edmunds et Waltz 1996]. Elles se nourrissent de détritus riches en matière organique et peuvent ingérer quotidiennement jusqu'à l'équivalent de leur poids corporel sec [Zimmerman et Wissing 1980]. Dans plusieurs plans d'eau, elles représentent la principale source de nourriture des poissons [Hunt 1953].



**Figure 2.** a) Nympe de l'éphémère *Hexagenia limbata* et b) tunnel creusé dans le sédiment par celle-ci. (photo et radiographie prises dans le laboratoire de l'INRS-ETE)

Comme il a déjà été dit, les nymphes de *H. limbata* sont des agents importants de bioturbation des sédiments [Charbonneau et Hare 1998]. De plus, elles sont utilisées pour un test de toxicité dans lequel des effets extrêmes tels la mortalité et la réduction de croissance sont mesurés. Des effets sous létaux plus subtils pourraient toutefois se

manifester de façon plus précoce chez les nymphes et affecter ainsi à long terme leur succès de survie et de croissance ou leur rôle au niveau de la bioturbation, par exemple.

## 1.4 Problématiques de recherche

Une première problématique de ce mémoire consistait, d'une part, à décrire l'exposition relative des larves de l'espèce *Chaoborus flavicans* aux compartiments sédiments vs eau surnageante en décrivant leur profondeur d'enfouissement et en vérifiant la présence d'un tunnel potentiellement bioirrigué. D'autre part, ce volet visait également à documenter le comportement d'enfouissement (et de sortie) des larves dans les sédiments et d'en quantifier l'importance en termes de bioturbation.

La deuxième problématique de ce mémoire était d'évaluer l'effet d'un métal, le Cd, sur le comportement fouisseur des nymphes de l'espèce *Hexagenia limbata*. Ce critère d'effet a été choisi étant donné son importance aux niveaux individuel et écosystémique. Quant au métal Cd, il a été choisi pour sa grande toxicité.

La troisième problématique du mémoire visait d'abord à utiliser et calibrer un nouveau microsenseur (récemment disponible sur le marché) permettant de mesurer de faibles vitesses de courants d'eau, puis d'appliquer cette technique dans le but de quantifier la bioirrigation engendrée par une espèce benthique active à ce chapitre, soit, à nouveau, la nymphe de l'éphémère *Hexagenia limbata*.



## 2. LE COMPORTEMENT FOUISSEUR DE LA LARVE *CHAOBORUS FLAVICANS* ET SA SIGNIFICATION ÉCOLOGIQUE

---

### 2.1 Objectifs

Trois objectifs spécifiques étaient poursuivis dans le cadre de ce volet. Le premier objectif visait à adapter une technique de radiographie développée par Charbonneau et al. [1997] afin de visualiser la position des larves de *Chaoborus flavicans* enfouies dans les sédiments. Le deuxième objectif consistait à utiliser la technique adaptée afin, d'une part, de décrire la profondeur d'enfouissement et l'orientation des larves dans les sédiments et, d'autre part, de vérifier si les larves maintiennent et irriguent un tube. Cet objectif visait ainsi à apprécier l'exposition potentielle des larves à la zone anoxique des sédiments et aux contaminants s'y retrouvant. Le troisième objectif visait à décrire le comportement d'enfouissement des larves à travers l'interface sédiment-eau dans le but d'en quantifier l'importance en termes de bioturbation des sédiments superficiels.

### 2.2 Méthodes

Des larves de *Chaoborus flavicans* (4<sup>e</sup> stade) et des sédiments ont été récoltés au lac Laflamme (47°19' N, 71°07' W) puis rapportés au laboratoire. Un composé opaque aux rayons X, le carbure de molybdène (Mo<sub>2</sub>C), a été ajouté au sédiment (32 g Mo<sub>2</sub>C/L de sédiment). Ce sédiment a ensuite été versé dans des aquariums minces (6 mm d'épaisseur) auxquels de l'eau du lac a été ajoutée. Cette technique a été modifiée de Charbonneau et al. [1997] qui utilisaient des aquariums plus épais (25 mm) et une concentration moindre de Mo<sub>2</sub>C (16 g/L de sédiment) afin de visualiser les structures biogéniques (et non les organismes eux-mêmes) construites par des larves d'insectes aquatiques de plus grande taille que *Chaoborus*. Les modifications apportées ont permis d'augmenter le contraste entre un matériel bloquant les rayons X, soit le sédiment mélangé au Mo<sub>2</sub>C, et un matériel les laissant passer, soit le corps des larves.

Des larves ( $n = 3$  ou  $4$  selon l'aquarium) ont été ajoutées une à une aux aquariums minces et leur comportement d'enfouissement dans les sédiments a été filmé à la clarté et enregistré à l'aide d'une caméra branchée à un magnétoscope. Suite à l'enfouissement des larves, une radiographie des sédiments a été prise avec une unité à rayons X portable. Au total, 10 larves ont été filmées et radiographiées. Mentionnons que quatre larves avaient été préalablement marquées sur leur capsule céphalique d'une goutte de vernis synthétique mélangée à du  $\text{Mo}_2\text{C}$ , et ce afin de déterminer l'orientation des larves une fois enfouies.

Dans le but de compléter les observations tirées des films réalisés, de nouvelles larves de *C. flavicans* (4<sup>e</sup> stade) ont été récoltées au lac Laflamme. Ces larves ( $n = 10$ ) ont été ajoutées simultanément dans un seul aquarium mince et ont été filmées en continu pendant 72 heures ceci dans le but, d'une part, de décrire le mouvement de sortie des larves du sédiment et, d'autre part, de vérifier si des variantes au comportement d'enfouissement existaient.

### 2.3 Résultats et discussion

Le mouvement d'enfouissement des larves dans les sédiments, tel que révélé par les films, est très dynamique. La larve place d'abord son corps perpendiculaire au sédiment, tête vers le bas, puis elle se replie sur elle-même d'un rapide battement de corps de telle sorte que son extrémité postérieure s'enfonce dans le sédiment. Les battements de corps se poursuivent jusqu'à ce que la larve soit complètement enfouie dans les sédiments (Chapitre 6 : Figure 1). Les larves qui quittent les sédiments utilisent le même mouvement de va-et-vient qu'à l'entrée; elles émergent donc des sédiments tête première. Ces événements contribuent à la bioturbation des sédiments superficiels.

Les radiographies prises ont permis de bien visualiser les larves enfouies dans les sédiments, de même que la marque de  $\text{Mo}_2\text{C}$  appliquée sur leur capsule céphalique (Chapitre 6 : Figure 2). Il est ainsi apparu que les individus sont orientés verticalement dans les sédiments, la tête vers le haut, ce qui est en accord avec leur comportement d'entrée



dans les sédiments. La profondeur maximale d'enfouissement (extrémité postérieure) des larves a été de 22 mm.

Bien qu'aucun profil d'oxygène n'ait été mesuré dans les sédiments, il y a lieu de croire que les larves enfouies se situaient dans la zone anoxique. En effet, une étude réalisée précédemment dans notre laboratoire dans les mêmes conditions, mais sans larves, a indiqué que la couche oxique avait une épaisseur de 3 mm [Wang et al. 2001]. Aucun trou n'a été vu à la surface des sédiments et aucun tube n'est apparu sur les radiographies entre les larves et l'eau surnageante, ce qui appuie le fait que les larves ne sont probablement pas en contact avec l'oxygène lorsqu'enfouies dans les sédiments.

Par ailleurs, les larves enfouies sont également susceptibles d'être exposées à des concentrations élevées de  $H_2S$ , lesquelles peuvent être mesurées dans les premiers centimètres sous l'interface sédiment-eau dans certains lacs. Dans les lacs pollués, les larves sont possiblement exposées aux métaux et aux contaminants organiques présents dans l'eau interstitielle anoxique; il y aurait donc potentiel de bioaccumulation de ces polluants. Cependant, ce potentiel demeurerait peut-être limité pour les métaux puisqu'il a été montré que, dans la colonne d'eau, les larves de *C. punctipennis* accumulent le cadmium principalement via l'ingestion de proies zooplanctoniques et non par contact direct avec l'eau [Munger et Hare 1997].

Il est possible d'estimer la surface des sédiments qui est «bioturbée» quotidiennement par les larves qui migrent à travers l'interface sédiment-eau si l'on compare le corps des larves à un cylindre frappant et bougeant le sédiment (voir Chapitre 6) et si l'on connaît la densité des individus de 4<sup>e</sup> stade dans un lac donné. Selon les calculs réalisés pour une série de lacs supportant des populations de *C. flavicans* d'abondance variée, la surface des sédiments de la zone d'un lac occupée par ces larves pourrait être entièrement altérée à l'intérieur d'une période de temps allant de moins d'un jour à une dizaine de jours selon le lac (Chapitre 6 : Tableau 1). Ceci illustre le rôle que peuvent jouer les larves de *Chaoborus* au niveau de la redistribution des sédiments superficiels, cette redistribution pouvant influencer les flux de nutriments et de contaminants à travers l'interface sédiment-eau.



### **3. EFFET DU CADMIUM SÉDIMENTAIRE SUR LE COMPORTEMENT DE *HEXAGENIA LIMBATA***

---

#### **3.1 Objectifs**

L'objectif principal de ce volet était de vérifier si le Cd accumulé par les nymphes de l'éphémère *Hexagenia limbata* induit des changements comportementaux chez les individus, et ce pour des concentrations corporelles en Cd semblables à celles mesurées chez des nymphes vivant dans des lacs contaminés de la région minière de Rouyn-Noranda. Afin de répondre à cet objectif, l'activité de nymphes témoins a été comparée à celle de nymphes contaminées en Cd, et ce en prenant des radiographies des sédiments et en réalisant des films montrant des nymphes dans leur tunnel naturel.

#### **3.2 Méthodes**

Des nymphes de *Hexagenia limbata* et des sédiments ont été récoltés au lac Saint-Joseph (46°55' N, 71°40' W). Une partie des sédiments a été contaminée avec du CdCl<sub>2</sub> afin d'obtenir une concentration de 20 µg Cd g<sup>-1</sup> poids sec, laquelle correspond aux concentrations de Cd mesurées dans les lacs les plus fortement contaminés de la région de Rouyn-Noranda [Arafat 1985; L. Hare données non publiées]. Les sédiments contaminés ont été laissés à équilibrer pendant 3 jours puis ont été placés, avec des nymphes, dans un aquarium pour une période de deux semaines afin que les nymphes accumulent le Cd. Des nymphes témoins placées dans du sédiment «propre» ont subi le même traitement.

Afin de rendre visibles les tunnels creusés par *H. limbata*, du carbure de molybdène a été mélangé aux sédiments contaminés et témoins (12 g Mo<sub>2</sub>C L<sup>-1</sup> sédiment humide). Ce composé permet d'augmenter l'opacité des sédiments aux rayons X, accentuant du coup le contraste entre ceux-ci et les tunnels remplis d'eau [Charbonneau et al. 1997]. Les sédiments ainsi traités ont été versés dans une série d'aquariums de 2,5 cm d'épaisseur, puis de l'eau du lac aérée a été ajoutée sur les sédiments. Une nymphe a été ajoutée à chacun des aquariums ( $n = 12$  aquariums par traitement) et une radiographie de chaque

aquarium a été prise après 24 h. La longueur totale des tunnels creusés par chaque nymphe, de même que leur profondeur maximale, ont ensuite été mesurées.

En vue d'observer directement les nymphes dans leurs tunnels, des sédiments témoins et contaminés ont été versés dans un autre type d'aquarium très mince (0,6 cm d'épaisseur). Trois nymphes témoins et trois nymphes contaminées ont respectivement été ajoutées à six de ces aquariums (à nouveau une nymphe par aquarium) et elles ont été filmées dans la noirceur, comme en nature, pendant 24 h à l'aide d'une caméra sensible à l'infrarouge [Gallon 2001]. Le temps alloué par les nymphes à leurs diverses activités comportementales (ventilation, fouissage/alimentation, marche, nettoyage des branchies et retournement) a été noté de même que le nombre et la durée de chacun des épisodes comportementaux. La vitesse de marche et la fréquence du battement des branchies (contribuant à la ventilation) ont aussi été mesurés.

Afin de déterminer leur concentration en Cd, les nymphes et les sédiments ont été digérés puis analysés par spectrophotométrie d'absorption atomique. Les méthodes de digestion et d'analyse sont décrites en détail dans le Chapitre 7.

### 3.3 Résultats et discussion

En ce qui concerne l'activité fouisseuse, il n'y avait pas de lien significatif entre la longueur totale des tunnels creusés après 24 h par un individu et sa concentration corporelle en Cd (Chapitre 7 : Figure 1). L'activité de fouissage était caractérisée par une grande variabilité autant chez les nymphes témoins que contaminées; une telle variabilité a toutefois déjà été rapportée par d'autres observateurs [Hunt 1953; Charbonneau et Hare 1998]. Si l'on considère que la toxicité comportementale est associée, en présence d'un contaminant, à l'observation d'un changement comportemental excédant la variabilité de base, alors il peut être conclu, dans la présente étude, que le Cd n'a pas d'effet sur l'activité fouisseuse de *Hexagenia limbata*, du moins pour la gamme de concentration en Cd mesurée chez les nymphes.

Ces résultats contrastent avec ceux obtenus par Odin et al. [1995], lesquels ont observé que la turbidité de l'eau surnageante de microcosmes contenant des sédiments et *H. rigida* diminuait suivant l'augmentation de la concentration en Cd des sédiments, suggérant une diminution de l'activité des nymphes due au Cd. Dans une étude semblable sur *H. bilineata*, Bartsch et al. [1999] ont également observé que la turbidité de l'eau diminuait lorsque la concentration en Cd des sédiments augmentait. Ces auteurs n'ont toutefois noté aucune différence de turbidité entre leur microcosme contrôle et celui contenant la plus forte concentration en Cd, ce qui révoquait du coup l'évidence d'un effet direct du Cd sur l'activité des nymphes. Les différents résultats obtenus dans la présente étude et dans celles de Odin et al. [1995] et Bartsch et al. [1999] pourraient être attribuables, entre autres facteurs, au fait que trois espèces différentes d'*Hexagenia* ont été étudiées. En effet, la tolérance au Cd peut varier d'une espèce à l'autre, à l'intérieur d'un même genre, comme l'ont montré Aoki et al. [1989] pour trois espèces de l'éphémère *Baetis* selon leur capacité à produire une protéine liant le Cd.

L'analyse des films montrant les nymphes de *H. limbata* actives dans leur tunnel a permis de comparer d'autres aspects comportementaux. À nouveau, aucune différence significative n'est apparue concernant le temps alloué aux divers comportements par les individus témoins comparativement aux individus contaminés (Chapitre 7 : Figure 2). De même, la vitesse de marche et la fréquence du battement des branchies étaient les mêmes pour les individus témoins et contaminés (Chapitre 7 : Figure 3). Quoique très variables, le nombre et la durée moyenne de chacun des épisodes de chaque type de comportement n'étaient pas différents pour les deux niveaux de contamination.

Des exemples tirés de la littérature indiquent que le Cd peut ou non influencer le comportement des larves d'insectes aquatiques. Heinis et al. [1990] ont observé des déviations comportementales significatives chez des larves de chironomides exposées au Cd ajouté à l'eau d'un microcosme. Les concentrations de Cd étudiées étaient toutefois de beaucoup supérieures à celles communément mesurées dans les écosystèmes pollués par les métaux. Dans une autre étude, Hare et Shooner [1995] ont observé que des larves du genre *Chironomus* ne montraient pas de préférence à creuser dans du sédiment témoin *versus* du sédiment contaminé en Cd.

En somme, il apparaît que le Cd n'a pas d'effet détectable sur le comportement de la nymphe *Hexagenia limbata*, du moins pour la gamme de concentrations ayant été mesurées dans les nymphes. Cependant, il n'est pas exclu que le Cd pourrait exercer un effet toxique chez les nymphes en présence d'autres agents de stress (ex. : acidité et température élevées, faible concentration en oxygène dissous, autres polluants, etc.) susceptibles d'être présents sous des conditions naturelles.

## 4. MESURE DU COURANT D'EAU DANS LES TUNNELS CREUSÉS PAR *HEXAGENIA LIMBATA* EN UTILISANT UN NOUVEAU MICROSENSEUR

---

### 4.1 Objectifs

Le premier objectif de ce troisième volet visait à calibrer un nouveau type de microsenseur permettant de mesurer les faibles vitesses de courant (eau ou autre fluide). Le deuxième objectif était d'appliquer cette technique afin de mesurer la vitesse des courants d'eau circulant dans les tunnels creusés par la nymphe *Hexagenia limbata*, puis de quantifier, sur la base des vitesses mesurées, la bioirrigation due à cette espèce. Quant au dernier objectif, il consistait à relier les variations de vitesse du courant aux activités comportementales de l'animal.

### 4.2 Méthodes

#### 4.2.1 Microsenseur

Le microsenseur utilisé (FS-20, Unisense, Danemark) possède une pointe très fine (20-50  $\mu\text{m}$ ) et permet de mesurer des vitesses de courant situées dans la gamme de  $5 \mu\text{m s}^{-1}$  à  $5 \text{cm s}^{-1}$ . Le principe du microsenseur repose sur la perte diffuse d'un gaz ( $\text{H}_2$  dans ce cas-ci) à travers une membrane qui est située dans l'extrémité du senseur (Figure 3). Dans une eau stagnante, le gaz diffusant à travers la membrane s'accumule dans le milieu immédiat et génère de ce fait un signal élevé, tandis qu'une eau circulant à une certaine vitesse érode

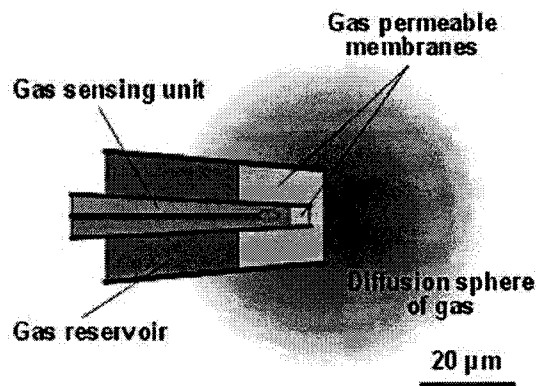


Figure 3. Vue schématique de l'intérieur de l'extrémité de la microsenseur utilisée pour mesurer les vitesses de courants. Le gaz diffuse dans le milieu ambiant à travers la membrane perméable ([Unisense<sup>®</sup>, Denmark]).

constamment la sphère de diffusion du gaz, diminuant du coup le signal généré par le senseur.

#### 4.2.2 Calibration du microsenseur

Un montage a été construit afin de calibrer le senseur à des vitesses contrôlées situées entre 100 et 10 000  $\mu\text{m s}^{-1}$ . Le montage pour la calibration se devait de ressembler le plus possible au tunnel de *H. limbata* (par exemple au niveau du diamètre du tube artificiel). De plus, le montage devait permettre de mesurer la vitesse du courant circulant aussi bien dans une direction que dans l'autre, car le microsenseur est sensible à la direction du courant. Le montage élaboré apparaît à la Figure 1a du Chapitre 8. Le calcul de la vitesse d'écoulement de l'eau était effectué en mesurant la masse d'eau récoltée par unité de temps, et ce grâce à la microbalance placée sous le montage.

Étant donné que l'eau dans le tunnel d'*Hexagenia* peut circuler dans deux directions opposées, selon l'orientation de l'animal dans le tunnel, le montage pour la calibration se devait de permettre la circulation de l'eau non seulement vers le bas, mais également vers le haut. Ceci a été rendu possible grâce à l'installation d'un second contenant de verre au-dessus du premier (Chapitre 8 : Figure 1b). Dans ce cas-ci, le second contenant est rempli d'eau, tandis que le premier est vide, et l'eau s'écoule donc du second vers le premier.

#### 4.2.3 Mesure du courant dans le tunnel d'*Hexagenia*

Des nymphes de *H. limbata* et du sédiment ont été récoltés au lac Saint-Joseph (46°55' N, 71°40' W). Du sédiment fut subséquemment ajouté à des aquariums minces (6 mm d'épaisseur), lesquels ont chacun accueilli une nymphe. Après deux jours, un aquarium pour lequel l'intérieur du tunnel creusé par la nymphe était entièrement visible sur toute sa longueur a été choisi pour réaliser les mesures.

Avant de débiter les mesures, le microsenseur a été calibré à l'aide du montage développé précédemment. La courbe obtenue (courant descendant par rapport au senseur) était de type exponentielle (Chapitre 8 : Figure 2); toutefois, aucune équation simple ne pouvait la



décrire adéquatement, de sorte que des approximations linéaires entre points voisins ont été appliquées afin de convertir les signaux mesurés en vitesses. Mentionnons que seule une calibration pour un courant s'écoulant vers le bas a été réalisée, la calibration pour la direction opposée ayant été prévue pour la fin de l'expérience. Cependant, un bris du capteur à la toute fin de l'expérience a empêché la calibration pour la direction opposée. Ainsi, seules les vitesses d'un courant circulant vers le bas ont pu être traitées.

Pour réaliser les mesures, le microsenseur a été fixé à un micromanipulateur puis a été positionné à l'intérieur de l'une des deux ouvertures du tunnel de *H. limbata*. Une caméra sensible aux rayons infrarouges a permis de filmer les activités de l'animal dans la noirceur (Chapitre 8 : Figure 3). Le comportement de l'animal a été enregistré pendant une période continue de six heures.

### 4.3 Résultats et discussion

La principale activité de la nymphe a été l'irrigation de son tunnel par le biais du battement quasi continu de ses branchies (99% du temps). Ce mouvement a entraîné un courant d'eau continu variant entre 100 et 350  $\mu\text{m s}^{-1}$  (Chapitre 8 : Figures 4a-c). La nymphe a marché dans le tunnel à quelques reprises, activité ayant généré des courants de 900 à 3000  $\mu\text{m s}^{-1}$ , dépendant de l'amplitude du mouvement. Le plus grand courant d'eau a été provoqué par le déplacement de sédiment par la nymphe (à la façon d'un «bulldozer») alors qu'elle avançait vers le capteur. Bien que le courant engendré par ce déplacement ait été en direction opposée, et comporte donc une incertitude quant à sa valeur, son ordre de grandeur a été mesuré à environ 40 000  $\mu\text{m s}^{-1}$ . Les autres activités de l'animal (fouissage, nettoyage des branchies et retournement) n'ont pas provoqué de variations de courant dépassant le niveau de base dû à l'irrigation par le battement des branchies.

Le volume d'eau circulant dans un tunnel par unité de temps peut être estimé en utilisant la valeur moyenne des vitesses de courant mesurées. En se basant sur les données de la Figure 4 du Chapitre 8, la vitesse moyenne de 190  $\mu\text{m s}^{-1}$  est calculée; une fois cette valeur multipliée par l'aire de la section du tunnel, le débit d'eau moyen circulant dans le tunnel

est obtenu, i.e.  $0,081 \text{ mL min}^{-1}$ . Connaissant le volume du tunnel, il a été estimé que l'équivalent de 117 mL d'eau circulerait quotidiennement dans un tunnel de même dimension que celui étudié, et irrigué avec la même intensité, de façon continue.

La nouvelle technique utilisée comporte plusieurs avantages. Elle permet de mesurer les courants d'eau directement dans le tunnel naturel de l'animal. De plus, sa grande sensibilité permet de mesurer de faibles courants, lesquels sont susceptibles d'être produits par des animaux de petite taille ou encore peu actifs.

## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

L'utilisation d'une technique de radiographie, d'une caméra vidéo sensible à l'infrarouge et d'un microsenseur mesurant des vitesses de courant a permis de répondre à certaines questions concernant l'exposition aux métaux traces, la toxicité et la bioturbation chez les larves du diptère *Chaoborus flavicans* et de l'éphémère *Hexagenia limbata*, et ce en lien avec des aspects comportementaux.

Les observations réalisées sur les larves de *Chaoborus* ont permis de mettre en évidence l'importance du compartiment sédimentaire pour cet organisme, en dépit de son statut d'espèce planctonique. En se réfugiant dans les sédiments, les larves y trouvent un gain en diminuant leur exposition aux prédateurs, mais leur exposition à des conditions chimiques adverses (anoxie, présence de H<sub>2</sub>S, présence de polluants) entraîne probablement des coûts reliés à une certaine adaptation. Par ailleurs, la migration quotidienne de ces larves à travers l'interface sédiment-eau était jusqu'ici connue; toutefois, son impact en terme de bioturbation de la couche superficielle des sédiments n'avait pas été quantifié.

Deux des trois techniques présentées dans ce mémoire ont par ailleurs permis d'étudier et de mesurer un critère sous-létal de toxicité, soit l'effet potentiel du cadmium sur le comportement de *H. limbata*, et ce en observant l'animal dans son tunnel naturel. Bien que reconnu pour sa toxicité face aux systèmes biologiques, ce métal est demeuré sans effet sur l'activité de l'éphémère. De plus, le fait que celle-ci ait accumulé ce métal sans que sa survie ne soit affectée indique qu'elle peut représenter une source de cadmium pour ses prédateurs.

En dernier lieu, la calibration et l'application d'un nouveau type de microsenseur destiné à la détection de faibles courants d'eau ont permis de confirmer que le battement des branchies chez *Hexagenia* est le principal comportement responsable de la ventilation, et donc du renouvellement d'eau, dans les tunnels creusés. Il est aussi apparu que les épisodes de marche peuvent causer de grands déplacements d'eau, bien que ponctuels dans le temps.

D'après la littérature consultée, ces vitesses de courant mesurées dans le tunnel d'un invertébré sont parmi les premières à être réalisées en eau douce.

Les perspectives de recherche émanant des problématiques étudiées sont diversifiées. Premièrement, il serait intéressant de vérifier expérimentalement si les larves de *C. flavicans* accumulent les métaux contenus dans l'eau interstitielle anoxique des sédiments. Aussi, l'influence de la migration des larves à travers l'interface sédiment-eau (bioturbation) sur les flux de métaux traces pourrait être étudiée en mesurant et en comparant des profils de ces métaux dans l'eau interstitielle pour des sédiments contaminés, en présence et en absence de larves.

En ce qui a trait à l'effet des métaux sur le comportement, d'autres métaux individuels ou encore des mélanges de métaux pourraient être étudiés en utilisant à nouveau *Hexagenia* ou d'autres espèces fouisseuses. De plus, l'influence de certains facteurs de stress, tels l'oxygène dissous et la température, pouvant potentiellement exacerber l'effet des métaux sur le comportement pourrait être étudiée, et ce afin de simuler des situations susceptibles d'être rencontrées en milieu naturel.

Finalement, le microsenseur permettant de mesurer la vitesse des courants d'eau pourrait être utilisé pour quantifier la bioirrigation des tunnels creusés par d'autres espèces fouisseuses ou encore pour mesurer la vitesse du courant circulant au dessus des biofilms en milieu aquatique. À nouveau, l'influence de facteurs tels la température et l'oxygène dissous sur l'intensité de la bioirrigation chez diverses espèces pourrait également être étudiée. De plus, les mesures de bioirrigation effectuées pourraient être intégrées aux modèles permettant de calculer les flux d'espèces chimiques à travers l'interface sédiment-eau.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aller, R.C. et J.Y. Yingst (1978). Biogeochemistry of tube-dwellings: a study of the sedentary polychaete *Amphitrite ornata* (Leidy). *J. Mar. Res.*, 36:201-254.
- Aoki, Y., S. Hatakeyama, N. Kobayashi, Y. Sumi, T. Suzuki et K.T. Suzuki (1989). Comparison of cadmium-binding protein induction among mayfly larvae of heavy metal resistant (*Baetis thermicus*) and susceptible species (*B. yoshinensis* and *B. sahoensis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 93C:345-347.
- Arafat, N.M. (1985). The impact of mining and smelting on trace metal distribution in lake sediments around Rouyn-Noranda, Quebec. *Water Pollut. Res. J. Can.*, 20:1-8.
- Bartsch, M.R., W.G. Cope et R.G. Rada (1999). Effects of cadmium-spiked sediment on cadmium accumulation and bioturbation by nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia bilineata*. *Water Air Soil Pollut.*, 109:277-292.
- Borgmann, U., W.P. Norwood, T.B. Reynoldson et F. Rosa (2001). Identifying cause in sediment assessments: bioavailability and the Sediment Quality Triad. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 58:950-960.
- Brittain, J.E. (1982). Biology of mayflies. *Ann. Rev. Entomol.*, 27:119-147.
- Burton, G.A. (1991). Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:1585-1627.
- Chapman, P.M. (1990). The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Sci. Total Environ.*, 97/98:815-825.
- Chapman, P.M. et F. Wang (2000). Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 6:965-988.
- Charbonneau, P., L. Hare et R. Carignan (1997). Use of X-ray images and a contrasting agent to study the behavior of animals in soft sediments. *Limnol. Oceanogr.*, 42:1823-1828.
- Charbonneau, P. et L. Hare (1998). Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects. *J. N. Amer. Benthol. Soc.*, 17:239-249.
- Croteau, M-N., L. Hare et A. Tessier (1998). Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environ. Sci. Technol.*, 32:1348-1353.
- Davey, J.T., P.G. Watson, R.H. Bruce et P.E. Frickers (1990). An instrument for the monitoring and collection of the vented burrow fluids of benthic infauna in sediment microcosms and its application to the polychaetes *Hediste diversicolor* and *Arenicola marina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 139:135-149.

- Edmunds, G.F. et R.D. Waltz (1996). Ephemeroptera. In *An Introduction to the Aquatic Insects of North America*. Merritt, R.W. et K.W. Cummins [Eds], Kendall/Hunt Publishing, Dubuque, Iowa, pp. 126-163.
- Gallon, C. (2001). Étude des microenvironnements oxiques créés par les animaux benthiques fouisseurs: *Sialis velata* (Megaloptera) et *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera). M.Sc. thesis, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, QC, Canada.
- Gerhardt, A. (1990). Effects of subacute doses of cadmium on pH-stressed *Leptophlebia marginata* (L.) and *Baetis rhodani* Pictet (Insecta: Ephemeroptera). *Environ. Pollut.*, 67:29-42.
- Hare, L., A. Tessier et P.G.C. Campbell (1991). Trace elements distributions in aquatic insects: variations among genera, elements, and lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48:1481-1491.
- Hare, L. et F. Shooner (1995). Do aquatic insects avoid cadmium-contaminated sediments? *Environ. Toxicol. Chem.*, 14:1071-1077.
- Hare, L. et A. Tessier (1996). Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature*, 380:430-432.
- Hare, L. et A. Tessier (1998). The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 43:1850-1859.
- Hare, L., A. Tessier et L.A. Warren. (2001). Cadmium accumulation by invertebrates living at the sediment-water interface. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20:880-889.
- Heinis F., K.R. Timmermans et W.R. Swain (1990). Short-term sublethal effects of cadmium on the filter feeding chironomid larva *Glyptotendipes pallens* (Meigen) (Diptera). *Aquat. Toxicol.*, 16:73-86.
- Hunt, B.P. (1953). *The Life History and Economic Importance of a Burrowing Mayfly, Hexagenia limbata, in Southern Michigan Lakes*. Bulletin of the Institute for Fisheries Research No. 4, Institute for Fisheries Research, Michigan Department of Conservation, Ann Arbor, MI, USA.
- Ingersoll, C.G. (1995). Sediment tests. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Rand, G.M. [Ed.], Taylor & Francis, Washington, DC, pp. 231-255.
- Jónasson, P. M. (1972). Ecology and production of the profundal benthos in relation to phytoplankton in Lake Esrom. *Oikos Suppl.*, 14:1-148.

- LaRow, E. J. (1970). The effect of oxygen tension on the vertical migration of *Chaoborus* larvae. *Limnol. Oceanogr.*, 15:357-362.
- Leland, H.V. et J.S. Kuwabara (1985). Trace metals. In *Fundamentals of Toxicology*. Rand, G.M. et S.R. Petrocelli [Eds], Hemisphere Publishing, Washington DC, pp. 374-406.
- Matisoff, G., J.B. Fisher et S. Matis (1985). Effects of benthic macroinvertebrates on the exchange of solutes between sediments and freshwater. *Hydrobiol.*, 122:19-33.
- McGreer, E.R. (1979). Sublethal effects of heavy metal contaminated sediments on the bivalve *Macoma balthica* (L.). *Mar. Pollut. Bull.*, 10:259-262.
- Munger, C. et L. Hare (1997). Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): Implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environ. Sci. Technol.*, 31:891-895.
- Nriagu, J.O. et J.M. Pacyna (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333:134-139.
- Odin, M., F. Ribeyre et A. Boudou (1995). Cadmium and methylmercury bioaccumulation by nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* from the water column and sediment. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2:145-152.
- Olla, B.L., V.B. Estelle, R.C. Swartz, G. Braun et A.L. Studholme (1988). Responses of polychaetes to cadmium-contaminated sediment: comparison of uptake and behavior. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7:587-592.
- Paquin, L. et R. Prairie (1996). Évaluation de la qualité des plans d'eau situés à proximité de la Fonderie Horne de Métallurgie Noranda Inc., Septembre 1994. Rapport technique, Noranda Inc., 44 p.
- Pynnönen, K. (1996). Heavy metal-induced changes in the feeding and burrowing behaviour of a Baltic isopod, *Saduria (Mesidotea) entomon* L. *Mar. Environ. Res.*, 41:145-156.
- Rand, G.M. (1985). Behavior. In *Fundamentals of Toxicology*. Rand, G.M. et S.R. Petrocelli [Eds], Hemisphere Publishing, Washington DC, pp. 221-263.
- Soster, F.M., G. Matisoff, P.L. McCall et J.A. Robbins (2001). In situ effects of organisms on porewater geochemistry in Great Lakes sediments. In *Organism-Sediment Interactions*. Aller, J.Y., S.A. Woodin et R.C. Aller [Eds], The Belle W. Baruch Library in Marine Science, Number 21, University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina, pp. 279-295.
- Teraguchi, M. et T. G. Northcote (1966). Vertical distribution and migration of *Chaoborus flavicans* larvae in Corbett Lake, British Columbia. *Limnol. Oceanogr.*, 11:164-176.

- Tjossem, S.F. (1990). Effects of fish chemical cues on vertical migration behavior of *Chaoborus*. *Limnol. Oceanogr.*, 35:1456-1468.
- Unisense © Home Page. 2001.  
<http://www.unisense.com/products/fs.html>
- Wallace, J.B. et N.H. Anderson (1996). Habitat, life history, and behavioral adaptations of aquatic insects. In *An Introduction to the Aquatic Insects of North America*. Merritt, R.W. et K.W. Cummins [Eds], Kendall/Hunt Publishing, Dubuque, Iowa, pp. 41-73.
- Wang, F., A. Tessier et L. Hare (2001). Oxygen measurements in the burrows of freshwater insects. *Freshwat. Biol.*, 46:317-327.
- Warren, L.A., A. Tessier et L. Hare (1998). Modeling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: the relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnol. Oceanogr.*, 43:1442-1454.
- Wiederholm, T. (1984). Responses of aquatic insects to environmental pollution. In *The Ecology of Aquatic Insects*. Resh, V.H. et D.M. Rosenberg [Eds], Praeger, New York, New York, pp. 508-557.
- Winter, A., J.J.H. Ciborowski, T.B. Reynoldson (1996). Effects of chronic hypoxia and reduced temperature on survival and growth of burrowing mayflies, *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera: Ephemeridae). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53:1565-1571.
- Wright, D.A. et P.M. Welbourn (1994). Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ. Rev.*, 2:187-214.
- Zimmerman, M.C. et T.E. Wissing (1980). The nutritional dynamics of the burrowing mayfly *Hexagenia limbata*. In *Advances in Ephemeroptera Biology*. Flannagan, J.F. et K.E. Marshall [Eds], Plenum, New York, New York, pp. 231-257.



## **6. ARTICLE #1**

---

### **Le comportement fouisseur des larves de *Chaoborus flavicans* et sa signification écologique**

**Anne Gosselin et Landis Hare**

Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)  
Université du Québec, C.P. 7500, Sainte-Foy,  
Québec, Canada G1V 4C7

Journal of the North American Benthological Society (2003)  
22(4) : 575-581

## Résumé de l'article

La forme et l'étendue des galeries creusées par les invertébrés fouisseurs influencent la structure du sédiment, les processus de bioturbation ainsi que les flux de nutriments et de contaminants entre les sédiments et la colonne d'eau. La larve de la mouche fantôme *Chaoborus flavicans* est un insecte fouisseur important des sédiments fins. Les larves de ce diptère migrent entre la colonne d'eau, où elles se nourrissent de zooplancton durant la nuit, et les sédiments, où elles se cachent des poissons prédateurs durant le jour. Le degré auquel ces larves dérangent le sédiment durant leurs migrations quotidiennes, de même que la profondeur à laquelle elles s'enfouissent dans les sédiments sont peu connues, principalement en raison d'un manque de techniques adéquates permettant d'étudier le comportement animal sous et près de l'interface sédiment-eau. Nous avons utilisé deux techniques afin d'enregistrer le comportement des larves en laboratoire, soit une caméra sensible aux rayons infrarouges, laquelle a permis de décrire la façon dont les larves s'enfouissent dans les sédiments, et une caméra à rayons X qui a permis, d'une part, de visualiser l'emplacement des larves enfouies dans les sédiments et, d'autre part, de vérifier si les larves maintiennent un tunnel les reliant à la colonne d'eau. Nos observations indiquent que l'enfouissement des larves déplace les sédiments superficiels contribuant du coup à la bioturbation. Une fois enfouies, les larves demeurent dans la zone anoxique des sédiments en position verticale, extrémité antérieure orientée vers le haut, et adoptent la forme d'un «S». De plus, les larves ne construisent pas un tunnel lié à la colonne d'eau par le biais duquel elles pourraient pomper de l'eau oxygénée. Ainsi, les larves sont susceptibles d'être exposées au sulfure d'hydrogène de même qu'aux contaminants présents dans l'eau interstitielle.

**Burrowing behavior of Chaoborus flavicans larvae and its ecological significance**

Anne Gosselin and Landis Hare<sup>1</sup>

Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE),  
Université du Québec, C. P. 7500, Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 4C7

---

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: [landis\\_hare@inrs-ete.quebec.ca](mailto:landis_hare@inrs-ete.quebec.ca)

Abstract. The form and extent of the galleries created by burrowing invertebrates influence sediment structure, bioturbation, and the fluxes of nutrients and contaminants between the sediment and the water column. An important burrowing insect in soft sediments is the phantom midge Chaoborus flavicans. Larvae of this dipteran migrate between the water column, where they feed at night on zooplankton, and the sediment, where they find refuge from predatory fish during the day. The extent to which these larvae disturb sediment during their daily migrations and the depth to which they burrow are poorly known in large part because of a lack of adequate techniques for studying animal behavior near and below the sediment-water interface. We used 2 techniques to record larval behavior in the laboratory, that is, infrared videos to determine how larvae burrow into sediment and X-ray images of burrowed larvae to determine whether they burrow into deeper anoxic sediment and whether they maintain a tube connected to the overlying water. Our observations indicate that larval burrowing visibly disturbs surface sediments thereby contributing to bioturbation. Once buried, larvae do not remain in the thin surface oxic layer but burrow into anoxic sediment. In anoxic sediment, larvae assume a vertical, anterior-end up, S-shaped posture and do not create a tube connected to the overlying water through which they could pump oxygenated water. Thus larvae are likely exposed to toxic hydrogen sulfide and contaminants in interstitial water, to which they are likely tolerant.

Key words: Chaoborus, behavior, burrowing, sediment, bioturbation, benthos, porewater.

## Introduction

Larvae of the phantom midge Chaoborus are unique among insects in that most species undergo diel vertical migrations during much of the ice-free period in lakes. Their descent by day into or near the sediment allows them to escape predation by fish, and their rise into the water column by night allows them to feed on zooplankton. Factors controlling the water column portion of these migrations include oxygen, light, and chemicals exuded by fish (Teraguchi and Northcote 1966, Chaston 1969, LaRow 1970, Tjossem 1990). In contrast, knowledge about the benthic portion of these migrations is very limited, in large part because of the rarity of techniques for studying animals in sediment. However, this type of information is important ecologically because it can help to explain how diverse species share a common habitat by occupying different niches. Limnologically, the burrowing and irrigation activities of benthic invertebrates can influence the vertical distribution of nutrients and contaminants in sediments as well as their fluxes to and from the water column (Matisoff 1995). Information on burrowing and irrigation behaviors can also be important ecotoxicologically because it can explain in part why taxa differ in their accumulation of sedimentary contaminants (Warren et al. 1998, Hare et al. 2001).

We set out to describe the behavior of Chaoborus flavicans larvae near the sediment-water interface. We chose this species for study because it is widely distributed in the Holarctic region and because the large size of its final (4th) instars, compared with those of many other Chaoborus species (Croteau et al. 2001), facilitated our observations. To record larval behavior, we used an infrared video camera to determine the manner in which larvae enter the sediment and to quantify the extent to which they displace sediment

thereby contributing to bioturbation. We also used radiographs to record larval positioning in sediment.

By studying these images, we hoped to answer the following questions. First, do larvae penetrate the sediment in a horizontal or vertical position and, if vertical, in a head-up or head-down position? Second, do larvae remain in the oxic microzone near the sediment-water interface or do they burrow into anoxic sediments? Third, what orientation do larvae adopt in the sediment. Last, do larvae create a tube connected to the sediment surface through which they could pump overlying water, as do most benthic insects (Charbonneau and Hare 1998, Wang et al. 2001, Gosselin and Hare 2004)? We then use this information to estimate the contribution made by Chaoborus larvae to sediment bioturbation.

### Methods

Divers collected C. flavicans larvae and sediment (0-10 cm depth) in a large (20 L) plastic bucket during the daytime in July 2000 from a depth of 4 m in Lake Laflamme, a small Canadian Shield lake near Québec City (lat 47°19' N, long 71°07' W). This sediment was sieved in the laboratory through a 1-mm-mesh net to remove animals, including Chaoborus, and coarse debris. Fourth-instar C. flavicans larvae were held in an aquarium containing aerated unfiltered lake water and sieved sediment from Lake Laflamme for 10 d to acclimate to laboratory conditions (10°C, 16:8 light:dark photoperiod).

To observe larvae in sediment, sieved sediment was mixed with an inert, X-ray dense compound, molybdenum carbide (32 g Mo<sub>2</sub>C / L of sediment), to increase the contrast between larvae and surrounding sediment (Charbonneau et al. 1997). Sediment

amended with Mo<sub>2</sub>C was poured into a series of thin (0.6-cm width) Plexiglas™ aquaria (15 cm in height × 13 cm in length) on top of which unfiltered lake water was added slowly so as not to resuspend the sediment. The sediment was left for 1 d, which, based on previous measurements in our laboratory, is sufficient for the development of subsurface anoxia. Ten 4th-instar C. flavicans larvae (identified according to Saether 1972) were used for our observations on burrowing behavior, of which 4 were first marked on the dorsum of their head capsule to ensure that their anterior and posterior ends could be distinguished on radiographs. Larvae to be marked were first anesthetized in sodium citrate and then a tiny drop of Mo<sub>2</sub>C mixed with a rapid-setting synthetic varnish (clear nail polish) was placed on their head capsule. Last, marked larvae were held in lake water to recover and to confirm by observation of their swimming behavior that the marking process had not damaged them.

To obtain a radiograph, a sheet of X-ray sensitive paper (Kodak X-Omat XK-1) was loaded into a cassette designed to increase film sensitivity and the loaded cassette was placed behind a thin aquarium. In the light, C. flavicans larvae (2 marked and 2 unmarked) were placed one at a time in the aquarium; all larvae burrowed within a few minutes. After burrowing, a radiograph was taken immediately using a portable X-ray unit (Kramex® model PX-20N) at settings determined by trial and error to produce good-quality images (exposure time 0.06 s at a current of 20 mA and a voltage of 50 kVP at a distance of 40 cm). This process was repeated for 2 additional thin aquaria (3 larvae per aquarium) for a total of 10 radiographed larvae. The resulting radiographs were developed in our laboratory. Previous trials using sealed capillary tubes to imitate burrows showed that we should be able to distinguish larval burrows as narrow as the width of a 4th-instar C. flavicans larva (~1 mm).

Each of the 10 larvae was also filmed as it entered the sediment (prior to the radiographs) using an infrared camera (Panasonic WV-BP130 1/3" CCD) connected to a videocassette recorder (Sanyo SRT-6000). Sediment disturbance by larvae was quantified using these video images. To bolster these observations, an additional 10 C. flavicans larvae and sediment were collected in November 2001 from the same site in Lake Laflamme using an Ekman grab. These larvae were treated in the same way as those collected initially, except that they were placed simultaneously in a thin aquarium, and their behavior as they entered and exited the sediment was filmed over a period of 3 d.

## Results and Discussion

### Behavior at the sediment-water interface

Chaoborus flavicans larvae remain motionless in a horizontal position when in the water column (Fig. 1, leftmost) with only occasional abrupt changes in position. Prior to entering the sediment, larvae orient their body perpendicular to the sediment-water interface in a posterior-up position (Fig. 1, 3rd from left); larvae took this position in all burrowing events that were filmed using the 10 individuals collected in July 2000. From that position, larvae flip their body very quickly (in a few hundredths of a second) so as to thrust their posterior end into the sediment (Fig. 1, 4th from left). Observations on the 10 additional animals collected in November 2001 ( $n = 30$  burrowing events) confirmed that larvae enter the sediment posterior end first. Chaston (1969) reported that larvae of another Chaoborus species (C. punctipennis) also adopt this position for burrowing. Once the posterior end has entered the sediment, C. flavicans larvae drive their body into the



sediment through a succession of very rapid lateral movements (Fig. 1). An individual lateral movement lasts ~0.5 s, and it takes ~6 such movements for larvae to disappear beneath the sediment surface. All lateral movements in a given burrowing sequence take place in approximately the same plane. With each lateral movement, part of one side of the larval body contacts the sediment surface, which causes sediment to be thrown up in a cloud around the larva (Fig. 1). Although individuals were occasionally observed thrashing at the sediment surface in a horizontal position, they never burrowed completely from this position. Furthermore, although larvae occasionally entered the sediment anterior end first and remained partially buried for minutes at a time, they never completed burrowing from this position. Jónasson (1972) also reported that *C. flavicans* partially bury themselves in a head-down position (fig. 65 in Jónasson 1972), but our results suggest that this is not the position from which larvae complete burrowing. Larvae leaving the sediment following complete burial used the same back and forth motion as on entry.

#### Behavior in sediment

Radiographs of *C. flavicans* larvae in sediment showed that they orient themselves vertically in a head-up position, as indicated by the mark of Mo<sub>2</sub>C visible on their head capsule (Fig. 2C). Furthermore, larvae curve their bodies into an S-shape rather than remaining straight as they do in the water column. The maximum depth to which *C. flavicans* burrowed was ~2.5 cm (Fig. 2A). Larvae of *C. punctipennis* are reported to burrow to a depth of 6 cm (LaRow 1969). *Chaoborus* species likely differ somewhat in the depth to which they burrow, but differences among studies could also be explained by exogenous factors including the time of day (LaRow 1969) and the density of the sediment.

The maximum depth to which C. flavicans burrowed is certainly well below that of the surface oxic sediment layer (3 to 5 mm in depth), as determined from previous measurements made under similar conditions in our laboratory (Gallon 2001, Wang et al. 2001).

No holes were observed on the sediment surface above buried larvae, nor were tubes observed between larvae and the sediment surface on radiographs (Fig. 2A). A remnant of the path made by a larva as it burrowed into the sediment is visible on Fig. 2B, but this path was incomplete and did not connect the individual to the overlying water. These observations suggest that larvae remain in the sediment without oxygen throughout the day. Biochemical measurements confirm that Chaoborus larvae can respire anaerobically for long periods of time, which results in high concentrations of either lactate (C. flavicans, Franke 1987) or succinate and alanine (C. crystallinus, Scholz and Zerbst-Boroffka 1998) as metabolic end products. The absence of a tube between buried Chaoborus and the sediment surface also suggests that these larvae do not contribute by burrow irrigation to nutrient and contaminant fluxes between overlying and interstitial waters, as has been reported for many freshwater and marine invertebrates (Aller and Yingst 1978, Matisoff et al. 1985).

Peak concentrations of hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) in our study lake (Hare et al. 2001) occur at the depth we observed C. flavicans in the laboratory ( $H_2S$  was not measured in our laboratory setup), and at concentrations 5 times those known to be lethal to other insects (Oseid and Smith 1975). Because buried Chaoborus do not have access to oxygenated overlying water (Fig. 2A), they are likely tolerant to  $H_2S$  (Franke 1987). Tolerance to  $H_2S$  is reported to be common among animals living in freshwater systems where anoxia is of regular occurrence (Nagell 1977).

Benthic animals such as C. flavicans can also be exposed to metals and organic contaminants in interstitial water, and bioaccumulation of these contaminants depends on their behavior (Hare et al. 1994, 2001). For example, although some insects live in contaminated sediments, they are likely little exposed to sedimentary metals because they build a tube through which they pump oxygenated water overlying the sediment (Wang et al. 2001). Our results suggest that this situation does not apply to C. flavicans because buried larvae are in direct contact with anoxic water and thus are likely to be exposed to the contaminants it contains. However, larvae will not necessarily take up contaminants in interstitial water through their exoskeleton; Buchwalter et al. (2002) have shown that the permeability of the insect exoskeleton to water and to some contaminants varies greatly among taxa. That the exoskeleton of Chaoborus larvae is little permeable to dissolved contaminants is supported by studies on C. punctipennis, which have shown that larvae in the water column take up most of their Cd from prey and not from water (Munger and Hare 1997, Munger et al. 1999). However, the permeability of the Chaoborus exoskeleton has not been measured experimentally. Even if Chaoborus larvae do not accumulate Cd from anoxic interstitial water, they could still accumulate this metal from the sediment compartment (sediment plus interstitial water) if they ate benthic prey that accumulated their metals from this compartment. However, benthic animals are not generally observed in the crop of Chaoborus larvae (Xie et al. 1998, Rabette and Lair 1999, Liljendahl-Nurminen et al. 2002, Croteau et al. 2003), suggesting that they take metal up only from the water column compartment through the ingestion of zooplankton.

### Bioturbation by burrowing Chaoborus larvae

By beating the sediment surface with their body as they burrow (Fig. 1), Chaoborus larvae contribute to bioturbation by displacing and resuspending sediment particles. We estimated the potential importance of C. flavicans larvae as agents of surface bioturbation for lakes of various population densities. First we determined the bioturbation factor particular to 4th-instar larvae of this species. We treated the larval body as a cylinder of surface area (A)  $34.5 \text{ mm}^2$ , calculated according to  $A = \pi DH$  where D is the larval diameter (1 mm) and H is the larval length (11 mm) (based on measurements of 25 larvae). Based on our films of larval burrowing, we assumed that a maximum of 75% of the length of the larval body contacts the sediment surface and that both the right- and left-hand sides of the body hit the sediment surface during its lateral movements. Knowing that larvae cross the sediment-water interface twice a day, we calculated that the bioturbation factor for 4th-instar larvae of C. flavicans is  $\sim 50 \text{ mm}^2 \text{ ind.}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (i.e.,  $34.5 \text{ mm}^2 \times 0.75 \times 2$ ). Multiplying this value by the population density of 4th-instar larvae in a given lake provides an estimate of the sediment surface area that is disturbed daily by all 4th-instars of this species. The inverse of this value is the number of days that it will take for larvae to bioturbate  $1 \text{ m}^2$  of the sediment surface. This calculation does not exclude sediment previously disturbed by larval movements, nor does it consider the volume of sediment that is disturbed by larvae, that is, it ignores the depth of disturbance, whether in oxic sediment (larvae strike the surface a total of 6 times on entry and exit) or anoxic sediment (larvae burrow to a depth of 2.5 cm).

In densely populated lakes, surface sediment in the zone inhabited by C. flavicans larvae would be completely disturbed in <1 d, whereas for lakes having low larval densities complete disturbance would be achieved after ~10 d (Table 1). On the one hand, these values are likely under-estimates because they ignore incomplete burrowing efforts (described above). Furthermore, early instars of C. flavicans and larvae of other Chaoborus species are not included in these estimates, so bioturbation by the genus as a whole could be greater. On the other hand, these values are likely overestimates for lakes with an anoxic hypolimnion because not all 4th-instar larvae enter the sediment during the day (Hare and Carter 1987). Overall, the values in Table 1 suggest that Chaoborus larvae could play a heretofore ignored role in the redistribution of surficial sediment particles in lake regions favored by these insects and thereby influence fluxes of nutrients and contaminants across the sediment-water interface (Starkel 1985).

### **Acknowledgements**

We thank P. Marcoux, R. Rodrigue, and L. Bérubé for their technical assistance, and A. Tessier and N. D. Yan for their suggestions on the manuscript. Funding was provided by the Metals In The Environment Research Network (MITE-RN, contribution no. 39), the Québec Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies (FRNT), and the Chapitre Saint Laurent of SETAC.

---

**Literature cited**

- Aller, R. C., and J. Y. Yingst. 1978. Biogeochemistry of tube-dwellings: a study of the sedentary polychaete *Amphitrite ornata* (Leidy). *Journal of Marine Research* 36:201-254.
- Bonomi, G. 1962. La dinamica produttiva delle principali popolazioni macrobentoniche del Lago di Varese. *Memorie dell' Instituto Italiano di Idrobiologia* 15:207-254.
- Buchwalter, D. G., J. J. Jenkins, and L. R. Curtis. 2002. Respiratory strategy is a major determinant of [<sup>3</sup>H]water and [<sup>14</sup>C]chlorpyrifos uptake in aquatic insects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59:1315-1322.
- Charbonneau, P., and L. Hare. 1998. Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects. *Journal of the North American Benthological Society* 17:239-249.
- Charbonneau, P., L. Hare, and R. Carignan. 1997. Use of X-ray images and a contrasting agent to study the behavior of animals in soft sediments. *Limnology and Oceanography* 48:1823-1828.
- Chaston, I. 1969. The light threshold controlling the vertical migration of Chaoborus punctipennis in a Georgia impoundment. *Ecology* 50:916-920.
- Croteau, M.-N., L. Hare, and P. Marcoux. 2003. Feeding patterns of migratory and non-migratory fourth instar larvae of two coexisting Chaoborus species in an acidic and metal

contaminated lake: importance of prey ingestion rate in predicting metal bioaccumulation.

Archiv für Hydrobiologie 158:57-74.

Croteau, M.-N., L. Hare, and A. Tessier. 2001. Differences in Cd accumulation among species of the lake-dwelling biomonitor Chaoborus. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 59:1737-1746.

Dusoge, K. 1983. Biotic structure and processes in the lake system of R. Jorka watershed (Masurian Lakeland, Poland) VIII. Biomass and distribution of benthos in profundal and littoral zones. Ekologia Polska 31:747-760.

Franke, C. 1987. Diurnal and seasonal change of lactate, glucose, and glycogen in larvae and pupae of Chaoborus flavicans (Diptera, Chaoboridae). Archiv für Hydrobiologie 110:565-577.

Gallon, C. 2001. Étude des microenvironnements oxygènes créés par les animaux benthiques fouisseurs: Sialis velata (Megaloptera) et Hexagenia limbata (Ephemeroptera). MSc Thesis, INRS-ETE, Université du Québec, Québec City, Québec.

Gosselin, A., and L. Hare. 2004. Effect of sedimentary cadmium on the behavior of a burrowing mayfly (Ephemeroptera, Hexagenia limbata). Environmental Toxicology and Chemistry 23 (in press).



Hare, L., R. Carignan, and M. A. Huerta-Diaz. 1994. A field study of metal toxicity and accumulation by benthic invertebrates; implications for the acid-volatile sulfide (AVS) model. *Limnology and Oceanography* 39:1653-1668.

Hare, L., and J. C. H. Carter. 1987. Zooplankton populations and the diets of three Chaoborus species (Diptera, Chaoboridae) in a tropical lake. *Freshwater Biology* 17:275-290.

Hare, L., A. Tessier, and L. A. Warren. 2001. Cadmium accumulation by invertebrates living at the sediment-water interface. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:880-889.

Jónasson, P. M. 1972. Ecology and production of the profundal benthos in relation to phytoplankton in Lake Esrom. *Oikos Supplementum* 14:1-148.

LaRow, E. J. 1969. A persistent diurnal rhythm in Chaoborus larvae. II. Ecological significance. *Limnology and Oceanography* 14:213-218.

LaRow, E. J. 1970. The effect of oxygen tension on the vertical migration of Chaoborus larvae. *Limnology and Oceanography* 15:357-362.

Liljendahl-Nurminen, A., J. Horppila, P. Eloranta, T. Malinen, and L. Uusitalo. 2002. The seasonal dynamics and distribution of Chaoborus flavicans larvae in adjacent lake basins of different morphometry and degree of eutrophication. *Freshwater Biology* 47:1283-1295.

- Matisoff, G. 1995. Effects of bioturbation on solute and particle transport in sediments. Pages 201-272 in H. E. Allen (editor). Metal contaminated aquatic sediments. Ann Arbor Press, Ann Arbor, Michigan.
- Matisoff, G., J. B. Fisher, and S. Matis. 1985. Effects of benthic macroinvertebrates on the exchange of solutes between sediments and freshwater. *Hydrobiologia* 122:19-33.
- Munger, C., and L. Hare. 1997. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (Chaoborus punctipennis): implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environmental Science and Technology* 31:891-895.
- Munger, C., L. Hare, and A. Tessier. 1999. Cadmium sources and exchange rates for Chaoborus larvae in nature. *Limnology and Oceanography* 44:1763-1771.
- Nagell, B. 1977. Survival of Cleon dipterum (Ephemeroptera) larvae under anoxic conditions in winter. *Oikos* 29:161-165.
- Oseid, D. M., and L. L. Smith. 1975. Long-term effects of hydrogen sulfide on Hexagenia limbata (Ephemeroptera). *Environmental Entomology* 4:15-18.
- Petridis, D., and A. Sinis. 1995. Benthos of Lake Mikri Prespa (North Greece). *Hydrobiologia* 304:185-196.

- Rabette, C., and N. Lair. 1999. Spatial and temporal distribution of benthic stages of Cyclops vicinus and Chaoborus flavicans in relation to abiotic factors and benthic fauna. *Hydrobiologia* 390:61-72.
- Roth, J. C. 1968. Benthic and limnetic distribution of three Chaoborus species in a southern Michigan Lake (Diptera, Chaoboridae). *Limnology and Oceanography* 13:242-249.
- Saether, O. A. 1972. Chaoboridae. Pages 257-304 in H. J. Elster and W. Ohle (editors). *Das Zooplankton der Binnengewässer*. E. Schweizerbart'sche, Stuttgart, Germany.
- Scholz, F., and I. Zerbst-Boroffka. 1998. Environmental hypoxia affects osmotic and ionic regulation in freshwater midge-larvae. *Journal of Insect Physiology* 44:427-436.
- Starkel, W. M. 1985. Predicting the effect of macrobenthos on the sediment/water flux of metals and phosphorus. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42:95-100.
- Teraguchi, M., and T. G. Northcote. 1966. Vertical distribution and migration of Chaoborus flavicans larvae in Corbett Lake, British Columbia. *Limnology and Oceanography* 11:164-176.
- Tjossem, S. F. 1990. Effects of fish chemical cues on vertical migration behavior of Chaoborus. *Limnology and Oceanography* 35:1456-1468.

Wang, F., A. Tessier, and L. Hare. 2001. Oxygen measurements in the burrows of freshwater insects. *Freshwater Biology* 46:317-327.

Warren, L. A., A. Tessier, and L. Hare. 1998. Modeling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: the relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnology and Oceanography* 43:1442-1454.

Wielgosz, S. 1983. Effects of artificial destratification on zoobenthos and on the trophic status of a Polish reservoir. *Hydrobiologia* 102:197-203.

Xie, P., T. Iwakuma, and K. Fujii. 1998. Studies on the biology of Chaoborus flavicans (Meigen) (Diptera: Chaoboridae) in a fish-free eutrophic pond, Japan. *Hydrobiologia* 368:83-90.

TABLE 1. Surface bioturbation estimates for lakes with various population densities of Chaoborus flavicans. Density data are for 4th-instar larvae, except for the studies noted by an asterisk for which values are for the total of 3rd and 4th instars.

| Lake (country)        | Maximum larval density (no./m <sup>2</sup> ) | Daily surface bioturbation (m <sup>2</sup> ) | Time to bioturbate 1 m <sup>2</sup> (d) | Reference for larval density estimates |
|-----------------------|--|--|---|--|
| Frains (USA)          | 2,300  | 0.12   | 8.7                                     | Roth 1968                              |
| Laflamme (Canada)     | 3,800  | 0.19   | 5.3                                     | Hare et al. 2001                       |
| Aydat (France)        | 89,600                                       | 4.50   | 0.2                                     | Rabette and Lair 1999                  |
| Hiidenvesi (Finland)  | 12,600                                       | 0.63   | 1.6                                     | Liljendahl-Nurminen et al. 2002        |
| NIES pond (Japan)     | 18,600                                       | 0.93   | 1.1                                     | Xie et al. 1998                        |
| Mikri Prespa (Greece) | 2,150*                                       | 0.11   | 9.3                                     | Petridis and Sinis 1995 <sup>a</sup>   |
| Majcz Wielki (Poland) | 130,000                                      | 6.50   | 0.2                                     | Dusoge 1983 <sup>a</sup>               |
| Mutek (Poland)        | 41,000*                                      | 2.00   | 0.5                                     | Wielgosz 1983 <sup>a</sup>             |
| Varese (Italy)        | 63,000*                                      | 3.20   | 0.3                                     | Bonomi 1962 <sup>a</sup>               |
| Esrom (Denmark)       | 5,000*                                       | 0.25   | 4.0                                     | Jónasson 1972                          |

<sup>a</sup> From Xie et al. 1998

## FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Sequence of movements used by a 4th-instar larva of Chaoborus flavicans to approach and burrow into sediment, as drawn from infrared video images (<http://www.inrs-eau.quebec.ca/activites/groupe/biogeo.htm>) and radiographs (final buried position). The burrowing portion of the sequence lasts ~2 s. Note that larval movements put sediment into suspension.

FIG. 2. Radiographs showing 4th-instar Chaoborus flavicans larvae in sediment. Solid arrows indicate larvae and the dotted arrow points to a white dot of X-ray dense material on the larval head capsule. A. --- Note the depth of larval burrowing and the absence of a tube connecting larvae to the water overlying the sediment. B. --- Note the remnant of a path made by a larva during entry into the sediment. C. --- Note head-up position of larvae, as indicated by mark on head capsule.



**Figure 1**

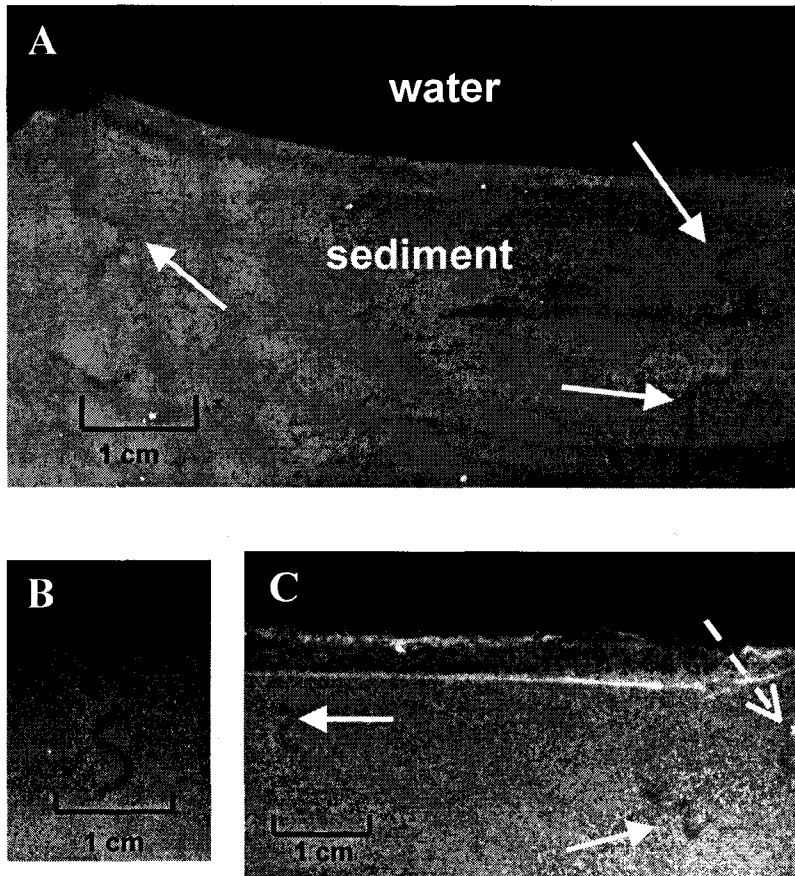


Figure 2



## **7. ARTICLE #2**

---

**Effet du cadmium sédimentaire sur le comportement d'une éphémère fousseuse  
(Ephemeroptera, *Hexagenia limbata*)**

**Anne Gosselin et Landis Hare**

Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)  
Université du Québec, C.P. 7500, Sainte-Foy,  
Québec, Canada G1V 4C7

Environmental Toxicology and Chemistry (2004)

23(2): 383-387

## Résumé de l'article

Les réponses comportementales des invertébrés aquatiques peuvent constituer les premiers signes indiquant des effets délétères dus aux métaux traces. Nous avons mené des expériences afin de déterminer si le comportement des nymphes de l'éphémère fousseuse *Hexagenia limbata* est modifié par la présence de cadmium (Cd) dans les sédiments. Pour ce faire, nous avons d'abord exposé *H. limbata* à des concentrations de Cd sédimentaire équivalentes à celles retrouvées dans les lacs sujets aux émissions des fonderies (20 µg/g poids sec). Nous avons ensuite comparé l'activité fousseuse de nymphes témoins et contaminées en Cd à l'aide de radiographies révélant les tunnels creusés par les nymphes. Nous avons aussi étudié le temps alloué par les deux groupes de nymphes à leurs diverses activités (ventilation, marche, fouissage/alimentation, nettoyage et retournement) en visionnant des films enregistrés à l'aide d'une caméra sensible à l'infrarouge. Les résultats obtenus suggèrent que l'activité fousseuse des individus contaminés et témoins ne diffère pas de façon significative. De plus, le temps alloué par les nymphes à diverses activités était similaire pour les individus des groupes témoins et contaminés en Cd. Sur la base de ces résultats, nous concluons que le Cd n'a pas d'effet sur le comportement de *H. limbata*, du moins pour la gamme de concentrations que nous avons mesurées chez les nymphes.

**Running head:** Effect of sedimentary Cd on mayfly behavior

**EFFECT OF SEDIMENTARY CADMIUM ON THE BEHAVIOR OF A  
BURROWING MAYFLY (EPHEMEROPTERA, *HEXAGENIA LIMBATA*)**

ANNE GOSSELIN and LANDIS HARE\*

Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE),  
Université du Québec, C.P. 7500, Sainte-Foy, Québec, G1V 4C7, Canada

\*To whom correspondence may be addressed ([landis@inrs-ete.quebec.ca](mailto:landis@inrs-ete.quebec.ca)).

**Total number of words:** 4,240 (text, references, tables and figure legends)

**Abstract**—Behavioral responses of aquatic invertebrates can serve as precocious indicators of adverse effects caused by metals. We conducted experiments to determine if the behavior of nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera) was modified by the presence of cadmium (Cd) in sediments. We first exposed *H. limbata* to concentrations of sedimentary Cd found in lakes subject to smelter emissions (20 µg/g dry wt). We then compared the burrowing activity of control and Cd-contaminated nymphs by means of radiographs. We also studied the time allotted by nymphs to various activities (irrigation, walking, burrowing/feeding, cleaning, turning), as determined from films taken using an infrared video camera. The results obtained suggest that there is no significant difference in the burrowing activity of control versus Cd-contaminated individuals. Furthermore, the time spent in various behavioral activities was similar between control and Cd-contaminated nymphs. Given these results, we conclude that Cd has no effect on the behavior of *H. limbata* for the range of Cd concentrations that we measured in nymphs.

**Keywords:** *Hexagenia limbata* Behavior Cadmium Toxicity Sediment

## INTRODUCTION

Mining and smelting activities are major sources of trace metals to aquatic ecosystems [1,2]. Much of the metal present in impacted freshwaters is found in bottom sediments where it can be harmful to benthic animals. Despite their general lack of ecological relevance [3], acute toxicity tests are widely used to set sediment quality guidelines. Such tests can be criticized for being of too short duration, exposing animals to metals at unrealistically high concentrations and assessing mostly extreme endpoints, such as lethality. More precocious behavioral effects usually go unreported even though they are often the first response of an organism following its exposure to a pollutant [4]. Such effects can compromise an animal's ability to survive at polluted sites [5]. Effects of metals on the behavior of benthic animals have been little studied [6], in part because the sediment in which they live hides their activities.

The trace metal cadmium (Cd) is readily accumulated by aquatic organisms and is known for its toxicity [7,8], including behavioral effects. Marine sediment contaminated with Cd has been shown to decrease the burrowing activity of marine isopods [9] and bivalves [10]. In contrast, Olla et al. [11] did not observe significant differences in burrowing or feeding between control and Cd-contaminated marine polychaetes. Three species of freshwater insects (*Chironomus* spp.) did not avoid Cd-contaminated sediments [12].

We investigated the effects of sedimentary cadmium on the behavior of the burrowing mayfly *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera) to help resolve these contrasting results reported among animal groups. Nymphs of *H. limbata* are widely distributed and often abundant in North American lakes and rivers, as well as being an important agent of bioturbation [13] and a major source of food for fish [14]. *Hexagenia* also is commonly

used as a test animal to assess sediment toxicity [15,16]. We asked the question: is the behavior of *H. limbata* changed by Cd at concentrations that are present in the sediment of metal-contaminated lakes? To answer this question, we used X-ray images to compare the burrows dug by control and Cd-contaminated nymphs as an indicator of their burrowing activity. We also recorded and compared the irrigation, feeding and walking activities of nymphs in self-constructed burrows by means of an infrared video camera.

## METHODS

### *Collection and preparation of nymphs and sediment*

Sediment and *Hexagenia limbata* nymphs were collected at a depth of 3 m from Lake St. Joseph (46°55'N, 71°40'W), a Shield lake near Quebec City, Quebec, Canada. The insects were collected by divers using an underwater benthic sampling net (1-mm mesh), sieved from the sediment and taken to the laboratory in coolers. From the same site, divers also collected sediment (0-10 cm depth) that was then sieved in the laboratory through a 1-mm mesh aperture net to remove resident animals and coarse particulate matter. Cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) dissolved in lake water was added to this sieved sediment to create a nominal total Cd concentration of 20  $\mu\text{g/g}$  dry wt. This Cd concentration can be found in the sediments of lakes and rivers impacted by trace metal pollution [17,18] (L. Hare unpublished). Control or Cd-contaminated sediment was placed in aquaria and lake water was added and aerated gently. *Hexagenia limbata* nymphs (identified by color patterns on reared adults [19]) were held for two weeks in Cd-contaminated or control sediment to allow acclimation to laboratory conditions (10 °C in the dark) and to reach a steady state in their Cd concentrations (attained after one week; data not shown). Nymph mortality was very low (~ 5%) in both the control and Cd-contaminated treatments. Dissolved Cd

concentrations in the overlying water of the aquaria were measured using Plexiglas™ diffusion samplers (peepers). We did not measure dissolved Cd in interstitial water because nymphs irrigate their burrows and thus are likely little exposed to Cd in sediment porewater [20]. These samplers were suspended in water 10 d after the aquaria were set up, and were sampled 4 d later. Samples for Cd analysis were removed by piercing the peeper membrane with a pipette fitted with an acid-cleaned tip. These samples were injected into prewashed and preacidified (53 µl of 1.35 N Anachemia HNO<sub>3</sub>) high-density polyethylene bottles (4-mL capacity).

#### *Burrow structure*

An X-ray dense, non-toxic compound, molybdenum carbide (Mo<sub>2</sub>C at 12 g/L), was added to both contaminated and control sediment to increase the contrast between water-filled burrows and sediment [21]. These sediments were poured into a series of thin Plexiglas™ aquaria (40 × 25 × 2.5 cm) and lake water was added slowly onto a piece of Styrofoam™ placed on the sediment surface to reduce the resuspension of particles. Control and Cd-contaminated individuals were added one to an aquarium containing either control or Cd-contaminated sediment, respectively. To minimize individual variability, we used female nymphs of similar size, that is, 22.0 ± 2.3 mm in length (mean ± standard deviation). We chose large nymphs to facilitate behavioral observations, which obliged us to conduct the experiments at a moderately low temperature (10 °C) to ensure that nymphs would not emerge as adults. Aquaria were maintained in the dark without aeration; measurements of oxygen (~ 100 % saturation) and pH (6.34–6.62) in overlying aquarium water showed that these parameters were stable over time and independent of sediment Cd. X-ray film (X-Omat XK-1; Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) to be exposed was

loaded into a cassette designed to increase film sensitivity and placed behind each aquarium. Film was exposed using a portable X-ray unit (PX-20N; Acoma X-ray Industry, Tokyo, Japan) at settings known to produce good-quality images (exposure time 0.32 s at a current of 20 mA and a voltage of 50 kVP from a distance of 50 cm; [21]). One radiograph was taken prior to the introduction of nymphs to record the presence of artifacts. The behavior of 6 control nymphs was measured after 24, 48 and 72 h to determine the optimum observation duration. Subsequent observations were limited to periods of 24 h because beyond this time the large number of burrows dug by some nymphs made it difficult to quantify total burrow length. The burrow lengths of an additional 6 control and 12 Cd-contaminated nymphs were measured 24 h after nymph introduction. Radiographs were developed in our laboratory. Burrow length and maximum depth were measured directly on each radiograph (1:1 scale) using a manual curvimeter.

#### *Mayfly behavior*

Cadmium-contaminated or control sediment was poured into a series of thin Plexiglas™ aquaria (15 × 13 × 0.6 cm) and a Cd-contaminated or control nymph, respectively, was added to each aquarium. These aquaria were immersed in a larger aquarium (25 × 48 × 30 cm) containing lake water that was aerated to maintain oxygen concentrations near saturation. Aquaria were maintained in the dark at 10 °C to delay nymph emergence. A net was fixed to the top of each thin aquarium to retain larvae until they had dug a burrow (generally within a few hours), at which time the net was removed. When at least half of a burrow's interior was visible through the walls of the thin aquarium, we began filming using an infrared video camera. A source of infrared light (Provideo IR-200; CSI/SPECO, Amityville, NY, USA) was directed towards the aquarium to be filmed while the camera



(WV-BP130 1/3" CCD; Panasonic Canada, Mississauga, ON, Canada) connected to a VCR system (SRT-6000; Sanyo Canada, Toronto, ON, Canada) recorded the activity of the nymph in its burrow [22]. This procedure allowed us to film nymphs in the dark, as would be the case in nature. The behavior of individual nymphs was recorded for 24 h, during which time nymphs were sometimes totally or partially obscured by the sediment. For five of the six nymphs studied, part of their body was visible 92% of the time and their entire body was visible 57% of the time. Because of this limited visibility, the total observation time on which calculations (% of time) were based varied for the various types of behavior. During the viewing of films we classified nymph behavior into several categories including irrigation (gill beating), walking, burrowing/feeding, gill cleaning, turning around and inactivity. We noted the time allotted by individual nymphs to each of these activities, some of them occurring simultaneously. We also recorded the duration and number of episodes for each type of behavior, as well as the speed of walking and frequency of gill beating. To evaluate these speeds, we randomly chose five and ten episodes of walking and gill beating (respectively) for each individual.

A long observation period (24 h) was chosen because preliminary observations revealed that nymphs sometimes exhibit single behavior patterns (e.g., irrigation) for several hours at a time. Because of the time required to view and analyze 24 h of film, we were obliged to limit our observations to three control and three Cd-contaminated nymphs. To minimize variability, we chose nymphs of the same sex (females) and size (mean length =  $25.3 \pm 2.2$  (standard deviation) mm).

*Cd analyses and statistics*

To minimize contamination, all labware was soaked in 15% nitric acid for 24 h and rinsed repeatedly in ultrapure water ( $> 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ) prior to use. Dissolved Cd concentrations in water samples were measured by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (SIMAA 6000; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Standard reference water samples (1643d, National Institute of Standards and Technology) were also analyzed for Cd and measured concentrations were within the certified range. Dry sediment samples were digested with a mixture of hydrofluoric, nitric and perchloric acids for the determination of total Cd. As a quality control, recovery of a certified sediment reference material (PACS-2, National Research Council of Canada, Ottawa, ON, Canada) was determined; the recovery for two determinations was 95%. Total Cd was measured by inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry (Axial Vista; Varian Canada, Mississauga, ON, Canada). The method detection limit was  $0.3 \mu\text{g Cd/g dry wt}$ .

At the end of each experiment, contaminated nymphs were held in Cd-poor sediment for 5 h so that the majority of the Cd-rich sediment present in the gut could be replaced by Cd-poor sediment [23]. All nymphs were then held in lake water for 48 h (to allow defecation), dried in a lyophiliser and weighed. Dried samples were digested in Teflon vials in concentrated nitric acid (Aristar grade;  $100 \mu\text{L}$  per mg sample dry wt) in an autoclave at  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  for 3 h. Cooled samples were diluted with ultrapure water and Cd concentrations were determined by flameless atomic absorption spectrophotometry (Spectra AA-300; Varian, Palo Alto, CA, USA). A certified reference material (lobster hepatopancreas, Tort-1, National Research Council Canada, Ottawa, ON, Canada) was digested in the same way; recovery averaged 103% for two determinations and Cd concentrations measured were within the certified range. The method detection limit was  $0.03 \mu\text{g Cd/g dry wt}$ .

Statistical analyses were performed using SYSTAT<sup>®</sup> 10 (SPSS, Chicago, IL, USA) software [24]. All values are means  $\pm$  standard deviations. Because data were normally distributed, means were compared using the Student *t* test (with  $\alpha = 0.05$ ). Results for a comparable non-parametric test (Mann-Whitney) were identical.

## RESULTS AND DISCUSSION

Sediment and overlying water Cd concentrations for control and Cd-contaminated aquaria are given in Table 1. Concentrations measured in nymphs exposed to Cd (10 to 38  $\mu\text{g/g}$  dry wt) were within the range of those reported for *H. limbata* from Cd-rich lakes in mining areas (9 to 57  $\mu\text{g/g}$  dry wt; [23,25] (L. Hare, unpublished data)), and were 11 to 42 times those measured in our control nymphs (Table 1). This variability in Cd concentrations is high though not unusual for *Hexagenia* [23,26].

### *Burrow structure*

The maximum burrow depths of Cd-contaminated ( $2.9 \pm 1.5$  cm) and control ( $2.2 \pm 0.9$  cm) nymphs were not significantly different ( $p = 0.25$ ). Furthermore, there was no significant relationship ( $p > 0.05$ ) between the cumulative burrow length of an individual and its Cd concentration (Fig. 1), as evidenced by the radiographs for two individuals having similar Cd concentrations (insets in Fig. 1). The burrowing activity of both control and Cd-contaminated nymphs varied widely among individuals but was not related to nymph Cd concentrations. Both Hunt [14] and Charbonneau and Hare [13] reported that individuals of *H. limbata* vary greatly in their burrowing activity level. Behavioral toxicity occurs when the introduction of a chemical induces a behavioral change that exceeds the normal range of variability [4], which is not the case here. Our results suggest that, at the

Cd concentrations accumulated by nymphs, which are similar to those observed for nymphs in Cd rich lakes in mining areas, this metal has no discernible effect on burrowing activity.

In contrast to our results, some studies on *Hexagenia* report a decrease in the activity of nymphs exposed to Cd-spiked sediments. Odin et al. [27] observed that the turbidity of water overlying sediment with *Hexagenia rigida* nymphs was almost three times higher in containers with control sediment than in those with elevated sedimentary Cd. In their study, maximum nymph Cd concentrations were somewhat lower ( $\sim 9 \mu\text{g/g}$  dry wt) than those in our Cd-contaminated nymphs ( $20 \pm 6 \mu\text{g/g}$  dry wt) and only three times higher than those in their control nymphs. Although the sediment used by Odin et al. [27] was also contaminated with methyl mercury, the authors did not ascribe a reduction in nymph activity to this metal based on the results of their previous experiments. However, nymphs in the Odin et al. [27] experiments were held at a higher temperature ( $24^\circ\text{C}$ ) than nymphs in our study ( $10^\circ\text{C}$ ), which could have contributed to behavioral effects occurring at lower nymph Cd concentrations in their experiments. In a similar study by Bartsch et al. [26] on *Hexagenia bilineata*, turbidity decreased as Cd concentrations in spiked sediment increased but then inexplicably returned to control levels at their highest sediment Cd concentration. At this sediment Cd concentration, nymph Cd concentrations ( $6 \mu\text{g/g}$  dry wt) were 27 times those of their control nymphs.

The results of Odin et al. [27] and Bartsch et al. [26] are ambiguous because these investigators used an indirect measurement, turbidity, to assess the effect of Cd on nymph behavior. Because turbidity depends on several behaviors (burrowing, feeding and ventilation), changes in this variable are difficult to interpret. Furthermore, different *Hexagenia* species were used in each of the three studies. As shown by Aoki et al. [28],

species of the mayfly *Baetis* differ in their tolerance to Cd due to differences in their abilities to produce a metal-binding protein that detoxifies this metal.

### *Mayfly behavior*

Because burrow length is only one behavioral indicator of many, we compared the behaviors of Cd-contaminated and control *H. limbata* nymphs by filming individuals in their self-constructed burrows to determine if this insect's feeding, locomotor and irrigation behaviors were affected by Cd.

The mean concentrations of Cd measured for the six individuals filmed are given in Table 1 and the proportions of time that nymphs devoted to five types of behavior are shown in Figure 2; these activities are discussed below in order of the time spent by nymphs from the most to the least important.

First, nymphs irrigated their burrows by means of rhythmic gill movements. The current created by movement of the gills pulls oxygenated overlying water into the burrow and clears excavated substrate and wastes. Water flow also helps to maintain burrow integrity in fine sediment by preventing collapse [29]. Nymphs irrigated their burrows ~ 85% of the time and there was no significant difference between control and Cd-contaminated individuals. This almost constant beating of the gills is consistent with the observation that *H. limbata* nymphs maintain constant high oxygen concentrations in their burrows (>75% saturation, [20]), and is in concert with their known sensitivity to low oxygen [30]. There was wide variation in both the duration of individual irrigation episodes (a few min to a few hours) and the frequency at which an individual beat its gills (5 to 150 beats/min), which is common for *Hexagenia* nymphs [22,31,32].

Second, nymphs alternately moved their prothoracic legs accompanied by to and fro motions of the head. We refer to this behavior as “burrowing/feeding” since it was difficult to distinguish whether the prothoracic legs were simply dislodging sediment, or bringing it to the mouth to eat [33], or both. There was no difference between control and Cd-contaminated nymphs in the proportion of time that they spent in this activity (Fig. 2). Likewise, there were no significant differences between nymphs in periods of inactivity ( $p = 0.2$ ) or in other behavioral categories that are as follows (Fig. 2). Nymphs occasionally walked a few centimeters forwards or backwards, and while walking forwards sometimes pushed sediment with their head thereby dislodging large amounts of sediment and reshaping their burrow. Nymphs used their metathoracic legs to clean their gills (1%) and occasionally turned around to face the opposite burrow opening (0.2%). Lastly, nymphs were periodically inactive (2%). We did not observe nymphs leaving their burrows, which suggests that they rarely do so [14].

The average walking speeds and gill-beating frequencies of contaminated individuals were the same as that for control nymphs (Fig. 3). The average gill-beating frequency that we measured (16 beats/min) was similar to that reported by Eriksen [34] for *H. limbata* in oxygen saturated water at 13 °C (18 beats/min).

Although the mean duration and number of single episodes for each type of behavior were quite variable among individuals, means were similar between control and Cd-contaminated individuals. On the one hand, we cannot rule out the possibility that observations on a very large number of nymphs over a long period of time might have overcome this large natural behavioral variability among *Hexagenia* nymphs [13,14] to reveal differences between control and Cd-contaminated nymphs. On the other hand, we can ask if the effect of Cd is that subtle, would it be meaningful at the population level?

In contrast to the lack of behavioral effects in our study, larvae of the chironomid *Glyptotendipes pallens* are reported to behave abnormally when exposed to Cd in water [6]. However, the Cd concentrations used in this and many other studies [35] are not environmentally realistic because they are much higher than those reported from metal-impacted freshwaters [36,37]. Gerhardt [38] reported that the impacts vary among mayfly genera because the locomotion of *Baetis rhodani* was affected by Cd whereas that of *Leptophlebia marginata* was not. Hare and Shooner [12] found that *Chironomus* larvae do not prefer to burrow in control sediments over those amended with Cd.

We conclude that Cd had no detectable effect on the behavior of *Hexagenia limbata* for the range of Cd concentrations that we measured in nymphs. This lack of effect is consistent with the wide distribution of this species in circum-neutral lakes influenced by fallout from a metals smelter in Rouyn-Noranda, Quebec (11 of 13 lakes sampled (L. Hare, unpublished)). However, we cannot exclude the possibility that such Cd concentrations could have a detrimental effect on *H. limbata* populations if nymphs are also stressed by other variables such as high acidity or temperature, low oxygen, or other contaminants. Further investigations are needed to assess these interactions so as to better evaluate the potential threat of metals to this and other aquatic invertebrates.

*Acknowledgement*—Funding was provided by the Metals In The Environment Research Network (contribution number 38), the Québec Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies and the Chapitre Saint-Laurent of SETAC. We thank A. Tessier for comments on the manuscript and P. Marcoux, L. Croisetière, R. Rodrigue, P. Fournier, M.G. Bordeleau and J. Orvoine for their technical assistance.

## REFERENCES

1. Nriagu JO, Pacyna JM. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333:134-139.
2. Pacyna JM, Scholtz MT, Li Y-F. 1995. Global budget of trace metal sources. *Environ Rev* 3:145-159.
3. Luoma SN. 1995. Prediction of metal toxicity in nature from bioassays: limitations and research needs. In Tessier A, Turner DR, eds, *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA, pp 609-660.
4. Rand GM. 1985. Behavior. In Rand GM, Petrocelli SR, eds, *Fundamentals of Toxicology*. Hemisphere Publishing, Washington, DC, USA, pp 221-263.
5. Wiederholm T. 1984. Responses of aquatic insects to environmental pollution. In Resh VH, Rosenberg DM, eds, *The Ecology of Aquatic Insects*. Praeger, New York, NY, USA, pp 508-557.
6. Heinis F, Timmermans KR, Swain WR. 1990. Short-term sublethal effects of cadmium on the filter feeding chironomid larva *Glyptotendipes pallens* (Meigen) (Diptera). *Aquat Toxicol* 16:73-86.
7. Williams KA, Green DW, Pascoe D. 1985. Studies on the acute toxicity of pollutants to freshwater macroinvertebrates 1. Cadmium. *Arch Hydrobiol* 102:461-471.
8. Wright DA, Welbourn PM. 1994. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ Rev* 2:187-214.
9. Pynnönen K. 1996. Heavy metal-induced changes in the feeding and burrowing behaviour of a Baltic isopod, *Saduria (Mesidotea) entomon* L. *Mar Environ Res* 41:145-156.



10. McGreer ER. 1979. Sublethal effects of heavy metal contaminated sediments on the bivalve *Macoma balthica* (L.). *Mar Pollut Bull* 10:259-262.
11. Olla BL, Estelle VB, Swartz RC, Braun G, Studholme AL. 1988. Responses of polychaetes to cadmium-contaminated sediment: comparison of uptake and behavior. *Environ Toxicol Chem* 7:587-592.
12. Hare L, Shooner F. 1995. Do aquatic insects avoid cadmium-contaminated sediments? *Environ Toxicol Chem* 14:1071-1077.
13. Charbonneau P, Hare L. 1998. Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects. *J N Am Benthol Soc* 17:239-249.
14. Hunt BP. 1953. *The Life History and Economic Importance of a Burrowing Mayfly, Hexagenia limbata, in Southern Michigan Lakes*. Bulletin of the Institute for Fisheries Research No 4, Institute for Fisheries Research, Michigan Department of Conservation, Ann Arbor, MI, USA.
15. Burton GA. 1991. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ Toxicol Chem* 10:1585-1627.
16. Leonhard SL, Lawrence SG, Friesen MK, Flannagan JF. 1980. Evaluation of the acute toxicity of the heavy metal cadmium to nymphs of the burrowing mayfly, *Hexagenia rigida*. In Flannagan JF, Marshall KE, eds, *Advances in Ephemeroptera Biology*. Plenum, New York, NY, USA, pp 467-465.
17. Andres S, Ribeyre F, Boudou A. 1998. Effects of temperature and exposure duration on transfer of cadmium between naturally contaminated sediments and burrowing mayfly nymphs (*Hexagenia rigida*). *Arch Environ Contam Toxicol* 35:295-301.
18. Arafat NM. 1985. The impact of mining and smelting on trace metal distribution in lake sediments around Rouyn-Noranda, Quebec. *Water Pollut Res J Can* 20:1-8.

19. Spieth HT. 1941. Taxonomic studies on the Ephemeroptera. II. The genus *Hexagenia*. *Amer Midl Nat* 26:233-280.
20. Wang F, Tessier A, Hare L. 2001. Oxygen measurements in the burrows of freshwater insects. *Freshw Biol* 46:317-327.
21. Charbonneau P, Hare L, Carignan R. 1997. Use of X-ray images and a contrasting agent to study the behavior of animals in soft sediments. *Limnol Oceanogr* 42:1823-1828.
22. Gallon C. 2001. Étude des Microenvironnements Oxiques Créés par les Animaux Benthiques Fouisseurs: *Sialis velata* (Megaloptera) et *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera). MSc thesis. INRS-ETE, Université du Québec, Québec, QC, Canada.
23. Hare L, Campbell PGC, Tessier A, Belzile N. 1989. Gut sediments in a burrowing mayfly (Ephemeroptera, *Hexagenia limbata*): their contribution to animal trace element burdens, their removal and the efficacy of a correction for their presence. *Can J Fish Aquat Sci* 46:451-456.
24. SYSTAT® 10. 2000. SPSS, Chicago, IL, USA.
25. Hare L, Campbell PGC. 1992. Temporal variations of trace metals in aquatic insects. *Freshw Biol* 27:13-27.
26. Bartsch MR, Cope WG, Rada RG. 1999. Effects of cadmium-spiked sediment on cadmium accumulation and bioturbation by nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia bilineata*. *Water Air Soil Pollut* 109:277-292.
27. Odin M, Ribeyre F, Boudou A. 1995. Cadmium and methylmercury bioaccumulation by nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* from the water column and sediment. *Environ Sci Pollut Res* 2:145-152.

28. Aoki Y, Hatakeyama S, Kobayashi N, Sumi Y, Suzuki T, Suzuki KT. 1989. Comparison of cadmium-binding protein induction among mayfly larvae of heavy metal resistant (*Baetis thermicus*) and susceptible species (*B. yoshinensis* and *B. sahoensis*). *Comp Biochem Physiol* 93C:345-347.
29. Keltner J, McCafferty WP. 1986. Functional morphology of burrowing in the mayflies *Hexagenia limbata* and *Pentagenia vittigera*. *Zool J Linn Soc* 87:139-162.
30. Winter A, Ciborowski JJH, Reynoldson TB. 1996. Effects of chronic hypoxia and reduced temperature on survival and growth of burrowing mayflies, *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera: Ephemeridae). *Can J Fish Aquat Sci* 53:1565-1571.
31. Landrum PF, Poore R. 1988. Toxicokinetics of selected xenobiotics in *Hexagenia limbata*. *J Gt Lakes Res* 14:427-437.
32. Morgan EL, Young RC, Crane CN. 1987. Developing automated multispecies biosensing for contaminant detection. *Water Sci Technol* 19:73-84.
33. Zimmerman MC, Wissing TE. 1980. The nutritional dynamics of the burrowing mayfly *Hexagenia limbata*. In Flannagan JF, Marshall KE, eds, *Advances in Ephemeroptera Biology*. Plenum, New York, NY, USA, pp 231-257.
34. Eriksen CH. 1963. Respiratory regulation in *Ephemera simulans* Walker and *Hexagenia limbata* (Serville) (Ephemeroptera). *J Exp Biol* 40:455-467.
35. Hare L. 1992. Aquatic insects and trace metals: Bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 22:327-369.
36. Hare L, Tessier A. 1996. Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature* 380:430-432.

37. Van Hattum B, Timmermans KR, Govers HA. 1991. Abiotic and biotic factors influencing *in situ* trace metal levels in macroinvertebrates in freshwater ecosystems. *Environ Toxicol Chem* 10:275-292.
38. Gerhardt A. 1990. Effects of subacute doses of cadmium on pH-stressed *Leptophlebia marginata* (L.) and *Baetis rhodani* Pictet (Insecta: Ephemeroptera). *Environ Pollut* 67:29-42.

Table 1. Mean ( $\pm$  standard deviation) concentrations of Cd in sediment, water and *H. limbata* for the two treatment groups (control and Cd-contaminated)

| Matrix   | units                  | Control         | Cd-contaminated |
|--|------------------------|-----------------|-----------------|
| Sediment<br>( $n = 3$ )                                | $\mu\text{g/g dry wt}$ | $0.6 \pm 0.1$   | $18.9 \pm 0.6$  |
| Overlying water (total dissolved)<br>( $n = 12$ )      | $\mu\text{g/L}$        | $0.02 \pm 0.01$ | $5.8 \pm 0.5$   |
| <i>Hexagenia limbata</i> - radiography<br>( $n = 12$ ) | $\mu\text{g/g dry wt}$ | $0.7 \pm 0.4$   | $20.3 \pm 6.6$  |
| <i>Hexagenia limbata</i> - films<br>( $n = 3$ )        | $\mu\text{g/g dry wt}$ | $1.9 \pm 1.2$   | $30.2 \pm 19.2$ |

## Figure titles

Fig. 1. Relationship between cumulative burrow length (after 24 h) and the Cd concentration of individual *H. limbata* from the control and Cd-contaminated groups. Radiographs in inset show the burrow(s) dug by two individuals having similar Cd concentrations; overlying water is black, sediment is light gray and water-filled burrows are dark gray. Original radiographs are 24 cm wide (life size).

Fig. 2. Proportion of time devoted to each type of behavior for control and Cd-contaminated *H. limbata* (means  $\pm$  standard deviations). The "bur./feed." activity refers to burrowing/feeding. The sum of the percentages for the six types of behavior exceeds 100% because some activities occurred simultaneously.

Fig. 3. Mean ( $\pm$  standard deviation) walking speeds and gill beating frequencies for control and Cd-contaminated *H. limbata*.

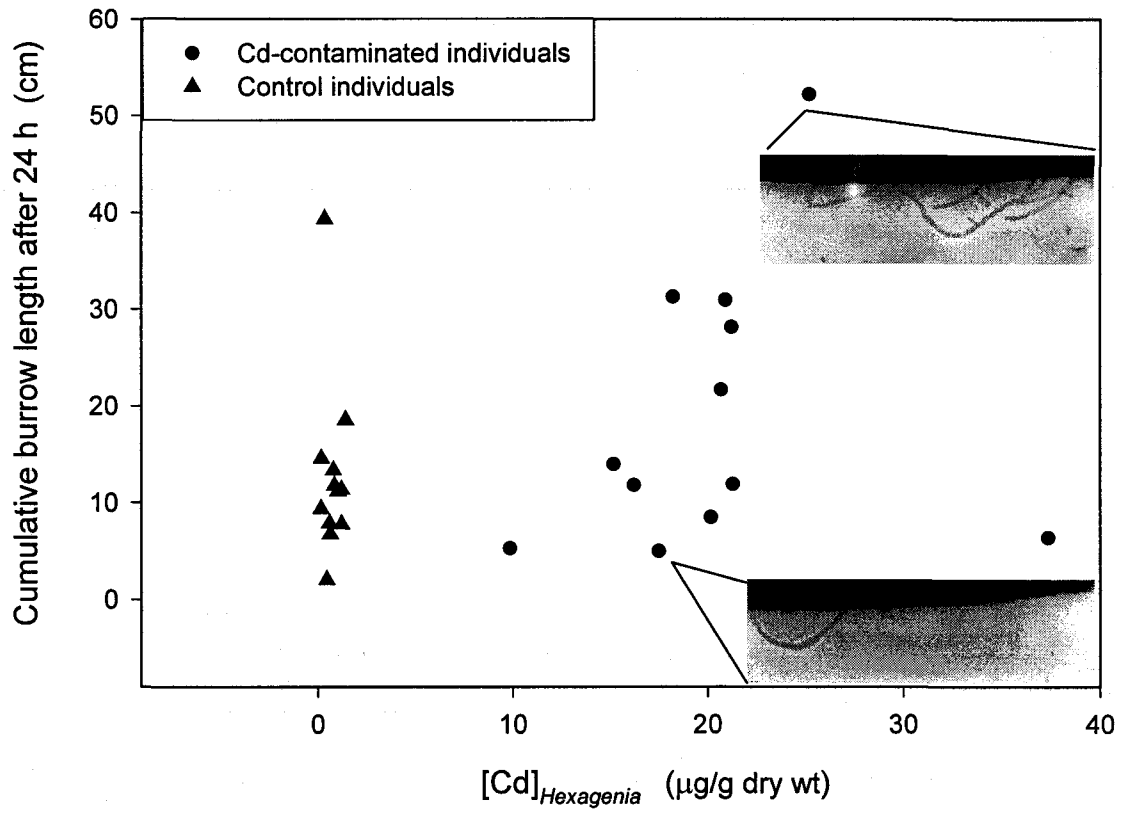


Figure 1

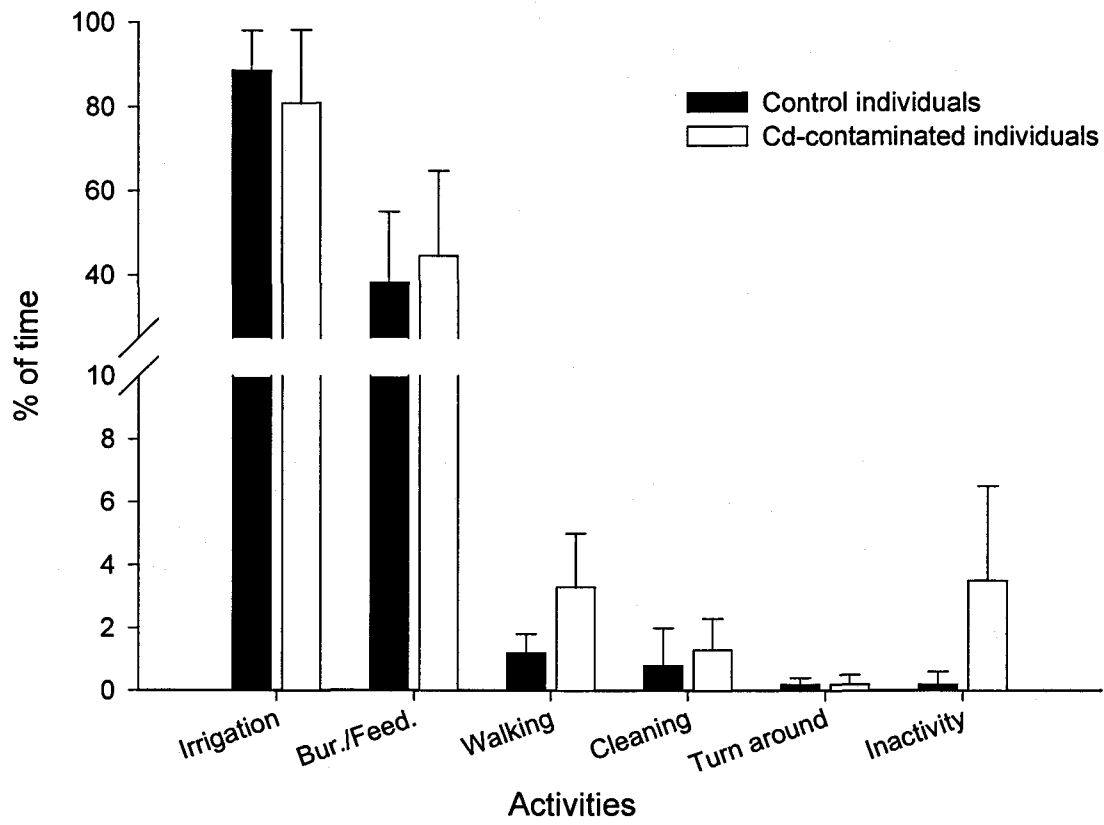


Figure 2



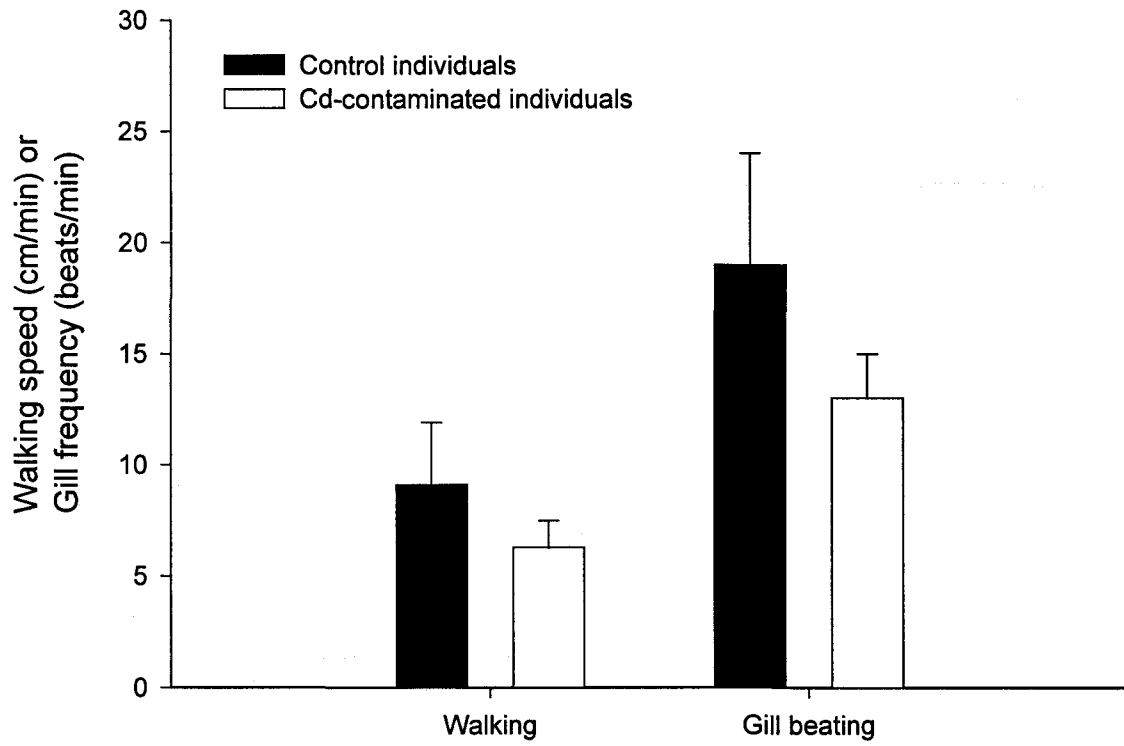


Figure 3



## **8. ARTICLE #3**

---

### **Utilisation d'un nouveau microsenseur pour mesurer les courants d'eau dans les tunnels creusés par des invertébrés aquatiques de petite taille**

**Anne Gosselin, Landis Hare, André Tessier et Lise Rancourt**

Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)  
Université du Québec, C.P. 7500, Sainte-Foy,  
Québec, Canada G1V 4C7

en préparation pour soumission dans  
Limnology and Oceanography : Methods

## Résumé de l'article

L'activité de bioirrigation des invertébrés aquatiques vivant dans les sédiments est susceptible d'influencer plusieurs processus géochimiques ainsi que les flux d'éléments traces à travers l'interface sédiment-eau. Nous avons testé un nouveau microsenseur conçu pour mesurer des courants de faible vitesse (aussi peu que quelques  $\mu\text{m s}^{-1}$ ) tels ceux circulant dans les tunnels de petits invertébrés. Contrairement à la plupart des appareils de mesure, le microsenseur que nous avons utilisé peut être inséré, avec une perturbation minimale, à l'intérieur des tunnels naturels creusés par les animaux. Le microsenseur est basé sur la perte diffuse d'un gaz traceur à travers une membrane perméable située dans la pointe du capteur. Nous avons d'abord développé un moyen de calibrer le capteur, puis nous avons utilisé le capteur calibré pour mesurer la vitesse du courant dans le tunnel de l'éphémère aquatique *Hexagenia limbata*. Nous avons également utilisé une caméra sensible à l'infrarouge afin de relier les variations dans les vitesses de courant aux changements dans le comportement de *H. limbata*. En dernier lieu, nous avons calculé les débits d'eau ( $\text{ml min}^{-1}$ ) engendrés par cette éphémère dans le but de quantifier son comportement d'irrigation. De façon générale, ce microsenseur présente un grand potentiel d'utilisation pour les études comportementales et biogéochimiques portant sur des animaux aquatiques fouisseurs, particulièrement ceux de petite taille retrouvés en eau douce.

**Running head:** Novel microsensor for flow measurements in invertebrate burrows

**Use of a novel microsensor for flow measurements in the burrows of small aquatic invertebrates**

Anne Gosselin, Landis Hare<sup>1</sup>, André Tessier and Lise Rancourt

Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE),  
Université du Québec, C.P. 7500, Sainte-Foy, QC, G1V 4C7, Canada

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed ([landis@inrs-ete.quebec.ca](mailto:landis@inrs-ete.quebec.ca))

**Acknowledgements**

Funding was provided by the Metals In The Environment Research Network (contribution 45), the Québec Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies and the Chapitre Saint-Laurent of SETAC. We thank the Unisense team in Aarhus, Denmark, for their technical support, Robert De Roach of the University of Western Australia for technical tips, as well as Normand Bergeron of INRS-ETE for discussions about hydrodynamics.

## Abstract

The bioirrigation activity of infaunal aquatic invertebrates is likely to influence several geochemical reactions as well as the fluxes of trace elements across the sediment-water interface. We tested a novel microsensor designed to measure low current velocities (down to a few  $\mu\text{m s}^{-1}$ ) such as those found in the burrows of small invertebrates. Unlike most such measuring devices, the microsensor that we used can be inserted with minimal disturbance into natural burrows dug by animals. The microsensor is based on the diffusive loss of a tracer gas through a permeable membrane at the tip of the sensor. We first developed a means to calibrate the sensor, then we used the calibrated sensor to measure flow velocities in the self-constructed burrow of the freshwater mayfly *Hexagenia limbata* (Insecta, Ephemeroptera). We also used an infrared video system to relate variations in current speed to changes in the behavior of *H. limbata*. Lastly, we calculated flow rates ( $\text{ml min}^{-1}$ ) produced by this mayfly in order to quantify its irrigation behavior. Overall, this microsensor has great potential for use in behavioral and biogeochemical studies involving burrowing aquatic animals, especially those of small size that are found in freshwaters.

## Introduction

Aquatic invertebrates living in burrows generate currents of water to facilitate gas exchange, the transport of food and gametes and the removal of metabolites and wastes (Scott et al. 1976). This bioirrigation can have a strong influence on a variety of biogeochemical reactions that occur near the sediment-water interface. Indeed, Aller and Yingst (1978) observed that iron, manganese and zinc are mobilized in the wall of the burrows constructed by the polychaete *Amphitrite ornata*, in part due to enhanced microbial activity in the burrow wall. Studying two species of polychaetes, Davey et al. (1990) measured higher dissolved concentrations of iron, manganese, copper, phosphate and nitrite in vented burrow fluids than in the overlying water close to the sediment surface.

Freshwater burrowers (tubificid oligochaetes, chironomid larvae and unionid bivalves) are also reported to enhance the fluxes of ammonium, bicarbonate, nitrate, chloride and silica from sediments in addition to increasing the rate of organic decomposition near burrow walls (Matisoff et al. 1985). To quantify bioirrigation and the fluxes of solutes across the burrow wall and the sediment-water interface, it would be helpful to know the flow rate of water through burrows.

A simple way to measure flow velocities in burrows is to calculate the time taken by dye to fill a burrow (Ridd 1996). However, this method is not very precise and requires that the dye be injected without altering water flow (Vogel 1981). Thermistor-type probes have also been used to measure flow rates in the burrows of marine invertebrates such as polychaetes (Scott et al. 1976, Aller and Yingst 1978, Davey et al. 1990). Gust and Harrison (1981) used a metal-clad hot-wire probe to measure the plume velocities at the aperture of shrimp burrows. Probes of this type use measurements of heat exchange between a heated body



and the surrounding liquid to determine flow rates (Forstner and Rützler 1969). The use of thermistor-type probes is complicated by the fact that their sensitivity depends on the temperature and thermal conductivity of the medium (Vepřek 1963). Moreover, such probes do not measure the direction of water flow (LaBarbera and Vogel 1976).

Electromagnetic flow meters have also been used to quantify flow rates (Miron et al. 1994, Kristensen 1981, Osovitz and Julian 2002). They are based on the fact that when a conductor (e.g. water) moves through a magnetic field, it induces an electrical current that can then be detected by electrodes (Vogel 1981). These flow meters allow for the detection of flow direction in addition to flow rate. However, they need to be attached to an artificial extension of the burrow (e.g., a polyethylene tube) or directly to an artificial burrow, which is likely to lead to less realistic flow measurements. Lastly, particle image velocimetry (PIV) uses a laser to light neutrally buoyant particles that are suspended in the water surrounding the animal under study. Successive video images serve to track the movement of particles and the resulting flow velocity is mapped in two-dimensional planes (Stamhuis and Videler 1995). On the one hand, this technique is non-intrusive, but on the other hand, it cannot be applied to study animals in natural burrows because particles need to be visible.

All published studies aimed at measuring water flow rates in burrows have been conducted on large marine invertebrates. Because of this, most of the methods used are not sensitive enough to measure the slow current velocities generated by the small invertebrates burrowing in freshwater sediments. Moreover, the animals employed in marine studies are generally held in artificial burrows made of plastic or glass, in which water flow rates are likely to differ from those in natural sediment. In contrast, our goal was to measure flow

rates in natural burrows made by small freshwater invertebrates. Because we expected to measure very low current speeds ( $< 1 \text{ mm s}^{-1}$ ) in small-diameter burrows ( $\sim 3 \text{ mm}$ ), we looked for a very sensitive device that could be inserted into such burrows with minimal flow disturbance. For these reasons, we tested a novel microsensor designed to detect low current velocities (down to a few  $\mu\text{m s}^{-1}$ ) and having a very narrow tip that is suitable for insertion into small-diameter burrows. The microsensor is based on the diffusive loss of a tracer gas through a permeable membrane at the tip of the sensor.

To determine if this microsensor could be used to measure current flows in small natural burrows we first had to develop a means to calibrate the sensor. We then used the calibrated microsensor to measure flow velocities in the self-constructed burrow of a freshwater invertebrate. For this purpose, we chose the mayfly *Hexagenia limbata* because it is widely distributed and often abundant in North American lakes and rivers, as well as being an important agent of bioirrigation and bioturbation (Gallon 2001, Charbonneau and Hare 1998). In addition to measuring water velocities in this insect's burrow, we used an infrared video system to relate variations in current speed to changes in its behavior. Lastly, we estimated flow rates ( $\text{ml min}^{-1}$ ) produced by this mayfly. If this microsensor works well with this insect, it could be useful for measuring bioirrigation by a variety of small freshwater and marine invertebrates.

## Materials and Procedure

### *The microsensor*

The microsensor (FS20 Unisense, Aarhus, Denmark) that we used to measure bioirrigation operates by the diffusive loss of a tracer gas ( $\text{H}_2$ ) through its narrow membrane-filled tip

(20-50  $\mu\text{m}$ ). If the water around the sensor is stagnant, the tracer gas will accumulate up to a steady-state concentration and a high signal will be read by the gas transducer mounted with its detecting tip in the membrane. In contrast, the faster the water moves past the sensor, the lower will be the tracer concentration at the tip as well as the signal from the transducer. The microsensor is designed to measure velocities ranging from  $5 \mu\text{m s}^{-1}$  to  $5 \text{ cm s}^{-1}$ , with a 90% response time of 5-60 s depending on flow velocity. It has a non-linear type of response.

#### *Calibration of the microsensor*

The principal difficulty associated with most flow sensors lies in their calibration. In our case, calibration required creating very low and controlled flow velocities ( $\ll 1 \text{ cm s}^{-1}$ ). One potential means to achieve this would be to use an automated micromanipulator to move the sensor through stagnant water at a programmed constant velocity. However, most such devices would move the sensor horizontally rather than in the direction of flow (vertical), which is required for accurate calibration because the sensor is direction sensitive.

Thus we constructed the calibration device shown in Fig. 1a to create flows within the range of  $100 - 10\,000 \mu\text{m s}^{-1}$ . We chose this range based on preliminary measurements of current velocities made by timing the movement of a dye (rhodamine B) injected into *H. limbata* burrows. The calibration device consists of a glass container having a hole in its base into which is inserted a polystyrene capillary. The diameter of the capillary (3 mm) was chosen to represent that of a *Hexagenia* burrow. The capillary-glass junction is sealed with Teflon tape and a plastic tube attached to the bottom of the capillary connects it to a

high precision valve (Nupro™) that is used to control water velocity. A piece of tubing connected below the valve directs the flow of water to a plastic container on a microbalance. Because the microsensor is direction sensitive, the calibration set-up was built to allow the circulation of flow in opposite directions, as would be likely to occur in a U-shaped burrow. To this end, an additional glass container was positioned above the first container and connected to it by tubing (Fig. 1b). In this way, water released from the uppermost container flows through the tubing, up the capillary in the lower container and into the empty glass container for calibration of upward flow.

Irrespective of flow direction, the microsensor was placed about 1 cm into the capillary simulating the insect's burrow and parallel to the capillary walls, as in our measurements in burrows dug by *H. limbata*. Electronic noise was eliminated by connecting the reference plug (ground) of the picoammeter to the water in the container. The weight of water collected in a given time allowed calculation of the water velocity in the capillary. By changing the valve opening, we obtained a series of current speeds for comparison with the corresponding signals acquired from the microsensor; these were plotted in the form of a nonlinear calibration curve as shown in Fig. 2 (for downward flow). Although the curve is broadly exponential, we found no equation that adequately fits the data. Thus we used linear approximations between neighbouring points to convert the data.

### *Hydrodynamic considerations*

The following hydrodynamic properties of the calibration apparatus were considered when calculating flow velocities. First, the 'entrance length' (L), which is the tube length required for flow to fully develop, varies with the diameter of the capillary tube ( $d = 3$  mm)

and the Reynolds number (Re), that is,  $L = 0.058 d Re$  (Vogel 1981). This equation applies for conditions of laminar flow, i.e., flow for which Re is less than 2000. To determine if flow in our system is laminar, we estimated Re for our calibration apparatus according to the relationship  $Re = \rho U d / \mu$  where  $\rho$  is the fluid density ( $1000 \text{ kg m}^{-3}$  for water),  $U$  is the average fluid velocity and  $\mu$  is the dynamic viscosity of water ( $1 \times 10^{-3} \text{ N m}^{-2} \text{ s}$  at  $20^\circ\text{C}$ ). In our calibration set-up,  $Re = 1000 \text{ kg m}^{-3} \times 0.01 \text{ m s}^{-1} \times 0.003 \text{ m} / 1 \times 10^{-3} \text{ N m}^{-2} \text{ s} = 30$ . This Re value is far below 2000, as is that of most 'biological pipes' including burrows (Vogel 1981), which means that we can assume laminar flow. Thus the value of the entrance length for our calibration set-up was  $L = 0.058 \times 0.003 \text{ m} \times 30 = 0.0052 \text{ m}$ . This means that the flow in our calibration set-up was fully developed at a depth of 5.2 mm into the capillary that we used to simulate an invertebrate burrow. Thus, to measure velocities accurately, we placed the sensor tip deeper than this entrance length in both the calibration set-up and the natural burrows.

A second hydrodynamic consideration is the general distribution of velocities within a tube under laminar flow. This distribution can be described by a parabola where water velocity is maximum at the centre of the tube and nearly stagnant close to the edges because of friction with the walls. Under such conditions, maximum velocity is twice the mean velocity ( $V_{\text{max}} = 2 U$ ). Because we positioned the microsensors at the centre of the capillary or the burrow, it always measured maximum velocity. However, we used average velocities for the calibration curve and for the conversion of experimental data, that is, we divided the flow rate (volume per time) by the cross sectional area of the tube.

## Assessment

### *Collection of animals and acclimation to the laboratory*

Sediment and nymphs of *Hexagenia limbata* were collected in early May at a depth of 3 m from Lake St. Joseph (46°55'N, 71°40'W), a lake lying on the Precambrian Shield near Quebec City, QC, Canada. Insects were collected using a 30- × 30- × 30-cm Ekman grab, sieved from the sediment using a 1-mm mesh net and taken to the laboratory in coolers. From the same site, we collected sediment (0-10 cm depth) that was then sieved in the laboratory through a 1-mm mesh aperture net to remove resident animals and coarse materials. This sediment was placed in an aquarium to which we added unfiltered lake water through which air was bubbled. Nymphs were held for ten days in the aquarium to allow acclimation to laboratory conditions, i.e., 10°C in the dark. We maintained nymphs near field temperatures (~10°C) to enhance their survival and to prevent adult emergence.

Some of the field-collected sediment was poured into a series of thin Plexiglas™ aquaria (15 cm height × 13 cm width × 0.6 cm thickness) and a nymph was added to each aquarium the following day. These thin aquaria were held in a larger aquarium (25 cm height × 48 cm width × 30 cm thickness) containing unfiltered lake water that was aerated gently to maintain oxygen concentrations near saturation. Aquaria were maintained at 10°C in the dark. A net was fixed to the top of each thin aquarium to retain larvae until they had dug a burrow (generally within a few hours), at which time the nets were removed.

### *Experimental set-up and data treatment*

After two days, we chose an aquarium in which the nymph burrow interior was visible along its entire length. We moved this thin aquarium (within the large aquarium) into an adjoining room at 22°C. We began flow measurements after 7 hours, that is, when the temperature of the lake water surrounding the thin aquarium reached 22°C. We made current velocity measurements at room temperature to facilitate testing of the microsensors; at 10°C the calibration range was only ~80% of that at room temperature, which is consistent with the temperature coefficient given in the flow sensor specifications (2-3% per °C). We also calibrated the microsensors at 22°C, using the calibration system described above and shown in Fig. 1.

The sensor was mounted on a micromanipulator (Narishige, Japan) to facilitate its fine positioning at the opening of the capillary tube (for calibration) or the mayfly burrow (Fig. 3). The signal (in pA) detected by the sensor was transmitted to a picoammeter (PA2000 Unisense, Aarhus, Denmark) and recorded on a computer with a Work Bench PC™ Data Acquisition and Control System (Strawberry Tree Inc., USA) (Fig. 3). Data were acquired every 10 s for the duration of the experiment (6 h).

A source of infrared light (Provideo IR-200) was directed towards the thin aquarium while a camera (Panasonic WV-BP130 1/3" CCD) connected to a VCR system (Sanyo SRT-6000) recorded the activity of *H. limbata* (length = 24.8 mm) in its burrow (Gallon 2001, Gosselin and Hare 2003) (Fig. 3). This set-up allowed us to film the insect in the dark (in nature nymphs would not be exposed to bright light). Filming and data acquisition began simultaneously. The mayfly's behavior was recorded for 6 h, of which it was visible only

part of the time due to sediment displaced by its burrowing activity. These video images allowed us to relate nymph activity to variations in water burrow velocity as measured by the microsensors.

We calibrated the sensor for downward flow prior to current measurements but did not calibrate for upward flow at the end of measurements due to accidental breakage. Thus we were obliged to select data when water flow was away from the sensor, as determined by the nymph's orientation. When the insect is irrigating its burrow by means of beating its abdominal gills (a nearly continuous activity), water moves towards it. Thus in our experimental set-up, water was flowing downwards with respect to the sensor whenever the nymph was facing it. However, some uncertainty is inevitable in ascertaining the direction of flow. For example, when the nymph occasionally walks it causes water to move faster or slower depending on the speed and duration of the walking event. For some such events, velocity can momentarily fall to zero (see Results) indicating that the direction of flow has changed.

The current velocity measured is likely influenced both by the exact timing of a behavioral event relative to the time at which measurements are acquired by the system (every 10 s), as well as by the position of the nymph relative to the sensor at the time of the event. For example, a behavioral event close to the sensor that occurs a few seconds before measurement acquisition would tend to generate a greater apparent flow response than the same event that happened at the opposite end of the burrow just after a measurement was acquired. In the latter case, the response (i.e., velocity of the current) would tend to be



attenuated by friction with the burrow walls or by water diffusing into the surrounding sediment or both.

## Results

The *Hexagenia limbata* nymph that we observed generated a downward current, with respect to the sensor, 62% of the time. During the entire recording period (6 h), the shape of its burrow remained unchanged, that is, in the form of a single U, which facilitated interpretation of the velocities measured. Indeed, *Hexagenia* is an active burrower that can construct new extensions to its gallery system within a few hours (Charbonneau and Hare 1998), which could make flow heterogeneous among the various branches.

Several types of nymph behavior were observed and associated currents measured. First, nymphs irrigated their burrows by means of rhythmic movements of their abdominal gills. The current created by gill movements pulls oxygenated overlying water into the burrow, clears excavated substrate and helps to maintain burrow integrity by preventing collapse (Keltner and McCafferty 1986). As recorded on film and as shown in Fig. 4a-c, this activity was nearly continual and generated velocities between 100-350  $\mu\text{m s}^{-1}$ . The frequency of gill beating did not appear to be related to variations in current velocity, likely because the amplitude of gill beating also varied. However, punctual episodes of intense ventilation did generate velocities over 500  $\mu\text{m s}^{-1}$  (Fig. 4a).

Second, the nymph occasionally walked a few centimeters forwards or backwards, and while walking forwards sometimes pushed sediment with its head thereby dislodging large amounts of sediment and reshaping its burrow. These walking episodes had the greatest

effect on water flow, as can be seen from Fig. 4. The shortest episodes (a single step) moved the water up to  $900 \mu\text{m s}^{-1}$  (Fig. 4c), whereas a walking movement over a few centimeters produced a peak flow of over  $3000 \mu\text{m s}^{-1}$  (Fig. 4a). The greatest displacement of water corresponded to the mayfly walking forward while pushing sediment with its head (like a bulldozer). Even though we cannot be certain of the exact water velocity associated with this movement, in part because current direction is uncertain and in part because these values were extrapolated beyond our calibration range, it is clear that they are very high and peaked around  $40\,000 \mu\text{m s}^{-1}$  (Fig. 4b). Such a high velocity can be explained by the fact that the nymph moves nearly all of the water along the burrow using both its body and the large mound of sediment that it is pushing.

Other types of behavior provoked only minor changes in water velocity. *Hexagenia limbata* burrowed by alternately moving its prothoracic legs accompanied by to and fro motions of the head. This movement likely served the dual purpose of digging and feeding. These burrowing/feeding movements did not increase current velocity above baseline irrigation values, suggesting that they produced currents of the same order of magnitude as those produced by moderate ventilation behavior. Lastly, nymphs sometimes used their metathoracic legs to clean their gills and they occasionally turned around to face the opposite burrow opening. Again, these movements did not provoke velocity variations that exceeded the flow due to ventilation. This result is consistent with observations by Davey et al. (1990) who noted that simple up and down movements of polychaetes in burrows had little effect on instantaneous recordings of irrigation as monitored by heated thermistors.

Even though the greatest velocities were generated by nymph walking movements, especially those accompanied by sediment displacement, these episodes were of short duration (a few seconds to a few minutes) compared to ventilation behavior that was almost continuous. This latter behavior proved to be the main activity responsible for bioirrigation, as revealed by the high proportion of the time spent by the nymph in irrigating its burrow (99% of the time the nymph was visible) and by the continuous low level of current velocities associated with this behavior. Oxygen measurements in *H. limbata* burrows coupled with visual observations (Gallon 2001) also suggest that, over time, ventilation is the behavior that creates the bulk of the flow in burrows, which serves to maintain oxygen concentrations between 75 and 100% of air saturation (Wang et al. 2001).

## Discussion

Use of the flow microsensor, along with an infrared camera, allowed us to meet our objective, that is, to measure the slow water velocities in the burrow of a small invertebrate and to relate these to the behavior of the animal. We confirmed that gill beating is the principal activity contributing to burrow irrigation by the mayfly *Hexagenia limbata*. These velocity measurements can now be used to estimate the volume of water flowing in a burrow per unit time.

### *Flow rate estimates*

We can estimate the flow rate in the burrow of *H. limbata* by multiplying the mean velocity of burrow water ( $190 \mu\text{m s}^{-1}$ , as calculated from the data in Fig. 4) by the cross sectional area of the burrow (radius of 1.5 mm). This calculation yields a value of  $0.081 \text{ ml min}^{-1}$ , which is five times less than the value of  $0.43 \text{ ml min}^{-1}$  estimated using the propagation of a

dye at 10°C in a larger burrow of the same species (Gallon 2001). Since no values for flow rates in burrows are available for other freshwater animals, we can only compare our value of 0.081 ml min<sup>-1</sup> with those reported for some marine invertebrates (Table 1). Differences among marine animals are likely due to differences in body size, ventilation mechanisms, temperature and whether measurements were made in artificial or natural burrows. The value for *H. limbata* is small compared to those for many marine tubicolous invertebrates, likely because this insect is small compared to the large invertebrates usually studied in marine systems and because it pumps water only with its gills rather than with its entire body (as do many polychaetes). Moreover, we measured current velocities in a natural burrow, where friction between the water and the sediment and water losses into the sediment can be important, rather than in an artificial burrow (where these losses are negligible) as in many marine studies. Indeed, Kristensen (1983) showed that current amplitude during ventilation episodes by the polychaete *Nereis* held in sediment-filled V-shaped tubes was half that measured for individuals in polyethylene tubes.

Given that the burrow we studied had a volume of ~1 cm<sup>3</sup> and that water moves through it at the rate of 0.081 ml min<sup>-1</sup>, water inside the burrow of *H. limbata* would be completely renewed every 12 minutes. As observed in this study and others (Hunt 1953, Gallon 2001, Gosselin and Hare 2003), *Hexagenia* nymphs irrigate their burrows almost continuously by means of gill beating. Our results suggest that on a daily basis 117 ml of water would move through a burrow of the same dimensions as that of the nymph studied. Assuming that this nymph is typical of *H. limbata* individuals, and given a mean population density of 160 individuals m<sup>-2</sup> in North American lakes (Charbonneau and Hare 1998), we estimate that 19 l of water m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> should pass through the burrows of a *H. limbata* population during the

summer when littoral water temperatures reach and exceed that at which we made our measurements (22°C).

### *Further studies*

The method that we tested opens the door for the measurement of water flow through the burrows of freshwater invertebrates, for which we could find no published values. By knowing the irrigation rates of the major burrowing taxa and by measuring the chemical composition of burrow water, it would be possible to estimate the extent to which freshwater benthic invertebrates influence the fluxes of nutrients, trace elements and contaminants across the sediment-water interface (Alfaro-De la Torre and Tessier 2002).

The microsensor that we tested permits direct measurements of flow in self-constructed burrows in natural sediment in a non-invasive manner, that is, flow disturbance by the sensor is minimal. Moreover, it does not introduce thermal turbulence as hot bead thermistors do. This may lead to more realistic measurements of flow compared to devices that require artificial tubes for animals. Perhaps its greatest strength is that the microsensor detects flow velocities as low as a few  $\mu\text{m s}^{-1}$ , which allows the measurement of flow in the burrows of animals that are small or little active (e.g., sit and wait predators; Wang et al. 2001) or over surfaces such as microbial mats.

### Comments and recommendations

The method that we tested has great potential for various applications in behavioral and biogeochemical studies. However, because the microsensor is fragile care needs to be taken when handling it (as with most thin glass electrodes and sensors). Furthermore, because it

does not indicate the direction of flow and because the calibration curve is direction sensitive, the behavior of animals in their burrow needs to be recorded to know in which direction the current is moving. However, as we have shown, animals can be observed under infra-red light, which minimizes disturbance to them and provides behavioral information that helps to interpret fluctuations in irrigation rates. Overall, the microsensor that we tested is liable to be a useful tool for researchers interested in measuring water flow rates of small magnitude in small environments.

---

## References

- Alfaro-De la Torre, C., and A. Tessier. 2002. Cadmium deposition and mobility in the sediments of an acidic oligotrophic lake. *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**: 3549-3562.
- Aller, R.C., and J.Y. Yingst. 1978. Biogeochemistry of tube-dwellings: a study of the sedentary polychaete *Amphitrite ornata* (Leidy). *J. Mar. Res.* **36**: 201-254.
- Charbonneau, P., and L. Hare. 1998. Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects. *J. North Am. Benthol. Soc.* **17**: 239-249.
- Davey, J.T., P.G. Watson, R.H. Bruce, and P.E. Frickers. 1990. An instrument for the monitoring and collection of the vented burrow fluids of benthic infauna in sediment microcosms and its application to the polychaetes *Hediste diversicolor* and *Arenicola marina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **139**: 135-149.
- Dworschak, P.C. 1981. The pumping rates of the burrowing shrimp *Upogebia pusilla* (Petagna) (Decapoda: Thalassinidea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **52**: 25-35.
- Forstner, H., and K. Rützler. 1969. Two temperature-compensated thermistor current meters for use in marine ecology. *J. Mar. Res.* **27**: 263-271.
- Foster-Smith, R.L. 1978. An analysis of water flow in tube-living animals. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **34**: 73-95.

Foster-Smith, R.L., and R.O. Shillaker. 1977. Tube irrigation by *Lembos websteri* (Bate) and *Corophium bonnelli* (Milne Edwards) (Crustacea: Amphipoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **26**: 289-296.

Gallon, C. 2001. Étude des microenvironnements oxiques créés par les animaux benthiques fouisseurs: *Sialis velata* (Megaloptera) et *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera). MSc thesis. INRS-ETE, Université du Québec, Québec, QC, Canada.

Gosselin, A., and L. Hare. 2003. Effect of sedimentary cadmium on the behavior of a burrowing mayfly (Ephemeroptera, *Hexagenia limbata*). Environ. Toxicol. Chem. in press

Gust, G., and J.T. Harrison. 1981. Biological pumps at the sediment-water interface: mechanistic evaluation of the alpheid shrimp *Alpheus mackayi* and its irrigation pattern. Mar. Biol. **64**: 71-78.

Hunt, B. P. 1953. *The Life History and Economic Importance of a Burrowing Mayfly, Hexagenia limbata, in Southern Michigan Lakes*. Bulletin of the Institute for Fisheries Research No 4, Institute for Fisheries Research, Michigan Department of Conservation, Ann Arbor, MI, USA.

Keltner, J., and W. P. McCafferty. 1986. Functional morphology of burrowing in the mayflies *Hexagenia limbata* and *Pentagenia vittigera*. Zool. J. Linn. Soc. **87**: 139-162.



Kristensen, E. 1981. Direct measurement of ventilation and oxygen uptake in three species of tubicolous polychaetes (*Nereis* spp.). *J. Comp. Physiol.* **145**: 45-50.

Kristensen, E. 1983. Comparison of polychaete (*Nereis* spp.) ventilation in plastic tubes and natural sediment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **12**: 307-309.

LaBarbera, M., and S. Vogel. 1976. An inexpensive thermistor flowmeter for aquatic biology. *Limnol. Oceanogr.* **21**: 750-756.

Matisoff, G., J.B. Fisher, and S. Matis. 1985. Effects of benthic macroinvertebrates on the exchange of solutes between sediments and freshwater. *Hydrobiol.* **122**: 19-33.

Miron, G., V. Brock, and E. Kristensen. 1994. Effects of mercury on the ventilation behaviour of the polychaete *Nereis virens* (Sars). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **184**: 67-81.

Osovitz, C.J., and D. Julian. 2002. Burrow irrigation behavior of *Urechis caupo*, a filter-feeding marine invertebrate, in its natural habitat. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **245**: 149-155.

Ridd, P.V. 1996. Flow through animal burrows in mangrove creeks. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **43**: 617-625.

Scott, D.M., M. Mazurkiewicz, and P. Leeman. 1976. The long-term monitoring of ventilation rhythms of the polychaetous annelid *Nereis virens* Sars. *Comp. Biochem. Physiol.* **53A**: 65-68.

Stamhuis, E.J., and J.J. Videler. 1995. Quantitative flow analysis around aquatic animals using laser sheet particle image velocimetry. *J. Exp. Biol.* **198**: 283-294.

Vepřek, J.A. 1963. A thermistor flowmeter. *J. Sci. Instrum.* **40**: 66-68.

Vogel, S. 1981. *Life in moving fluids: the physical biology of flow*. W. Grant Press, Boston. 352 p.

Wang, F., A. Tessier, and L. Hare. 2001. Oxygen measurements in the burrows of freshwater insects. *Freshwat. Biol.* **46**: 317-327.

## Figure legends

Fig. 1: Set-up for calibration of the microsensor. This set-up allows water to move downward or upward (dotted inset) in the capillary simulating the animal's burrow. The flow in the capillary is controlled by the degree of opening of the valve.

Fig. 2: Calibration curve obtained for downward flow using the calibration set-up.

Fig. 3: Experimental set-up used to make burrow water-velocity measurements and to film the animal (modified from Gallon 2001).

Fig. 4 (a, b and c): Water velocity in the burrow of *Hexagenia limbata* as a function of time. Also indicated is the mayfly's behavior, as determined from simultaneously recorded video images.

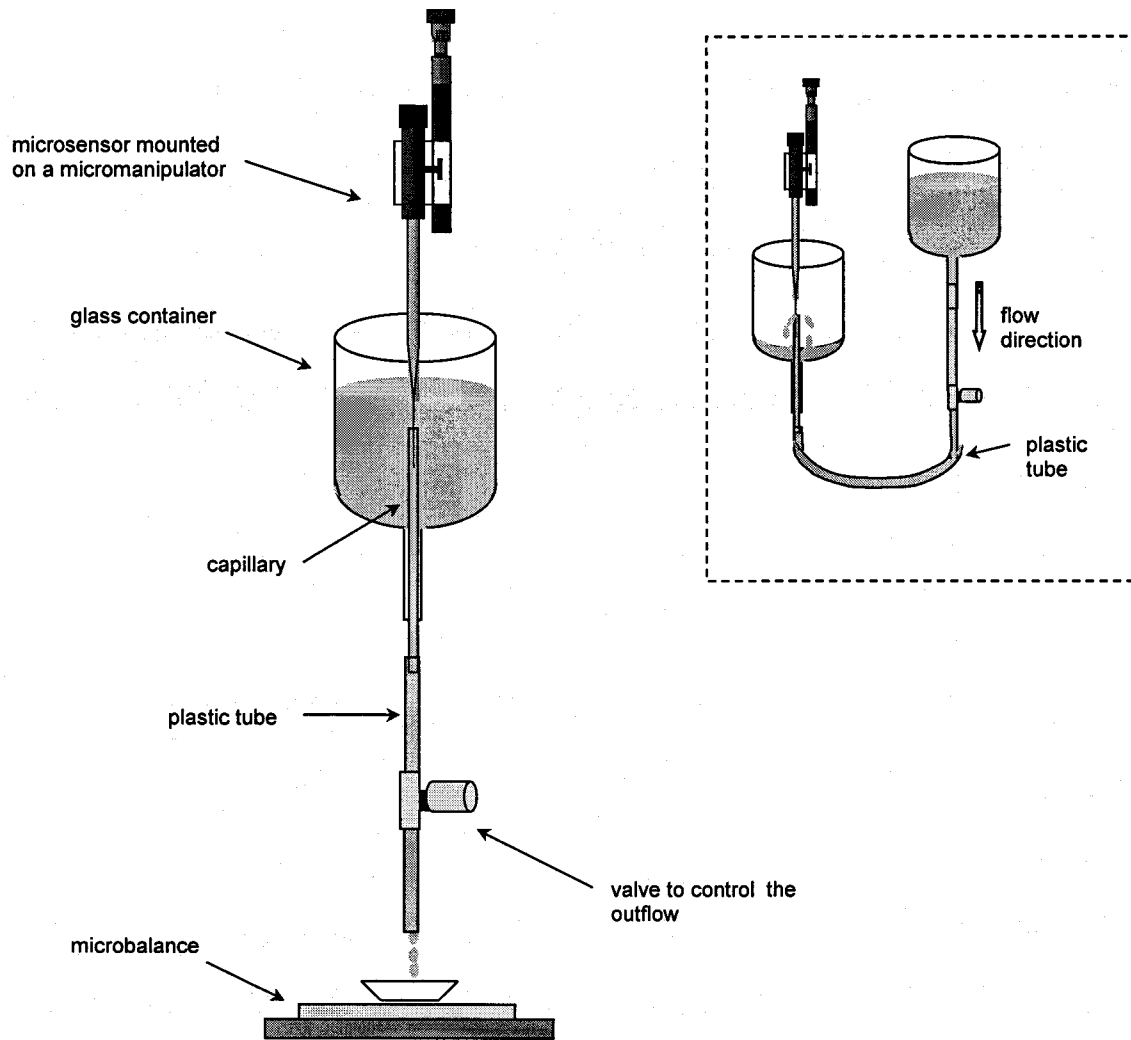
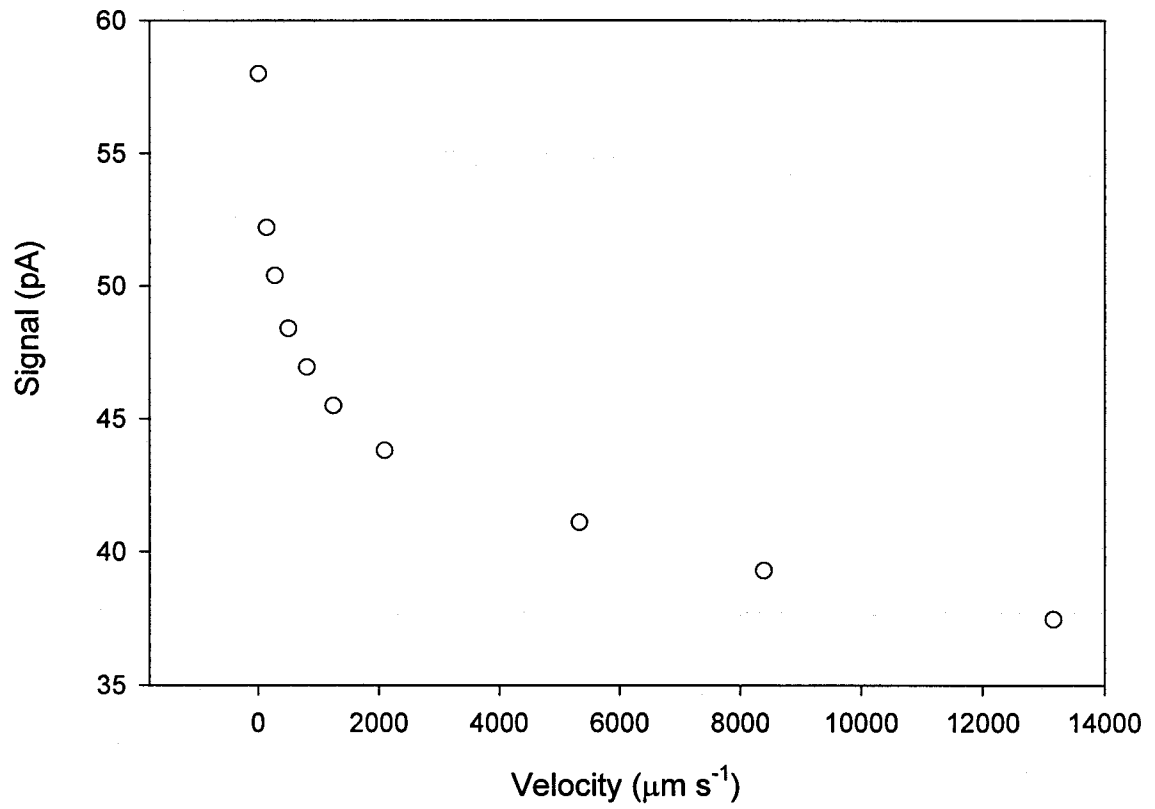
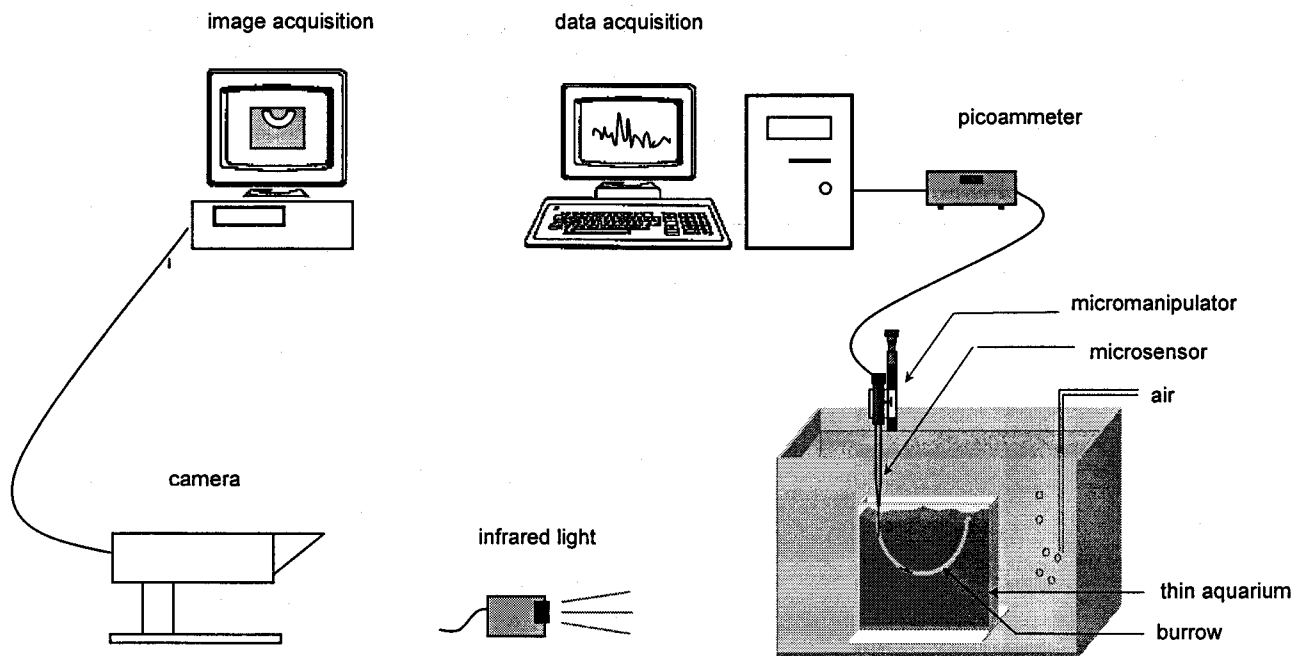
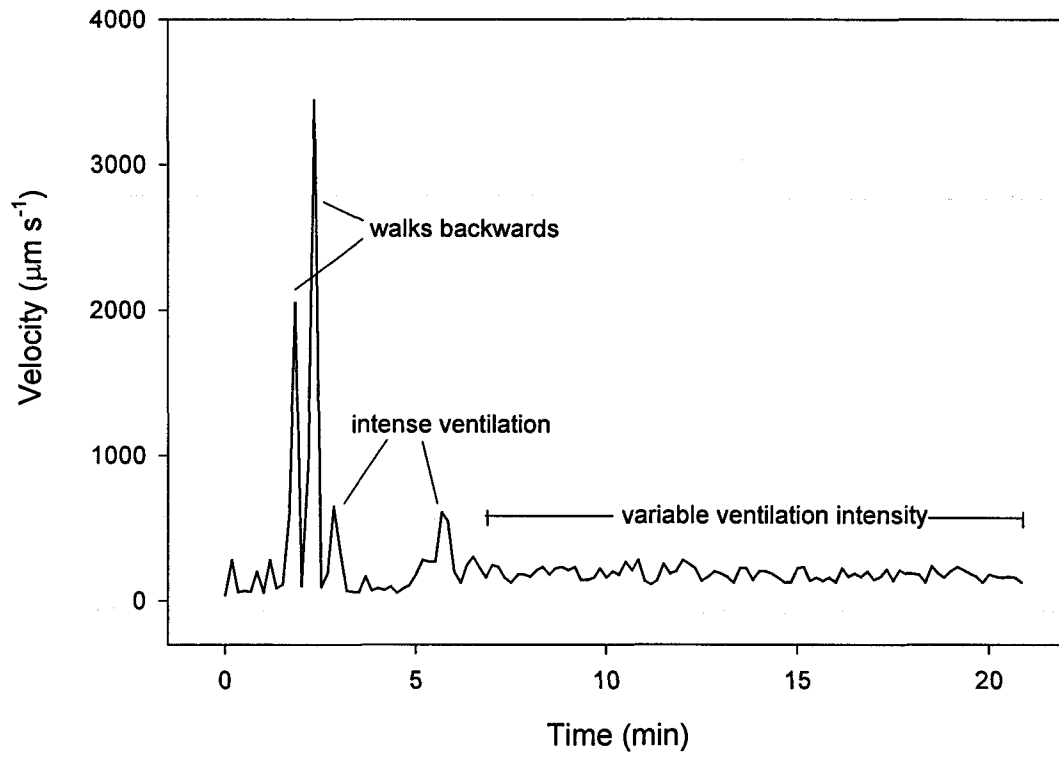


Figure 1

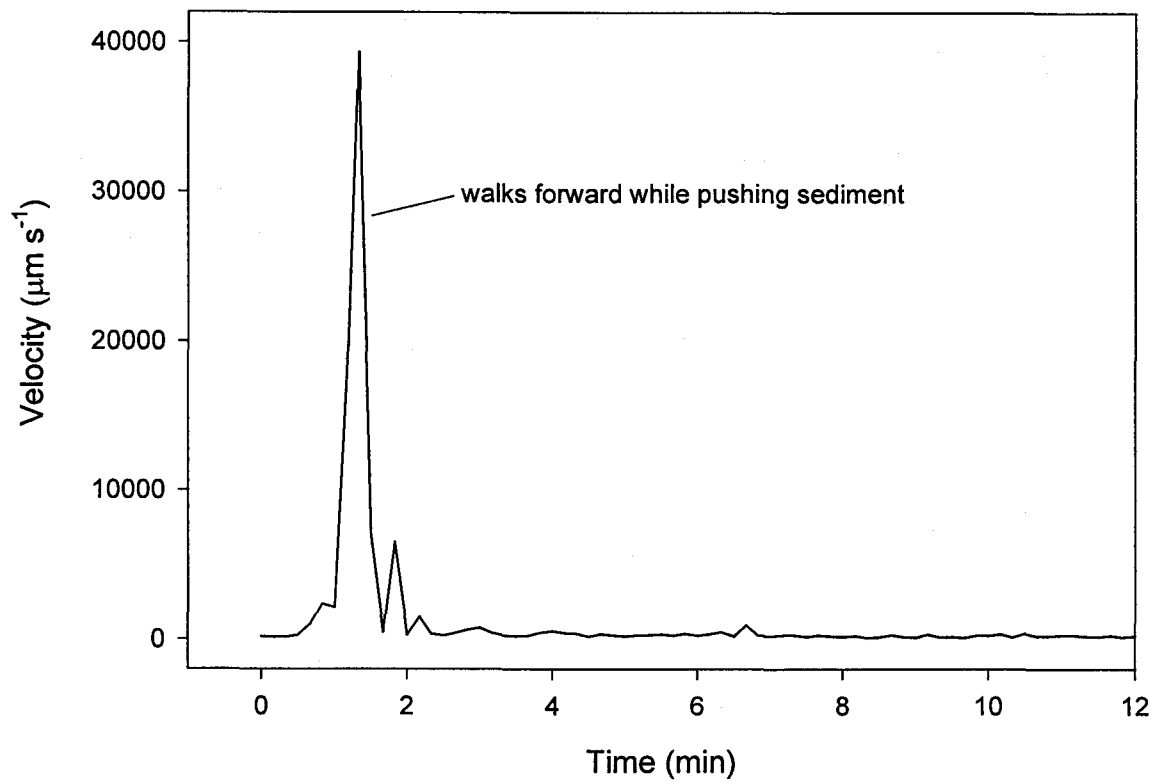
**Figure 2**



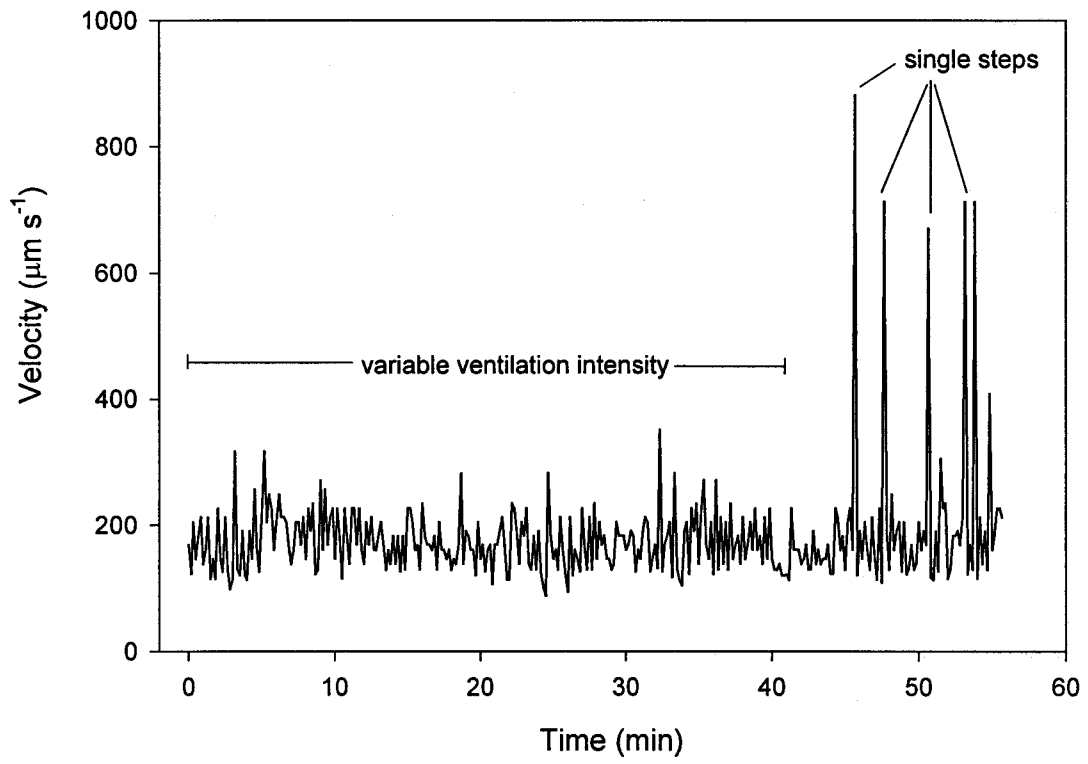
**Figure 3**



**Figure 4a**

**Figure 4b**





**Figure 4c**

## Table

Table 1. Maximum or average (\*) values for ventilation rates measured in the U-shaped burrows of several marine invertebrates.

| Class (Order)         | Species                    | Ventilation rate<br>(ml min <sup>-1</sup> ) | Temperature<br>(°C) | Source                               |
|-----------------------|----------------------------|---|---------------------|--------------------------------------|
| Polychaeta            | <i>Nereis virens</i>       | 3.6   | 16                  | Kristensen (1981)                    |
| Polychaeta            | <i>Nereis virens</i>       | 3.7*  | 15                  | Miron et al. (1994)                  |
| Polychaeta            | <i>Nereis virens</i>       | 3.2   | 10                  | Scott et al. (1976)                  |
| Polychaeta            | <i>Nereis diversicolor</i> | 0.6   | 12-14               | Foster-Smith (1978)                  |
| Polychaeta            | <i>Amphitrite ornata</i>   | 1.5*  | 22                  | Aller and Yingst (1978)              |
| Crustacea (Decapoda)  | <i>Alpheus mackayi</i>     | 5.8   | 26                  | Gust and Harrison (1981)             |
| Crustacea (Decapoda)  | <i>Upogebia pusilla</i>    | 53  | 17.5                | Dworschak (1981)                     |
| Crustacea (Amphipoda) | <i>Corophium volutator</i> | 1.3   | 12-14               | Foster-Smith (1978)                  |
| Crustacea (Amphipoda) | <i>Corophium bonnelli</i>  | 0.12  | 11                  | Foster-Smith and Shillaker<br>(1977) |
|                       | <i>Lembos websteri</i>     | 0.022                                       | 11                  |                                      |