

Université du Québec
INRS-EAU

**LA NOURRITURE COMME SOURCE DE CADMIUM CHEZ LA
LARVE DE L'INSECTE *CHAOBORUS* (DIPTERA) EN MILIEU
AQUATIQUE**

Par
Catherine Munger

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

Jury d'évaluation

Examineur externe

D. George Dixon
Université Waterloo

Examineur externe

Norman Yan
Ministère de l'Environnement
et de l'Énergie de l'Ontario

Examineur interne

Jean-Christian Auclair
INRS-Eau

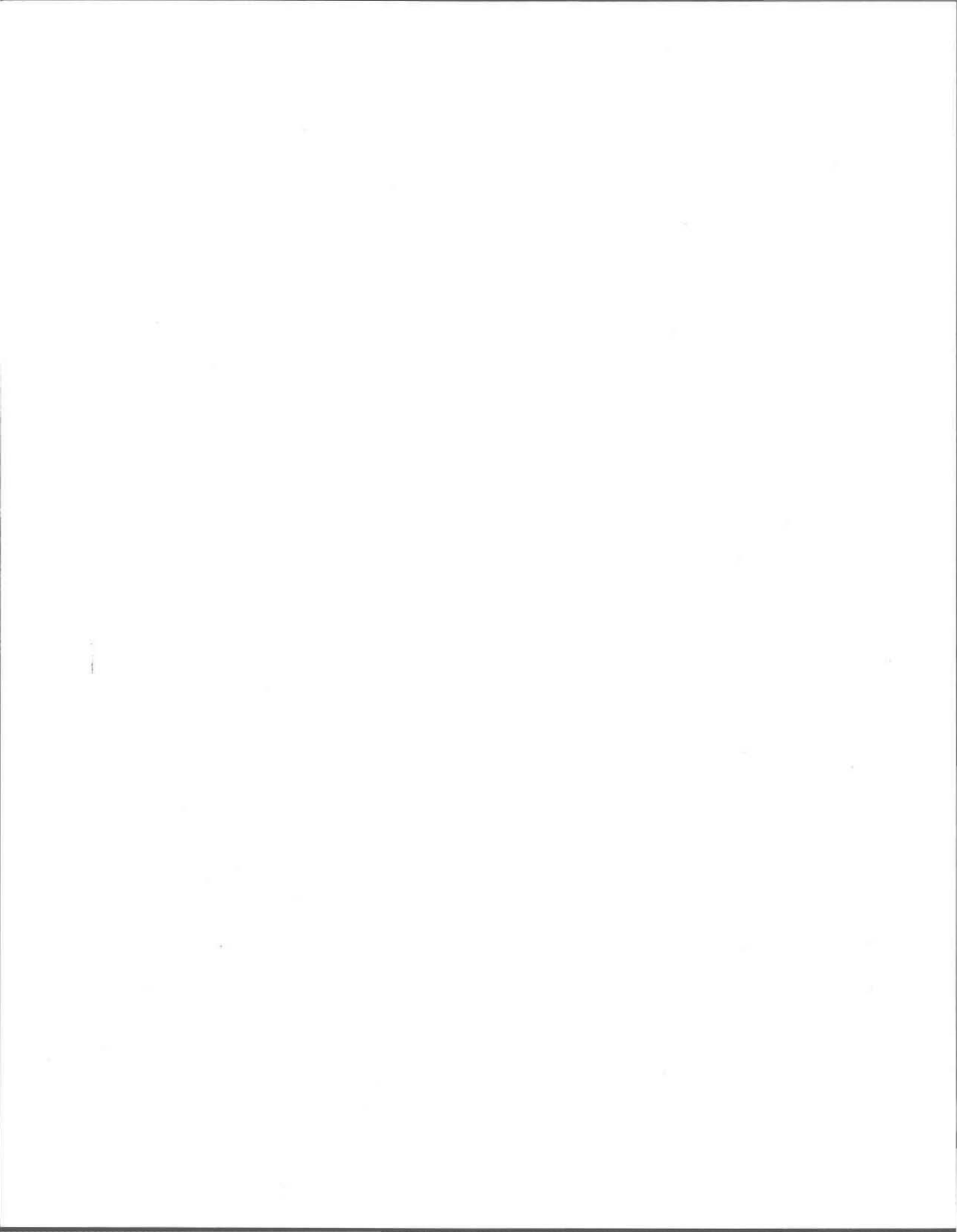
Examineur interne

André Tessier
INRS-Eau

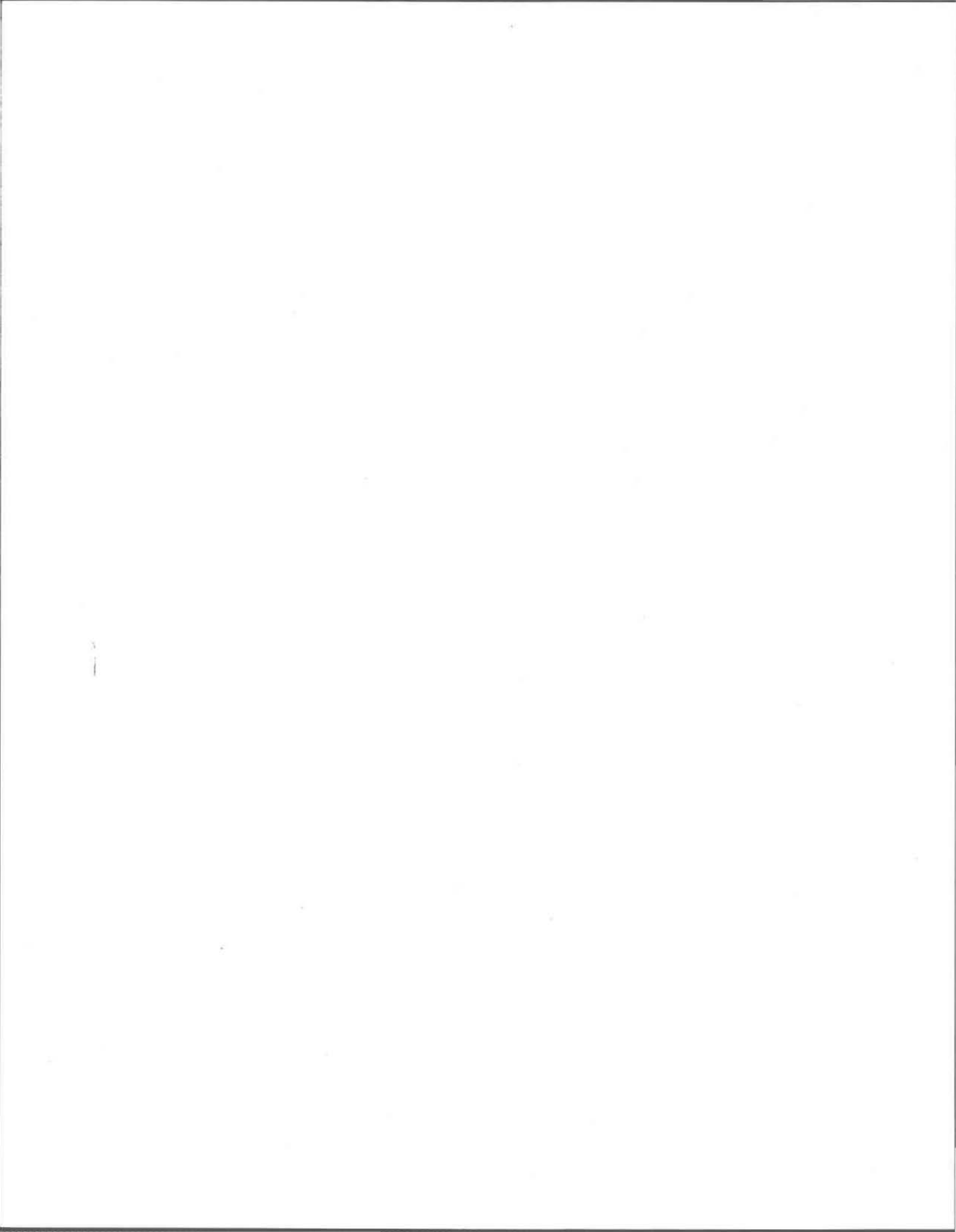
Directeur de recherche

Landis Hare
INRS-Eau

Décembre 1998



*À mes très chers parents,
des modèles de force intérieure ,
merci de tout coeur de m'avoir permis d'en arriver là...*



Avant-propos

Cette thèse comprend 4 publications auxquelles ont participé différents auteurs. La contribution des auteurs se répartit comme suit:

1. 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.

C. Munger: Conception et réalisation du projet, analyse des données, rédaction initiale et finale du manuscrit.

L. Hare: Conception du projet, rédaction finale du manuscrit.

2. Munger, C., L. Hare, A. Craig et P.M. Charest. 1999. Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. *Aquat. Toxicol.*, 44: 195-200.

C. Munger: Conception et réalisation du projet, rédaction initiale et finale du manuscrit.

L. Hare: Conception du projet, rédaction initiale et finale du manuscrit.

A. Craig: Développement et mise au point de la méthode, rédaction finale du manuscrit.

P.-M. Charest: Conception du projet.

3. Munger, C., L. Hare et A. Tessier. 1999. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in nature. *Limnol. Oceanogr.*, en révision.

C. Munger: Conception et réalisation du projet, développement du dispositif expérimental, analyse des données, modélisation, rédaction initiale et finale du manuscrit.

L. Hare: Conception du projet, rédaction initiale et finale du manuscrit.

A. Tessier: Conception du projet, modélisation, rédaction initiale et finale du manuscrit.

4. Munger, C. et L. Hare. 1999. Influence of ingestion rate and food types on cadmium accumulation by the aquatic insect *Chaoborus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, en révision.

C. Munger: Conception et réalisation du projet, développement du dispositif expérimental, rédaction initiale et finale du manuscrit.

L. Hare: Conception du projet, rédaction initiale et finale du manuscrit.

Remerciements

De simples mots ne suffisent pas à traduire ma reconnaissance envers mon directeur et mentor, le professeur Landis Hare qui m'a non seulement inculqué et permis d'acquérir les concepts scientifiques qui m'ont conduit jusqu'ici mais qui m'a aussi appris à développer une pensée scientifique critique et constructive qui me servira assurément dans toutes mes entreprises. Landis, je te remercie pour m'avoir toujours invité à me surpasser en tant que personne et scientifique de même que pour ton support inconditionnel à tous les égards. Ta direction teintée de philosophie et d'humour m'a sans contredit apporté énormément plus que ce qui transparait des pages de cette thèse.

Je désire adresser des remerciements très sincères au professeur André Tessier, mon second mentor, pour avoir joué un rôle clé dans l'élaboration, la réalisation et l'écriture de mes travaux de maîtrise et de doctorat grâce à ses idées innovatrices et constructives. Monsieur Tessier, j'ai particulièrement apprécié vos commentaires toujours positifs et édifiants de même que votre accueil et votre intérêt à mon égard sans conditions et à tout moment.

J'ai aussi grandement apprécié l'apport hautement significatif à mes recherches du professeur Jean-Christian Auclair (INRS-Eau) et du Dr Norman Yan (Min. Environnement Ontario) de par leurs commentaires et suggestions lors d'étapes clés de mon cheminement doctoral. Les commentaires et suggestions des professeurs et Drs Marc Amyot, Peter Campbell, Richard Carignan, Albert Craig, George Dixon, Nicholas Fisher, Samuel Luoma, Micheal Twiss et Lesley Warren ont été également très appréciés.

L'aide technique, pour ne pas dire dévouement, souvent empreinte d'amitié de la part des stagiaires Julie Bernier, Suzanne Fournier, Langis Gagnon, Marie-Claude Morin, Brigitte Patry et Nancy Simard, des techniciens Michèle Bordeleau et René Rodrigue, des assistantes de recherches Marie-Renée Doyon et Lise Rancourt et de l'étudiante Marie-Noëlle Croteau a été des plus appréciée. J'aimerais remercier particulièrement le professeur Nelson Belzile pour m'avoir entre autre permis l'accès à son laboratoire pendant mes périodes de terrain.

Je ne peux passer sous silence les amitiés développées au cours de mon passage à l'INRS-Eau qui ont fort agrémente mes études, notamment avec Marie-Noëlle Croteau,

Marie-Renée Doyon, Claude Fortin, Vincent Fortin, Diane Fournier, Pauline Fournier, Pierre Gagné, Joël Gauthier, Stéphane Prémont, Nancy Simard et Pascale Wendling.

Je réserve mes plus vifs remerciements personnels à mes parents pour leur appui quotidien incommensurable à tous les niveaux, aux membres de ma famille très compréhensifs envers les étudiants pauvres, à mes beaux-parents pour leur appui à ma petite famille à tous les égards, et évidemment à mon cher et tendre Jean-François pour sa grande compréhension, ses encouragements et son amour tout à fait réciproque. Un merci tout particulier à mon fils Antoine qui me ramène toujours à l'essentiel!

Résumé

L'industrialisation a mené à une augmentation des flux de contaminants vers les écosystèmes aquatiques. Ces contaminants posent un problème potentiel pour les animaux qui y vivent puisqu'ils peuvent s'y accumuler et les intoxiquer. Les organismes appelés «biomoniteurs» permettent de refléter le niveau de contamination des écosystèmes aquatiques de par leur concentration en contaminants. Une forte relation entre les concentrations en cadmium dans l'eau d'une quarantaine de lacs et celles accumulées chez la larve d'insecte aquatique *Chaoborus* a été démontrée, suggérant son potentiel comme biomoniteur pour ce métal. Cependant cela ne veut pas nécessairement dire que *Chaoborus* prend son Cd de l'eau; une relation directe entre le prédateur et le métal dans l'eau serait aussi observée si les organismes à des échelons inférieurs de la chaîne alimentaire prenaient leur Cd principalement de l'eau. Pour mieux comprendre la relation mécaniste entre les paramètres impliqués dans le modèle nous avons évalué l'importance relative des voies eau et nourriture pour l'entrée du cadmium chez *Chaoborus*.

Dans un premier temps, l'importance relative de l'eau et la nourriture pour la prise en charge du cadmium chez l'insecte prédateur *Chaoborus punctipennis* a été étudiée en laboratoire sur une chaîne trophique planctonique composée de la larve d'insecte, de sa proie, le crustacé *Ceriodaphnia dubia*, et de l'algue verte *Selenastrum capricornutum*, nourriture pour sa proie. Aucune différence significative entre les concentrations de Cd dans les larves exposées seulement au métal dans leur nourriture versus celles exposées au métal à la fois dans l'eau et la nourriture n'a été observée, indiquant que la bioaccumulation du Cd à partir de l'eau a été négligeable. Pour s'assurer de la fiabilité des résultats obtenus de même que de leur extrapolation à la nature, nous avons introduit le cadmium à la base de la chaîne alimentaire, nous avons utilisé une concentration de cadmium susceptible d'être rencontrée par les animaux en milieu naturel, nous avons mesuré la perte de Cd de la nourriture vers l'eau, et nous avons contrôlé la disponibilité et les concentrations de Cd dans l'eau et la nourriture. Aussi, pour s'assurer que la disponibilité au prédateur du cadmium accumulé dans la nourriture était semblable pour les proies contaminées en laboratoire comparée à celles contaminées en nature, nous avons étudié, dans un deuxième temps, l'influence du temps d'exposition sur la distribution interne du métal chez la proie. La quantité de cadmium de même que la distribution de celui-ci dans la proie étaient semblables après les expositions à court et à long termes, suggérant que les paramètres d'accumulation du métal pour le prédateur mesurés après une courte exposition des proies sont valides pour cet organisme. Le cadmium s'est accumulé principalement dans les diverticules situés dans la partie antérieure du mésentéron des proies, une région reconnue pour son rôle dans l'absorption des nutriments. Nous émettons l'hypothèse que le cadmium est accumulé dans les diverticules en raison de leur implication dans la prise en charge du calcium chez *C. dubia*.

Malgré les précautions prises pour reproduire en laboratoire les conditions les plus réalistes possibles, l'extrapolation directe des conclusions au milieu naturel doit être faite avec retenu étant donné la complexité des réseaux trophiques, des conditions physico-chimiques et de la disponibilité biologiques des métaux. Dans un troisième temps, nous avons effectué une expérience de validation sur la question de l'importance des voies d'entrée pour l'accumulation du cadmium chez *C. punctipennis* en milieu naturel contaminé (Sudbury). Pour ce faire nous avons développé un design expérimental innovateur impliquant le transfert de larves peu contaminées vers un lac contaminé où elles ont été placées dans des mésocosmes en filet maillant de 64 μm et exposées aux concentrations de Cd élevées prévalant dans l'eau du lac et à des quantités variées de proies riches en Cd provenant du lac contaminé. Notre design expérimental assure une exposition à des concentrations de Cd réalistes dans l'eau et dans le mélange naturel de types de proies offertes. Nos résultats indiquent que les larves prennent leur Cd principalement de leurs proies.

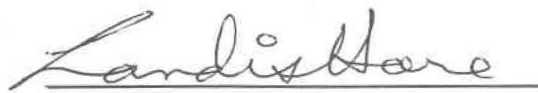
Ayant démontré en laboratoire et *in situ* que le Cd accumulé chez la larve de *C. punctipennis* provenait de sa nourriture, l'étape suivante a été d'étudier l'influence de variables relatives à la nourriture sur l'accumulation du Cd chez le prédateur. Les variables reconnues pour influencer la bioaccumulation des métaux sont le taux de consommation de la nourriture, appelé taux d'ingestion, la concentration de métal dans la nourriture, et l'efficacité avec laquelle le métal ingéré est assimilé. Puisqu'à la fois la concentration de métal dans la nourriture et l'efficacité d'assimilation sont reliées au type de nourriture consommé, nous avons émis l'hypothèse que l'entrée du Cd chez les larves de *C. punctipennis* était gouvernée par le type de proies consommé et le taux d'ingestion. Dans un quatrième temps, nous avons mesuré l'influence de deux variables relatives à la nourriture, le type de proies et le taux d'ingestion sur la prise en charge du Cd par la larve de l'insecte aquatique *Chaoborus punctipennis*. Des larves de *C. punctipennis* provenant d'un lac pauvre en cadmium, ont été amenées en laboratoire et exposées à l'eau et à des quantités variées de copépodes (*Diaptomus minutus*) ou de cladocères (*Diaphanosoma* sp.) provenant d'un lac riche en cadmium. Le contenu en Cd des larves exposées au métal dans l'eau seulement n'a pas augmenté dans le temps, confirmant les résultats obtenus lors d'expériences précédentes ayant démontré que la nourriture est la source majeure de Cd pour les larves de *C. punctipennis*. Le type de proies n'a pas influencé le contenu en Cd du prédateur, probablement dû au fait que les concentrations en Cd dans les deux types de proies étaient semblables et que le Cd a été assimilé avec la même efficacité par le prédateur à partir des deux types de proies. Le taux d'ingestion du prédateur s'est avéré être inversement relié à son efficacité d'assimilation pour le Cd, ce qui s'expliquerait par un temps de passage plus rapide de la nourriture dans l'intestin lorsque de grandes quantités de proies sont consommées. Nos résultats suggèrent que dans le lac riche en Cd le type de proies et le taux d'ingestion ont peu d'influences sur le contenu en Cd du prédateur.

L'étude de l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis* fournit des informations importantes sur les dynamiques de prises en charge du Cd dans cet animal. En combinant ces informations à celles issues d'études cinétiques d'élimination de Cd, nous obtenons des connaissances temporelles importantes pour l'utilisation efficace de ces organismes à des fins de biomonitoring. Dans un cinquième temps, nous avons déterminé le taux de perte du Cd chez *C. punctipennis* suite à leur transfert d'un lac contaminé (région de Sudbury) vers un lac peu contaminé (région de Québec). Les larves transférées ont été placées dans les mésocosmes perméables à l'eau utilisés dans l'expérience eau vs nourriture *in situ*. Le taux de perte du Cd chez *C. punctipennis* s'est avéré lent avec un temps de demi-vie biologique d'environ 1 mois.

L'ensemble de ces résultats suggère que, malgré la corrélation entre les concentrations de Cd dans le prédateur et celles dans l'eau, la prise en charge du métal directement à partir de l'eau est probablement négligeable; la corrélation serait due à la prise en charge du Cd de l'eau mais à un niveau plus bas dans la chaîne trophique. L'importance de la nourriture comme voie d'entrée du Cd suggère que les modèles visant à prédire les concentrations de Cd dans les animaux seront plus complets et probablement plus fiables s'ils considèrent la prise en charge du métal par la chaîne trophique. Nos résultats soulèvent également le caractère potentiellement irréaliste de plusieurs études en laboratoire de même que des tests de toxicité dans lesquels les animaux sont exposés au métal dans l'eau seulement. Enfin, l'étude des dynamiques d'échanges des métaux chez la larve de *Chaoborus* a fourni des informations essentielles pour connaître le destin du Cd dans cet animal qui joue un rôle clé au sein des réseaux trophiques aquatiques, en tant que lien entre le zooplancton et les petits poissons.



Catherine Munger



Landis Hare, directeur de recherche

Table des matières

Avant-propos	iii
Remerciements	v
Résumé	vii
Table des matières	ix
Liste des figures et des tableaux	xi
Chapitre I: Synthèse	1
1.0 Introduction.....	1
1.1 Biologie des larves de <i>Chaoborus</i>	4
1.2 Modèle biogéochimique	9
1.3 Importance eau vs nourriture: études antérieures	12
2.0 Objectifs.....	16
3.0 Méthodologie.....	18
3.1 Eau versus nourriture: expérience de laboratoire	18
3.2 Eau versus nourriture: expérience in situ	20
3.3 Évaluation in situ du taux de perte.....	21
3.4 Influence du type et de la quantité de proies sur l'accumulation du Cd chez <i>C. punctipennis</i>	22
4.0 Résultats	23
4.1 Eau versus nourriture: expérience de laboratoire	23
4.2 Eau versus nourriture: expérience in situ	24
4.3 Évaluation in situ du taux de perte.....	25
4.4 Influence du type et de la quantité de proies sur l'accumulation du Cd chez <i>C. punctipennis</i>	25
5.0 Discussion	26
5.1 Discussion générale.....	26
5.2 Comparaison entre les études	30
6.0 Conclusions	35
7.0 Suggestions de recherches.....	37
8.0 Références	37
Chapitre 2: Expérience eau vs nourriture en laboratoire	45
Résumé	46
Abstract	47
Introduction	48
Experimental design.....	48
Methods.....	49
Collection and exposure to Cd of the insect predator	49
Contamination of crustacean prey for <i>C. punctipennis</i>	51
Contamination of algae as food for the crustacean prey	52
Cadmium analyses	53
Results and Discussion	53
Cd in prey and water used as exposure media for the predator.....	53
Relative importance of food and water as Cd sources to the predator	59
Literature Cited.....	61
Chapitre 3: Sources et taux d'échange de Cd in situ	65
Résumé	66
Abstract	67
Introduction	68
Methods.....	69
Experimental design	69
Cadmium influx experiment	71
Cadmium efflux experiment	72
Results.....	72

Reliability of experimental approach.....	72
Cd influx experiment	72
Cd efflux experiment	77
Modeling Cd exchange	79
Discussion.....	82
References.....	86
Chapitre 4: Influence du type et de la quantité de proies en labo.....	91
Résumé	92
Abstract.....	93
Introduction	94
Methods.....	95
Results and Discussion	97
Predator ingestion rate.....	97
Predator weight and Cd accumulation	98
Cd biomonitoring model for <i>Chaoborus</i>	102
References.....	103
Annexe A: Distribution interne du Cd chez <i>C. dubia</i>	107
Résumé	108
Abstract.....	109
Introduction	110
Methods.....	111
Rearing and ¹⁰⁹ Cd exposure of <i>C. dubia</i>	111
Autoradiography	112
Results & Discussion	112
References.....	116
Annexe B: Distribution interne du Cd chez <i>C. punctipennis</i>	119
Méthodologie.....	119
Collecte des organismes.....	119
Contamination en ¹⁰⁹ cadmium	119
Échantillonnage.....	120
Préparation pour l'autoradiographie	120
Autoradiographie.....	120
Résultats	120
Discussion.....	134
Références.....	136
Annexe C: Technique de séparation de proies.....	139
Introduction	139
Méthodes	140
Résultats.....	141
Discussion.....	143
Références.....	145
Annexe D: Influence du type et de la quantité de proies in situ.....	147
Méthodologie.....	147
Résultats.....	148
Annexe E: Élimination du Cd chez <i>C. flavicans</i>.....	151

Liste des figures et des tableaux

Chapitre I: Synthèse

- Figure 1. Sources possibles de métaux pour une chaîne trophique aquatique.....2
 Figure 2. Distribution spatiale des espèces de *Chaoborus punctipennis*.....6
 Figure 3. Contribution saisonnière de différents taxa de zooplancton.....8
 Figure 4. Relation entre les concentrations de Cd dans les larves de *Chaoborus punctipennis* et [Cd²⁺]..... 10
 Figure 5. Schéma de l'estimation de l'importance relative de l'eau et la nourriture..... 21

Chapitre 2: Expérience eau vs nourriture en laboratoire

- Figure 1. Diagrammatic representation of the experimental food chain 49
 Figure 2. Cadmium partitioning in prey animals exposed to Cd 54
 Figure 3. Retention of Cd by *Ceriodaphnia dubia* 55
 Figure 4. Mean aqueous Cd concentrations in the "food only" and in the "food + water" treatments..... 57
 Figure 5. Cadmium concentrations in the crustacean and in the alga 58
 Figure 6. Accumulation over time of Cd by the predator *Chaoborus punctipennis* from either "food only" or from both "food + water" 59

Chapitre 3: Sources et taux d'échange de Cd in situ

- Figure 1. Drawing of a mesocosm and the funnel trap..... 70
 Figure 2. Quantities of crustacean prey offered to *C. punctipennis* larvae during the Cd-influx experiment..... 73
 Figure 3. Percentage of total numbers of zooplankton represented by copepods, cladocerans and rotifers during the Cd-influx 74
 Figure 4. Temporal changes in weight and Cd content of *C. punctipennis* larvae exposed to water and crustacean prey from Cd-rich Crowley Lake..... 76
 Figure 5. Temporal changes in weight, Cd content and Cd concentration of *Chaoborus punctipennis* larvae in Lake au Cèdre 78

Chapitre 4: Influence du type et de la quantité de proies en labo.

- Figure 1. Temporal changes in *C. punctipennis* dry weight and Cd content for larvae exposed to Cd in water only or in one of two nonimal quantities of Cd-rich cladocerans or copepods 100

Annexe A: Distribution interne du Cd chez *C. dubia*

- Figure 1. Schematic view of *Ceriodaphnia* sp.....113
 Figure 2. Sagittal sections showing Cd accumulation sites in two typical *C. dubia* individuals 114

Annexe B: Distribution interne du Cd chez *C. punctipennis*

- Figure 1. Schéma d'une larve de *Chaoborus*121
 Figure 2. Microphotographies photoniques du milieu du mésentéron.....124
 Figure 3. Microphotographies photoniques montrant l'accumulation du Cd dans la paroi du pharynx de *Chaoborus*.....127
 Figure 4. Microphotographies photoniques montrant l'accumulation du Cd dans l'exosquelette de *Chaoborus*.....128
 Figure 5. Microphotographies photoniques des organes hydrostatiques.....129
 Figure 6. Microphotographies photoniques montrant une super-accumulation du Cd.....131
 Figure 7. Microphotographies photoniques de la même partie d'un *Chaoborus* exposé à l'eau et la nourriture contaminées, selon que la mise au point est faite sur les grains d'argent révélés par une accumulation dans l'exosquelette ou le muscle.....132
 Figure 8. Microphotographie photonique d'un *Chaoborus* fixé au glutaraldéhyde 3% seulement.....133

Annexe C: Technique de séparation de proies	
Figure 1. Exposition d'un mélange de zooplancton à 2 longueurs d'ondes différentes.....	141
Annexe D: Influence du type et de la quantité de proies in situ	
Figure 1. Changements temporel du poids et contenu en Cd des larves de <i>C. punctipennis</i> exposées au Cd dans l'eau seulement ou dans l'eau et à l'une des deux quantités de cladocères ou copépodes riches en Cd.....	149
Annexe E: Élimination du Cd chez <i>C. flavicans</i>	
Figure 1. Changements temporels du poids et du contenu en Cd des larves de <i>Chaoborus flavicans</i> transférées d'un lac riche en Cd	151
Chapitre I: Synthèse	
Tableau 1. Proportion de gros phytoplancton, protozoaires, rotifères, et crustacés dans les pharynx de <i>Chaoborus punctipennis</i>	6
Tableau 2. Concentrations de cadmium dans le zooplancton collecté dans Plastic Lake	8
Tableau 3. Données expérimentales sur l'importance relative de l'eau et la nourriture pour l'accumulation du Cd chez des arthropodes d'eau douces.....	15
Tableau 4. Classification des études menées en eau douce sur l'importance relative de l'eau et la nourriture.....	16
Tableau 5. Variations maximales de poids et de Cd démontrant les tendances les plus fortes de chaque expérience impliquant <i>C. punctipennis</i>	32
Tableau 6. Densité de <i>C. punctipennis</i> et de proies offertes par volume d'eau par jour dans chaque expérience.....	33
Chapitre 2: Expérience eau vs nourriture en laboratoire	
Table I. Composition of the media used to culture the alga and the crustacean prior to Cd exposure, as well as the Cd-exposure media for the three trophic levels	50
Chapitre 3: Sources et taux d'échange de Cd in situ	
Table 1. Cadmium content of fourth instar <i>Chaoborus punctipennis</i> and selected chemical parameters in water of the high-Cd lake.....	69
Table 2. Estimated values of various model parameters for Cd exchange in larvae.....	82
Table 3. Classification of freshwater studies on the relative importance of water and food as Cd sources according to their adherence or not to six key methodological criteria	84
Chapitre 4: Influence du type et de la quantité de proies en labo.	
Table 1. Mean numbers of cladocerans and copepods offered and consumed per <i>C. punctipennis</i> larva per day.	98
Table 2. Cadmium assimilation efficiencies for <i>C. punctipennis</i> larvae exposed to the metal in either copepods or cladocerans.....	101
Annexe B: Distribution interne du Cd chez <i>C. punctipennis</i>	
Tableau 1. Moyennes des concentrations de Cd accumulé par <i>Chaoborus punctipennis</i> après une exposition via l'"Eau et la Nourriture" à la fois, vs via la "Nourriture" seulement.....	121
Annexe C: Technique de séparation de proies	
Tableau 1. Estimation qualitative de l'abondance des groupes de zooplancton.....	143
Annexe D: Influence du type et de la quantité de proies in situ	
Tableau 1. Composition en crustacés copépodes et cladocères dans le lac avant et après séparation.....	148

Chapitre I

SYNTHÈSE

1.0 Introduction

Un nombre important de lacs directement exposés aux rejets des raffineries métallurgiques et des autres industries ont été contaminés par des métaux traces potentiellement toxiques tel que le cadmium, le cuivre et le plomb (Pacyna et al. 1995). Ces métaux peuvent aussi être transportés dans l'atmosphère sur des milliers de kilomètres (Nriagu et Pacyna, 1988), contaminant ainsi des écosystèmes aquatiques distants du site d'émission des métaux (Franzin et al. 1979; Verta et al. 1986). Une fois introduits dans les lacs, les métaux se retrouvent sous forme dissoute ou sous forme particulaire (Luoma 1983; Tessier *et al.* 1994). Les animaux aquatiques sont susceptibles d'accumuler les métaux à partir de la forme dissoute, *i.e.* l'eau, et/ou de la forme particulaire, *i.e.* la nourriture (Luoma 1983; Hare 1992; Gerhardt 1993). Selon Tessier *et al.* (1994), l'accumulation à partir de l'une et/ou l'autre de ces voies d'entrée est influencée par des facteurs physico-chimiques spécifiques à l'eau (e.g. pH, concentrations du métal) ou à la nourriture (e.g. association du métal avec une nourriture spécifique). Une fois bioaccumulés, ces métaux peuvent avoir des conséquences biologiques néfastes (Leland et Kuwabara, 1985). Les métaux peuvent en effet causer un mauvais fonctionnement des membranes cellulaires, de l'ADN, du système nerveux et des enzymes chez les organismes aquatiques (Gerhardt 1993). Ceci se traduit par des problèmes au plan, par exemple, de la locomotion, la respiration, l'alimentation, la croissance, la morphologie ou la reproduction des organismes (Hare 1992). Ces effets toxiques surviennent lorsque la quantité de métal qui entre dans les animaux dépasse la capacité de la machinerie biochimique à métaboliser ces métaux (Hare 1992). La grande dispersion et la toxicité potentielle des métaux traces requiert, donc l'étude approfondie de l'impact des métaux traces dans la nature.

Il est difficile de prédire les effets biologiques des métaux à partir des concentrations totales mesurées dans l'eau des lacs ou dans les sédiments (Luoma 1983). Une façon plus directe de prédire les effets des métaux est la mesure de la quantité de métal accumulée par les animaux (Tessier *et al.* 1994). En mesurant la quantité de métal accumulée par un animal, on possède aussi une estimation du niveau de contamination en métaux d'un milieu (Hare 1992). Un animal utilisé pour révéler l'état de contamination en métaux des lacs peut être appelé biomoniteur. La larve de *Chaoborus punctipennis* (Insecta, Diptera) a retenu notre

attention puisqu'elle possède les qualités d'un bon bioindicateur : maillon stratégique de la chaîne trophique entre le zooplancton et les petits poissons, largement répandue, facile à échantillonner, à identifier et à garder en microcosmes, et, par-dessus tout, capable d'accumuler les métaux sans y être trop sensible.

Cependant, l'utilisation efficace d'un bioindicateur repose sur un modèle reliant les concentrations en métaux bioaccumulé ($[M]_{\text{organisme}}$) à celles dans leur environnement. En laboratoire, l'accumulation des métaux dans les organismes aquatiques ne peut généralement pas être prédite par la concentration totale du métal, mais plutôt par la concentration (activité) de l'ion libre du métal, M^{2+} (Campbell 1995). La concentration en métal libre peut d'ailleurs être utilisée pour prédire efficacement les concentrations de métaux accumulées dans les animaux aquatiques en nature (Hare et Tessier 1996; Croteau et al. 1998; Hare et Tessier 1998). Ces auteurs ont montré que les concentrations de cadmium (Cd) dans l'insecte prédateur *Chaoborus punctipennis* (Diptera) sont reliées et peuvent donc être prédites par la concentration du métal libre dans l'eau des lacs. Cependant cela ne veut pas nécessairement dire que *Chaoborus* prend son métal de l'eau; une relation directe entre le prédateur et le métal dans l'eau serait aussi observée si les organismes à des échelons inférieurs de la chaîne alimentaire prenaient leur métal principalement de l'eau. Pour mieux comprendre le lien entre les paramètres impliqués dans le modèle, nous avons mené une première étude mécaniste visant à évaluer l'importance relative des voies eau et nourriture pour l'entrée du cadmium chez *Chaoborus*. En d'autres termes, nous avons déterminé si la relation entre le métal dans l'insecte et l'eau des lacs est directe (métal entre par l'eau) ou indirecte (métal entre par la nourriture qui elle-même tire son métal directement ou indirectement de l'eau) (Figure 1).

Pour une chaîne trophique aquatique, les contributions relatives des voies d'entrée déterminent l'importance du transfert trophique des métaux :

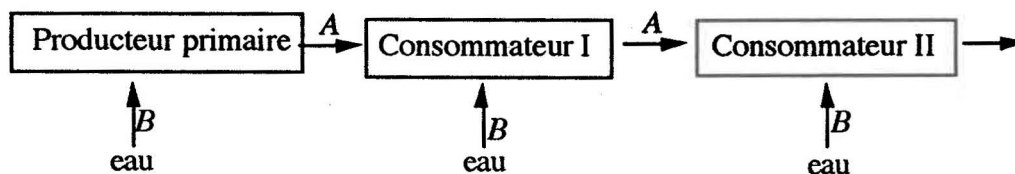


Figure 1. Sources possibles de métaux pour une chaîne trophique aquatique. La flèche "A" représente l'entrée des métaux via la nourriture et la flèche "B", via l'eau.

En terme d'équation, le schéma précédent se résume ainsi, pour un consommateur :

$$M_{\text{organisme}} = M_{\text{eau}} + M_{\text{nourriture}} \quad (1)$$

La quantité de métal accumulé dans un organisme ($M_{\text{organisme}}$) est la somme du métal accumulé à partir de l'eau (M_{eau}) et à partir de la nourriture ($M_{\text{nourriture}}$). En évaluant l'importance relative des voies d'entrées pour un animal donné (flèche *A* par rapport à la flèche *B*, Figure 1), on détermine la contribution du terme M_{eau} par rapport à $M_{\text{nourriture}}$ (équation 1) pour l'accumulation des métaux par l'organisme.

L'importance relative de l'eau et la nourriture comme vecteurs de métaux traces est inconnue pour la plupart des animaux aquatiques, quoique cette information est importante pour modéliser les mouvements des métaux le long des réseaux trophiques et entre les animaux et leur environnement. Les premières études portant sur le transfert trophique des métaux, et par la suite sur la détermination de l'importance relative des voies d'entrée, remonteraient à la fin des années 1950 (Wilhm 1970). Malgré les années, seulement un faible nombre d'études a été réalisé jusqu'à ce jour sur l'importance relative de l'eau et la nourriture pour l'accumulation des métaux chez les organismes aquatiques (van Hattum et al. 1989). Ce faible nombre de travaux s'explique par la difficulté d'évaluer l'importance relative des voies d'entrée, particulièrement en raison des contraintes expérimentales (Luoma 1983; Kay 1985; section 1.1 de ce document). Dû au fait que les contraintes et approches méthodologiques peuvent différer selon les études, la comparaison des conclusions obtenues entre les études doit être faite avec précaution. Bien que comparées en répertoires, e.g. organismes marins et différents métaux (Luoma 1983), poissons et différents métaux (Dallinger 1987), invertébrés aquatiques et différents métaux (Gerhardt 1993), différents organismes et cadmium (Kay 1985; van Hattum et al., 1989), et organismes d'eau douce et cadmium (section 1.3 de ce document), les études conduisent à diverses conclusions : il n'existe pas de tendance quant à la prédominance d'une voie d'entrée sur l'autre pour l'accumulation des métaux chez les organismes aquatiques. Les différences physiologiques entre les espèces comparées peuvent rendre compte de l'absence de tendance. Il faut aussi noter que l'obtention de conclusions fiables à l'issue d'une étude sur l'importance relative de l'eau et la nourriture repose d'abord et avant tout sur son approche méthodologique. Bien que particulièrement difficiles à obtenir, les informations sur l'importance relative des voies d'entrée sont toutefois essentielles afin de connaître le destin des métaux dans la nature (van Hattum *et al.* 1989; Timmermans *et al.* 1992).

L'accumulation du Cd à partir de l'eau dépend de plusieurs variables physico-chimiques relatives à l'eau, tel le pH et la concentrations en ligands organiques et inorganiques de l'eau (Hare et Tessier 1996). L'accumulation du Cd à partir de la nourriture serait quand à elle influencée par les variables relatives à la nourriture: le taux d'ingestion, la quantité de métal dans la proie et l'efficacité d'assimilation du métal (Thoman 1981; Spacies et Hamelink 1985; Luoma et al. 1992; Wang et Fisher 1996). Après avoir déterminé l'importance relative des sources de Cd pour la larve de *C. punctipennis*, nous nous sommes intéressés à l'influence des variables relatives à la source d'entrée prédominante sur l'accumulation du Cd chez cet organisme. Par exemple, si la nourriture est la voie d'entrée prédominante, nous étudierons l'influence de variations dans le type et la quantité de nourriture offerts sur l'accumulation du Cd chez *Chaoborus*. Ces connaissances nous permettront de mieux comprendre, au plan mécaniste, la relation entre les concentrations de Cd dans *Chaoborus* et celles dans l'eau du modèle de bioaccumulation de *Chaoborus* (Hare et Tessier 1996; Croteau et al. 1998; Hare et Tessier 1998). Aussi, l'étude des variables relatives à la source prédominante du métal nous fournira des outils pour expliquer la déviation de certains lacs des prédictions faites par le modèle de bioaccumulation de *Chaoborus* (e.g. cas du lac Turcotte, Croteau et al. 1998).

L'étude de l'entrée du Cd à partir des sources eau et nourriture apporte des connaissances sur les taux de prise en charge du Cd chez la larve de *C. punctipennis*. Dans le but d'utiliser efficacement *Chaoborus* à des fins de biomonitoring, ces connaissances sur l'entrée du Cd doivent être combinées à l'étude du taux de sortie ou d'élimination du Cd chez cet organisme. Ces informations sur les dynamiques d'échange du Cd nous permettront par exemple de connaître la vitesse d'équilibration des concentrations en Cd de la larve face à un changement de conditions du milieu environnant. Aussi ces connaissances cinétiques sont essentielles pour modéliser le destin du Cd au sein des chaînes trophiques impliquant *Chaoborus*, un organisme qui joue un rôle trophique clé en tant que consommateur des organismes du zooplancton et nourriture pour les petits poissons.

1.1 Biologie des larves de *Chaoborus*

Chaoborus (Diptera, Chaoboridae) ou la "mouche fantôme" est un insecte commun des lacs du monde (Borkent 1981). Cet organisme se reconnaît par la transparence caractéristique de sa larve aquatique, laquelle exhibe, en général, des migrations diurnes à travers la colonne d'eau. Son comportement migratoire et son habileté à résister à un hypolimnion anoxique permet à *Chaoborus* d'être passablement répandu dans les milieux lenticules (Figure 2). Le cycle de vie complet de *Chaoborus* sous nos climats est d'une année. La larve de *Chaoborus*

comporte 4 stades larvaires (I, II, III et IV); les stades I et II sont courts ; les larves sont majoritairement limnétiques et répondent positivement au phototactisme. Les larves des stades III et IV de la plupart des espèces habitent dans les sédiments ou l'hypolimnion, pendant le jour, et le soir, elles envahissent l'épilimnion. Ces migrations sont motivées par la capacité de *Chaoborus* à détecter des signaux chimiques des poissons, synonyme de prédation (Dawidowicz *et al.* 1990). Les larves du stade IV se transforment en pupes avant d'émerger du lac. Les adultes vivent pendant peu de temps; ils se reproduisent, pondent leurs oeufs à la surface de l'eau et meurent.

La diète de *Chaoborus punctipennis* est majoritairement composée, en terme de biomasse, de rotifères, pour les stades I et II, et de crustacés (copépodes et cladocères) pour le stade IV; au stade III, les larves mangent une combinaison des deux groupes de proies (Tableau 1). Cette tendance, observée chez *C. punctipennis* pour un lac du New Hampshire (Moore 1988), se reproduit pour un lac acide et contaminé en métaux, Plastic Lake, Ontario (Moore *et al.* 1994). Ce patron de proies n'est cependant pas le même pour toutes les espèces de *Chaoborus* du monde. Par exemple, les larve du IV ième stade de *C. ceratopogones* et *C. anomalus*, des espèces africaines dont la largeur de la bouche est environ 1.5 fois plus petite que celle de *C. punctipennis*, consomment majoritairement des rotifères et des phytoflagellés (Hare et Carter 1987). La diète de *Chaoborus* varie donc selon l'espèce, le stade larvaire et le type de communauté planctonique présente dans le milieu.

Bien que les grosses proies représentent un apport énergétique plus grand que les petites proies, *Chaoborus* serait limité par le diamètre de sa bouche, lequel doit excéder la grosseur de sa proie (Hare et Carter 1987; Moore 1988). Bien que l'on croyait la larve de *Chaoborus* obligatoirement prédatrice, sa consommation d'animaux, par tous les stades larvaires, de phytoflagellés mixotrophes (e.g. *Peridinium* sp., *Dinobryon* sp.), laquelle peut atteindre 67% du nombre de proies du pharynx (Hare et Carter 1987; Moore 1988; Moore *et al.* 1994), nous permettrait de la qualifier davantage d'omnivore.

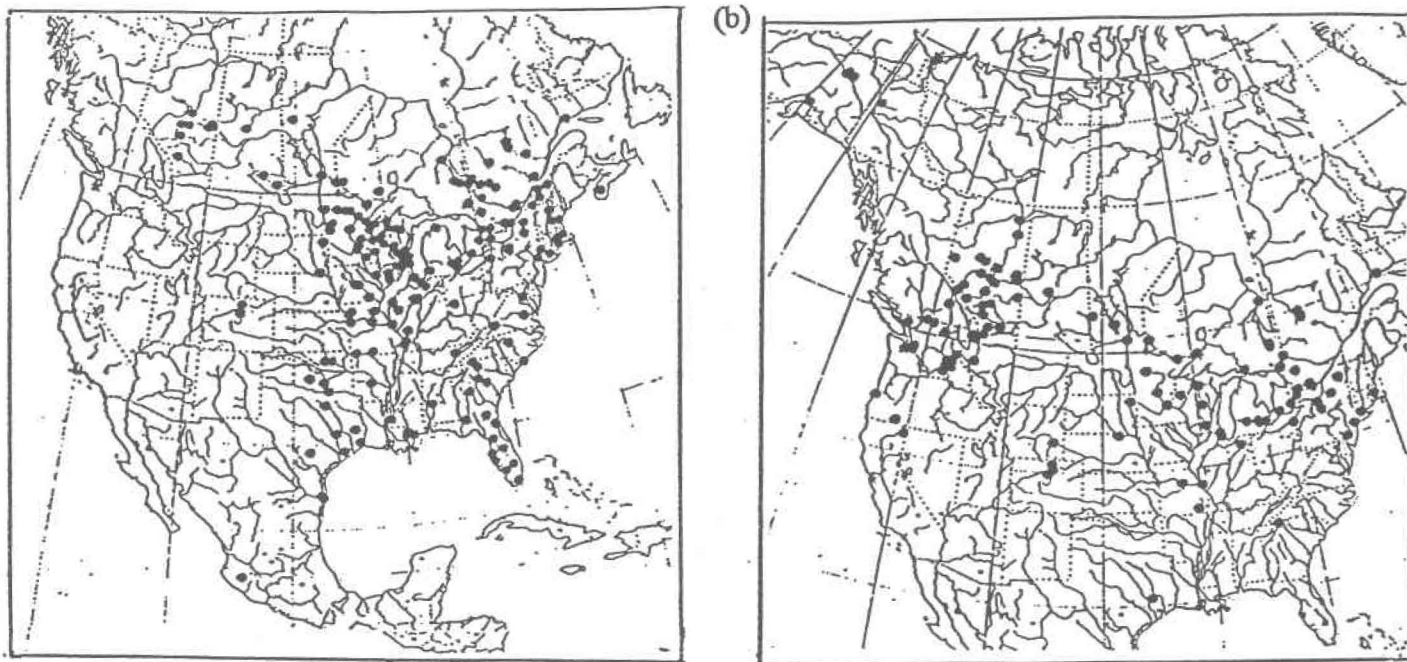


Figure 2. Distribution spatiale des espèces de *Chaoborus punctipennis* (a) et *Chaoborus flavicans* (b) en Amérique du Nord. (Borkent 1981)

Tableau 1. Proportion de gros phytoplancton, protozoaires, rotifères, et crustacés en terme de biomasse dans les pharynx de *Chaoborus punctipennis* collectés à minuit entre 2 et 4 m de profondeur. Pourcentage calculé sur la moyenne de 40 pharynx contenant des proies pour le stade I, 54 pour le stade II, 74 pour le stade III et 92 pour le stade IV. (30 juillet, 1984, Post Pond, Lyme, New Hampshire) (Moore 1988)

Stade larvaire	Phytoplancton	Protozoaires	Rotifères	Crustacés
I	0,5	0	99,5	0
II	0,8	0	99,2	0
III	11,5	0	58,3	30,2
IV	<0,1	0	1,5	98,4

Aussi, en plus de varier d'un lac à l'autre, la diète d'une espèce de *Chaoborus* peut fluctuer selon les saisons à l'intérieur d'un seul lac (Yan *et al.* 1991; Moore *et al.* 1994). On observe aussi des différences dans la quantité de Cd accumulé selon les taxons d'une même

communauté planctonique, dont la composition peut changer en fonction des saisons et des années (e.g. Yan et al. 1990a) (Tableau 2 et Figure 3).

Bien que l'on puisse retrouver les larves de *Chaoborus* dans des lacs acides et à fortes concentrations en métaux, comme c'est le cas dans les lacs des régions minières, peu d'informations sont disponibles quant à leur capacité d'accumulation des métaux. Des mesures de concentrations de métaux chez *Chaoborus* stade IV et dans l'eau dans une quarantaine de lacs recouvrant une superficie de 350 000 km² ont cependant été réalisées entre 1987 et 1996. Les concentrations de Cd accumulé se situent entre 0.2 µg/g p.s. pour *C. punctipennis* du lac Hélène (Rouyn-Noranda), et 13 µg/g p.s. pour la même espèce du lac Crowley (Sudbury) (Hare et Tessier 1996). Si le métal accumulé par *Chaoborus* provient de sa nourriture, et sachant que i) la disponibilité des types de proies varie entre les lacs et à l'intérieur d'un lac selon la saison (Yan *et al.* 1991; Moore *et al.* 1994), ii) la quantité de Cd varie selon le type de proies (Yan et al. 1990a, Hare non-publié), et que iii) la diète peut varier selon les espèces de *Chaoborus* et entre les stades larvaires d'une même espèce (Hare et Carter 1987; Moore 1988), nous pensons que les variables relatives à la nourriture, telles le type de proies et le taux d'ingestion peuvent influencer l'accumulation de Cd chez le prédateur.

Tableau 2. Concentrations de cadmium dans le zooplancton collecté dans Plastic Lake, Dorset, automne 1985 et 1986. (Yan *et al.* 1990a et Yan *et al.* 1990b, pour les données de *Holopedium*). *N* représente le nombre d'échantillons analysés. Les échantillons contenaient plusieurs individus de la même espèce, du même sexe et de tailles semblables.

Espèces	Date	<i>N</i>	Cd, $\mu\text{g/g}$ de poids sec	
			moyenne	min.-max.
Copépodes				
<i>Diaptomus minutus</i>	10/22/85	2	0.92	0.41 - 1.10
<i>Cyclops scutifer</i>	10/22/85	2	1.77	1.5 - 2.0
Cladocères				
<i>Daphnia pulex</i>	10/8/85	3	5.85	5.1 - 6.3
<i>Holopedium gibberum</i>	9/10/85	8	2.35	1.2 - 6.8
	10/8/85	1	2.99	
	10/16/86	16	4.60	2.3 - 9.8
	10/30/86	16	2.80	0.9 - 6.5

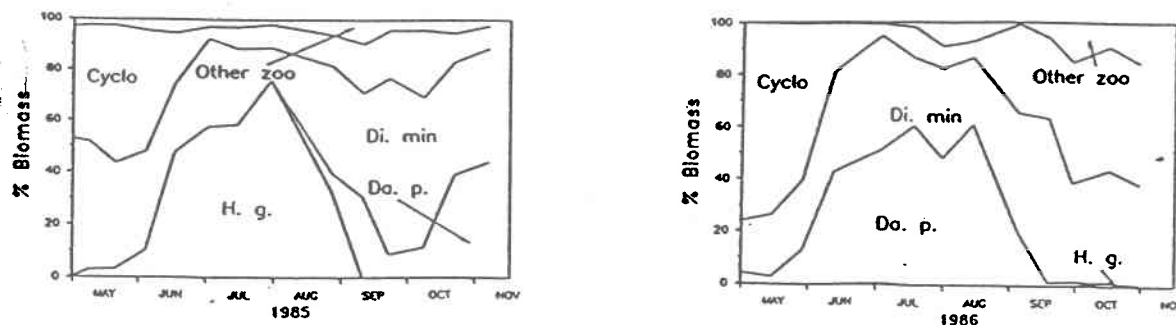


Figure 3. Contribution saisonnière de différents taxa de zooplancton sur la biomasse totale de plancton capturé (>250 μm), dans Plastic Lake, en automne 1985 et 1986. Les abréviations indiquent les contributions de Cyclopoïdes (Cyclo), *Holopedium. gibberum* (H. g.), *Diaptomus. minutus* (Di. min.), et *Daphnia. pulex* (Da. p.). (Yan *et al.* 1990a)

1.2 Modèle biogéochimique

L'accumulation d'un métal chez plusieurs espèces d'animaux et de plantes aquatiques peut être raisonnablement bien prédite par la concentration du métal dissous dans l'eau. Cette relation repose sur le modèle de l'ion libre qui prédit que la réponse biologique serait proportionnelle à la concentration de l'ion libre ($[M^{z+}]$) plutôt qu'à la concentration totale du métal (Morel 1993, Campbell 1995).

En termes d'équation, le modèle se résume ainsi :

$$[M]_{\text{organisme}} = F \cdot [M^{z+}] \quad (2)$$

où F est un facteur de proportionnalité entre le métal dans l'eau (M^{z+}) et le métal accumulé dans un animal ($M_{\text{organisme}}$). Cette relation semble bien prédire les concentrations de Cd accumulé par des bivalves d'eau douces pour des lacs de pH autour de 7 (Tessier et al., 1993). Cependant, pour un insecte comme *Chaoborus* qu'on peut retrouver dans des lacs acides, l'équation (2) ne prédit pas bien la relation entre le Cd bioaccumulé et le Cd dans l'eau (Hare et Tessier 1996, Croteau et al. 1998, Hare et Tessier 1998). Par exemple, on note une accumulation de $3 \mu\text{g/g}$ pour une $[\text{Cd}^{2+}]$ de 7 nM dans un lac acide (pH = 4.58), contre $13 \mu\text{g/g}$ pour une $[\text{Cd}^{2+}]$ de 2 nM dans un lac moins acide (pH = 5.86). La relation peut, par ailleurs, être améliorée en considérant une compétition hypothétique entre le cadmium libre et l'ion hydrogène pour les sites biologiques d'entrée du métal. Donc, l'équation (2) devient, pour l'accumulation du cadmium chez *Chaoborus*, en tenant compte de cette compétition entre les ions hydrogène et cadmium:

$$[\text{Cd}]_{\text{Chaoborus}} = F \cdot [\text{Cd}^{2+}] / ([\text{H}^+] + K_a) \quad (3)$$

où K_a est une constante d'acidité pour les sites d'entrée du métal chez l'organisme.

La relation entre les paramètres de l'équation (3) donne lieu à un modèle qui permet de prédire la concentration en cadmium dans l'eau à partir de la concentration en cadmium chez *Chaoborus*, en considérant quelques paramètres chimiques de l'eau (concentration en matière organique dissoute et pH; Figure 4).

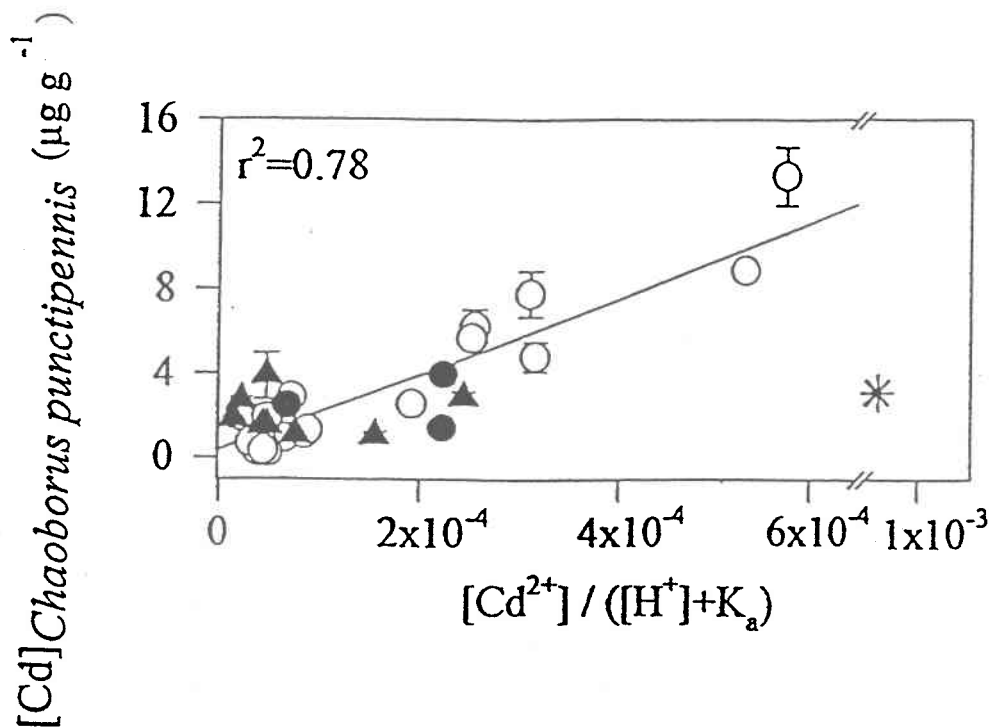


Figure 4. Relation entre les concentrations moyennes (\pm SD, $\mu g\ g^{-1}$ dry weight) de Cd dans les larves de *Chaoborus punctipennis* et $[Cd^{2+}]$ normalisé pour la compétition hypothétique entre les ions hydrogènes et cadmium pour les sites biologiques d'entrée. Symboles blancs, pH > 5.5; symboles noirs, pH < 5.5; cercles, données provenant de Hare et Tessier 1996; triangle, données provenant de Croteau et al. 1998. L'étoile indique le lac Turcotte et n'a pas été pris en compte dans la régression.

Ce modèle destinés aux chercheurs et aux gestionnaires de l'environnement pour prédire les concentrations en Cd des lacs à partir de la concentration en cadmium dans *Chaoborus* ne nous renseigne cependant pas sur le pourquoi du lien qui existe entre les deux paramètres. Plus un modèle est mécaniste par opposition à empirique, plus il repose sur des fondements bio-physico-chimiques et donc plus son pouvoir prédictif peut être étendu à des lacs différents de ceux utilisés pour calibrer le modèle. Une question mécaniste importante visant à comprendre comment s'effectue l'accumulation du métal chez *Chaoborus* est la quelle est l'importance relative de l'eau et la nourriture pour l'entrée du Cd.

Si le métal entre majoritairement via l'eau, la relation entre le métal dans *Chaoborus* et le métal dans l'eau (Figure 4, équation 3) est directe. Si la contribution de la nourriture était prépondérante pour l'accumulation du cadmium, la relation entre $[Cd]_{Chaoborus}$ et $[Cd^{2+}]$ serait indirecte, sous-entendant que la nourriture tirerait elle-même son métal de l'eau directement ou indirectement.

Les deux premières expériences réalisées dans le cadre de nos travaux avaient pour but de déterminer l'importance relative des voies d'entrée du métal chez *C. punctipennis*. Si l'eau s'était avérée la voie majoritaire, donc la relation entre les paramètres du modèle serait directe et la compréhension du modèle reposerait sur les variables relatives à l'eau (on revient à l'équation 3). Si la nourriture s'était avérée la voie majeure d'entrée des métaux chez *C. punctipennis*, les variables relatives à la nourriture deviendraient donc des éléments importants pour mieux comprendre l'accumulation du Cd chez un animal et pour expliquer pourquoi certains lacs peuvent dévier des prédictions du modèle (e.g. lac Turcotte, Figure 4). Aussi le 22% de variabilité entre les deux paramètres du modèle ($r^2 = 0.78$ entre $[Cd]_{animal}$ et $[Cd^{2+}] / ([H^+] + K_a)$) pourrait être expliquée et peut être ultérieurement réduite en sachant comment les variables relatives à la source principale de métal influencent la prise en charge du Cd par *Chaoborus*.

Les variables reconnues pour influencer la bioaccumulation des contaminants sont le taux d'ingestion, l'efficacité d'assimilation et la quantité de contaminant dans la proie. Si on inclue un terme représentant l'entrée du métal via la nourriture à l'équation (3), on obtient:

$$[Cd]_{Chaoborus} = \underbrace{(F_1 \cdot [Cd^{2+}] / ([H^+] + K_a))}_{eau} + \underbrace{(F_2 \cdot [Cd]_{nourriture})}_{nourriture} \quad (4)$$

où F_1 et F_2 sont des facteurs de proportionnalité pour le cadmium provenant de l'eau et la nourriture, respectivement, et où $[Cd]_{nourriture}$ représente la concentration de cadmium dans les proies consommées par le prédateur. La constante F_2 peut être décomposée en ses variables, selon Reinfelder (1994):

$$F_2 = \frac{AE \cdot I}{k + G} \quad (5)$$

où le numérateur est le produit de la proportion assimilée à partir de la nourriture (AE, %) et du taux d'ingestion (I, g proie g prédateur⁻¹ jour⁻¹), alors que le dénominateur donne les

termes de "perte", où k et G sont des constantes de taux d'élimination et de croissance (jour⁻¹). En combinant les équations (4) et (5) et en négligeant le terme représentant l'entrée du métal via l'eau dans l'équation (4), on obtient:

$$[\text{Cd}]_{\text{animal}} = \frac{AE \cdot I \cdot [\text{Cd}]_{\text{nourriture}}}{k + G} \quad (6)$$

Les variables reliées à la nourriture étudiées dans le cadre de ces travaux sont le taux d'ingestion, la quantité de métal provenant des proies et l'efficacité d'assimilation du métal

1.3 Importance eau vs nourriture: études antérieures

L'étude de l'importance relative des voies d'entrées du cadmium pour *Chaoborus* permettra de connaître d'où vient le métal accumulé par cette larve. Cette question motive aussi toutes les études impliquant d'autres espèces aquatiques, étant donné notre désir de trouver la source de métal qui reflète le niveau de contamination en métaux chez les organismes aquatiques. Par exemple, si l'eau était vraiment dominante par rapport à la nourriture pour l'accumulation des métaux dans les chaînes trophiques, la mesure de paramètres relatifs à l'eau suffirait à prédire les concentrations accumulées. Cependant, il semble difficile d'en arriver à une conclusion unanime pour tous les organismes aquatiques.

Le Tableau 3 répertorie les conclusions de 6 études sur l'accumulation du Cd via l'eau et la nourriture pour des espèces d'arthropodes d'eau douce. On constate qu'il n'y a pas de tendance quant à l'importance des voies d'entrée: si l'eau semble être plus importante pour les crustacés, la nourriture compterait davantage pour les mites et les insectes.

L'importance relative de l'eau et de la nourriture pour l'accumulation des métaux varie selon le métal, la nature et l'état physiologique de l'organisme, et la disponibilité relative des concentrations de métaux dans les deux sources (Weeks et Rainbow 1993). Hare (1992) a décrit les paramètres relatifs au milieu aquatique et à l'organisme qui régissent l'importance relative des voies d'entrées chez les insectes aquatiques. Parmi ceux-ci, on note:

- i) la biodisponibilité du métal dans chacun des média en contact avec les sites d'entrée des métaux de l'organisme;
- ii) l'importance des surfaces d'absorption;

- iii) la grosseur des particules de nourriture et la manière dont le métal y est associé;
- iv) la vitesse à laquelle l'eau circule sur les surfaces corporelles ou la nourriture dans le tractus digestif;
- v) les conditions physico-chimiques existant dans le tractus digestif (pH, p_e, enzymes, etc.);
- vi) la facilité avec laquelle le métal traverse les membranes biologiques.

La grande variabilité potentielle de ces paramètres pour les milieux aquatiques et les organismes qui y vivent expliquerait les diverses conclusions quant aux contributions relatives des voies d'entrée pour divers organismes.

À la lumière de ces travaux, on remarque que pour que les conclusions soient comparables entre elles, reproductibles et valables pour les extrapoler, quoique sous toute réserve, aux écosystèmes naturels, il convient de considérer plusieurs exigences méthodologiques tant d'ordre biologiques, chimiques que physiques. Nous en avons relevées quelques unes parmi les plus importantes et nous avons classifié les études relevées au Tableau 3 selon qu'elles répondent ou non à ces critères méthodologiques (Tableau 4).

- i) concentrations de Cd réalistes dans les milieux d'exposition: au Québec, pour des lacs soumis aux retombés des raffineries métallurgiques, la concentration en Cd²⁺ libre peut atteindre 19.5 nM (Croteau et al. 1998). Des concentrations de cadmium irréalistes sont souvent utilisées pour étudier les dynamiques et les patrons d'accumulation du cadmium chez les organismes aquatiques avec un risque d'obtenir des résultats non représentatifs de ceux obtenus chez des organismes exposés au métal dans la nature.
- ii) exposition de tous les niveaux trophique à la même concentration de Cd dans l'eau: ceci afin de ne pas favoriser la contribution d'une voie d'entrée sur l'autre;
- iii) contrôle de la spéciation du Cd dans l'eau tout au long de l'expérience: pour les milieux qui contiennent de fortes concentrations en substances ligands (sédiment, matière organique dissoute, etc.), la concentration biodisponible (potentiellement proportionnelle à [M^{z+}]) peut être de beaucoup inférieure à la concentration totale du métal. Aussi, au cours d'une même expérience, les organismes introduits aux milieux expérimentaux peuvent faire varier la spéciation des métaux, par exemple en changeant le pH, en introduisant de la matière organique ou en bioaccumulant les métaux;

- iv) biodisponibilité du métal accumulé dans la nourriture représentative de la réalité; le temps d'exposition de la nourriture au métal peut influencer l'efficacité du transfert du métal aux niveaux trophiques supérieurs. Par exemple, un court temps d'exposition peut engendrer l'accumulation du Cd dans des sites d'échanges rapides du métal chez la proie et non de stockage à long terme (Jannasch et al. 1988) menant à une surestimation de la quantité de métal transférée au prédateur. De plus, les tissus de la proies qui ont été synthétisés avant son exposition au métal ne seront vraisemblablement pas contaminés dans ce cas (Reinfelder et Fisher, 1994). Pour s'assurer d'obtenir une distribution interne du métal représentative du milieu naturel il est suggéré soit d'exposer la nourriture au métal pendant toute leur vie et même pendant plusieurs générations avant de les offrir aux consommateurs (Reinfelder et Fisher 1994), soit de démontrer que le temps choisi d'exposition des proies au métal n'a pas d'influence sur la distribution du métal (Annexe A);
- v) conditions expérimentales réalistes: le stress engendré par des conditions expérimentales non représentatives de la réalité (e.g. température, grosseurs des enclos, lumière) peut influencer l'accumulation des métaux;
- vi) mélange naturel de proies: la biodisponibilité et le contenu en métal peut varier d'un type de nourriture à l'autre (e.g. Yan et al. 1990a). Il est donc important d'offrir aux organismes un mélange naturel de proies représentatif des espèces consommées dans la nature afin de mesurer des taux de prise en charge via la nourriture réalistes.

Tableau 3. Données expérimentales sur l'importance relative de l'eau et la nourriture pour l'accumulation du Cd chez des arthropodes d'eau douces. (++) signifie contribution très importante, + signifie contribution non-négligeable, - signifie contribution négligeable).

	Mode alimentaire	Nourriture utilisée	[Cd]nourriture (µg g ⁻¹)	[Cd]eau (µg L ⁻¹)	Importance des sources		Références
					eau	nourriture	
Crustacés							
<i>Moina macrocopa</i>	Herbivore	<i>Chlorella</i> - algue	14 - 341	1.3 - 20	++	+	Hatakeyama & Yasuno 1981
<i>Daphnia magna</i>	Herbivore	<i>Chlorella</i> - algue	?	120	++	+	Carney et al. 1986
<i>Asellus aquaticus</i>	Herbivore	<i>Elodea</i> - macrophyte	10 - 358	0.9 - 13	++	+	van Hatsum et al 1989
<i>Procambarus acutus</i>	Carnivore	<i>Lumbricus</i> - vers de terre	27 - 110	5 - 10	++	++	Giesy et al. 1980
... <i>Hyalella azteca</i>	Herbivore	mélange naturel d'spp. de périphyton	4.1	0.09	+	++	Stephenson & Turner 1993
Mites							
<i>Limnesia maculata</i>	Carnivore	<i>Chironomus</i> - insecte	639	94	+	++	Timmermans et al 1992
Insectes							
<i>Mystacides</i> spp.	Carnivore	<i>Chironomus</i> - insecte	288	85	+	++	Timmermans et al 1992
<i>Chaoborus punctipennis</i>	Carnivore	<i>Ceriodaphnia</i> crustacé	75	1.12	-	++	Munger & Hare 1997 (Chapitre 1)
<i>Chaoborus punctipennis</i>	Carnivore	mélange naturel de crustacés	10	0.11	-	++	Munger et al. 1999 (Chapitre 2)

Tableau 4. Classification des études menées en eau douce sur l'importance relative de l'eau et la nourriture comme source de Cd selon qu'elles adhèrent (O) ou non (N) à six critères méthodologiques clés: i) concentrations de Cd réalistes dans les milieux d'exposition; ii) exposition de tous les niveaux trophiques à la même concentration de Cd dans l'eau; iii) contrôle de la spéciation du Cd dans l'eau tout au long de l'expérience; iv) biodisponibilité réaliste du Cd dans la nourriture; v) conditions expérimentales réalistes; et vi) mélange naturel de proies. Point d'interrogation (?) signifie que l'information n'était pas disponible.

Animal	Critères						Références
	i	ii	iii	iv	v	vi	
Crustacés							
<i>Moina macrocopa</i>	N	N	?	?	N	N	Hatakeyama & Yasuno 1981
<i>Daphnia magna</i>	N	?	?	?	N	N	Carney et al. 1986
<i>Asellus aquaticus</i>	N	N	N	?	N	N	van Hattum et al. 1989
<i>Procambarus acutus</i>	N	N	N	?	N	N	Giesy et al. 1980
<i>Hyalolella azteca</i>	O	O	O	O	O	O	Stephenson & Turner 1993
Mites							
<i>Limnesia maculata</i>	N	O	?	?	N	N	Timmermans et al. 1992
Insectes							
<i>Mystacides</i> spp.	N	O	?	?	N	N	Timmermans et al. 1992
<i>Chaoborus punctipennis</i>	O	O	O	O	N	N	Munger & Hare 1997 (Chapitre 1)
<i>Chaoborus punctipennis</i>	O	O	O	O	O	O	Munger et al. 1999b (Chapitre 2)

2.0 Objectifs

Les objectifs des travaux réalisés étaient de:

- i) déterminer la contribution de la nourriture par rapport à l'eau pour l'accumulation du cadmium chez la larve de *C. punctipennis*, par des expériences en laboratoire;
- (ii) déterminer la contribution de la nourriture par rapport à l'eau pour l'accumulation du cadmium chez la larve de *C. punctipennis*, par des expériences *in situ*,
- (iii) évaluer *in situ* le taux de perte du Cd chez le prédateur *C. punctipennis* provenant d'un lac contaminé;
- (iv) vérifier l'effet du type et de la quantité de proies consommées sur l'accumulation du Cd chez la larve de *C. punctipennis*.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'importance relative de l'eau et la nourriture pour l'entrée des métaux traces chez la larve d'insecte aquatique *C. punctipennis* en laboratoire. Ces expériences portant sur la chaîne trophique algue verte *Selenastrum capricornutum* - crustacé herbivore *Ceriodaphnia dubia* - prédateur *Chaoborus punctipennis* ont été menées avec un grand souci de reproduire les conditions naturelles. Entre autre, nous avons démontré grâce à une expérience parallèle que le Cd accumulé par la nourriture offerte au prédateur respectait les mêmes patrons de distribution interne que pour des proies contaminées depuis plusieurs générations. Aussi nous avons utilisé les mêmes concentrations réalistes de Cd sous sa forme d'ion libre pour tous les échelons de la chaîne alimentaire. Malgré cela, l'extrapolation directe des conclusions au milieu naturel doit être faite avec retenue étant donné la complexité des réseaux trophiques, des conditions physico-chimiques du milieu et de la disponibilité biologique des métaux (Taylor 1983, Kay 1985, Bothwell et al. 1994).

Dans un deuxième temps, nous avons effectué une expérience de validation sur la question de l'importance des voies d'entrée pour l'accumulation du cadmium chez *Chaoborus* en milieu naturel contaminé (Sudbury). Pour ce faire nous avons développé un design expérimental innovateur impliquant le transfert de larves non-contaminées vers un lac contaminé où elles ont été placées dans des mésocosmes en filet maillant de 64 μm qui restreignent l'entrée des proies. En utilisant de l'eau et des proies naturellement contaminées, plusieurs difficultés sont contournées, telles les exigences méthodologiques de la section 1.3.

Dans un troisième temps, nous avons déterminé le taux de perte du Cd chez *C. punctipennis* suite à leur transfert d'un lac contaminé (région de Sudbury) vers un lac peu contaminé (région de Québec). Les larves transférées ont été placées dans les mésocosmes de 64 μm utilisés dans l'expérience eau vs nourriture *in situ*. Le taux de perte des contaminants de même que les taux d'accumulation obtenus à partir des expériences précédentes permettent d'avoir une vue globale du destin du cadmium chez *Chaoborus*. Ces informations complémentaires à l'accumulation améliore nos connaissances des dynamiques de transfert du Cd le long de la chaîne trophique impliquant *C. punctipennis*.

L'étape suivante a été d'étudier l'influence de variables relatives à la nourriture sur l'accumulation du Cd chez le prédateur. Les variables reconnues pour influencer la bioaccumulation des métaux sont le taux de consommation de la nourriture, appelé taux d'ingestion, la concentration de métal dans la nourriture, et l'efficacité avec laquelle le métal ingéré est assimilé (Thoman 1981; Spacies et Hamelink 1985; Luoma et al. 1992; Wang et

Fisher 1996). Le type de nourriture offert peut aussi influencer indirectement l'accumulation du Cd puisqu'il a été rapporté avoir un lien avec la concentration de métal dans la nourriture et l'efficacité d'assimilation. En fait, deux types de proies de taxa différents peuvent accumuler des concentrations de métaux différentes (Yan et al. 1990a, Hare non-publié, Croteau non-publié). Aussi, il a été démontré que l'efficacité d'assimilation du métal varie avec le type de proies probablement due à des différences de compositions biochimiques entre les types de proies (Wang et Fisher 1996). Puisqu'à la fois la concentration de métal dans la nourriture et l'efficacité d'assimilation sont reliés au type de nourriture consommé, nous avons émis l'hypothèse que l'entrée du Cd chez les larves de *C. punctipennis* était gouvernée par le type de proies consommé et le taux d'ingestion.

Après avoir démontré l'importance de la nourriture pour l'accumulation du Cd chez la larve prédatrice de même que le taux de perte de Cd par le prédateur, nous avons donc étudié, dans un quatrième temps, l'influence du type de proies consommé et du taux d'ingestion sur celle-ci. Ainsi, en faisant varier le type de proie offert au prédateur, on fait potentiellement varier de pair la quantité de métal provenant de la proie de même que la nature du lien «métal-proie», lequel influence l'efficacité d'assimilation du métal ingéré par le prédateur. En plus de jouer un rôle clé dans l'accumulation des métaux pour la larve *Chaoborus* spp., nous soupçonnons donc que le type et la quantité de nourriture ingérée peuvent influencer le transfert du métal au prédateur.

3.0 Méthodologie

3.1 Eau versus nourriture: expérience de laboratoire

Dans le but de connaître les contributions relatives de l'eau et de la nourriture pour l'accumulation du cadmium chez *Chaoborus punctipennis*, une expérience en laboratoire a été réalisée. L'exposition de *Chaoborus* au métal via la nourriture et l'eau, d'une part, et via la nourriture seulement, d'autre part, a été inspirée du modèle additif de l'équation 1. L'importance relative des deux sources de cadmium pour *Chaoborus* a donc pu être quantifiée après avoir obtenu, par soustraction entre les deux traitements, la contribution de l'eau.

Dans la pratique, une chaîne trophique simplifiée, composée de l'algue verte *Selenastrum capricornutum*, du crustacé herbivore *Ceriodaphnia dubia*, et de la larve prédatrice *Chaoborus punctipennis*, a été créée en laboratoire. Désirant reproduire les conditions les plus naturelles possibles, chacun des niveaux trophiques a subi une exposition à la même concentration en cadmium libre dans l'eau, soit $[Cd^{2+}] = 10 \text{ nM}$, une

concentration semblable à celles trouvées dans les lacs soumis à l'influence des retombés des raffineries métallurgiques (Tessier et al. 1993). L'isotope radioactif du cadmium, ^{109}Cd , a été utilisée afin de travailler à cette concentration réaliste.

Notons que lors de cette expérience la concentration du cadmium dans l'eau du traitement "Eau + Nourriture" est demeurée stable (10 nM, CV = 4.5%), celle du traitement "Nourriture" est demeurée faible (75 pM, CV = 60%), et la teneur de métal dans la nourriture s'est maintenue aux concentrations désirées (76 $\mu\text{g/g}$ p.s., CV = 30%). Ces mesures, prises tout au long de l'expérience, justifient que seule l'eau contaminée à été la différence entre les traitements "Eau + Nourriture" et "Nourriture" pendant les 14 jours de l'expérience.

Les détails méthodologiques de l'expérience visant à déterminer l'importance relative des voies d'entrée du Cd chez *C. punctipennis* en laboratoire se retrouvent dans la partie «Methods» du Chapitre 2.

Dans l'expérience précédente menée sur la chaîne trophique simplifiée, la proie *Ceriodaphnia dubia* avait été exposée pendant une courte période de temps au Cd, en comparaison à leur durée de vie, avant d'être offerte à la larve prédatrice. Une telle procédure peut avoir engendré l'accumulation du Cd dans des sites d'échange rapide du métal chez la proie et non de stockage à long terme (Jannasch et al., 1988) menant à une surestimation de la quantité de métal transférée au prédateur. De plus, les tissus de la proies qui ont été synthétisés avant son exposition au métal ne seront vraisemblablement pas contaminés dans ce cas (Reinfelder et Fisher 1994).

Pour savoir si les patrons de distribution du Cd chez la proie sont influencés par le temps d'exposition de la proie au métal, nous avons comparé la distribution interne du Cd dans le crustacé planctonique *Ceriodaphnia dubia* après une courte (1 jour) et une longue (population exposée pendant plusieurs générations) exposition au métal. La technique d'autoradiographie sur coupe d'organismes entiers exposés au Cd radioactif a été utilisée pour comparer la distribution interne du Cd après la courte et la longue exposition au métal. Les détails méthodologiques de cette expérience se retrouvent dans la partie «Methods» de l'Annexe A.

La technique d'autoradiographie utilisée pour étudier l'influence du temps d'exposition sur la localisation interne du Cd chez *C. dubia* a été utilisée également pour localiser le Cd accumulé chez les larves de *C. punctipennis* après leur exposition à la nourriture contaminée seulement ou à l'eau et à la nourriture contaminées (Annexe B).

3.2 Eau versus nourriture: expérience *in situ*

Après avoir évalué les contributions de l'eau et la nourriture pour l'accumulation du cadmium chez la larve de *Chaoborus*, nous avons confirmé les conclusions obtenues en laboratoire par des expériences *in situ*. En comparaison avec les études faites en laboratoire, le milieu naturel offre l'avantage de travailler à concentration de Cd réaliste, d'offrir un mélange naturel de proies contaminées depuis plusieurs générations et d'être soumis aux facteurs physico-chimiques existant naturellement. L'expérience *in situ* a impliqué l'ensemencement de mésocosmes placés dans un lac très contaminé (région de Sudbury) avec des larves de *Chaoborus* provenant d'un lac peu contaminé (région de Québec).

Notre choix du lac peu contaminé (St-Joseph) et du lac contaminé (Crowley) pour l'étude était basé sur i) la présence de population indigènes de l'insecte prédateur *C. punctipennis* dans les deux lacs; ii) la similitude du pH des deux lacs; et iii) les plus fortes concentrations de Cd dans l'eau du lac et dans les larves du lac Crowley, probablement en raison de sa location à l'intérieur de 10 km des raffineries minières de Sudbury, Ontario (Gunn 1995).

L'utilisation de mésocosmes en filet et l'ajout de nourriture contaminée dans ceux-ci a permis d'exposer les *Chaoborus* allochtones à l'eau contaminée seulement (traitement «eau») ou l'eau et à la nourriture contaminées (traitement «eau + nourriture»). Le traitement «eau + nourriture» a été créé en offrant, aux *C. punctipennis* transférés dans les mésocosmes, un nombre de proies provenant du lac contaminé variant entre 25 et 675 proies par prédateur. Ce design expérimental (Figure 5) suppose que plus il y a de proies contaminées, plus les prédateurs en mangent et plus ils accumulent de Cd via ces proies. Selon ce design, si la contribution de la nourriture est négligeable, *i.e.* prédominance du terme «eau» de l'équation (4), la quantité de Cd accumulée par *Chaoborus* est la même dans tous les mésocosmes et l'accumulation prend l'allure de la ligne pointillée (*i.e.* pente ≈ 0). En revanche, si la contribution de la nourriture est importante, *i.e.* si le terme «nourriture» de l'équation (4) prédomine, plus il y a de proies, plus les quantités de Cd accumulées sont importantes. L'accumulation du cadmium est alors représentée par la ligne pleine, où la contribution de l'eau équivaut à l'ordonnée à l'origine et où la contribution de la nourriture équivaut à la quantité de Cd accumulée moins l'ordonnée à l'origine.

Les détails méthodologiques de l'expérience visant à déterminer l'importance relative des voies d'entrée du Cd chez *C. punctipennis in situ* se retrouvent dans la partie «Methods» du Chapitre 3.

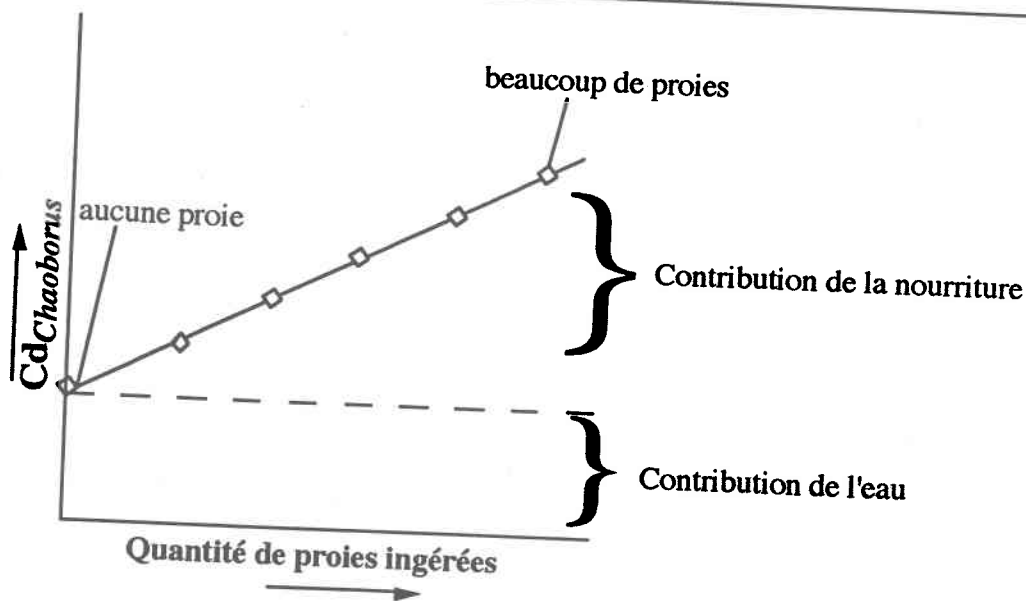


Figure 5. Représentation schématique de l'estimation de l'importance relative de l'eau et la nourriture pour l'accumulation du Cd chez *Chaoborus* par exposition à des quantités croissantes de Cd via le nombre de proies offertes.

3.3 Évaluation *in situ* du taux de perte

Dans les expériences précédentes nous avons mesuré le taux de prise en charge du cadmium à partir de la nourriture par *Chaoborus*. Ces dynamiques d'entrée du Cd combinées à la mesure du taux de perte du Cd procurent des informations capitales pour connaître le temps de résidence du métal chez *Chaoborus* et conséquemment pour cerner le destin du Cd au sein des chaînes trophiques aquatiques impliquant cette larve. Afin d'évaluer le taux de perte de Cd par *Chaoborus* sur le terrain nous avons transféré des larves provenant d'un lac contaminé (lac Crowley, Sudbury, Ontario) vers les mésocosmes utilisés dans l'expérience *in situ* eau vs nourriture mais placés ici dans un lac non-contaminé (lac au Cèdre, Forêt Duchesnay, Québec). Notre choix du lac au Cèdre pour mener l'expérience plutôt que le lac St-Joseph comme dans l'expérience précédente a reposé sur des besoins pratiques d'ancrage des mésocosmes et d'achalandage minimum autour de ceux-ci.

Les deux espèces de larves transférées, *C. punctipennis* et *C. flavicans*, ont été nourries avec deux quantités de proies provenant du lac peu contaminé représentant 35 et 210 proies offertes par prédateur. Nous voulions voir si le taux d'ingestion pouvait modifier le taux de perte du métal. Les détails méthodologiques de l'expérience de perte du Cd par les larves de *Chaoborus* sont présentées au Chapitre 3.

3.4 Influence du type et de la quantité de proies sur l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis*

Après avoir déterminé l'importance de la nourriture pour l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis* de même que le taux de perte du Cd chez ce prédateur, nous avons étudié l'influence de deux variables influençant le transfert des métaux entre les niveaux trophiques: la quantité de proies consommées et le type de proies, ce dernier étant directement lié à la concentration de Cd dans la proie et à l'efficacité d'assimilation. Pour ce faire, nous avons exposé des larves de *C. punctipennis* provenant d'un lac non-contaminé près de la ville de Québec (Québec) à deux types de proies offertes en petite ou grande quantité provenant d'un lac contaminé près de Sudbury (Ontario). La quantité de proies consommées par jour par larve, de même que l'accumulation de Cd dans les larves et dans les proies ont été mesurés de façon à obtenir une valeur d'efficacité d'assimilation pour chaque type de proies et quantité offertes. L'efficacité d'assimilation (AE) est simplement la proportion du métal ingéré dans un temps donné qui est retenue par un consommateur,

$$AE = \frac{\Delta \text{Cd}_{\text{Chaoborus}}}{\Delta t \text{ Cd}_{\text{ingéré}}} \times 100 \quad (11)$$

ou de façon plus explicite :

$$AE = \frac{\Delta [\text{Cd}]_{\text{Chaoborus}} \cdot \text{poids moyen } \text{Chaoborus}^{-1}}{\Delta t \cdot [\text{Cd}]_{\text{proies}} \cdot I \cdot \text{poids moyen proie}^{-1}} \times 100 \quad (12)$$

Selon les équations (11 et 12), l'efficacité d'assimilation est obtenue par le rapport entre la quantité de Cd accumulé par *Chaoborus* pendant l'expérience et la quantité de Cd ingérée via la nourriture pendant l'expérience.

Les détails méthodologiques de l'expérience visant à déterminer l'influence du type et de la quantité de proies sur l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis* se retrouvent dans la partie «Methods» du Chapitre 4.

Les types de proies offertes, cladocères et copépodes calanoïdes, ont été d'abord sélectionnés grossièrement à partir de l'échantillon de zooplancton collecté dans le lac Crowley selon une technique de séparation basée sur le phototactisme positif des cladocères. En mettant un mélange de zooplancton dans un bac blanc opaque et exposé à la lumière ambiante, les cladocères s'agglomèrent près des parois alors que les calanoïdes restent au milieu. Cette technique de séparation a été préférée à plusieurs autres développées dans le

cadre de ces travaux en raison de son succès et sa rapidité à séparer une grande quantité de proies à partir d'un gros volume d'eau et de zooplancton. Une expérience intéressante visant à séparer les types de proies est présentée en Annexe C. Les gros volumes étaient nécessaires pour alimenter une expérience parallèle visant à offrir à des larves placées en mésocosmes des quantités et types de proies différentes; les résultats de cette expérience sont présentés en Annexe D.

4.0 Résultats

4.1 Eau versus nourriture: expérience de laboratoire

Dans cette expérience nous avons tenté d'avoir un fin contrôle sur la concentration de l'ion libre du métal ($[Cd^{2+}] = 10 \text{ nM}$) par la modélisation de la complexation du métal avec les autres ligands en solution, et ce pour chaque niveau trophique. Nous avons aussi mesuré la perte de métal par les proies vers l'eau non-contaminée et vérifié que les concentrations de Cd dans l'eau, les algues et les cladocères sont demeurées constantes tout au long de l'expérience.

L'accumulation du Cd par *C. punctipennis* dans cette expérience augmente de façon linéaire pour les deux premières semaines d'exposition au métal, et ce pour les deux traitements. Aussi, les résultats ont montré aucune différence significative (test de comparaison de régressions linéaires, $p < 0,05$) entre la quantité de cadmium que le prédateur accumule à partir de ses proies seulement, et celle qu'il accumule à partir de l'eau et ses proies. Ce résultat suggère que l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis* s'effectue via la nourriture consommée. Ces informations sont nécessaires pour mieux comprendre les relations entre les concentrations de métaux bioaccumulés et celles dans l'environnement.

L'ensemble des résultats de l'expérience visant à déterminer l'importance relative des voies d'entrée sur l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis* en laboratoire se retrouvent dans la partie «Results and Discussion» du Chapitre 2.

Dans l'expérience précédente nous avons offert à *C. punctipennis* de la nourriture contaminée pendant 24 heures seulement. Nous avons démontré par une expérience parallèle d'autoradiographie que la distribution interne du métal chez ces proies était la même que pour des proies contaminées pendant plusieurs générations avec le métal. Le Cd a été accumulé dans les diverticules de l'intestin, une paire de sacs en forme de virgule rattachés au mésentéron antérieur et qui se terminent derrière l'oeil des cladocères; ce site de

bioaccumulation était le même pour les proies soumises aux deux temps d'exposition au métal.

L'ensemble des résultats de l'expérience visant à déterminer l'effet du temps d'exposition sur l'accumulation du métal chez le cladocère *C. dubia* se retrouvent dans la partie «Results and Discussion» de l'Annexe A.

4.2 Eau versus nourriture: expérience *in situ*

L'accumulation de poids par les larves a été proportionnelle à la quantité de proies contaminées offertes. Effectivement, les larves exposées à l'eau contaminée seulement n'ont pas gagné de poids alors que celles placées dans les mésocosmes additionnés de différentes quantités de proies ont montré une accumulation significative de poids ($p < 0.05$). Aussi nous n'avons vu aucune augmentation significative du contenu en Cd des larves exposées à l'eau contaminée seulement, mais une augmentation significative chez celles auxquelles des proies ont été offertes, suggérant que la nourriture est la source de Cd chez *C. punctipennis*. Bien que l'expression des résultats comme en Figure 5 est très explicite quant à l'importance relatives des voies d'entrée, nous avons préféré utiliser le temps en abscisse pour obtenir des cinétiques d'accumulation ce qui nous donne une information supplémentaire. Cette expérience menée en mésocosmes avec des larves non-contaminées exposées à l'eau du lac contaminé seulement et/ou à un mélange naturel de proies contaminées depuis plusieurs générations a permis de confirmer sans ambiguïté que la nourriture est la voie d'entrée majeure du Cd chez la larve de *C. punctipennis*.

Aussi, nous avons vu une augmentation du poids larvaire proportionnelle à la quantité de proies offertes, ce qui suggère que les larves ont mangé une quantité de proies proportionnelle à la quantité offerte. En dépit de l'augmentation de poids en fonction du nombre de proies offertes, aucune différence significative n'a été détectée entre les niveaux de traitements dans la quantité de Cd accumulé chez les larves nourries à plus de 75 proies par larve. L'absence d'un lien entre la quantité de proies offerte et l'accumulation de Cd suggère que la quantité de proies offerte serait inversement reliée à l'efficacité d'assimilation du Cd: une grande quantité de proies offertes favoriserait potentiellement un court temps de résidence de la nourriture dans l'intestin de *Chaoborus* ce qui aurait comme conséquence de diminuer l'efficacité d'assimilation du Cd.

L'ensemble des résultats de l'expérience visant à déterminer l'importance relative des voies d'entrée sur l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis in situ* se retrouvent dans la partie «Results and Discussion» du Chapitre 3.

4.3 Évaluation *in situ* du taux de perte

Nous avons mesuré une augmentation de poids proportionnelle à la quantité de proies offerte chez *C. punctipennis*, suggérant que ces larves ont mangé normalement en dépit de leur transfert de lacs et confinement en mésocosmes. Le taux de perte de Cd mesuré chez *C. punctipennis* s'est avéré lent ($0.059 \text{ ng Cd larve}^{-1} \text{ jour}^{-1}$) conduisant à un temps de demi-vie biologique d'environ 22 jours. À la fin de l'expérience on remarque une perte de métal légèrement accrue pour les organismes exposés à la plus grande quantité de proies; il faut noter que la quantité d'organismes disponibles pour analyse a rapidement diminué vers la fin de l'expérience dû à l'émergence, si bien que la plupart des derniers points ont été obtenus pour des *C. punctipennis* des mésocosmes d'un même traitement qui ont été rassemblés pour constituer un même échantillon. Un modèle cinétique à un compartiment d'accumulation des contaminants a été appliqué à nos données expérimentales et a prédit des valeurs de concentration de Cd à l'état stationnaire, de demi-vie biologique et d'efficacité d'assimilation très réalistes. Les résultats de l'expérience de perte de Cd chez *C. punctipennis* se retrouvent dans la partie «Results» du Chapitre 3.

Étant donné l'émergence hâtive des *C. flavicans* par rapport aux *C. punctipennis* et donc de la présence de pré-pupes et pupes après respectivement 3 et 10 jours, les résultats pour cette espèce ont été considérés avec retenue et placés en annexe (voir Annexe E).

4.4 Influence du type et de la quantité de proies sur l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis*

Dans cette expérience menée en laboratoire avec des larves non-contaminées exposées à l'eau et/ou à des proies provenant d'un lac contaminé nous avons mesuré la quantité de proies consommée quotidiennement par larve (taux d'ingestion), la concentration de Cd chez ces types de proies, l'influence du type et de la quantité de proies offertes sur l'accumulation de poids et de Cd chez *C. punctipennis* et l'efficacité d'assimilation du Cd en fonction du type de proies et du taux d'ingestion.

De façon générale, le taux d'ingestion a varié proportionnellement à la quantité de proies offertes et a diminué avec le temps pour chaque type de proies. Par exemple, une larve exposée quotidiennement en moyenne à 24.5 copépodes consommait la totalité au début de l'expérience mais uniquement 30% après une semaine.

L'augmentation temporelle du poids entre les organismes faiblement et abondamment nourris n'a pas été imitée par une accumulation proportionnelle du Cd larvaire. Ce phénomène s'expliquerait par une augmentation de l'efficacité d'assimilation chez les larves

exposées à une quantité de nourriture limitante. L'accumulation de Cd chez les larves exposées à l'eau contaminée seulement a été négligeable, confirmant une fois de plus que la nourriture est responsable de l'entrée du Cd chez *C. punctipennis*.

Aussi nous n'avons vu aucune influence du type de proies offert sur l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis* puisque les deux types avaient les mêmes quantités et concentrations de Cd et qu'elle transféraient le Cd au prédateur avec la même efficacité, probablement due à une similarité de leur composition biochimique. Enfin cette étude a suggéré que le taux d'ingestion avait peu d'influence sur l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis* en raison de la diminution de son efficacité d'assimilation pour le Cd lorsque la nourriture est abondante.

L'ensemble des résultats de l'expérience visant à déterminer l'influence du type et de la quantité de proies sur l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis* se retrouvent dans la partie «Results» du Chapitre 4.

5.0 Discussion

5.1 Discussion générale

La première partie des travaux visait à déterminer l'importance relative de l'eau et la nourriture pour l'entrée du cadmium chez la larve de *C. punctipennis* en laboratoire. Pour ce faire nous avons développé une chaîne trophique en laboratoire composée de trois échelons: une algue verte (*S. capricornutum*), un cladocère et proie pour *Chaoborus* (*C. dubia*) et le prédateur (*C. punctipennis*) et obtenu que la nourriture était la source de Cd pour le prédateur. Cependant la proie *C. dubia* avait été contaminée pendant 24 heures seulement avant d'être offerte à *C. punctipennis* en comparaison avec des proies contaminées sur plusieurs générations dans la nature. Une courte période d'exposition au métal peut avoir pour conséquence de modifier la distribution interne du métal chez la proie *C. dubia* en comparaison à la distribution observée chez des proies exposées au métal pendant toute leur vie, tel qu'en nature. En exposant les organismes pendant une courte période de temps, les tissus synthétisés pendant les stades juvéniles risquent de ne pas être contaminés de même que les tissus qui accumulent lentement le métal. Une distribution interne non-représentative de la nature pourrait vraisemblablement influencer le taux et l'efficacité du transfert du métal vers les niveaux trophiques supérieurs. La distribution interne du métal, comparée entre des organismes exposés à court vs long terme au Cd, a révélé un site commun d'accumulation du Cd, à savoir les diverticules de l'intestin, un site responsable de l'absorption des nutriments chez le cladocère *Daphnia pulex* (Schultz et Kennedy, 1976). Étant donné le changement de

structure que subissent les diverticules après une exposition au Cd (Griffith 1980) et de l'utilisation probable des sites d'entrée du calcium par les ions Cd (Simkiss et Taylor, 1995; Craig et al., 1998) observés chez d'autres espèces de cladocères, nous pensons que le Cd pourrait aussi modifier l'échange et le métabolisme du Ca chez notre cladocère *C. dubia*. Aussi, puisque l'intestin était l'organe majoritaire dans lequel nous avons observé une accumulation de Cd après une courte et une longue exposition, cet organe serait potentiellement le site d'action toxique chez *C. dubia* (Annexe A).

De cette démonstration nous concluons que les expériences en laboratoire visant à étudier l'accumulation du Cd à partir de la nourriture planctonique de même que l'efficacité du transfert du métal au prédateur peuvent être menées avec des *C. dubia* exposés pendant 1 seule journée pour produire des patrons d'accumulation représentatifs au plan histologique de ceux chez des organismes exposés pendant plusieurs générations au métal.

La distribution réaliste du métal chez la proie de même que le contrôle de tous les paramètres connus qui influencent le taux d'accumulation du métal (e.g. biodisponibilité du métal, concentrations de métal réalistes et stables pendant la durée de l'expérience) et ce pour les trois échelons de la chaîne alimentaire a permis d'obtenir une conclusion fiable et reproductible sur la question de l'importance relative des voies d'entrée des métaux en laboratoire. Cependant, nous savons que les larves de *Chaoborus* peuvent manger plusieurs types de proies selon leur disponibilité saisonnière dans chaque lac et entre les lacs, et que la concentration et la disponibilité du Cd varient selon les types de proies (Yan et al. 1990a). Aussi, la spéciation chimique des métaux est beaucoup plus complexe en eau naturelle qu'en eau reconstituée en laboratoire. Enfin le confinement des prédateurs en microcosme en laboratoire inhibe leur migration verticale, peut induire des stress associés aux parois par exemple et modifie leur environnement physique. Ces facteurs suggèrent que les conclusions sur l'importance de l'eau et la nourriture obtenues en laboratoire ne devraient pas être extrapolées au milieu naturel sans avoir été validées *in situ* (Taylor 1983, Kay 1985, Bothwell et al. 1995). Cependant, à notre connaissance, peu d'études *in situ* visant à déterminer les voies d'entrée des métaux ont été réalisées en eau douce, probablement en raison des difficultés méthodologiques répertoriées à la section 1.3 de ce document.

Le cadmium accumulé chez *C. punctipennis* serait localisé dans le mésentéron tel que révélé par autoradiographie de larves exposées à l'eau et la nourriture contaminées ou à la nourriture contaminée seulement (Annexe B), de même que par dissection de larves ayant accumulé le Cd en milieu naturel (L. Hare, comm. pers.). Le mésentéron, en plus d'être le siège de l'accumulation du cadmium, serait responsable de l'absorption des nutriments, de

l'entreposage et du métabolisme du glycogène et des lipides, du transport des nutriments à l'hémolymphe et de la synthèse des protéines pour la sécrétion (Seidman *et al.*, 1986). Son implication physiologique et métabolique à l'égard des nutriments apporte une autre évidence au fait que le mésentéron serait le lieu d'assimilation du cadmium. D'ailleurs, selon Luoma (1983), le cadmium lui-même emprunterait des mécanismes d'entrée qui s'opèrent aux sites d'assimilation des nutriments : i) transport via des transporteurs spécifiques aux cations essentiels (e.g. Ca, Mo, Zn); ii) transport «accidentel» ou immobilisation à l'interface externe de la membrane d'un complexe non-spécifique entre un métal et une molécule de transport ; iii) transport de complexes "métaux-nutriments essentiels" par transporteurs spécifiques aux nutriments; iv) transport de complexes de métaux essentiels pour la nutrition.

Dans la deuxième partie des travaux, nous avons développé un design expérimental permettant d'étudier l'importance relative de l'eau et de la nourriture en conditions naturelles et sans ambiguïté. Le design implique le transfert d'organismes peu contaminés en métaux vers un site contaminé où ils sont placés dans des mésocosmes. Ces mésocosmes innovateurs comportent plusieurs avantages, entre autres: i) grâce à leur paroi de côté en filet de 64 μm , l'eau des mésocosmes est en équilibre avec l'eau du lac mais l'entrée des organismes supérieurs à 64 μm est restreinte; ii) les organismes (> 64 μm) y sont ajoutés manuellement selon la quantité et la ou les espèces désirée(s), un gradient de proies offert permet d'évaluer la contribution de la nourriture; iii) leur fond fermé en toile permet d'ancrer les mésocosmes dans des lacs de profondeur variée et de pouvoir y ajouter du sédiment pour recréer un environnement naturel pour les organismes; iv) la partie aérienne des mésocosmes composée de flotteurs totalisant une hauteur de 30 cm les isolent des vagues; v) les organismes habitant la colonne d'eau peuvent facilement être échantillonnés grâce à des trappes en entonnoirs placées dans la lumière du mésocosme; vi) en effectuant le transfert inverse d'organismes, i.e. d'un site contaminé vers un site non-contaminé, on peut étudier l'élimination des contaminants par les organismes.

Ce design expérimental a été utilisé pour confirmer sans ambiguïté que la nourriture est responsable de l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis*. Il est aussi très peu probable que *C. punctipennis* prenne une partie de son métal à partir des sédiments contaminés des mésocosmes ou de l'eau interstitielle puisque les organismes expérimentaux qui n'ont pas été nourris n'ont pas accumulé de Cd. Ce résultat suggère que la nourriture ne devrait pas être exclue *a priori* comme voie d'entrée du Cd dans les expériences d'accumulation des métaux et dans les tests de toxicité, ces derniers supposant pour la plupart que la nourriture est négligeable pour l'accumulation des contaminants (Luoma 1995). Omettre la nourriture dans ces expériences pourrait résulter en une sous-estimation de l'accumulation et de la toxicité

des métaux, risquant donc de sous-estimer l'impact des métaux sur l'environnement de même que de protéger non adéquatement les écosystèmes aquatiques (Luoma et al. 1992).

La considération de la nourriture serait aussi importante pour augmenter la précision et élargir l'application des modèles de bioaccumulation tel celui développé par Hare et Tessier (1996). Selon nos résultats, l'existence d'une forte relation entre la concentration de métal accumulée par les animaux aquatiques et celle dans l'eau reposerait sur un lien indirect entre ces deux paramètres, i.e. que l'accumulation du métal via l'eau se ferait à un niveau trophique inférieur à celui de la larve *C. punctipennis*. Des résultats antérieurs démontrant que la proie *C. dubia* tirerait son métal de sa nourriture, l'algue *S. capricornutum*, suggèrent qu'un lien direct entre les concentrations de Cd dans l'eau et celles bioaccumulées s'établirait au niveau algal.

De fait, la base de la chaîne alimentaire pourrait potentiellement expliquer la variabilité résiduelle du modèle de bioaccumulation de *Chaoborus* ($r^2 = 0.78$, Croteau et al. 1998) entre les concentrations de Cd dans les animaux et dans l'eau, selon ce qui en a résulté de l'expérience visant à évaluer l'influence des variables relatives à la nourriture sur l'accumulation du Cd par *C. punctipennis*. Puisqu'il a été démontré que ni le taux d'ingestion ni le type de proies avaient influencé l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis* et vu que les proies semblent tirer leur métal des algues (Munger, non-publié), nous pensons que des variations inter lacs dans la structure des communautés de producteurs primaires (e.g. espèces présentes, abondance, capacité inter spécifiques d'accumulation des métaux, efficacité d'assimilation) pourraient influencer l'accumulation de Cd chez les proies et conséquemment chez le prédateur. En d'autres termes, nous pensons que les quantités de métal dans les proies de *Chaoborus* et l'efficacité du transfert du métal au prédateur peuvent varier d'un lac à l'autre selon les différences entre les lacs dans la structure du premier niveau trophique.

Pour appuyer cette extrapolation de nos résultats, nous suggérons d'étudier la variabilité inter lacs des concentrations en Cd des espèces de proies consommées par *C. punctipennis* et essayer de relier les concentrations en Cd spécifiques aux taxa de proies à la concentration en Cd de l'eau des lacs (i.e. remplacer $[Cd]_{Chaoborus}$ par $[Cd]_{proies}$ dans le modèle Hare et Tessier 1996). Si les concentrations dans l'eau et celles dans les proies ne sont pas bien reliées, ceci pourrait suggérer que le modèle reposerait sur un lien plus directe entre l'eau et les producteurs primaires.

Puisque les producteurs primaires prennent leur métal de l'eau cela pourrait expliquer la forte relation entre les concentrations de Cd chez les larves de *Chaoborus* et celles dans l'eau (Hare et Tessier, 1996; Croteau et al. 1998; Hare et Tessier 1998). Selon ces observations, le 22% de variabilité résiduelle entre les lacs du modèle serait potentiellement due à des variations de structure du premier niveau trophique entre les lacs, ce qui influence les concentrations de Cd dans les crustacés, la source de Cd chez *C. punctipennis*.

Enfin, le taux de perte de Cd par la larve de *C. punctipennis* conduisant à un temps de demi-vie biologique estimé à 30 jours est considéré lent en comparaison avec d'autres invertébrés prédateurs d'eau douce. Par exemple, le temps de demi-vie biologique pour le Cd des mites d'eau (*Limnesia maculata*) serait de 9 à 17 jours respectivement (Timmermans 1992; comm. pers. Landis Hare), celui des insectes *Hexagenia rigida* et *H. limbata* de 8 jours pour les deux espèces (Hare et al. 1991; comm. pers. Landis Hare) et celui du coléoptère *Notiophilus biguttatus* de 2 jours (comm. pers. Landis Hare). Nous avons conscience que notre mesure du taux de perte ignore l'entrée de Cd via les proies provenant du lac pauvre en Cd. Bien que la concentration en Cd dissous du lac au Cèdre était très faible (Tableau 1, Chapitre 3), et que la concentration en Cd des proies serait en conséquence très faible, nous pensons qu'il serait quand même plus prudent de considérer que le taux de perte mesuré est un minimum.

5.2 Comparaison entre les études

Pour chacune des études impliquant la larve *C. punctipennis* réalisée, des données cinétiques d'accumulation ou perte de Cd ont été répertoriées et les traitements présentant les variations les plus extrêmes dans le temps ont été comparées (Tableau 5). On peut voir que les larves utilisées dans les trois expériences d'accumulation (trois premières du tableau) ont accumulé du poids et le Cd à des taux différents les unes par rapport aux autres. L'accumulation de poids la plus marquée a été observée chez les larves de l'expérience visant à vérifier l'influence du type et de la quantité de proies offertes sur l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis*. En effet, le gain de poids par jour a été plus de 5 fois et 23 fois supérieur chez ces larves que chez celles de l'expérience eau vs nourriture *in situ* et en laboratoire, respectivement. Il est cependant à noter que le poids initial des larves de l'expérience types et quantités de proies était plus de deux fois plus petit que le poids initial des organismes impliqués dans les autres expériences (Tableau 5). Leur faible poids, probablement due à leur développement récent en stade larvaire 4, conjugué à une période de jeûne de 48 heures avant le début de l'expérience pourraient potentiellement expliquer un métabolisme accéléré et conséquemment un gain rapide de poids. Bien que le gain de poids chez les larves de l'expérience types et quantités de proies soit accompagné d'un gain

important en Cd, le plus haut taux d'accumulation du Cd a été observé chez les larves de l'expérience eau vs nourriture en laboratoire. Le taux d'entrée du Cd chez ces larves exposées à un type de proies contaminées en laboratoire s'avère environ 6 fois plus élevé que ceux obtenus chez des larves exposées à des proies contaminées en nature dans un lac ayant le quart de la teneur en Cd de celle utilisée en laboratoire. Ce taux d'entrée élevé du Cd mesuré chez des larves exposées à des proies contaminées en laboratoire suggère que l'extrapolation au terrain de résultats sur les dynamiques d'échanges des métaux obtenus en laboratoire devrait être faite avec beaucoup de précautions.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer ces taux d'accumulation de poids et Cd élevés réside dans le fait que l'ingestion de proies aurait pu être favorisée en raison de l'augmentation de la promiscuité entre les prédateurs et les proies dans l'expérience types et quantités de proies. Bien que le nombre de proies offertes par prédateur ait été inférieur dans cette expérience en comparaison avec les autres expériences et dans le lac Crowley, le risque de contact entre les animaux a été grandement augmenté par le faible volume de l'unité expérimental (Tableau 6). Ces faibles densités de proies par prédateur et volumes ont été choisis dans l'expérience types et quantités de proies pour leur avantages pratiques.

Le taux d'accumulation le plus réaliste est probablement celui issu de l'expérience eau vs nourriture *in situ* en raison de la densité de proies comparable à celle du lac Crowley dans un volume d'eau très grand. Le volume d'eau et la hauteur des mésocosmes ont aussi permis un comportement de migration vertical normal induisant une période de nutrition journalière de 9 heures contrairement aux autres études où la nutrition était possible pendant 24 heures par jour.

Pour les deux expériences menées *in situ* avec les mêmes densités de proies offertes par prédateur par unité de volume, le gain de poids a été identique pour un taux de perte du Cd (expérience d'élimination du Cd) deux fois plus rapide que le taux d'entrée. Il faut cependant noter que le taux de perte dépend de la concentration de métal dans l'organisme (Spacies et Hamelink 1985) ce qui suggère que plus la concentration chez les organismes au début de la période d'élimination est grande, plus le taux d'élimination sera grand. Or les concentrations en Cd chez les organismes ayant servi à étudier l'élimination du Cd était 10 fois plus élevées que les concentrations en Cd chez les organismes ayant servi à étudier l'accumulation de Cd. Nous pensons que d'étudier le taux de perte du cadmium chez des larves ayant des concentrations Cd du même ordre de grandeur permettraient une meilleure comparaison.

Tableau 5. Variations maximales de poids et de Cd observée pour le traitement démontrant les tendances les plus fortes de chaque expérience réalisée impliquant *C. punctipennis*. (Eau vs nourriture en laboratoire les deux traitements combinés après 14 jours d'exposition; Eau vs nourriture *in situ*: traitement de 225 proies offertes par larve, après 12 jours d'exposition; Élimination *in situ*: traitement de 210 proies offertes par larve, après 32 jours d'exposition; Type et quantités de proies: larves exposées à 25 copépodes pendant 7 jours)

Expérience	Poids initial (mg larve ⁻¹)	Poids final (mg larve ⁻¹)	Accumulation poids (mg p.s. larve ⁻¹ jour ⁻¹)	Cd initial (ng larve ⁻¹)	Cd final (ng larve ⁻¹)	Accumulation Cd (ng Cd larve ⁻¹ jour ⁻¹)	EA (%)
Eau vs nourriture: laboratoire	0.21	0.23	0.001	0.17	3.86	0.264	4
Eau vs nourriture: <i>in situ</i>	0.17	0.25	0.004	0.22	0.56	0.027	17
Type et quantités de proies	0.07	0.25	0.023	0.23	0.67	0.056	11 - 100
Élimination de Cd: <i>in situ</i>	0.26	0.51	0.008	3.44	1.24	-0.059	-

Tableau 6. Densité de *C. punctipennis* et de proies offertes par volume d'eau par jour dans chaque expérience impliquant *C. punctipennis* et dans le lac Crowley en septembre 1995.

Expérience	<i>Chaoborus</i> (L ⁻¹)	proies (L ⁻¹ jour ⁻¹)	vol. total (L)	proies <i>Chaoborus</i> ⁻¹
Eau vs nourriture: laboratoire	35	525	0.85 ^a	15
Eau vs nourriture: <i>in situ</i>	0.8	20 - 530	255 ^a	25 - 675
Types et quantités de proies	80	400 - 2000	0.025 ^a	5 - 25
Élimination de Cd: <i>in situ</i>	0.8 - 1.2	27 - 243	255 ^a	35 - 210
<i>Lac Crowley</i>	0.2	51	1 ^b	255

a : volume total de l'unité expérimentale

b : volume de l'échantillon

L'efficacité d'assimilation du Cd a été calculé pour chaque expérience à partir de la formule de l'équation 11. Cette formule donne cependant une simple estimation de l'efficacité d'assimilation puisqu'elle ignore l'élimination du métal qui est de moins en moins négligeable à mesure que l'organisme gagne du Cd. Une sous-estimation de l'élimination du Cd conduit à une sous-estimation de l'efficacité d'assimilation. Aussi, chaque terme de l'équation comporte une erreur expérimentale (CV = 88%) qui suggère de considérer les pourcentages obtenus comme des estimations et d'étudier d'avantage les tendances générales (voir Discussion de l'annexe D) plutôt que les valeurs absolues.

On pourrait aussi normalement déduire l'efficacité d'assimilation à partir d'une courbe cinétique de perte de métal débutée immédiatement à la fin d'un repas riche en métal, la première vitesse (pente abrupte) représentant la perte rapide du métal non assimilé et la deuxième la perte lente (pente douce) du métal qui a été assimilé via la nourriture. Le quotient entre la quantité de métal assimilée (i.e. le point d'inflexion entre les deux pentes) et la quantité de métal ingérée (i.e. la quantité de métal dans l'organisme à la fin du repas) donne la valeur d'efficacité d'assimilation (Wang et al. 1996). Cependant, il faut ici supposer que la perte de métal assimilé est négligeable pendant la première partie de la courbe avec un risque de sous estimer l'efficacité d'assimilation si cette supposition est fausse. Dans un cas où les deux pentes ne sont pas dissociables, comme le nôtre, l'efficacité d'assimilation n'est encore une fois qu'une estimation.

Une technique intéressante pour mesurer l'efficacité d'assimilation sans devoir supposer la perte négligeable est celle du double marquage isotopique, l'un assimilé par le

prédateur (e.g. Cd) l'autre non (e.g. Am) (Callow et Fletcher 1972; Reinfelder et Fisher 1991). L'ingestion pendant une courte période de temps de proies doublement marquées (isotope assimilé incorporé dans les tissus de la proie; isotope non-assimilé adsorbé sur l'exosquelette de la proie) par le prédateur est suivi d'une période pendant laquelle on mesure le destin des isotopes chez le prédateur. Au moment où la quantité de l'isotope non-assimilé est recouverte dans les fèces et/ou l'urine du prédateur, la quantité de l'isotope assimilé est mesurée dans le prédateur (expérience de type «pulse and chase»). On obtient l'efficacité d'assimilation en divisant la quantité de l'isotope assimilé par le prédateur par sa quantité ingérée via les proies. Puisque *Chaoborus* n'avale pas l'exosquelette de ses proies (après les avoir ingérées puis décortiquée dans son pharynx, il rejette l'exosquelette par la bouche et avale le liquide et les tissus mous; Pastorok 1980) pour appliquer cette technique à *Chaoborus* le défi est de trouver un radioisotope qui serait assimilé dans les tissus internes de la proie mais non du prédateur. En résumé, nous avons conscience que les données d'efficacité d'assimilation obtenues dans nos travaux sont variables mais elles risquent d'être la meilleure approximation qui soit pour un certain temps compte tenu du déficit méthodologique à relever.

Dans l'expérience eau vs nourriture *in situ* les larves de *C. punctipennis* ont sélectionné positivement les cladocères à partir d'un mélange composé principalement de copépodes (voir Figure 3, Chapitre 3). Cette préférence des larves pour les cladocères n'a pas pu être confirmée dans l'expérience de types et quantités de proies où les cladocères et copépodes ont été offerts séparément aux larves (voir Chapitre 4) puisque toutes les proies offertes ont été consommées, au moins au début de l'expérience. Un modèle de prédiction de vulnérabilité des proies à la prédation par *Chaoborus* impliquant la vitesse de nage des proies, la grosseur des proies, et un terme d'efficacité de contact et capture des proies selon les espèces de proies et de *Chaoborus* a été appliqué dans le cadre de nos travaux à l'expérience eau vs nourriture *in situ* (Riessen et al. 1984; Riessen et al. 1988). Aidé par quelques données tirées de la littérature (Swift et Fedorenko 1975, Swift et Forward 1981), nous avons calculé une vulnérabilité comparables des cladocères *Diaphanosoma* sp. et des copépodes *Diaptomus minutus*.

Il faut cependant noter que les variables incluses dans le modèle ne semblent pas les seules à intervenir dans la préférence des larves de *Chaoborus* pour une proie ou l'autre. En effet, lorsqu'exposé à un mélange de proies, *Chaoborus* pourrait choisir le type de proies ayant la plus grande valeur (e.g. énergétique, Pastorok 1980; goût, forme, robustesse, Swuste et al. 1973) sous des conditions appropriées (e.g. densité, Fedorenko 1975, Riessen et al. 1988; satiété du prédateur, Pastorok 1980), rendant difficile la prédiction de l'espèce la

plus vulnérable. Par exemple des larves de *C. trivittatus* à jeun préfèrent *Diaptomus* à *Daphnia* lorsque la nourriture est abondante mais ne discriminent pas pour une espèce ou l'autre si la densité de nourriture est faible. Des larves à satiété préfèrent les copépodes indépendamment de la densité de proies.

L'ensemble de ces variables pourrait expliquer pourquoi, dans l'expérience *in situ* dans laquelle les larves de *C. punctipennis* ont été exposées à un mélange de proies, les larves ont semblé préférer les cladocères *Diaphanosoma* sp. et *Bosmina longirostris* aux copépodes *D. minutus*. Bien que 80% des proies offertes étaient des copépodes, les contenus stomacaux de *C. punctipennis* étaient composés de cladocères à plus de 80% (Chapitre 3). De façon générale, les *C. punctipennis* démontrent une forte préférence pour les cladocères (e.g. Moore et al. 1994, Chapitre 3 de ce document) alors que les copépodes sont les préférés des espèces *C. trivittatus* (Pastorok 1980, Swift et Fedorenko 1975) et *C. americanus* (Giguère 1986).

6.0 Conclusions

- i) L'étude sur l'importance relative des sources de Cd menée en laboratoire a démontré que la nourriture était responsable de l'entrée du Cd chez la larve d'insecte *Chaoborus punctipennis*. Dans cette étude la proie *C. dubia* était contaminée pendant 1 journée au Cd dans l'eau et la nourriture.
- ii) La longueur du temps d'exposition (1 jour ou plusieurs générations) au métal n'a eu aucun effet sur la distribution interne du Cd chez la proie *C. dubia* offerte au prédateur *C. punctipennis* dans la précédente étude de laboratoire. Pour les proies ayant subi les deux traitements, le Cd s'est accumulé chez le cladocère *C. dubia* dans les diverticules de l'intestin un site potentiellement responsable de la majorité des échanges de calcium et probablement le site d'action toxique du cadmium.
- iii) L'étude *in situ* sur l'importance relative des sources de Cd a confirmé que la nourriture était responsable de l'accumulation du Cd chez la larve de l'insecte *C. punctipennis*.
- iv) Le taux de perte de Cd par la larve *C. punctipennis* mesuré par une étude *in situ* a révélé un taux de perte lent avec un temps de demi-vie biologique du Cd d'environ 22 jours.
- v) Puisque la nourriture s'est avérée la voie d'entrée du Cd chez *C. punctipennis* en laboratoire et en nature, la forte relation existant entre les concentrations de Cd dans cet

insecte et celles dans l'eau doit être indirecte, i.e. que le Cd doit être pris de l'eau à un niveau trophique inférieur de la chaîne alimentaire menant au prédateur.

Conséquemment, la considération de la nourriture et des variables relatives à la nourriture pourraient être utilisées pour améliorer les modèles conçus pour relier les concentrations de métaux dans les organismes biomoniteurs à celles dans leur environnement. Les trois variables reconnues pour influencer l'accumulation des contaminants chez les organismes aquatiques sont le taux d'ingestion, l'efficacité d'assimilation et la quantité de métal dans la nourriture. Ces deux dernières pouvant varier avec le types de proies nous avons étudiés l'influence de deux types de proies communes au prédateur et deux taux d'ingestion sur l'accumulation du métal chez *C. punctipennis*.

vi) Nous n'avons vu aucun effet du type de proies offertes sur l'accumulation de Cd puisque

i) les deux types de proies avaient les mêmes teneurs en métaux et ii) ils transfèrent leur Cd au prédateur avec la même efficacité.

vii) Nous n'avons vu aucune influence du taux d'ingestion sur l'accumulation du Cd chez *C. punctipennis* en raison de la diminution de l'efficacité d'assimilation lorsque la quantité de nourriture augmente.

viii) Nous pensons que les taux d'ingestion qui peuvent varier en réponses aux fluctuations saisonnières dans l'abondance des proies à l'intérieur des lacs et entre les lacs sont contrebalancées par un effet inverse de l'efficacité d'assimilation. Cependant, si le taux d'ingestion est inférieur à 2.5 proies par jour par larve (taux d'ingestion minimum obtenu) et que l'efficacité d'assimilation est maximale, l'accumulation de Cd pourrait être fonction du taux d'ingestion.

ix) La relation indirecte entre les concentrations de Cd dans *C. punctipennis* et celles dans l'eau résulterait d'un lien directe plus bas dans la chaîne alimentaire entre le métal dans l'eau et dans les algues. Les variations inter lacs de l'abondance et des types de communautés algales composant la base de la chaîne alimentaire pourraient influencer l'accumulation de Cd chez le prédateur *Chaoborus* et expliquer vraisemblablement la variation du modèle entre les deux paramètres.

x) Si la proie de *C. punctipennis* prend son métal de la nourriture tel que suggéré par des travaux préliminaires, une partie de la variabilité du modèle (22%) entre les concentrations de Cd dans les organismes et dans l'eau pourrait s'expliquer par des différences dans la

structure de la base de la chaîne alimentaire (e.g. algues) entre les lacs. Les concentrations de Cd dans *Chaoborus* mal prédites par le modèle pourraient potentiellement s'expliquer par les trois variables relatives à la nourriture, i.e. le taux d'ingestion, l'efficacité d'assimilation et la quantité de métal dans la nourriture, entre les algues et les brouteurs, proies majoritaires de *C. punctipennis*.

7.0 Suggestions de recherches

Il est proposé d'étudier:

- i) la variabilité inter lacs de concentrations de Cd des espèces de proies consommées par *C. punctipennis*. Si les concentrations des espèces de proies peuvent être prédites par le terme eau du modèle Hare et Tessier (1996), on peut penser que le lien serait plus directe entre le terme eau du modèle et les algues, nourriture principale pour les proies de *C. punctipennis*.
- ii) d'étudier en laboratoire et *in situ* l'importance de la nourriture (e.g. algues) pour l'entrée des métaux chez les crustacés, proies de *C. punctipennis*. Pour l'expérience *in situ* le design expérimental développé dans nos travaux impliquant les mésocosmes serait approprié si on choisi un maillage inférieur au diamètre de la plupart des algues consommées par les brouteurs.
- iii) l'étude des variables relatives à la nourriture qui influencent l'entrée des métaux chez les proies serait suggérée, i.e. le taux d'ingestion, l'efficacité d'assimilation et la quantité de Cd dans les producteurs primaires, si le phytoplancton s'avère la source de Cd prédominante pour le zooplancton, tel que supposé sur la base de travaux préliminaires en laboratoire.
- iv) la variabilité inter lacs dans la structure de la communauté algale et ainsi tenter d'expliquer la variabilité résiduelle du modèle Hare et Tessier (1996) de même que le cas de lacs qui dévient de la relation du modèle (e.g. lac Turcotte, Croteau et al. 1998).

8.0 Références

- Borkent, A. (1981). *The distribution and habitat preferences of the Chaoboridae (Culicomorpha, Diptera) of the Holarctic region*. Can. J. Zool. 59: 122-133.
- Bothwell, M.L., D.M.J. Sherbot, C.M. Pollock. (1994). *Ecosystem response to solar ultraviolet-B radiation: Influence of trophic-level interactions*. Science. 265: 97-100.

- Calow, P. et C.R. Fletcher. (1972). *A new radiotracer technique involving ^{14}C and ^{51}Cr , for estimating the assimilation efficiencies of aquatic, primary consumers*. *Oecologia* 9: 155-170.
- Campbell, P.G.C. (1995). *Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model*. In Trace metal speciation and bioavailability in aquatic systems. Edited by A. Tessier et D. Turner. John Wiley, Chichester. pp. 45-102.
- Carney, G.C., P. Shore et H. Chandra. (1986). *The uptake of cadmium from a dietary and soluble source by the crustacean *Daphnia magna**. *Environmental Research* 30: 290-298.
- Craig A., L. Hare et A. Tessier. (1998). *Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri**. *Aquat. Toxicol.*, in press.
- 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.
- Dallinger, R., F. Prosi, H. Segner et H. Back. (1987). *Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research*. *Oecologia* 73: 91-98.
- Dawidowicz, P., J. Pijanowska et K. Ciechomski. (1990). *Vertical migration of *Chaoborus* larvae is induced by the presence of fish*. *Limnol. Oceanogr.* 35: 1631-1637.
- Fedorenko, A.Y. (1975). *Feeding characteristics and predation impact of *Chaoborus* (Diptera, Chaoboridae) larvae in a small lake*. *Limnol. Oceanogr.* 20: 250-258.
- Franzin, W.G., G.A. McFarlane et A. Lutz. (1979). *Atmospheric fallout in the vicinity of a base metal smelter at Flin Flon, Manitoba, Canada*. *Environ. Sci. Technol.* 13: 1513-1522.
- Gerhardt, A. (1993). *Review of impact of heavy metals on stream invertebrates with special emphasis on acid conditions*. *Water Air Soil Pollut.* 66: 289-314.

- Giesy, J.P., J.W. Bowling et H.J. Kania. (1980). *Cadmium and zinc accumulation and elimination by freshwater crayfish*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 9: 683-697.
- Giguère, L.A. (1986). *The estimation of crop evacuation rates in Chaoborus larvae (Diptera: Chaoboridae) using natural prey*. Freshwat. Biol. 16: 557-560.
- Griffith, P.R.E. (1980). *Morphological and ultrastructural effects of sublethal cadmium poisoning on Daphnia*. Environmental Research 22: 277-284.
- Gunn, J.M., N. Conroy, W.E. Lautenbach, D.A.B. Pearson, M.J. Puro, J.D. Shorthouse et M.E. Wiseman. (1995). *From restoration to sustainable ecosystems*. In Restoration and recovery of an industrial region. Edited by J.M. Gunn. Springer-Verlag, New York, Inc. pp. 335-344.
- Hare, L. (1992). *Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity*. Critical Reviews in Toxicology 22: 327-369.
- Hare, L. et C.H. Carter. (1987). *Zooplankton populations and the diets of three Chaoborus species (Diptera, Chaoboridae) in a tropical lake*. Freshwat. Biol. 17: 275-290.
- Hare, L., E. Saouter, P.G.C. Campbell, A. Tessier, F. Ribeyre, et A. Boudou (1991). *Dynamics of cadmium, lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly Hexagenia rigida (Ephemeroptera) and the environment*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48: 39-47.
- 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.
- Hatakeyama, S. et M. Yasuno. (1981). *The effects of cadmium-accumulated Chlorella on the reproduction of Moina macrocopa (Cladocera)*. Ecotoxicology and Environmental Safety 5: 341-350.
- Jannasch, H.W., B.D. Honeyman, L.S. Balistrieri et J.W. Murray (1988). *Kinetics of trace metal uptake by marine particles*. Geochim. Cosmochim. Acta, 52: 567-577.

- Kay, S.H. (1985). *Cadmium in aquatic food webs*. Residue Reviews 96: 13-43.
- Leland, H.V. et J.S. Kuwabara. (1985). *Trace metals*. In Fundamentals of aquatic toxicology. Edited by G.M. Rand et S.R. Petrocelli. Hemisphere Publishing Corporation, New York. pp. 374-414.
- Luoma, S.N. (1983). *Bioavailability of trace metals to aquatic organisms: a review*. Sci. Total Environ. 28: 1-22.
- Luoma, S.N., C. Johns, N.S. Fisher, N.A. Steinberg, R.S. Oremland et J.R. Reinfelder. (1992). *Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways*. Environ. Sci. Technol. 26: 485-491.
- Luoma, S.N. (1995). *Prediction of metal toxicity in nature from bioassays: Limitations and research need*. In Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. Edited by A. Tessier et D.R. Turner. John Wiley, N Y. pp. 609-659.
- Moore, M.V. (1988). *Differential use of food resources by the instars of Chaoborus punctipennis*. Freshwat. Biol. 19: 249-268.
- Moore, M.V., N.D. Yan et T. Pawson. (1994). *Omnivory of the larval phantom midge (Chaoborus spp.) and its potential significance for freshwater planktonic food webs*. Can. J. Zool. 72: 2055-2065.
- Morel, F.M.M. et J.G. Hering. (1993). *Principles and applications of aquatic chemistry*. John Wiley & Sons, Chichester.
- 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.
- Pacyna, J.M., M.T. Scholtz et Y.-F. Li. (1995). *Global budget of trace metal sources*. Environ. Rev. 3: 145-159.
- Pastorok, R.A. (1980). *Selection of prey by Chaoborus larvae: A review and new evidence for behavioral flexibility*. In Evolution and ecology of zooplankton communities. Special symposium (volume 3). American Society of limnology and oceanography. Edited by W.C. Kerfoot. University Press of New England, Hanover. pp. 538-554.

- Reinfelder, J.R. et N.S. Fisher. (1991). *The assimilation of elements ingested by marine copepods*. Science 251: 794-796.
- Reinfelder, J.R. et N.S. Fisher. (1994). *Retention of elements absorbed by juvenile fish (Menidia menidia, Menidia beryllina) from zooplankton prey*. Limnol. Oceanogr. 39: 1783-1789.
- Reinfelder, J.R. (1994). *Assimilation efficiencies and turnover rates of trace elements ingested by adult oysters (Crassostrea virginica) and hard clams (Mercenaria mercenaria)*. In Ph.D. these. pp. 92-162.
- Riessen, H.P., W.J. O'Brien et B. Loveless. (1984). *An analysis of the components of Chaoborus predation on zooplankton and the calculation of relative prey vulnerabilities*. Ecology 65: 514-522.
- Riessen, H.P., J.W. Sommerville, C. Chiappari et D. Gustafson. (1988). *Chaoborus predation, prey vulnerability, and their effect in zooplankton communities*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 1912-1920.
- Schultz, T.W. et J.R. Kennedy. (1976). *The fine structure of the digestive system of Daphnia pulex (Crustacea: Cladocera)*. Tissue & Cell 8: 479-490.
- Seidman, L.A., G.B. Bergtrom, D.J. Gingrich et C.C. Remsen. (1986). *Accumulation of cadmium by the fourth instar larva of the fly Chironomus thummi*. Tissue & Cell, 18: 395-405.
- Simkiss, K. et M.G. Taylor (1995). *Transport of metals across membranes*. In Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. Edited by A. Tessier et D.R. Turner. John Wiley, N.Y., pp. 1-44.
- Spacies, A. et Hamelink, J.L. (1985). *Bioaccumulation*. In Fundamentals of aquatic toxicology. Edited by G.M. Rand et S.R. Petrocelli. Hemisphere Publishing Corporation, New York. pp. 495-525.
- Stephenson, M. and Turner, M.A. (1993). *A field study of cadmium dynamics in periphyton and in Hyalella azteca (Crustacea: Amphipoda)*. Water Air Soil Pollut. 68: 341-361.

- Swift, M.C. et A.Y. Fedorenko. (1975). *Some aspects of prey capture by Chaoborus larvae*. Limnol. Oceanogr. 20: 418-425.
- Swift, M.C. et R.B.Jr. Forward. (1981). *Chaoborus prey capture efficiency in the light and dark*. Limnol. Oceanogr. 26: 461-466.
- Swuste, H.F.J., R. Cremer et S. Parma. (1973). *Selective predation by larvae of Chaoborus flavicans (Diptera, Chaoboridae)*. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh. 18: 1559-1563.
- Taylor, D. (1983). *The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms*. Ecotoxicology and Environmental Safety 7: 33-42.
- Tessier, A., Y. Couillard, P.G.C. Campbell et J.C. Auclair. (1993). *Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve Anodonta grandis*. Limnol. Oceanogr. 38: 1-17.
- Tessier, A. J. Buffle et P.G.C. Campbell. (1994). *Uptake of trace metals by aquatic organisms*. In Chemical and biological regulation of aquatic systems. Edited by J. Buffle et R. DeVitre. Lewis Publishers, Boca Raton. pp. 197-226.
- Thomann, R.V. (1981). *Equilibrium model of fate of microcontaminants in diverse aquatic food chains*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38: 280-296.
- Timmermans, K.R., E. Spijkerman, M. Tonkes et H. Govers. (1992). *Cadmium and zinc uptake by two species of aquatic invertebrate predators from dietary and aqueous sources*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 655-662.
- van Hattum, B., P. de Voogt, L. van den Bosch, N.M. Van Straalen et E.N.G. Joosse. (1989). *Bioaccumulation of cadmium by the freshwater isopod Asellus aquaticus (L.) from aqueous and dietary sources*. Environ. Pollut. 62: 129-151.
- Verta, M., S. Rekolainen, J. Mannio et K. Surma-Aho. (1986). *The origin of level of mercury in Finnish forest lakes*. Public. Water Res. Inst., Natl. Board Waters, Finland, 65: 21-31.

- Wang, W.-X. et N.S. Fisher. (1996). *Assimilation of trace elements and carbon by the mussel *Mytilus edulis*: Effects of food composition*. Limnol. Oceanogr. 41: 197-207.
- Weeks, J.M. et P.S. Rainbow. (1993). *The relative importance of food and seawater as sources of copper and zinc to talitrid amphipods (Crustacea; Amphipoda; Talitridae)*. Journal of Applied Ecology 30: 722-735.
- Wilhm, J.L. (1970). *Transfer of radioisotopes between detritus and benthic macroinvertebrates in laboratory microecosystems*. Health Physics Pergamon Press 18: 277-284.
- Yan, N.D., G.L. Mackie et P.J. Dillon. (1990a). *Cadmium concentrations of crustacean zooplankton of acidified and nonacidified canadian shield lakes*. Environ. Sci. Technol. 24: 1367-1372.
- Yan, N.D., G.L. Mackie et P. Grauds. (1990b). *Control of cadmium levels in *Holopedium gibberum* (Crustacea, Cladocera) in canadian shield lakes*. Environ. Toxicol. Chem. 9: 895-908.
- Yan, N.D., W. Keller, H.J. MacIsaac et L.J. McEachern. (1991). *Regulation of zooplankton community structure of an acidified lake by *Chaoborus**. Ecol. Appl. 1: 52-65.

L'INRS ne détient pas les droits pour diffuser cette version de l'article. Vous pouvez le consulter à l'adresse suivante :

Munger, C. et Hare, L. (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(3): 891-895.

<http://dx.doi.org/10.1021/es9606440>

Chapitre 3

Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in nature

Submitted to Limnology and Oceanography, January 1999.

Catherine Munger, Landis Hare and André Tessier

Université du Québec, INRS-Eau
C.P. 7500, Ste-Foy
Québec, Canada G1V 4C7

Résumé

Bien que les insectes aquatiques soient reconnus pour accumuler les métaux traces en laboratoire à partir de l'eau et de la nourriture, l'importance relative des sources de métaux pour ces animaux n'a jamais été mesurée dans la nature, tout comme le taux auquel ils éliminent le métal dans la nature. Ici, nous décrivons une approche expérimentale *in situ* innovatrice qui nous a permis de déterminer que les proies constituent la source majeure de cadmium pour la larve d'un animal commun dans les lacs, la mouche fantôme *Chaoborus punctipennis*. Nous avons transféré les larves de *C. punctipennis* d'un lac pauvre à un lac riche en cadmium où elles ont été placées dans des mésocosmes fabriqués en filet maillant de 64 μm et exposées aux concentrations de Cd élevées prévalant dans l'eau du lac et à des quantités variées de proies riches en Cd provenant du lac contaminé. Notre design expérimental assure une exposition à des concentrations de Cd réalistes dans l'eau et dans le mélange naturel de types de proies offertes. Nos résultats indiquent que les larves prennent leur Cd principalement de leurs proies. Ainsi, les modèles de dynamique et d'effets des métaux chez les invertébrés seraient vraisemblablement plus réalistes s'ils incluaient la nourriture comme voie d'entrée. Nos résultats soulignent également le caractère potentiellement irréaliste de plusieurs études en laboratoire de même que des tests de toxicité dans lesquels les animaux sont exposés au métal dans l'eau seulement. En utilisant notre design impliquant les mésocosmes en filet, nous avons pu déterminer que des larves de *C. punctipennis* transférées d'un lac riche en Cd vers un lac pauvre en Cd perdent le Cd lentement, menant à un temps de demie-vie biologique estimé à 30 jours. En combinant nos informations sur la prise en charge et la perte du Cd par *C. punctipennis*, nous pouvons mieux comprendre les échanges de Cd entre cet insecte et son environnement.

Abstract

Although freshwater insects are known to accumulate trace metals in the laboratory from both water and food, the relative importance of metal sources for these animals, as well as the rate at which they take up and eliminate their metal have not been measured in nature. We describe a novel *in situ* approach that allowed us to determine that prey are the main source of cadmium for larvae of a common lake-dwelling animal, the phantom midge *Chaoborus punctipennis*. We transferred *C. punctipennis* larvae from a low-cadmium to a high-cadmium lake where they were exposed in 64- μm mesh mesocosms to the prevailing high Cd concentrations in water and to various quantities of prey collected from the Cd-rich lake. Our experimental design ensured exposure of *C. punctipennis* larvae to realistic Cd concentrations in water and in a natural mixture of prey types. Our results indicate that larvae take up their Cd mainly from prey. Thus models of metal dynamics and effects on these invertebrates are likely to be more realistic if they include food as a metal source. Using the same mesh mesocosm design we also determined that *C. punctipennis* larvae transferred from a high-Cd to a low-Cd lake lost their Cd slowly. Combining our information on Cd uptake and loss from *C. punctipennis* allowed us to model Cd exchange between this insect and its surroundings.

Introduction

Aquatic systems directly influenced by mining, metal-smelting and other industrial activities have been contaminated in their thousands by potentially toxic trace metals such as cadmium, copper and lead (Pacyna et al. 1995). Trace metals are also transported long distances in the atmosphere (Nriagu and Pacyna 1988), thereby reaching aquatic ecosystems distant from local sources (Franzin et al. 1979, Verta et al. 1986). The wide dispersion and potential toxicity of metals require that their impact on aquatic organisms be evaluated.

The biological effects of metals on aquatic animals are most often assessed by exposing individuals in the laboratory to aqueous metal in the absence of metal-contaminated food. Exposures of this type assume by design that metal uptake from food is negligible (Luoma 1995). Rigorous demonstrations to support this assumption are few, due in large part to the technical difficulties involved in unambiguously separating food and water as metal sources to animals (Kay 1985; Fisher and Reinfelder 1995). One exception is a recent laboratory experiment in which water and food (a planktonic crustacean) were successfully separated as cadmium (Cd) sources for the predatory insect *Chaoborus punctipennis* (Munger and Hare 1997). In this experiment, the predator was shown to accumulate Cd solely from its prey bringing into question the realism of experiments in which such animals are exposed to this metal in water only. However, the conclusions of laboratory experiments cannot be readily extrapolated to reliably model the transfer of metals along food webs in ecosystems. The handling of animals can produce experimental artefacts, and conditions in the field (metal bioavailability, food webs) are more complex than those in the laboratory (Taylor 1983; Kay 1985; Bothwell et al. 1994).

In nature, Cd concentrations in *Chaoborus* larvae have been related to those in water (Hare and Tessier 1996; 1998; Croteau et al. 1998). However, such a relationship cannot be used to affirm that this insect takes up its metal directly from water since a correlation could also occur if metal concentrations in food are correlated with those in water. Here we use a novel experimental approach to determine whether the Cd taken up by larvae of *Chaoborus punctipennis* in nature comes from their food or from water. Our approach also allowed us to estimate Cd influx and efflux rates from this predator, so as to model Cd exchange between the predator and its environment. Reliable measurements of metal sources to animals in nature would improve our ability both to model metal movements along food webs and to relate metal concentrations in animals to those in their environment (a prerequisite to using animals as metal biomonitors).

Methods

Experimental design

We transferred larvae between low- and high-Cd lakes where they were held in mesh mesocosms (64- μ m-mesh aperture) that allowed the free passage of lake water but restricted the movement of planktonic crustaceans that are the major food source for late instars of this insect (Moore 1988). Larvae in mesocosms were offered various quantities of crustacean prey and their uptake or loss of Cd was measured. We chose lakes for our study (Table 1) based on 1) the presence of native populations of *C. punctipennis*, 2) their similar pH, and 3) the higher concentrations of Cd in lake water and indigenous *C. punctipennis* larvae from one of the lakes (Crowley Lake), likely a result of its location within 10 km of the mining and metal-refining complex at Sudbury, Ontario (Gunn et al. 1995a, b).

Table 1. Cadmium content of fourth instar *Chaoborus punctipennis* (mean \pm SD), and selected chemical parameters in water of the high-Cd lake (Crowley Lake; 46°23' N, 80°59' W) and the low-Cd lakes (Lake St. Joseph (46°55' N, 71°40' W) and Lake au Cèdre (46°54' N, 71°43' W)).

	high-Cd lake (Crowley)	low-Cd lake (St. Joseph)	low-Cd lake (au Cèdre)
Cd content of <i>C. punctipennis</i> (ng larva ⁻¹ , \pm SD)	2.9 \pm 0.3	0.2 \pm 0.1	0.02 \pm 0.01
total dissolved Cd (nM)	1.0	0.15	<0.1
pH	6.4	6.4	6.7

Mesocosms (Fig. 1) were filled by the passive entry of lake water through the Nitex netting making up their sides. Each mesocosm was anchored individually in the littoral zone (3 m depth) and buoyed at the surface to preclude the entry of water and prey by wave action. Final instar larvae of *C. punctipennis* were collected with a plankton net (64- μ m-mesh aperture) during the night-time and transported to the laboratory where they were isolated, placed in bottles with lake water at 4°C, shipped by air to the study site, and placed in waiting mesocosms within 24 h of collection. Several centimeters of sediment collected with a grab in the lake containing the mesocosms had been placed on the bottom of each mesocosm as a daytime refuge for these vertically migrating larvae (we estimate that 3 indigenous *C. punctipennis* were introduced inadvertently into each mesocosm with the added lake sediment, based on the enumeration of animals in 4 grab samples).

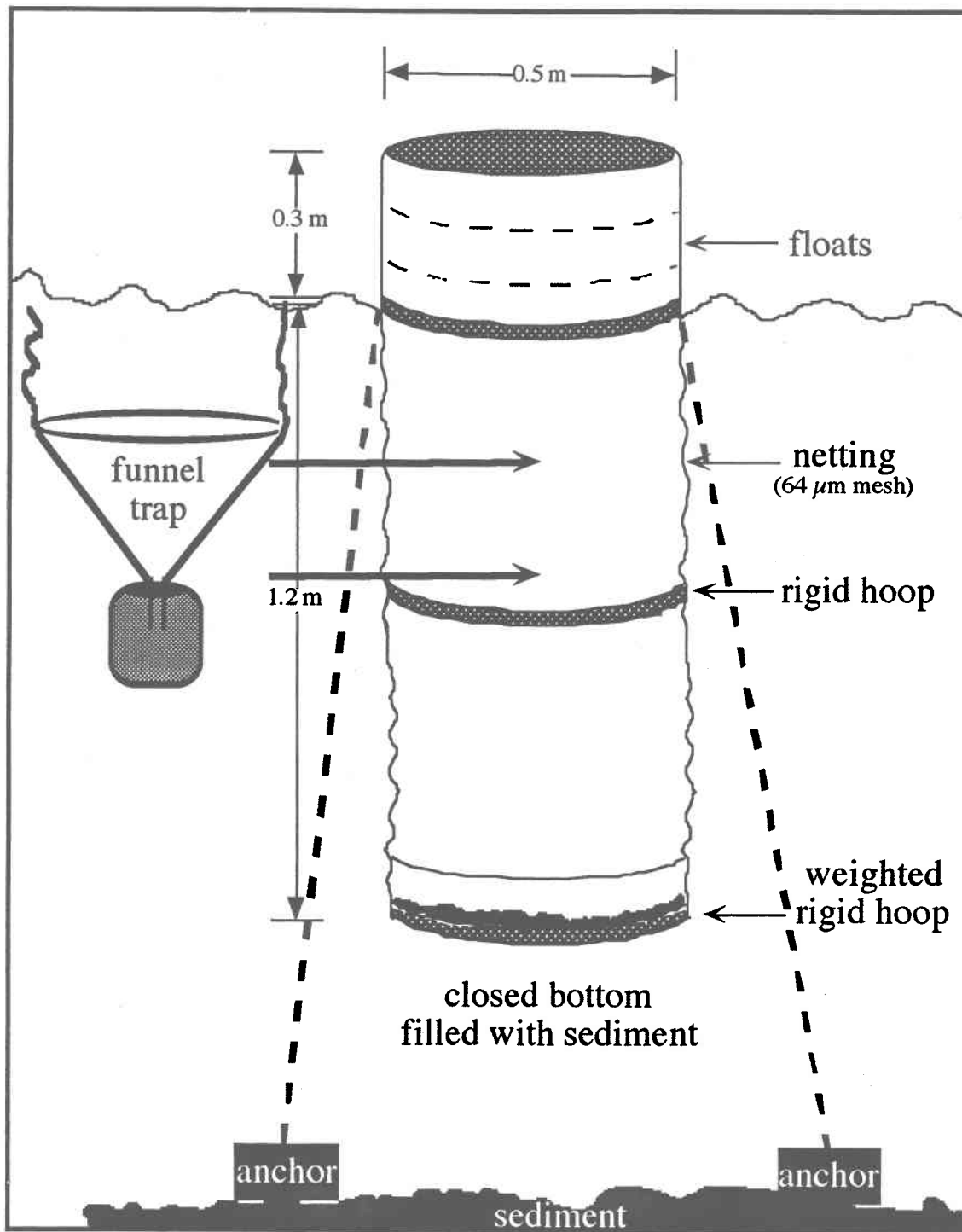


Figure 1. Drawing of a mesocosm and the funnel trap used in our in situ experiments.

Zooplankton offered as prey was collected by horizontal tows of a 64- μm -mesh plankton net at a depth of 3 m in the lake containing the mesocosms. In a nearby laboratory, potential prey were sieved through 500- μm -mesh netting to eliminate those larger than the mouth diameter of *C. punctipennis* (450 μm). A subsample of remaining prey was separated

with a plankton splitter, narcotised with a drop of chloroform, and counted under a microscope at a magnification of 25X. On the basis of such estimates of prey density, we prepared lots of various prey densities for addition to the mesocosms. We measured prey quantities daily in each mesocosm by counting zooplankton in a 2.5-liter water sample collected with a 75-cm long Plexiglas tube (3.25 cm diameter). Densities of prey in the mesocosms were adjusted if necessary by adding freshly collected prey from the lake.

We exploited the migratory behavior of *C. punctipennis* to collect larvae from the mesocosms with a minimum of disturbance. Larvae were captured at night during their downward migration by placing a funnel trap (Fig. 1) in each mesocosm during the day when larvae were in the sediment. The larvae collected from each mesocosm were allowed to defecate their gut contents for 24 h in a 500-mL high-density polyethylene container filled with 64- μ m filtered lake water. Cadmium losses from *C. punctipennis* larvae are negligible for depuration periods of up to several days in the laboratory (L. Hare, unpublished data) and are consistent with the low elimination rate of Cd observed in the efflux experiment of this study at low prey predator⁻¹ ratio. Depurated larvae were dried in a lyophilizer, weighed on a micro-balance, digested in concentrated Aristar nitric acid in an autoclave, and analysed for Cd by graphite furnace AAS (method as in Hare et al. 1989). Repeated measurements of Cd in small samples of a certified reference material (lobster hepatopancreas) were within the range of acceptable analytical variation (coefficient of variation \approx 5%, n = 10).

Cadmium influx experiment

Larvae of *C. punctipennis* were collected in early September in the low-Cd Lake St. Joseph and transferred to the high-Cd Crowley Lake where 200 individuals were placed in each of 15 mesocosms. All individuals were exposed in the mesocosms to the prevailing high aqueous Cd concentrations and to a range of densities of Cd-rich crustacean zooplankton collected from Crowley Lake. Prey to predator ratios in mesocosms (3 replicates at 0, 25, 75, 225 or 675 prey predator⁻¹) were chosen to bracket the ratio measured in Crowley Lake at the time of the experiment (225 prey predator⁻¹, as estimated by night-time vertical hauls of a 64- μ m-mesh net). Considering the results of previous laboratory studies (Munger and Hare 1997), we hypothesised that the Cd content of animals exposed to the prevailing high Cd concentrations in lake water only would not increase, whereas the addition of indigenous prey from the Cd-rich lake would lead to increases in predator Cd content. The mean coefficient of variation of counts of plankton samples collected from the mesocosms was 16%, as estimated from triplicate samples on days 4, 8, 12 and 16 of the experiment. Fifteen *C. punctipennis* taken from net hauls in each mesocosm and from Crowley Lake on night 13 were dissected and their gut contents examined (method as in

Swift and Fedorenko 1973). Fifteen larvae were collected from each mesocosm (3 pooled samples of 5 larvae) at 4-d intervals during our 16-d experiment for the measurement of larval mass and Cd content.

Cadmium efflux experiment

We collected fourth instar *C. punctipennis* larvae from Cd-rich Crowley Lake in early June and transferred them to low-Cd Lake au Cèdre. Larvae were placed in mesocosms and fed low-Cd prey from Lake au Cèdre at one of two densities to determine if feeding rate influenced Cd efflux. The low prey : predator treatment level (35 prey predator⁻¹) was obtained by adding 6,900 ± 3,500 prey (SD, n=16) and 200 *C. punctipennis* in 3 replicate mesocosms while the high prey : predator treatment level (210 prey predator⁻¹) was obtained by the addition of 62,000 ± 32,700 prey (SD, n=28) and 300 *C. punctipennis* in 6 replicate mesocosms. The prevailing prey : predator ratio in Lake au Cèdre at the time of the experiment was between our two treatment levels (115 ± 7; SD, n=3). One sample of five *C. punctipennis* larvae per mesocosm was collected using funnel traps at intervals of 1 to 4 days over the 32-d duration of the experiment for measurement of larval weight and Cd content.

Results

Reliability of experimental approach

Chaoborus punctipennis larvae were observed in the water column of the mesocosms at night but not during the day (presumably taking refuge in the sediment), indicating that their normal migratory behavior was not altered by handling or confinement in mesocosms. Furthermore, larval feeding behavior did not appear to be suppressed as some individuals from all treatment levels were found with prey in their gut. There was no visible development of periphyton on the mesocosm netting during our experiment: an absence of fouling is also supported by the similar chlorophyll *a* concentrations in lake and mesocosm water when measured at 4-d intervals by fluorometry (Welschmeyer 1993) during our experiment (overlap of 95% CI at all times). These observations suggest that water and phytoplankton moved freely across the mesocosm walls during our experiments.

Cd influx experiment

Measurements of prey densities in mesocosms confirmed that they were close to targeted values and that they differed significantly among treatment levels (Fig. 2). The proportions of copepods (mainly the calanoid *Diaptomus minutus*) and rotifers (mainly *Keratella cochlearis*) in mesocosms were not significantly different from those in Crowley Lake (Fig. 3A), except for the lowest prey : predator ratio (25 prey predator⁻¹). In

mesocosms there was a tendency towards lower proportions of copepods at low prey densities (Fig. 3A), suggesting that at these densities the predator was able to reduce copepod numbers more effectively than at high prey densities. The proportions of cladocerans (mainly *Diaphanosoma birgei* and *Bosmina longirostris*) in mesocosms at all treatment levels were significantly lower than the proportion measured in the surrounding lake (Fig. 3A). The higher predator densities in mesocosms than in the lake may have led to greater predation pressure on cladocerans in mesocosms. Cladocerans appear to have been more vulnerable to predation by *C. punctipennis* larvae than were the other prey types; indeed, whereas cladocerans represented from 25 to 90% of the animals identified in predator crop contents (Fig. 3B) they accounted for <20% of the prey community (Fig. 3A).

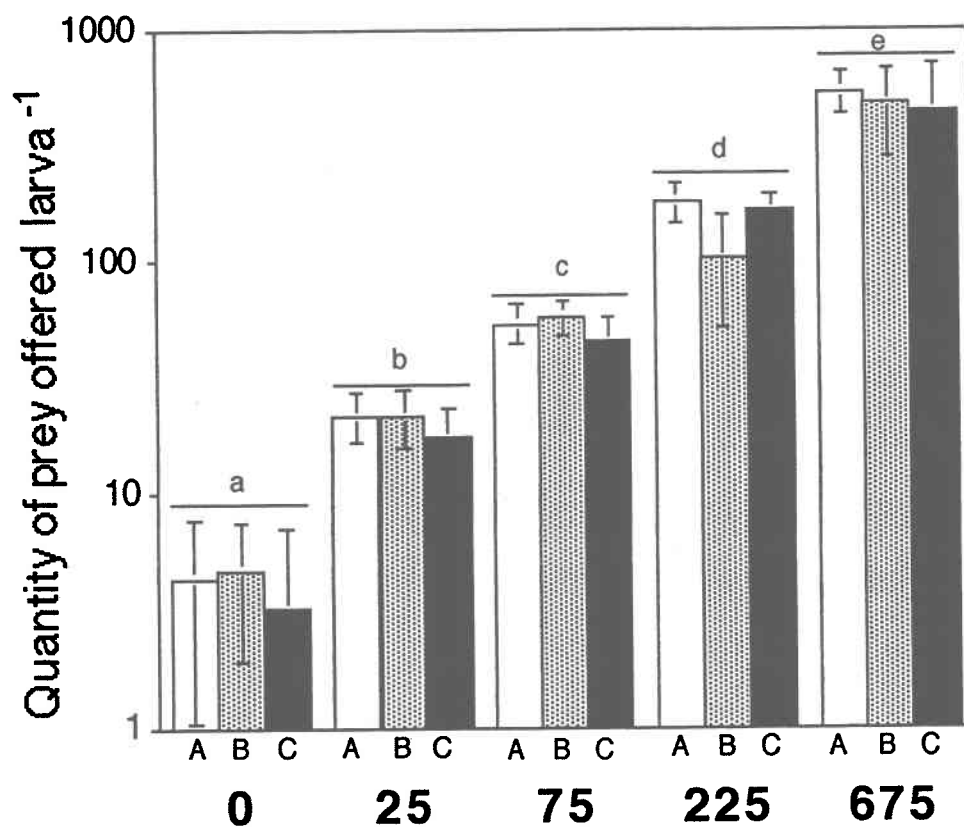


Figure 2. Quantities of crustacean prey offered to *C. punctipennis* larvae during the Cd-influx experiment. Mean values (\pm 95% CI) are shown for replicate mesocosms (A, B, C) of the 5 nominal prey : predator ratios (0, 25, 75, 225 and 675 prey predator-1). The value for a given mesocosm is the mean of 14 to 27 measurements during our 16 d experiment. Different letters (a-e) indicate significant differences among treatment level means ($P < 0.05$ Kruskal-Wallis test and Dunn's method).

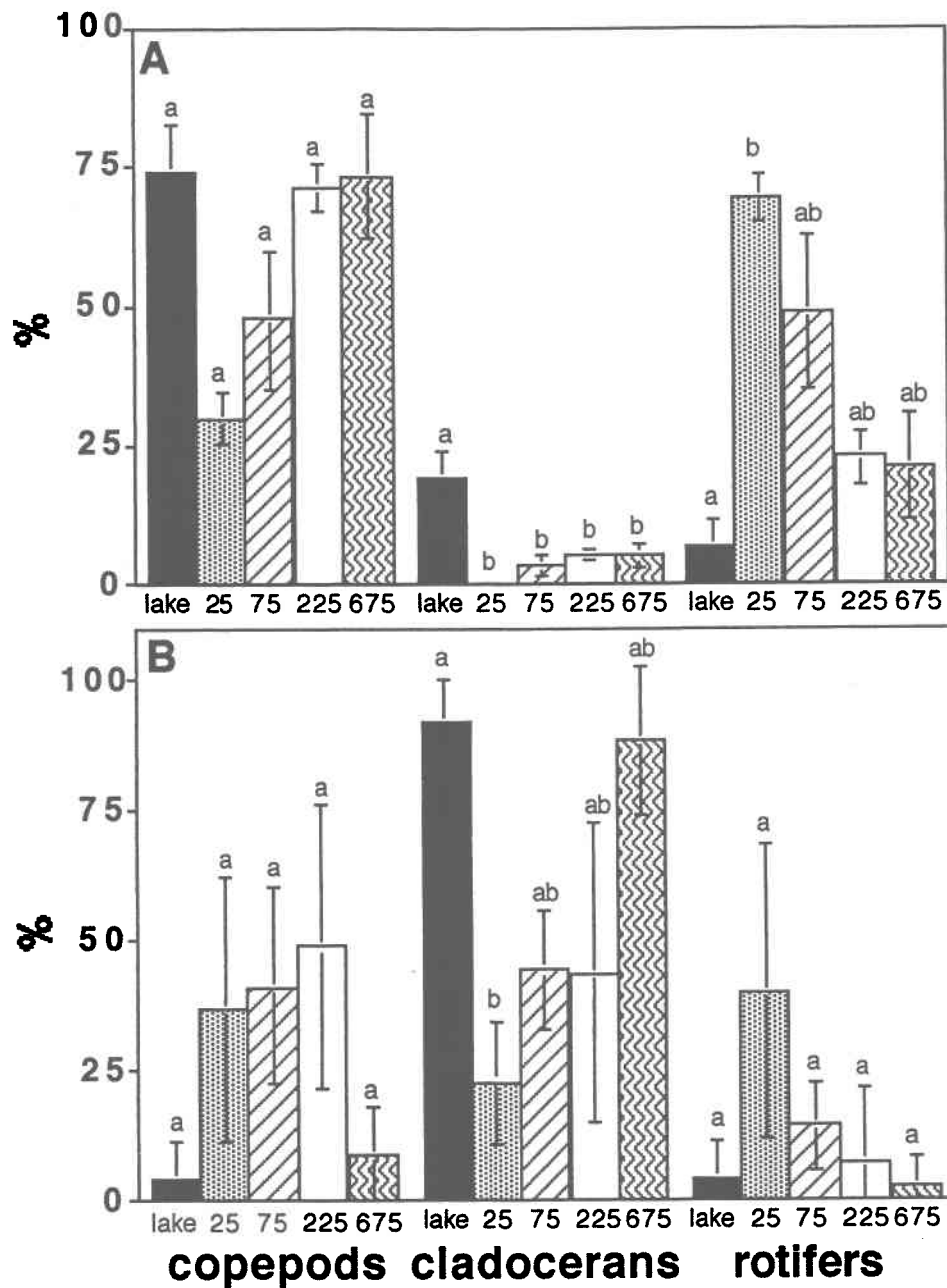


Figure 3. Percentage of total numbers of zooplankton represented by copepods, cladocerans and rotifers during the Cd-influx experiment (A) in the lake (means of days 0, 10 and 13) and in mesocosms (on day 16) at prey : predator ratios of 25, 75, 225 and 675, and (B) in the crops of *C. punctipennis* larvae collected on night 13 (lake and mesocosms). Different letters (a and b) indicate a significant difference ($P < 0.05$ based on Kruskal-Wallis and SNK method). All values are means \pm 95% CI; in (A) $n = 3$ measurements mesocosm⁻¹ and in (B) $n = 7$ to 16 *C. punctipennis* larvae. The zero prey treatment level is not included due to the very small prey densities.

The mean weight of larvae varied significantly among treatment levels and larval weight increased with increasing numbers of prey offered (Fig. 4A). We expressed larval Cd in terms of mass of Cd taken up per individual rather than Cd concentration so that the changes measured in larval weight would not confound interpretation of larval Cd uptake. Larvae exposed to Cd simultaneously in prey and water showed a significant increase ($P < 0.05$; ANCOVA) in their Cd content over time, whereas the Cd content of larvae exposed to Cd in water only (0 prey added) remained constant (Fig. 4B). Because small numbers of crustacean prey (< 5 per predator) were found in the mesocosms to which no prey had been added (they probably passed through the netting as early life stages), as well as in the guts of larvae from this treatment level, the Cd values for the nominal 0 prey treatment level have been corrected for the contribution of food. We multiplied the slope of the relation between the Cd content of larvae and the number of prey offered by the number of prey found in the 0 prey treatment level to obtain values used to correct for the contribution of food. Given the small numbers of prey involved, the Cd contents of larvae in the 0 prey nominal treatment level were reduced by <15% (a mean of $0.02 \text{ ng larva}^{-1}$) on application of this correction.

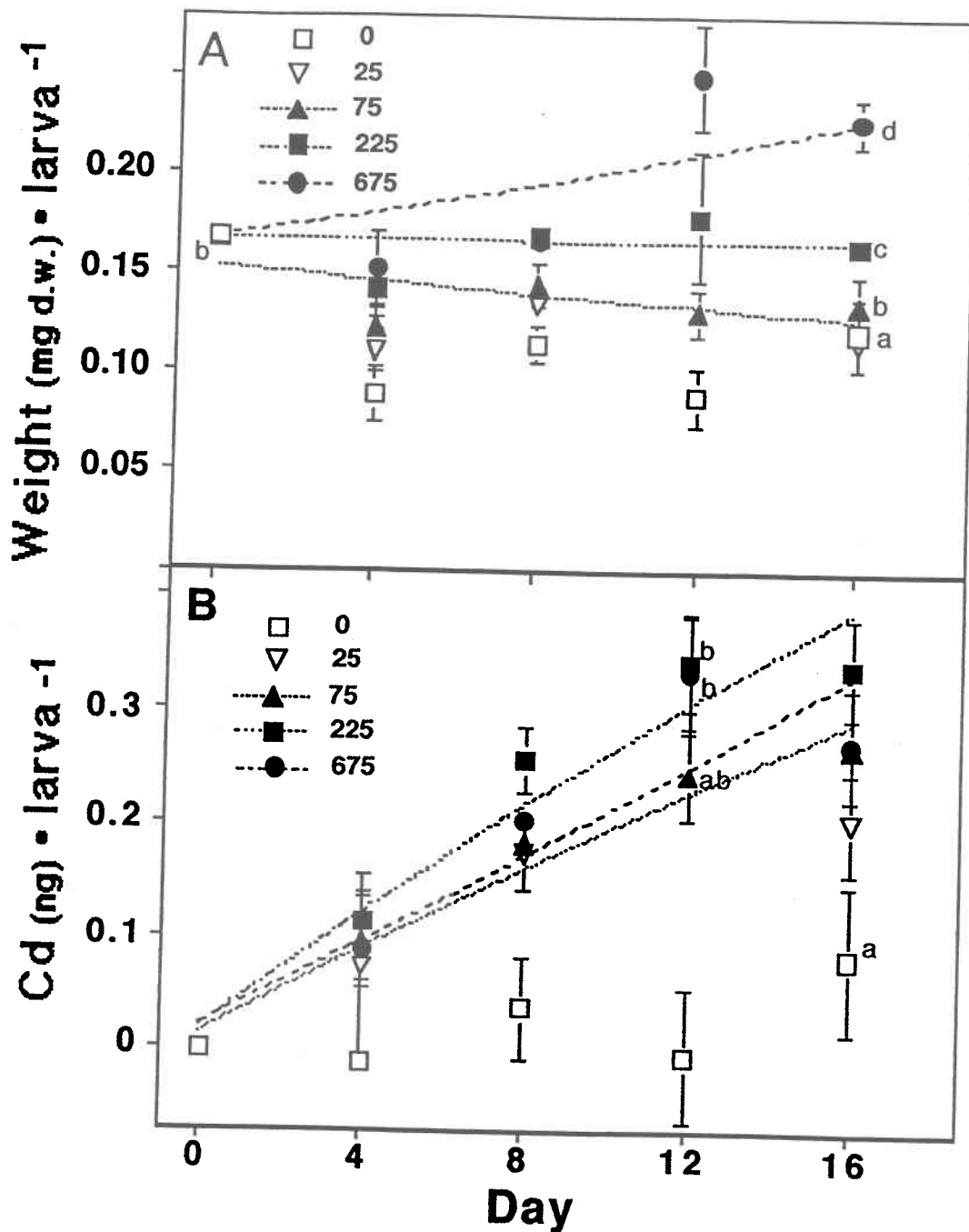


Figure 4. Temporal changes in (A) weight and (B) Cd content of *Chaoborus punctipennis* larvae exposed to water and crustacean prey from Cd-rich Crowley Lake at the nominal prey : predator ratios of 0, 25, 75, 225 and 675. Model curves obtained with the parameters given in Table 2 and experimental data are represented by lines and symbols respectively. The vertical axis in (B) represents increases in larval Cd content above their value at the beginning of the experiment (0.219 ± 0.006 (\pm SE) ng Cd, $n = 3$). Values are means (\pm SE) for the 3 mesocosms at each treatment level (the value for a given mesocosm is the mean of 1 to 5 pooled samples of 5 *C.*

punctipennis). Different letters (a, b, c, d) indicate a significant difference in (A), among treatment levels ($P < 0.05$ ANOVA and SNK, based on a comparison of experimental data from days 4 to 16 for each treatment level) and in (B), between experimental slopes ($P < 0.05$ ANCOVA based on a comparison of values from days 0 to 12 for all treatment levels, except that of "0 prey" for which values from days 0 to 16 are used). Larval weights and Cd contents at the 25 prey : predator treatment level were not included in statistical analyses because of a missing data point for day 12. In (B) the slope of the line for the nominal ratio of 0 prey predator⁻¹ is not significantly different from zero ($P > 0.05$). Larval weight (mg d.w. larva⁻¹) and Cd content (ng Cd larva⁻¹) in the indigenous larvae of Crowley Lake were 0.23 ± 0.01 (\pm SE, $n = 8$) and 2.9 ± 0.3 (\pm SE, $n = 8$), respectively.

Cd efflux experiment

The weight of *C. punctipennis* larvae transferred from high-Cd Crowley Lake to low-Cd Lake au Cèdre increased rapidly when they were offered prey at high prey : predator ratios (Fig. 5A). In contrast, the weight of larvae offered low prey densities (35 prey predator⁻¹) did not increase significantly during our experiment (Fig. 5A). Larvae lost Cd slowly during our 32 d experiment and we estimate the Cd loss rates for the high and low prey : predator ratios to be 0.059 and 0.016 ng Cd predator⁻¹ d⁻¹, respectively.

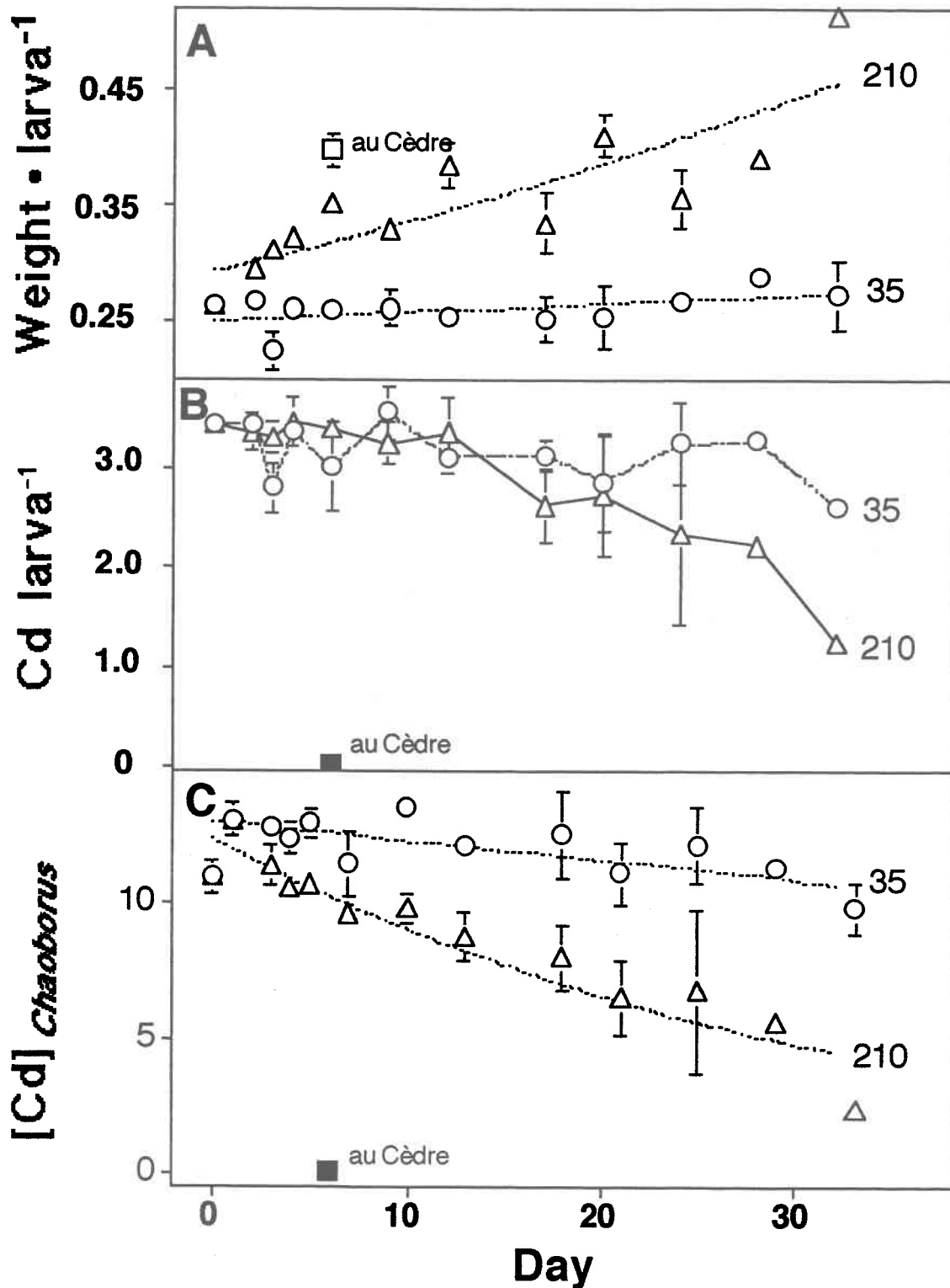


Figure 5. Temporal changes in (A) weight (mg d.w. larva⁻¹), (B) Cd content (ng Cd larva⁻¹) and (C) Cd concentration ($\mu\text{g Cd g}^{-1}$ d.w.) of *Chaoborus punctipennis* larvae transferred from the Cd-rich Crowley Lake and exposed to Cd-poor crustacean prey in mesocosms deployed in uncontaminated Lake au Cèdre at nominal densities of 35

and 210 prey predator⁻¹. Model curves obtained with the parameters given in Table 2 and experimental data are represented by lines and symbols respectively. Values are means (\pm SE) for 1 to 6 samples of 5 *C. punctipennis* at each treatment level. The solid squares indicate values for indigenous Lake au Cèdre *C. punctipennis* larvae.

Modeling Cd exchange

We can fit a kinetic bioaccumulation model to our experimental data to estimate the Cd growth and efflux rate constants, the efficiency with which the Cd ingested is retained by the predator (i.e. assimilation efficiency), the Cd biological half-life and the Cd concentration in the predator at steady-state.

If we treat *C. punctipennis* as a single compartment, the rate of change of Cd concentrations in this animal ($d[\text{Cd}]_a/dt$) can be expressed (Thomann 1981) as the difference between metal entering and leaving the animal, i.e.,

$$\frac{d[\text{Cd}]_a}{dt} = k_u [\text{Cd}]_w + \text{AE} \cdot \text{IR} \cdot [\text{Cd}]_f - k_e [\text{Cd}]_a - k_g [\text{Cd}]_a \quad (1)$$

where k_u ($\text{L g}^{-1} \text{d}^{-1}$), k_e (d^{-1}) and k_g (d^{-1}) are rate constants for cadmium uptake and efflux, and for growth, respectively; $[\text{Cd}]_w$ (ng L^{-1}), $[\text{Cd}]_a$ ($\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$) and $[\text{Cd}]_f$ ($\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$) are cadmium concentrations in water, in *C. punctipennis* tissues and in its food, respectively; AE ($\text{g Cd retained g}^{-1} \text{Cd ingested}$) and IR ($\text{g prey ingested g}^{-1}$ of body weight d^{-1}) are assimilation efficiency and ingestion rate, respectively. The terms on the right hand side of equation (1) represent uptake from water, uptake from food, loss by efflux and loss by growth, respectively. Our experimental results (Fig. 4B) suggest that Cd uptake from water by *C. punctipennis* larvae is negligible in nature which agrees also with the results of a laboratory study for this species (Munger and Hare 1997). For this reason, we can neglect Cd uptake from water and equation (1) reduces to:

$$\frac{d[\text{Cd}]_a}{dt} = \text{AE} \cdot \text{IR} \cdot [\text{Cd}]_f - k_e [\text{Cd}]_a - k_g [\text{Cd}]_a \quad (2)$$

Because we chose to express our Cd bioaccumulation data in terms of Cd burden, we can write a corresponding equation to express the rate of change in the Cd burden (dQ_{Cd}/dt) of *C. punctipennis* as:

$$\frac{dQ_{Cd}}{dt} = AE \cdot IR \cdot [Cd]_f \cdot W - k_e [Cd]_a \cdot W \quad (3)$$

where Q_{Cd} (ng) is the quantity of Cd in the body and W is the larval weight, changes in which are exponentially related to time (Winberg 1971):

$$W = W^0 e^{k_g t} \quad (4)$$

Equation (4) and integrated forms of equations (2) and (3) can be used to estimate the rate constants k_g and k_e , as well as the assimilation efficiency (AE). First, we estimated k_g (Table 2) by fitting equation (4) to the growth curves in Figures 4A and 5A. For the Cd efflux experiment, uptake of cadmium can be neglected since the transferred *C. punctipennis* larvae were maintained in a low-Cd lake and were fed poor-Cd food. Given this assumption, the integrated form of equation (2) becomes:

$$[Cd]_a = [Cd]_a^0 e^{-(k_g + k_e)t} \quad (5)$$

where $[Cd]_a^0$ is the initial Cd concentration in the larvae. The sums of k_g and k_e were determined by fitting equation (5) to the experimental data shown in Fig. 5C. Knowing k_g (from equation (4); see Table 2), k_e was obtained by subtraction. Integration of equation (3) gives:

$$Q_{Cd} = \frac{AE \cdot IR \cdot [Cd]_f \cdot W^0}{k_g + k_e} (e^{-(k_g + k_e)t}) + Q_{Cd}^0 e^{-k_e t} \quad (6)$$

The product of the food-related parameters (P)

$$P = AE \cdot IR \cdot [Cd]_f \quad (7)$$

was obtained by fitting equation (6) to the data points shown in Figure 4B (Table 2); only the data points for 75, 225 and 675 prey predator⁻¹ ratios were fitted because they are the only complete sets of data. For the fitting, the values of k_g and k_e were fixed; k_g values chosen were -0.0118, -0.0005 and 0.0189 d⁻¹ for the 75, 225 and 675 prey predator⁻¹ treatment

level respectively (see Table 2), whereas k_e chosen was 0.018 d^{-1} for larvae from both 225 and 675 prey predator⁻¹ treatment levels and 0.0031 d^{-1} for larvae exposed to 75 prey predator⁻¹ (Table 2).

Assimilation efficiency (Table 2) was calculated for prey predator⁻¹ ratios of 75, 225 and 675 from equation (7) using IR values given in Table 2 and assuming $[\text{Cd}]_f = 10.8 \mu\text{g g}^{-1}$. The values of IR (Table 2) are means of ingestion rates calculated for each treatment level at days 4, 8, 12 and 16. The value of $[\text{Cd}]_f$ was measured separately experiment in cladocerans and copepods (4 replicate samples of 50-100 cladocerans or copepods of Crowley Lake) (Munger and Hare 1999); the same Cd concentration was obtained for both organisms.

After a sufficiently long exposure time Cd concentration in *C. punctipennis* larvae should reach a steady-state value at which time $d[\text{Cd}]_a/dt$ equals zero. Under these conditions, equation (2) become:

$$[\text{Cd}]_{ss} = \frac{AE \cdot IR \cdot [\text{Cd}]_f}{k_e + k_g} \quad (8)$$

values of $[\text{Cd}]_{ss} = 3.2$ and $3.7 \text{ ng Cd larva}^{-1}$ were calculated by assuming that the mean larval dry weight is $0.22 \text{ ng larva}^{-1}$, $P = 0.13$ and $0.30 \text{ ng Cd g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and $k_g = -0.0118$ and -0.0005 d^{-1} , respectively (see Table 2 for uptake experiment at 75 and 225 prey predator⁻¹ ratios), and $k_e = 0.0031$ and 0.018 d^{-1} respectively (see Table 2 for the efflux experiment at 35 and 210 prey predator⁻¹). The value of $[\text{Cd}]_{ss}$ for the treatment level of 675 prey predator⁻¹ was not calculated given the lack of k_e value at a treatment level close to 675 prey predator⁻¹. The biological half-life of Cd in larvae (Table 2), $t_{1/2}$ was obtained from equation (9) which is derived from equation (5):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0.5}{k_e + k_g} \quad (9)$$

Model curves of growth, Cd elimination and Cd uptake obtained with the constants given in Table 2 are compared with our experimental data in Figures 4 and 5.

Table 2. Estimated values of various model parameters for Cd exchange in larvae of *C. punctipennis*.

Parameters	Symbol	Estimated Values		
		Elimination Experiment		
		Prey : Predator ratio		
		35	210	
Growth rate constant (d ⁻¹)	k _g	0.0027	0.0139	
Elimination rate constant (d ⁻¹)	k _e	0.0031	0.0180	
Biological half-life (d)	t _{1/2}	117	22	
		Uptake Experiment		
		Prey : Predator ratio		
		75	225	675
Growth rate constant (d ⁻¹)	k _g	-0.0118	-0.0005	0.0189
Food-related parameters (ng Cd g ⁻¹ d ⁻¹)	P	0.13	0.30	0.18
Assimilation efficiency (%)	AE	2	13	18
Cd concentration at steady-state (ng larva ⁻¹)	Cd _{ss}	3.2	3.7	-
Ingestion rate (g prey g ⁻¹ d ⁻¹)	IR	0.064	0.21	0.91

Discussion

Because food is the major Cd source for *C. punctipennis* larvae in nature, the strong relationship reported to exist between Cd concentrations in this insect and those in water (Hare and Tessier 1996; Croteau et al. 1998; Hare and Tessier 1998) must be indirect, that is, the metal must be taken up from water at a lower level in the food chain leading to the predator. Consequently, food-related variables (e.g., type of food consumed, feeding rate, and assimilation efficiency) should be considered as a means to improve their *Chaoborus* bioaccumulation model.

Our findings that food is the major Cd source for *C. punctipennis* agree with those obtained by Stephenson and Turner (1993) for the freshwater amphipod *Hyalella azteca* this

taxon is reported to take up to 60% of its Cd from its periphyton food in nature. Food is also reported to be an important Cd source in the laboratory for mites and caddisfly larvae (Timmermans et al. 1992) as well as polychaetes (Selck et al. 1998). However, these conclusions are in contrast with those of several laboratory investigations in which aquatic animals are reported to take up the majority of their Cd from water (Williams and Giesy 1978; Kayser 1982; Wang and Fisher 1998). Although various species could differ in their Cd uptake, the conclusions of many laboratory studies should be accepted with caution (Table 3) because 1) Cd concentrations in artificial exposure media often largely exceed those at even highly contaminated sites, 2) a consumer's food and the consumer itself are often exposed to different Cd concentrations, 3) Cd speciation in water, and thus Cd bioavailability, are usually not controlled, 4) food is usually not exposed to Cd for a sufficient length of time to reach an internal steady-state (as discussed in Munger et al. 1999), 5) consumers are stressed by unnatural experimental conditions, and 6) a natural mixture of food is usually not offered to consumers. We believe that our innovative experimental design involving the in situ exposure of aquatic animals to natural Cd concentrations in water and to a realistic mixture of food types has allowed us to avoid the pitfalls of many laboratory studies.

Table 3. Classification of freshwater studies on the relative importance of water and food as Cd sources according to their adherence (Y) or not (N) to six key methodological criteria (as discussed in the text), i.e., 1) environmentally realistic Cd concentrations in the exposure media, 2) all trophic levels exposed to the same Cd concentration in water, 3) control of aqueous Cd speciation, 4) realistic metal bioavailability in food, 5) realistic experimental conditions, 6) natural mixture of food. A question mark (?) indicates that the information was not available in the publication. The predominance of the metal source is indicated by W (water) or F (food).

Animal	Criteria No						Metal	References
	1	2	3	4	5	6	source W/F	
Crustaceans								
<i>Moina macrocopa</i>	N	N	?	?	N	N	W	Hatakeyama & Yasuno 1981
<i>Daphnia magna</i>	N	?	?	?	N	N	W	Carney et al. 1986
<i>Asellus aquaticus</i>	N	N	N	?	N	N	W	van Hattum et al 1989
<i>Procambarus acutus</i>	N	N	N	?	N	N	W/F	Giesy et al. 1980
<i>Hyaella azteca</i>	Y	Y	Y	Y	Y	Y	F	Stephenson & Turner 1993
Mites								
<i>Limnesia maculata</i>	N	Y	?	?	N	N	F	Timmermans et al 1992
Insects								
<i>Mystacides</i> spp.	N	Y	?	?	N	N	F	Timmermans et al 1992
<i>Chaoborus punctipennis</i>	Y	Y	Y	Y	N	N	F	Munger & Hare 1997
<i>Chaoborus punctipennis</i>	Y	Y	Y	Y	Y	Y	F	This study

The data points in Figure 4 suggest plateaus in larval Cd content around 0.55 ng predator⁻¹ (initial larval Cd content of 0.22 ng plus the increase of 0.32 ng during our experiment). Assuming a similar feeding behavior in larvae confined in mesocosms to those in Crowley Lake, a plateau in larval Cd content seems unlikely because the Cd content of fed larvae at the end of our experiment was < 20% of that measured in indigenous larvae from Crowley Lake (2.9 ng larva⁻¹; Table 1). Moreover, our one-compartment model suggests that steady-state Cd concentration in larvae from the mesocosms should be 3.2 - 3.7 ng larva⁻¹ (Table 2). The apparent plateaus could be explained by a decline in feeding rates during our experiment associated with a decline in lake temperature (a drop of 9° C was recorded during the experiment).

The values of AE at treatment levels of 75, 225 and 675 prey predator⁻¹ ratios (Table 2) show that the AE and IR are inversely related: a high ingestion rate (128 prey consumed predator⁻¹ d⁻¹ when 675 prey predator⁻¹ are offered) is accompanied with a low assimilation efficiency (2%) whereas a low ingestion rate (9 prey consumed predator⁻¹ d⁻¹ when 75 prey predator⁻¹ are offered) was associated with a high assimilation efficiency (18%). Such a tendency has also been reported for phosphorous assimilation by *Chaoborus trivittatus* (Giguère 1981) and for Cd assimilation by the marine mussel *Mytilus edulis* (Wang et al. 1995). A controlled laboratory experiment conducted on *Chaoborus* larvae have supports also this tendency (Munger and Hare 1999).

Our estimated assimilation efficiencies for Cd taken up as food (2 – 18 %, Table 2) are lower than those reported for *C. punctipennis* larvae exposed in the laboratory to large numbers of cladocerans (27%) or copepods (33%) from Crowley Lake (Munger and Hare 1999). Our values are higher than those obtained for the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (1.1 %, van Hattum et al. 1989) and for the insect larvae *Mystacides* spp. (4.4 %, Timmermans et al. 1992), but are lower than the values of 61 % and 80 % obtained for the water mites *Limnesia maculata* (Timmermans et al. 1992) and the amphipod *Hyaella azteca* (Stephenson and Turner 1993), respectively; they are also lower than the mean value of 25 % observed in the marine mussel *Mytilus edulis* (Wang et al. 1995). Variations of AE values among species can be attributed to the species-specific physiology of the animals, but it could also result from the difficulty to obtain realistic ingestion rate, a key factor influencing AE's values (e.g. Wang et al. 1995; Munger and Hare, 1999).

Estimated values of elimination rate constants (k_e) increase with increasing food density. This increase could be explained if a greater food consumption led to either a higher metabolic rate and thus a higher loss rate of Cd, or to differences in digestive processes as observed in mussels (Wang et al. 1995). Biological half-life decrease from 117 to 22 days with increasing food density (Table 2). The value of 22 d is probably more representative of $t_{1/2}$ occurring in larvae from Crowley Lake since it was obtained for a prey : predator ratio in the mesocosms close to that in the lake. Our value of 22 d was higher than the one reported for an other aquatic insect larvae *Hexagenia rigida* (8 d, Hare et al. 1991), was similar to the value obtained for the isopod *Asellus aquaticus* (22 d, van Hattum et al. 1989) but was lower than that for the mussel *Mytilus edulis* (Wang et al. 1996).

The present study illustrates that our approach can be used to address the previously intractable problem of separating metal sources to aquatic animals in nature. Although we studied a planktonic system, our approach could be extended to study benthic animals by using sediment-filled trays covered with netting to retain animals. Our experimental results suggest that, in addition to being an important channel for the movement of nutrients from zooplankton (Neill and Peacock 1980) to fish (Pope et al. 1973), *Chaoborus* larvae represent a means by which trace metals such as Cd could be transferred between trophic levels. In more general terms, the results of our experiment indicate that models designed to trace the dynamics and fate of metals in communities of aquatic animals should not be based solely on metal uptake from water, but are likely to be improved by including metal transfer along trophic pathways. Our results also suggest that food should not be excluded *a priori* as a Cd source for animals in laboratory experiments and toxicity tests (Luoma 1995) doing so would likely result in the under-estimation of Cd accumulation and toxicity with a concomitant risk for the environment.

Acknowledgements

Funding for our study was provided by the U.S. Environmental Protection Agency, Human Resources Development Canada, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Quebec Ministry of Education and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche. We would like to thank M. Amyot and J.-C. Auclair for their comments, N. Belzile for having made his laboratory available to us and M.-N. Croteau, M.-R. Doyon, S. Fournier, M.-C. Morin, B. Patry, R. Rodrigue and N. Simard for their technical assistance.

References

- Bothwell, M.L., D.M.J. Sherbot, C.M. Pollock. 1994. Ecosystem response to solar ultraviolet-B radiation: Influence of trophic-level interactions. *Science*. 265: 97-100.
- Carney, G.C., P. Shore and H. Chandra. 1986. The uptake of cadmium from a dietary and soluble source by the crustacean *Daphniamagna*. *Environ. Res.* 30: 290-298.
- Croteau, M.-N., L. Hare and A. Tessier. 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environ. Sci. Technol.* 32: 1348-1353.

- Fisher N.S. and J. R. Reinfelder. 1995. The trophic transfer of metals in marine systems, p. 363-406. In A. Tessier and D.R. Turner [eds.], *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Wiley.
- Franzin, W.G., G.A. McFarlane and A. Lutz. 1979. Atmospheric fallout in the vicinity of a base metal smelter at Flin Flon, Manitoba, Canada. *Environ. Sci. Technol.* 13: 1513-1522.
- Giesy, J.P., J.W. Bowling and H.J. Kania. 1980. Cadmium and zinc accumulation and elimination by freshwater crayfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 9: 683-697.
- Giguère, L.A. 1981. Food assimilation efficiency as a function of temperature and meal size in larvae of *Chaoborus trivittatus* (Diptera: Chaoboridae). *J. Anim. Ecol.* 50: 103-109.
- Gunn, J., W. Keller, J. Negusanti, R. Potvin, P. Beckett and K. Winterhalder. 1995a. Ecosystem recovery after emission reductions: Sudbury, Canada. *J. Water Air Soil Pollut.* In press.
- Gunn, J.M., N. Conroy, W.E. Lautenbach, D.A.B. Pearson, M.J. Puro, J.D. Shorthouse and M.E. Wiseman. 1995b. From restoration to sustainable ecosystems, p. 335-344. In J.M. Gunn [ed.], *Restoration and recovery of an industrial region*. Springer-Verlag.
- Hare, L., P.G.C. Campbell, A. Tessier and N. Belzile. 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.
- Hare, L., E. Saouter, P.G.C. Campbell, A. Tessier, F. Ribeyre and A. Boudou. 1991. Dynamics of cadmium, lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* (Ephemeroptera) and the environment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 39-47.
- Hare, L. and A. Tessier. 1996. Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature* 380: 430-432.

- Hare L. and A. Tessier. 1998. The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1850-1859.
- Hatakeyama, S. and M. Yasuno. 1981. The effects of cadmium-accumulated *Chlorella* on the reproduction of *Moina macrocopa* (Cladocera). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 5: 341-350.
- Kay, S.H. 1985. Cadmium in aquatic food webs. *Residue Reviews* 96: 13-43.
- Kayser, H. 1982. Cadmium effects in food chain experiments with marine plankton algae (Dinophyta) and benthic filter feeders (Tunicata). *Nether. J. Sea Res.* 16: 444-454.
- Luoma, S.N. 1995. Prediction of metal toxicity in nature from bioassays: Limitations and research need, p. 609-659. *In* A. Tessier and D.R. Turner [eds], *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Wiley.
- Moore, M.V. 1988. Differential use of food resources by the instars of *Chaoborus punctipennis*. *Freshwat. Biol.* 19: 249-268.
- 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. *Environ. Sci. Technol.* 31: 891-895.
- Munger, C., L. Hare, A. Craig and P.-M. Charest. 1999. Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. *Aquat. Toxicol.* 44: 195-200.
- Munger, C. and L. Hare. 1999. Influence of ingestion rate and food types on cadmium accumulation by the aquatic insect *Chaoborus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* (under review).
- Neill, W.E. and A. Peacock. 1980. Breaking the bottleneck: Interactions of invertebrate predators and nutrients in oligotrophic lakes, p. 715-724. *In* W.C. Kerfoot [ed.], *Evolution and ecology of zooplankton community*. Univ. Press of New England.
- Nriagu, J.O. and J.M. Pacyna. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139.

- Pacyna, J.M., M.T. Scholtz and Y.-F. Li. 1995. Global budget of trace metal sources. *Environ. Rev.* 3: 145-159.
- Pope, G.F., J.C.H. Carter, G. Power. 1973. The influence of fish on the distribution of *Chaoborus* spp. (Diptera) and density of larvae in the Matamek river system, Québec. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 102: 707-714.
- Selck, H., V.E. Forbes and T.L. Forbes. 1998. Toxicity and toxicokinetics of cadmium in *Capitella* sp. I: relative importance of water and sediment as routes of cadmium uptake. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 164: 167-178.
- Stephenson, M. and M.A. Turner. 1993. A field study of cadmium dynamics in periphyton and in *Hyalella azteca* (Crustacea: Amphipoda). *Water Air Soil Pollut.* 68: 341-361.
- Swift, M.C. and A.Y. Fedorenko. 1973. A rapid method for the analysis of the crop contents of *Chaoborus* larvae. *Limnol. Oceanogr.* 18: 795-798.
- Taylor, D. 1983. The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 7: 33-42.
- Timmermans, K.R., E. Spijkerman, M. Tonkes and H. Govers. 1992. Cadmium and zinc uptake by two species of aquatic invertebrate predators from dietary and aqueous sources. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 655-662.
- Thomann, R.V. 1981. Equilibrium model of fate of microcontaminants in diverse aquatic food chains. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 280-296.
- van Hattum, B., P. de Voogt, L. van den Bosch, N.M. Van Straalen and E.N.G. Jooisse. 1989. Bioaccumulation of cadmium by the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L.) from aqueous and dietary sources. *Environ. Pollut.* 62: 129-151.
- Verta, M., S. Rekolainen, J. Mannio and K. Surma-Aho. 1986. The origin of level of mercury in Finnish forest lakes. *Public. Water Res. Inst., Natl. Board Waters, Finland*, 65: 21-31.

- Wang, W.-X., N.S. Fisher and S.N. Luoma. 1995. Assimilation of trace elements ingested by the mussel *Mytilus edulis*: effects of algal food abundance. Mar. Ecol. Prog. Ser. 129: 165-176.
- Wang, W.-X., N.S. Fisher and S.N. Luoma. 1996. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 140: 91-113.
- Wang, W.-X. and N.S. Fisher. 1998. Accumulation of trace elements in a marine copepod. Limnol. Oceanogr. 43: 273-283.
- Welschmeyer, N. 1993. Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. Limnol. Oceanogr. 39: 1985-1992.
- Williams, D.R. and F.P.J. Giesy. 1978. Relative importance of food and water sources to cadmium uptake by *Gambusia affinis* (Poeciliidae). Environ. Res. 16: 326-332.
- Winberg, G.G. 1971. Methods for the estimation of production of aquatic animals. Academic Press.

Chapitre 4

Influence of ingestion rate and food types on cadmium accumulation by the aquatic insect *Chaoborus*

To be submitted to Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, December 1998.

Catherine Munger and Landis Hare

Université du Québec, INRS-Eau
C.P. 7500, Ste-Foy
Québec, Canada G1V 4C7

Résumé

Nous avons mesuré l'influence de deux variables relatives à la nourriture, le type de proies et le taux d'ingestion sur la prise en charge du Cd par la larve de l'insecte aquatique *Chaoborus punctipennis*. Des larves provenant d'un lac pauvre en cadmium, ont été amenées en laboratoire et exposées à l'eau et à des quantités variées de copépodes (*Diaptomus minutus*) ou de cladocères (*Diaphanosoma birgei*) provenant d'un lac riche en cadmium. Le contenu en Cd des larves exposées au métal dans l'eau seulement n'a pas augmenté dans le temps, confirmant les résultats obtenus lors d'expériences précédentes ayant démontré que la nourriture est la source majeure de Cd pour les larves de *C. punctipennis*. Ces données suggèrent que la relation rapportée entre le Cd dans l'eau et dans cet insecte devrait être indirecte, i.e. que la prise en charge de l'eau aurait lieu à un niveau inférieur dans la chaîne trophique menant à *C. punctipennis*. Le type de proies n'a pas influencé le contenu en Cd du prédateur, possiblement dû au fait que les concentrations en Cd dans les deux types de proies étaient semblables et que le Cd a été assimilé avec la même efficacité par le prédateur à partir des deux types de proies. L'efficacité d'assimilation pour le Cd s'est avéré être inversement reliée au taux d'ingestion du prédateur, ce qui s'expliquerait par un temps de passage plus rapide de la nourriture dans l'intestin lorsque de grandes quantités de proies sont consommées. Nos résultats suggèrent que, dans le lac riche en Cd, le type de proies et le taux d'ingestion ont peu d'influence sur le contenu en Cd du prédateur.

Abstract

We measured the influence of two food-related variables, prey type and ingestion rate, on Cd uptake by larvae of the aquatic insect *Chaoborus punctipennis*. Larvae collected from a low-Cd lake were held in the laboratory where they were exposed to water and to various quantities of either copepods (*Diaptomus minutus*) or cladocerans (*Diaphanosoma birgei*) from a high-Cd lake. The Cd content of larvae exposed to Cd in water only did not increase, confirming the results of previous experiments in which food was demonstrated to be the major Cd source for *C. punctipennis* larvae. These data suggest that the reported relationship between Cd in water and in this insect must be indirect, that is, Cd uptake from water must occur at a lower level in the food web leading to *C. punctipennis*. Prey type did not influence predator Cd content, likely because Cd concentrations in the two prey types were the same and Cd was assimilated with the same efficiency by the predator from the two prey types. Cadmium assimilation efficiency was observed to be inversely related to its predator ingestion rate, which could be explained by a more rapid gut passage time at high prey consumption rates. Our results suggest that in the high-Cd lake the type and number of prey consumed would have little influence on predator Cd content.

Introduction

Cadmium is a potentially toxic trace metal present in aquatic systems directly influenced by mining, metal-smelting and other industrial activities (Pacyna et al. 1995). Because this metal can be transported long distances in the atmosphere (Nriagu and Pacyna 1988), it can also contaminate ecosystems distant from local sources (Franzin et al. 1979; Verta et al. 1986). The wide dispersion and toxicity of Cd dictate that its concentrations in nature be measured and its impact on organisms be evaluated. Bioaccumulation models can be used to estimate the concentration of Cd and other metals in the environment from those in animals selected as biomonitors (Phillips and Rainbow 1993). Bioaccumulation models are likely to be more powerful for predicting environmental metal concentrations if they are based on chemical and biological principles, i.e., if they are based in theory rather than being purely empirical.

An accurate theoretically-based model for relating Cd concentrations in lake water to those in a biomonitor has been developed for *Chaoborus punctipennis* (Hare and Tessier 1996, 1998; Croteau et al. 1998), an insect that meets many of the prerequisites for a good biomonitor (Phillips and Rainbow 1993). However, experiments have shown that food, and not water, is the major Cd source for these larvae (Munger and Hare 1997; Munger et al. 1999b). Thus the relationship reported between Cd concentrations in *C. punctipennis* larvae and those in water must be indirect, that is, the metal must be taken up from water by organisms at a lower level in the food chain leading to the predator. Measurements of the influence of food-related variables on Cd bioaccumulation by this predator could be useful for improving the bioaccumulation model for this insect, as well as for modeling the movement of Cd along food webs in nature.

Food-related variables known to influence metal accumulation by an animal are the metal's concentration in a given food type, the rate at which the food is ingested, and the assimilation efficiency of the metal from food (Thomann 1981; Spacies and Hamelink 1985; Luoma et al. 1992; Wang and Fisher 1996). In the case of *Chaoborus* larvae, their prey are reported to vary in Cd content (Yan et al. 1990) and in the rate at which they are ingested by the predator (Swift and Fedorenko 1975). Comparisons of Cd assimilation efficiencies by *Chaoborus* larvae from various prey types have not been reported. We measured the influence of prey type (copepods versus cladocerans) and ingestion rate on Cd uptake by larvae of *C. punctipennis* and calculated Cd assimilation efficiencies at various ingestion rates and for different prey types. Hypothesized variations in assimilation efficiency have been previously used to explain a lack of increase in *C. punctipennis* Cd content with increasing prey consumption rates (Munger et al. 1999b). We conducted our experiments in

the laboratory but used naturally Cd-rich prey collected from a Cd-contaminated lake so that the metal's internal distribution in prey would not bias its uptake by the predator (Reinfelder and Fisher 1991; Munger et al. 1999a).

Methods

We exposed uncontaminated *Chaoborus punctipennis* (Say) larvae from a lake near Quebec City, Quebec (Lake St. Joseph, 46°55' N, 71°40' W) to Cd-rich water and prey collected from a metal-contaminated lake in the mining region of Sudbury, Ontario (Crowley Lake, 46°23' N, 80°59' W). These two lakes were chosen because: i) they both support native populations of *C. punctipennis*; ii) they are chemically similar in being soft water lakes of similar pH, and iii) Cd concentrations in the lake water and in indigenous *C. punctipennis* larvae are much higher in Crowley Lake than in Lake St. Joseph (Munger et al. 1999b).

Insect larvae were collected at night by horizontal hauls of a 250- μm -mesh plankton net at a 3-m depth in Lake St. Joseph in early September. Samples were transported to the laboratory in coolers where final (fourth) instar *C. punctipennis* larvae were removed and placed in filtered (64- μm mesh) Lake St. Joseph water. Larvae were flown to Sudbury in coolers where they were placed in pairs in a series of high-density polyethylene (HDPE) vials filled with 25 mL of 64- μm -filtered Crowley Lake water within 2 days of their initial collection.

Zooplankton to be offered as prey to *C. punctipennis* were collected by horizontal tows of a 64- μm -mesh plankton net at a 3-m depth in Crowley Lake. In the laboratory, prey were sieved through 500- μm -mesh netting to eliminate animals larger than the mouth diameter of *C. punctipennis* ($\approx 450 \mu\text{m}$, Moore 1988). A partial separation of cladocerans and copepods was attained by placing a bulk zooplankton sample in an opaque white-plastic 10-L basin filled with 5 L of Crowley Lake water under cool-white fluorescent lights at room temperature. After about 30 min, water and zooplankton were siphoned either from near the basin walls to collect mainly cladocerans or from the center of the basin to collect mainly copepods. From these concentrates, prey of each taxonomic group were removed at a magnification of 25X with a Pasteur pipette and placed into the HDPE vials containing the previously added pair of *C. punctipennis* larvae.

We offered 0, 5 or 25 \cdot prey predator⁻¹ (i.e., 0, 10 or 50 prey \cdot HDPE-vial⁻¹). Although these ratios are lower than those in Crowley Lake (225 prey \cdot predator⁻¹), prey and predator were confined in a small volume of water in our experiments and thus their densities were much higher than in the lake (e.g., 80 versus 0.2 predators \cdot L⁻¹ in our

experiments and in the lake, respectively). After feeding for 1 day, predators were transferred to a second series of similar vials containing freshly collected water and prey. Prey that had not been eaten in the first set of vials were fixed in 5% formaldehyde and counted under a dissecting microscope at 25X. This procedure was repeated daily to the end of our 7-day experiment. On each of days 2, 4 and 7, twelve containers were sacrificed for Cd measurements (3 per treatment level excluding that of 0 prey). Counts of prey remaining after predator removal are therefore based on a declining number of samples from 36 (days 1 and 2), to 24 (days 3 and 4), to 12 (day 5 to 7).

Cladocerans and copepods offered as prey were identified as *Diaphanosoma birgei* and *Diaptomus minutus*, respectively. Our choice of prey types was based on the fact that they were the dominant crustaceans in the plankton of Crowley Lake, as in many Shield lakes (Keller and Conlon 1994), and that crustaceans are reported to comprise > 98% by biomass of the diet of final instar *C. punctipennis* larvae (Moore 1988). A subsample of a known number of cladocerans or copepods (50-100 individuals \cdot sample⁻¹) was placed on pieces of pre-weighed, acid-washed, Teflon® sheeting to measure their mean biomass and Cd concentration (4 samples per prey type). These crustaceans had the same mean weight ($1.3 \pm 0.2 \mu\text{g} \cdot \text{cladoceran}^{-1}$ and $1.1 \pm 0.3 \mu\text{g} \cdot \text{copepod}^{-1}$, \pm SD, $n = 4$) and thus represented the same prey biomass for *C. punctipennis* larvae.

We verified that the actual numbers of prey offered corresponded to our target values by counting the number of prey in 6 containers chosen at random prior to the addition of *C. punctipennis* larvae. At the highest treatment level (50 \cdot container⁻¹), the number of free-swimming copepods was equal ($49 \pm 2 \cdot \text{container}^{-1}$, \pm SD) to the nominal value whereas the number of free-swimming cladocerans was lower ($44 \pm 3 \cdot \text{container}^{-1}$, \pm SD) because some individuals had died after having been trapped in the surface film. Rotifers and copepod nauplii ($16 \pm 14 \cdot \text{container}^{-1}$, \pm SD, $n = 41$) were observed in our experimental containers, but given their small sizes we assumed that they represented a negligible biomass for the predator. Replicates in which there was predator mortality (1 larva in 5 containers) were eliminated.

Living *C. punctipennis* larvae sampled on days 2, 4 and 7 of the experiment, were held in 25 mL of filtered Crowley Lake water to evacuate their gut contents and then placed on pieces of thin pre-weighed, acid-washed, Teflon® sheeting (Hare et al. 1989). Animals samples were frozen and lyophilized to constant weight and digested at room temperature in 4-mL HDPE bottles containing concentrated nitric acid (100 μL Environmental grade acid \cdot mg^{-1} sample dry weight) for 5 days and then concentrated H_2O_2 (40 $\mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ sample dry

weight) for 1 day. Samples were then diluted to volume with Milli Q deionized water (>18 megaohms \cdot cm $^{-1}$ at 25°C) and Cd concentrations were measured by flameless atomic-absorption spectrophotometry (Varian Spectra AA300 Model, GTA-95 equipped with a graphite tube atomizer). Samples of similar weight of a certified reference material (lobster hepatopancreas; Tort 1, National Research Council of Canada) were digested during each analytical run; measured Cd concentrations varied little over time (coefficient of variation \approx 5%, $n = 10$) and were within the certified range of 0.23 ± 0.02 (SD) μ mol Cd \cdot g $^{-1}$ dry weight for the metal. Cadmium concentrations in all reagent blanks were below the detection limit for the metal (0.2 nmol \cdot L $^{-1}$).

Results and Discussion

Predator ingestion rate

In spite of their confinement in small experimental containers, *C. punctipennis* larvae fed throughout our 7 day experiment (Table 1). When few prey were offered, almost all were consumed by the predator (Table 1) suggesting that larvae at the lower prey density were food limited. Although most prey were consumed on day 1 at the higher prey density, ingestion rates declined thereafter (Table 1) suggesting predator satiation. The maximum ingestion rate that we measured (24.5 copepods \cdot predator $^{-1}$ \cdot day $^{-1}$) is close to the maximum reported value of 28 *D. birgei* eaten per third instar *C. trivittatus*, which are about the same length as the final instar of *C. punctipennis* larvae used in our experiment (Fedorenko, 1975).

Table 1. Mean numbers (\pm SD) of cladocerans and copepods offered and consumed (no. offered - no. free-swimming prey remaining after 24 h) per *C. punctipennis* larva per day. The numbers of cladocerans offered are lower than those for copepods because some cladocerans were trapped in the surface film and thus were unavailable as prey.

Days	Cladocerans		Copepods	
	offered	ingested	offered	ingested
1	3.8 \pm 1.1	3.6 \pm 1.1	5.0 \pm 0.7	4.9 \pm 0.2
2	3.8 \pm 0.7	3.4 \pm 1.1	5.0 \pm 0.7	4.9 \pm 0.2
3	3.6 \pm 0.4	3.3 \pm 0.6	5.0 \pm 0.7	4.8 \pm 0.4
4	3.4 \pm 0.8	3.2 \pm 0.8	5.0 \pm 0.7	5.0 \pm 0.0
5	1.5 \pm 1.0	-1.0 \pm 1.8	5.0 \pm 0.7	3.8 \pm 0.3
6	3.0 \pm 1.3	2.2 \pm 2.1	5.0 \pm 0.7	5.0 \pm 0.0
7	2.5 \pm 0.0	1.5 \pm 0.7	5.0 \pm 0.7	4.8 \pm 0.3
mean	3	2	5	5
1	20.9 \pm 1.2	19.1 \pm 1.3	24.5 \pm 1.2	24.6 \pm 0.4
2	16.0 \pm 3.3	13.2 \pm 4.1	24.5 \pm 1.2	22.3 \pm 3.8
3	14.9 \pm 4.8	11.8 \pm 3.8	24.5 \pm 1.2	21.4 \pm 2.4
4	15.8 \pm 1.8	13.5 \pm 2.4	24.5 \pm 1.2	17.2 \pm 4.8
5	10.8 \pm 4.4	3.2 \pm 8.7	24.5 \pm 1.2	8.3 \pm 2.5
6	15.5 \pm 1.5	12.0 \pm 2.3	24.5 \pm 1.2	11.2 \pm 4.5
7	11.7 \pm 1.0	3.0 \pm 2.5	24.5 \pm 1.2	8.7 \pm 1.6
mean	15	11	25	16

Predator weight and Cd accumulation

Net increases in larval dry weight were observed in copepods fed larvae ($p < 0.05$ ANOVA) but not in larvae from the other treatment levels ($p > 0.05$) (Fig. 1A). We are not able to explain the low predator weight on day 7 of the "3 cladocerans" treatment level (Fig. 1A) but suspect an error in weighing. The young age of the fourth instar larvae that we used in our experiments probably explains their higher growth rate ($0.023 \text{ mg} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) than that reported for the same species in a previous field experiment ($\approx 0.004 \text{ mg} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$, Munger et al. 1999b).

Cadmium accumulation by *C. punctipennis*, expressed as Cd content rather than Cd concentration because of the variations in larval weight, was approximately linear over time

(Fig. 1B). In larvae exposed to Cd-rich water only, no accumulation of cadmium was measured over time ($p = 0.10$) and a comparison of slopes (ANCOVA, $p < 0.05$) revealed that this treatment level was significantly different from the 4 others in which Cd-rich prey were present (Fig. 1B). Thus water was a negligible source of Cd for *C. punctipennis* larvae in our experiment, as has been reported in previous studies (Munger and Hare 1997, Munger et al. 1999b). The Cd uptake rate in our experiment ($0.056 \text{ ng Cd} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ obtained for individual larvae exposed to 25 copepods for 7 d) was approximately twice that reported for larger larvae of the same species in a previous field experiment ($0.027 \text{ ng Cd} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$; Munger et al. 1999b).

In spite of the fact that our two prey types are in different taxonomic groups (copepods and cladocerans) their Cd contents and concentrations were similar, i.e., Cd concentrations ($\mu\text{g Cd} \cdot \text{g}^{-1} \text{ d.w.} \pm \text{SD}$) were 11.2 ± 0.8 and 9.3 ± 1.9 and Cd contents ($\text{ng Cd} \cdot \text{prey}^{-1} \pm \text{SD}$) were 0.014 ± 0.003 and 0.011 ± 0.003 for *D. birgei* and *D. minutus*, respectively. Such similarity does not always exist, as Yan et al. (1990) have reported higher Cd concentrations in cladocerans than in copepods and M.-N. Croteau (unpublished) has shown that relative Cd concentrations between the two groups can vary among lakes.

Larvae consuming greater numbers of prey did not accumulate more Cd than those eating smaller numbers (Fig. 1B) suggesting that the efficiency with which Cd was assimilated by larvae was lower at higher ingestion rates. We estimated the efficiency with which ingested Cd was assimilated by the predator (AE) as follows:

$$\text{AE} = \frac{\Delta \text{Cd}_{\text{Chaoborus}}}{\text{IR} \cdot \text{Cd}_{\text{prey}}} \cdot 100 \quad (1)$$

where $\text{Cd}_{\text{Chaoborus}}$ is the quantity of Cd (ng) accumulated by *C. punctipennis* larvae during our experiment, IR is the species-specific ingestion rate ($\text{prey} \cdot \text{larva}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) and Cd_{prey} is the Cd content of a given prey type ($\text{ng Cd} \cdot \text{individual}^{-1}$). This equation assumes a negligible Cd loss from larvae during our experiment, which is supported by the long biological half-life reported for Cd in *C. punctipennis* larvae in nature (Munger et al. 1999b). Given the uncertainty around each parameter in equation (1) (see error terms in tables and figure) our estimates of AEs are also uncertain, as is evidenced by the fact that some values exceeded 100% (Table 2). However, by using the average of estimates for 3 days of each treatment level (Table 2), we are confident that the relative magnitude of the values are useful for comparative purposes.

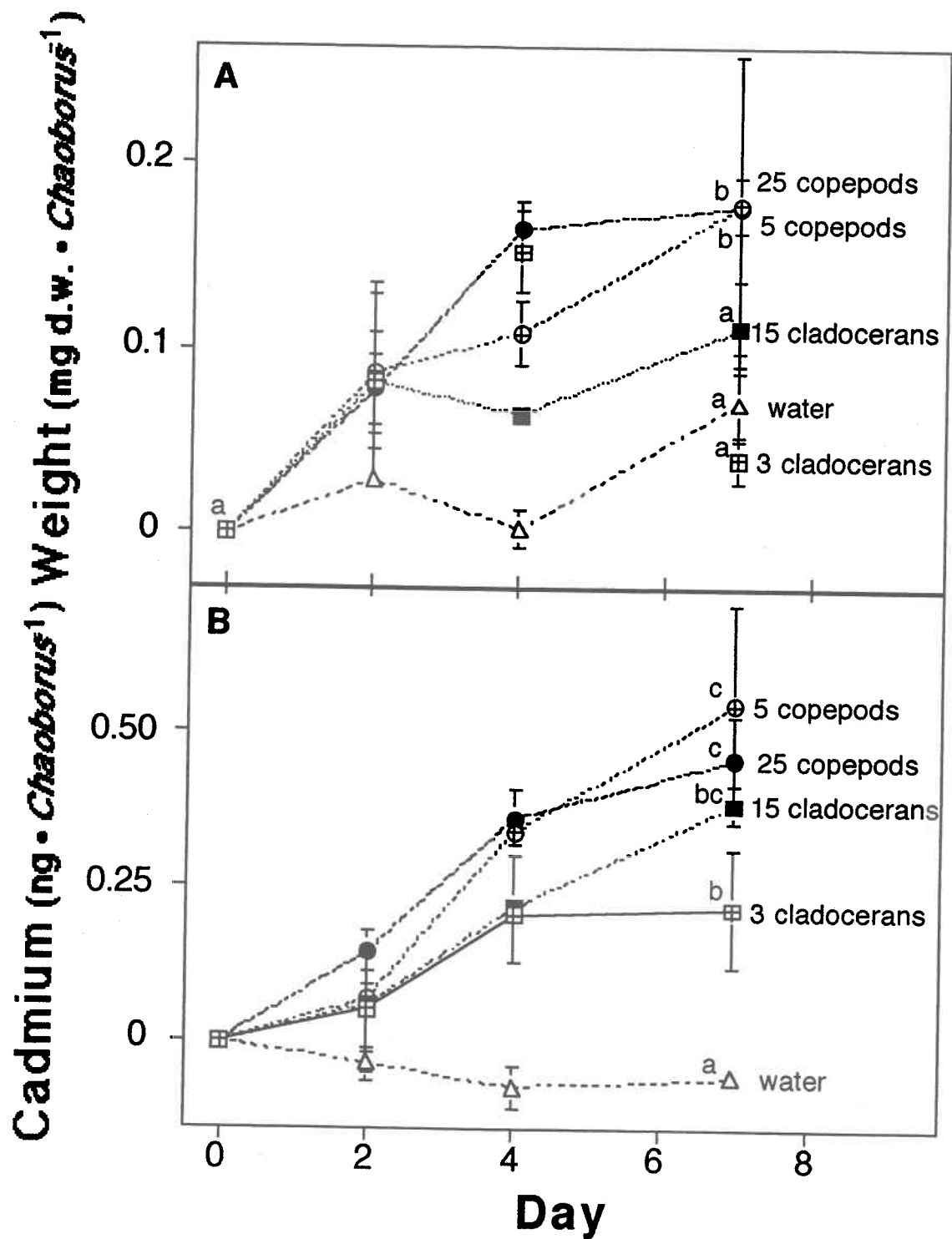


Figure 1. Temporal changes in *C. punctipennis* (A) dry weight and (B) Cd content for larvae exposed to Cd in water only or to Cd in both water and prey. Each prey type was offered to the predator in both low and high numbers, i.e., 3 or 15 cladocerans or 5 or 25 copepods per larva per day. Values are means (\pm SE) for the 3 replicate containers at each treatment level. Values on the vertical axis are net increases in larval

dry weight and Cd content above the values at the beginning of the experiment (0.07 ± 0.02 (\pm SD) mg d.w. larva⁻¹, $n = 6$, and 0.23 ± 0.01 (\pm SD) ng Cd larva⁻¹, $n = 3$, respectively). Different letters (a, b, c) indicate a significant difference in (A), among treatment levels ($p < 0.05$ ANOVA and SNK, based on a comparison of data at days 0 and 7) and in (B), among slopes ($p < 0.05$ ANCOVA, based on a comparison of values from days 0 to 7 for all treatment levels. In (B), the slope of the line for the nominal ratio of 0 prey predator⁻¹ is not significantly different from zero ($p > 0.05$).

Table 2. Cadmium assimilation efficiencies (% , see equation 1) for *C. punctipennis* larvae exposed to the metal in either copepods or cladocerans at one of 2 prey : predator ratios. Values are for larvae consuming Cd-rich prey for either 2, 4 or 7 days.

Days	cladocerans	copepods
	low prey : predator ratio	
2	44	55
4	102	146
7	90	129
mean (\pm SD)	79 (\pm 31)	110 (\pm 48)
	high prey : predator ratio	
2	11	26
4	33	37
7	37	36
mean (\pm SD)	27 (\pm 14)	33 (\pm 6)

The comparison of mean AE's between food types revealed no significant difference (overlap of SD) suggesting that the assimilation of Cd by *C. punctipennis* larvae is not influenced by the type of food consumed (Table 2). However, the calculated Cd AE for a given prey type was inversely proportional to the number of prey consumed. Variation in AEs has also been used to explain the results of an in situ experiment in which the Cd content of *C. punctipennis* larvae did not increase in spite of an increase in prey consumption (Munger et al. 1999b). Ingestion rates are also reported to be inversely related to assimilation efficiencies for phosphorus taken up by *Chaoborus trivitatus* (Giguère 1981) and various metals taken up by mussels (Wang et al. 1995). In both cases, the mechanism hypothesized to account for variations in AE is a higher rate of passage of food materials along the gut at high ingestion rates leading to greater losses of nutrients or metals in feces.

Cd biomonitoring model for Chaoborus

Because we measured no increase in the Cd content of larvae exposed to this metal in water only, the previously reported relationship between Cd concentrations in *Chaoborus* and those in water (Hare and Tessier 1996, 1998; Croteau et al. 1998) must be indirect, that is, Cd accumulation from water takes place in organisms at a lower level in the food web leading to *Chaoborus*. Given the importance of food for Cd accumulation in *C. punctipennis*, we expected that prey type and ingestion rate would influence predator Cd content in our experiments. If this were the case, then, these variables could be used to explain deviations of certain lakes (e.g. Lake Turcotte, Croteau et al. 1998) from model predictions. However, because the cladoceran and copepod prey that we used had the same Cd content and because their Cd was transferred with the same efficiency to the predator, we measured no difference in predator Cd content with prey type. Moreover, differences in predator ingestion rates had no effect on its Cd uptake because of the decreasing efficiency with which the metal was assimilated when larger quantities of food were consumed. Our data suggest that inter-lake variations in predator ingestion rate due to variations in prey abundance could be offset by decreases in Cd assimilation efficiency. However, because we used only two extreme prey densities, we cannot rule out the possibility that Cd assimilation efficiencies are constant up to a threshold ingestion rate above which they decline. Further experiments of this type are warranted, especially for metal uptake from rotifers about which we know very little in spite of the reported importance of these animals in the diet of *Chaoborus* (Hare and Carter 1987, Moore 1988). Rotifers are reported to dominate the zooplankton community of a lake that deviated from model predictions for Cd concentrations in *C. punctipennis* (Croteau et al. 1998).

Acknowledgments

Funding was provided by the US. Environmental Protection Agency, Human Resources Development Canada, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Quebec Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche. Comments on the manuscript were kindly provided by A. Tessier and J.-C. Aulair; technical assistance was furnished by M.-R. Doyon, R. Rodrigue and N. Simard. We thank N. Belzile for the use of his laboratory at Sudbury.

References

- Croteau, M-N., Hare, L., and Tessier, A. 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 1348-1353.
- Fedorenko, A.Y. 1975. Feeding characteristics and predation impact of *Chaoborus* (Diptera, Chaoboridae) larvae in a small lake. *Limnol. Oceanogr.* **20**: 250-258.
- Franzin, W.G., McFarlane, G.A., and Lutz, A. 1979. Atmospheric fallout in the vicinity of a base metal smelter at Flin Flon, Manitoba, Canada. *Environ. Sci. Technol.* **13**: 1513-1522.
- Giguère, L.A. 1981. Food assimilation efficiency as a function of temperature and meal size in larvae of *Chaoborus trivittatus* (Diptera: Chaoboridae). *J. Anim. Ecol.* **50**: 103-109.
- Hare, L., and Carter, J.C.H. 1987. Zooplankton populations and the diets of three *Chaoborus* species (Diptera, Chaoboridae) in a tropical lake. *Freshwat. Biol.* **17**: 275-290.
- Hare, L., Campbell, P.G.C., Tessier, A., and 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.
- Hare, L., and Tessier, A. 1996. Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature* **380**: 430-432.
- Hare, L., and Tessier, A. 1998. The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 1850-1859.
- Keller, W., and Conlon, M. 1994. Crustacean zooplankton communities and lake morphometry in precambrian shield lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **51**: 2424-2434.

- Luoma, S.N., Johns, C., Fisher, N.S., Steinberg, N.A., Oremland, R.S., and Reinfelder, J.R. 1992. Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. *Environ. Sci. Technol.* **26**: 485-491.
- Moore, M.V. 1988. Differential use of food resources by the instars of *Chaoborus punctipennis*. *Freshwat. Biol.* **19**: 249-268.
- Munger, C., and Hare, L. 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.
- Munger, C., Hare, L., Craig, A., and Charest, P.-M. 1999a. Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. *Aquat. Toxicol.*, **44**: 195-200.
- Munger, C., Hare, L., and Tessier, A. 1999b. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in nature. *Limnol. Oceanogr.*, under review.
- Nriagu, J.O., and Pacyna, J.M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* **333**: 134-139.
- Pacyna, J.M., Scholtz, M.T., and Li, Y.-F. 1995. Global budget of trace metal sources. *Environ. Rev.* **3**: 145-159.
- Phillips, D.J.H., and Rainbow, P.S. 1993. The early use of biomonitors. *In* *Biomonitoring of trace aquatic contaminants*. Edited by D.J.H. Phillips and P.S. Rainbow. Elsevier applied science, London. pp. 65-78.
- Reinfelder, J.R., and Fisher, N.S. 1991. The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science* **251**: 794-796.
- Spacies, A., and Hamelink, J.L. 1985. Bioaccumulation. *In* *Fundamentals of aquatic toxicology*. Edited by G.M. Rand and S.R. Petrocelli. Hemisphere Publishing Corporation, New York. pp. 495-525.
- Swift, M.C., and Fedorenko, A.Y. 1975. Some aspects of prey capture by *Chaoborus* larvae. *Limnol. Oceanogr.* **20**: 418-425.

- Thomann, R. V. 1981. Equilibrium model of fate of microcontaminants in diverse aquatic food chains. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**: 280-296.
- Verta, M., Rekolainen, S., Mannio, J., and Surma-Aho, K. 1986. Public. Water Res. Inst., Nat. Board Waters, Finland, **65**: 21-31.
- Wang, W.-X., Fisher, N.S., and Luoma, S.N. 1995. Assimilation of trace elements ingested by the mussel *Mytilus edulis*: effects of algal food abundance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **129**: 165-176.
- Wang, W.-X., and Fisher, N.S. 1996. Assimilation of trace elements and carbon by the mussel *Mytilus edulis*: Effects of food composition. *Limnol. Oceanogr.* **41**: 197-207.
- Yan, N.D., Mackie, G.L., and Dillon, P.J. 1990. Cadmium concentrations of crustacean zooplankton of acidified and nonacidified Canadian shield lakes. *Environ. Sci. Technol.* **24**: 1367-1372.

Annexe A

Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*

Aquatic Toxicology, 1999, 44: 195-200.

Catherine Munger^a, Landis Hare^a, Albert Craig^a and Pierre-Mathieu Charest^b

^a Université du Québec, INRS-Eau
C.P. 7500, Ste-Foy
Québec, Canada G1V 4C7

^b Département de phytologie
Université Laval, Québec,
Québec, Canada G1K 7P4

Résumé

La distribution interne d'un métal trace permet d'identifier l'organe susceptible de subir des effets toxiques et le système physiologique le plus susceptible d'être affecté. De plus, puisque la distribution d'un métal à l'intérieur d'un organisme influence vraisemblablement le taux et l'efficacité du transfert du métal vers les niveaux trophiques supérieurs, la mesure en laboratoire des paramètres de transfert trophique peut être influencée par la durée d'exposition de l'organisme au métal. Nous avons comparé la distribution interne du cadmium dans le cladocère *Ceriodaphnia dubia* destiné à être offert comme nourriture à l'insecte prédateur *Chaoborus* après une exposition de soit 1 jour ou de toute leur vie au métal. Les proies ont été exposées au $^{112+109}\text{Cd}$ dans l'eau (10nM) et leur nourriture (algues), tout comme dans la nature. La distribution interne du ^{109}Cd dans le cladocère a été déterminée par autoradiographie après exposition au métal des organismes entiers. La quantité de cadmium de même que la distribution de celui-ci dans la proie étaient semblables après les expositions à court et à long terme, suggérant que les paramètres d'accumulation du métal mesurés après une courte exposition sont valides pour cet organisme. Le cadmium s'est accumulé principalement dans les diverticules situés dans la partie antérieure du mésentéron, une région reconnue pour son rôle dans l'absorption des nutriments. Nous émettons l'hypothèse que le cadmium est accumulé dans les diverticules en raison de leur implication dans la prise en charge du calcium.

Abstract

The internal distribution of a trace metal can be useful in determining in which body organ toxic effects are most likely to occur and the animal function most likely to be affected. In addition, because a metal's distribution within an organism is likely to influence the rate and efficiency with which it is transferred to a higher trophic level, laboratory measurements of trophic transfer could be influenced by exposure duration. We compared the internal distribution of cadmium (Cd) in a cladoceran crustacean (*Ceriodaphnia dubia*) destined as food for a predatory insect (*Chaoborus*) after either a 1 d or a lifetime of exposure of prey to the trace metal. Prey were exposed to $^{112+109}\text{Cd}$ in both water (10 nM) and their food (algae), as might occur in nature. The internal distribution of ^{109}Cd in the cladoceran was determined by whole-animal autoradiography. Both the amount and the tissue distribution of Cd in prey were the same after the short and the long term exposures, suggesting that metal accumulation parameters measured after short-term metal exposures can be valid for this animal. Cadmium was mainly accumulated in diverticula of the anterior midgut, a region reported to be responsible for nutrient absorption. We hypothesize that Cd is accumulated in the diverticula because of their purported role as sites of calcium uptake.

Introduction

Trace metals such as cadmium (Cd) are major contaminants of aquatic environments that can be taken up by animals from water and food thereby causing toxic effects (Kay, 1985; Wright and Welbourn, 1994; Malley, 1996). Although aquatic animals are treated as black boxes in many ecotoxicological studies, knowledge of the internal distribution of a trace metal (e.g., Hare et al., 1991) can be useful in determining in which body organ toxic effects are most likely to occur and which animal function is most likely to be affected. Furthermore, a metal's internal distribution can influence its transfer to higher trophic levels by affecting the efficiency with which it is assimilated by a consumer. Consideration of internal metal partitioning is especially important when prey animals are experimentally exposed to metal prior to feeding to a predator. In the laboratory, organisms offered as food to a consumer are often exposed to the metal for only a short period of time relative to their lifetime. Such a procedure could yield food in which metal is bound in easily exchangeable pools (Jannasch et al., 1988) leading to an overestimation of the amount transferred to a consumer. Furthermore, prey tissues synthesized prior to the metal exposure might not be contaminated (Reinfelder and Fisher, 1994). Although long-term metal exposures are ideal, they tend to be costly in both time and effort.

We compared the internal distribution of Cd in the planktonic crustacean *Ceriodaphnia dubia* (Richard) after a short (1 d) or long (60 d) exposure to the metal. Cladocerans such as *C. dubia* are important prey for freshwater predators such as *Chaoborus* and have been used to study Cd transfer between primary and secondary consumers (Munger and Hare, 1997). *Ceriodaphnia dubia* is also widely used in toxicity tests because of its short life cycle and the ease with which it reproduces in the laboratory (Environment Canada, 1992).

We used whole-body microautoradiography to localize ^{109}Cd in *C. dubia*. This technique has several advantages: i) it is sensitive to all forms of metal including those bound to metalloproteins or in granules; ii) it is easily applied to organisms that are too small to dissect; iii) the use of sagittal sections of entire animals (whole-body) allows the simultaneous comparison of metal distributions in most of an individual's organs; iv) the application of a liquid photographic emulsion to glass microscope slides permits the observation of results directly on the tissues rather than on negatives as in traditional autoradiograms (Craig et al., 1997).

Methods

Rearing and ¹⁰⁹Cd exposure of C. dubia

Ceriodaphnia dubia was cultured at room temperature in dechlorinated tap water adjusted to a hardness of 180 mg L⁻¹ by the addition of magnesium and calcium chlorides in proportions of 1 : 3.5, respectively (Environment Canada, 1992). Food for the cladoceran consisted of the green alga *Selenastrum capricornutum*, (cultured in Bold Basal Medium prepared according to Starr and Zeikus, 1993), and an organic supplement (yeast, alfalfa and trout chow in approximately 1 : 1 : 1 proportions by dry weight).

To favor Cd distribution patterns that would be similar to what might be observed in nature, *C. dubia* were exposed to ¹⁰⁹Cd both in water and algae in a medium favorable for the coexistence and reproduction of both organisms. A concentration of 10 nM ¹¹²⁺¹⁰⁹Cd (167 GBq g⁻¹ specific activity) was used for the cladoceran/algal exposures, Cd concentrations this high have been measured in lakes subject to Cd deposition from metal smelters (Tessier et al., 1993; Hare and Tessier, 1996; Croteau et al., 1998).

We used two Cd exposure durations; a 1 d exposure, such as might be used in a short-term laboratory food-chain transfer experiment, versus a 60 d exposure in which animals could accumulate Cd over several generations, as might occur in nature. The life span of animals under our experimental conditions was about 30 d, whereas their generation time was about 5 d. To distinguish between the two treatment levels, we use the terms "1 d exposure" and "life-time exposure". Following Cd exposure, samples of 30 adult *C. dubia* (length ≈ 1 mm) were held in 100 μM EDTA for 5 min to remove the Cd sorbed on their exoskeleton. The animals were then placed in uncontaminated water containing ¹⁰⁹Cd-free algae for 30 min to allow them to eliminate their ¹⁰⁹Cd-rich gut contents. A 30 min depuration period is sufficient to allow the gut contents of *C. dubia* to be replaced 6 times (Munger and Hare, 1997), thereby removing all Cd-rich gut contents and any Cd adsorbed on the gut wall. ¹⁰⁹Cadmium accumulation was measured by gamma-counting (LKB Wallac 1282 Compugamma NaI(Tl) well-type counter; 60% counting efficiency for ¹⁰⁹Cd). Variations in counts due to the position of samples in vials were avoided by counting animals in a constant volume of water (1 mL) in a single type of vial. Counts per minute were converted to Cd concentrations per gram of *C. dubia* based on the specific activity of the Cd solutions used and a mean dry weight of 0.368±0.019 mg (±S.D.) for 5 pooled samples of 30 individuals.

Autoradiography

The same reagent solutions were used for all specimens at each step of the autoradiographic process to ensure that Cd-exposure patterns could be compared among specimens. *Ceriodaphnia dubia* from the short-term and long-term exposures were fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) containing 0.5% tannic acid to prevent translocation of Cd within tissues (Murakami and Webb, 1981; Craig et al., 1997). Samples of 30 *C. dubia* were dehydrated to toluene and were embedded in paraffin in a random orientation. Sections of 10 μm thickness were placed on microscope slides, exposed to 2% paraformaldehyde vapor to harden the gelatin, then deparaffinized with toluene. Craig et al. (1997) measured negligible Cd loss from insect tissues during fixation and dehydration to toluene, suggesting that the Cd distribution patterns observed in our crustacean are unlikely to be artifacts of the histological techniques employed. All slides were dipped at the same time in a single batch of Kodak NTB-3 nuclear track emulsion in a darkroom maintained at 30°C with a relative humidity of 80%, and dried and refrigerated in the dark for 20-24 d of exposure. When test slides showed sufficient autoradiographic labeling, all remaining slides were developed shortly thereafter (at 24 d) at 14°C in Kodak D-19 for 4 min. Sections were stained with methylene blue. Fifty *C. dubia* per exposure time were examined under a light microscope. Craig et al. (1997) demonstrated that slides of animals not exposed to ^{109}Cd show no labeling.

Results & Discussion

Cadmium concentrations in whole fresh *C. dubia* were not significantly different ($p > 0.05$, t -test on log transformed data) after either a 1 d or a 60 d Cd exposure; that is, mean Cd concentrations (\pm S.D.) in samples of 30 animals from the two treatments levels were 64 (± 4 , $n = 3$) and 53 (± 7 , $n = 8$) $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ d.w., respectively. This rapid achievement of steady-state Cd concentrations was also observed in a previous study in which Cd concentrations in *C. dubia* reached 90% of their maximum value after a 1 d exposure to Cd from water and food (Munger and Hare, 1997). These whole-animal data suggest that short term Cd exposures would be sufficient to produce animals having the same Cd concentrations as those exposed to the metal for several generations. However, because the internal distribution of Cd could influence its availability to a predator, total animal concentrations alone might not be sufficient to justify short term prey exposures to metal.

The anatomy of a cladoceran is presented in schematic view (Fig. 1). All *C. dubia* showed the same Cd distribution pattern; complete individuals that were cut by chance along either their longitudinal or cross sectional axis are presented in figure 2 to facilitate the recognition of animal structures. Autoradiographic labeling was weak on the exoskeleton of

C. dubia (Fig. 2), as might be expected since external Cd had been removed from animals by desorption in EDTA. The removal of sorbed Cd is clearly necessary to avoid externally sorbed Cd obscuring internal Cd distribution patterns (as in Carney et al., 1986). A weakly labeled exoskeleton is also consistent with the reportedly small amounts of Cd present in the exoskeleton matrix of *C. dubia* (Munger and Hare, 1997). In contrast, substantial amounts of Cd are reported in the exoskeleton of some larger crustacean species, i.e., from 24 to 50% of the body total in the amphipod *Gammarus pulex* (Wright, 1980) and the shrimp *Palaemon elegans* (White and Rainbow, 1986), respectively.

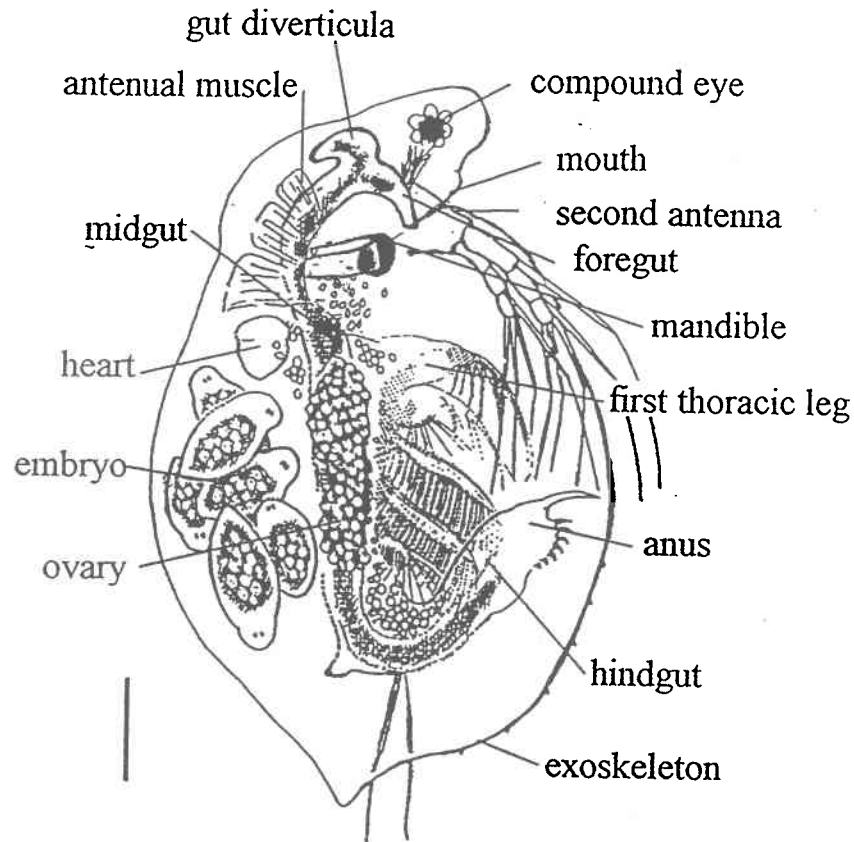


Figure 1. Schematic view of *Ceriodaphnia* sp. Scale bar represents 0.1 mm. Figure redrawn from Dodson and Frey (1991).

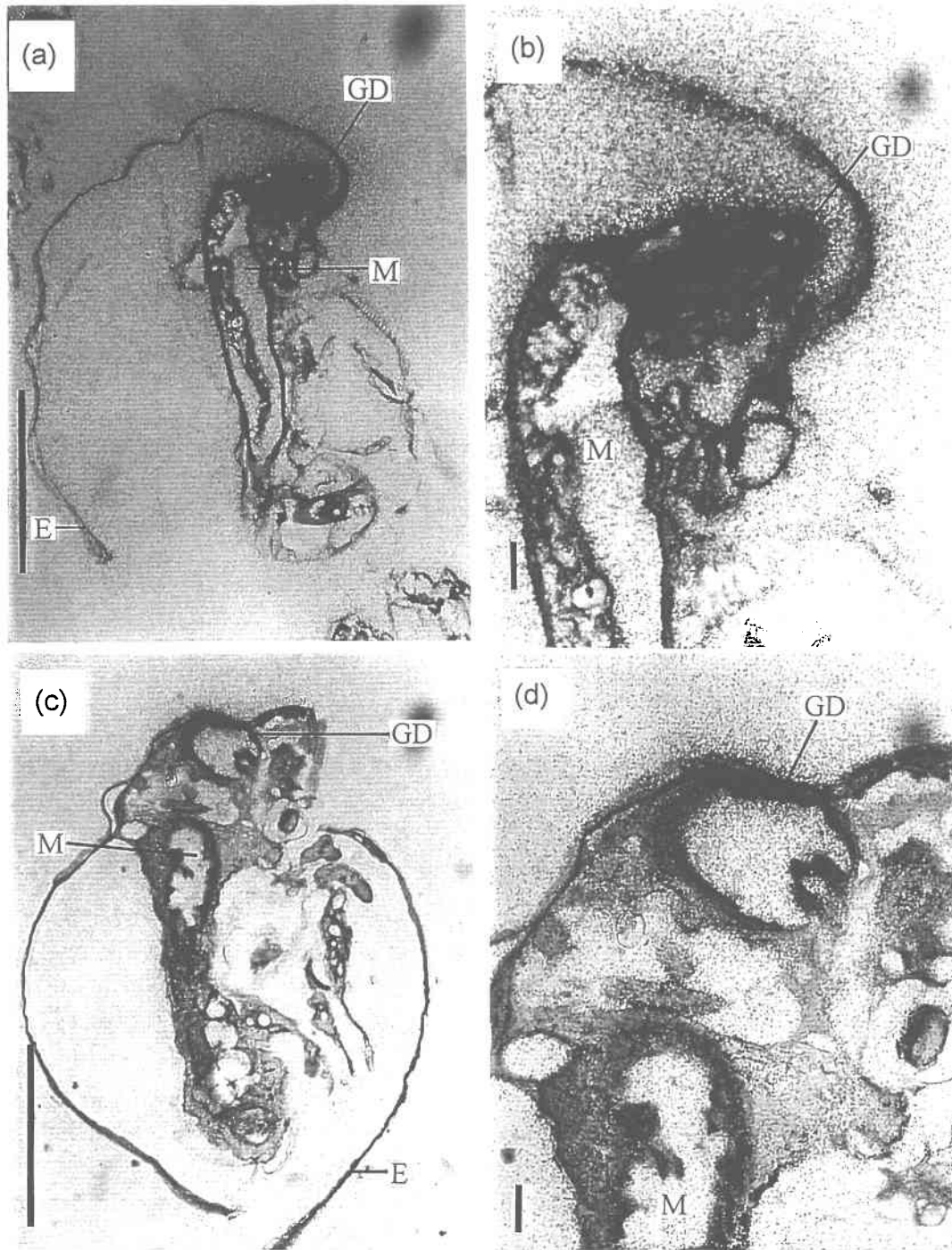


Figure 2. Sagittal sections showing Cd accumulation sites in two typical *C. dubia* individuals as revealed by autoradiographic labeling (regions of black points): low (a and c) and high (b and d) magnification views of individuals that were exposed to Cd for either 60 d (a) and (b) or 1 d (c) and (d). GD= gut diverticula; E=exoskeleton; M=midgut. Scale bar represents 500 μm in a and c, and 50 μm in b and d.

Autoradiographic labeling was strongly concentrated in the anterior midgut region, especially in the gut diverticula - a pair of sacs that curve backward from the midgut to terminate blindly behind the animal's eye (GD, Fig. 1). The gut diverticula of a related species, *Daphnia magna*, are reported to undergo a dramatic change in structure following Cd exposure (Griffiths, 1980), suggesting that these organs are the major site of Cd accumulation in these cladocerans as well. Although the function of the midgut region (including the diverticula) has not been studied in *C. dubia*, nutrients are reported to be taken up mainly in this region in the cladoceran *Daphnia pulex* (Schultz and Kennedy, 1976). Because Cd is thought to cross animal membranes mainly at uptake sites for calcium (Simkiss and Taylor, 1995; Craig et al., 1998), a consequence in part of the similar ionic radii of the two ions (Pauling, 1960), our results suggest that the gut diverticula function in Ca exchange. This hypothesis is supported by the fact that Ca-rich granules can be observed in intercellular channels located in the diverticula of Cd-exposed *D. magna* (Griffiths, 1980). From this observation it has been hypothesized that Cd-exposure impairs Ca metabolism and eventually gut diverticula morphology (Griffiths, 1980). The generally high Ca requirements of crustaceans compared to insects (Taylor, 1986) could explain the greater sensitivity of crustaceans to acute Cd exposures than their arthropod cousins (Williams et al., 1985).

Because the gut was the major organ in which we observed Cd accumulation after both short and long term Cd exposures, this organ is likely to be the site at which the animal's physiology is affected and thus at which toxic effects occur. Furthermore, given the reportedly small loss rates of Cd from *C. dubia* (Munger and Hare, 1997), it seems likely that there is little transfer of Cd to other body organs; if this had been the case, then Cd in organs other than the gut should have been visible in autoradiographs of animals exposed to the metal for their lifetime. However, because our study was not designed to reveal the presence of minor accumulation sites, we cannot rule out the possibility that they were hidden by the strong labeling of the gut diverticula. Feeding contaminated animals Cd-free algae would allow the measurement of Cd movement from gut tissues to other organs and to the surrounding water. Studies at the biochemical level have indicated that the majority of the Cd in *C. dubia* is found in the non-lipid fraction regardless of the Cd-exposure duration (Munger and Hare, 1997). The fact that the internal distribution of Cd in *C. dubia* achieves steady state rapidly and does not appear to vary over time could make this animal a good candidate as prey for use in Cd trophic transfer experiments. Laboratory experiments designed to study the accumulation of Cd from planktonic food as well as the efficiency with which the metal is assimilated by predators could rely on *C. dubia* that have been exposed to Cd for only 1 d to produce patterns representative of those likely to occur in animals exposed to the metal throughout their lifetime.

Acknowledgments

Funding for our study was provided by Human Resources Development Canada, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec. Technical assistance was furnished by A. Goulet.

References

- Carney, G.C., Shore, P. and Chandra, H., 1986. The uptake of cadmium from a dietary and soluble source by the crustacean *Daphniamagna*. Environ. Res., 39: 290-298.
- Craig A., Hare, L., Charest, P.-M. and Tessier, A., 1997. Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in *Chironomus staegeri* larvae (Insecta, Diptera). Aquat. Toxicol., 41: 265-275.
- Craig A., Hare, L. and Tessier, A., 1998. Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri*. Aquat. Toxicol., in press.
- Croteau M.-N., Hare, L. and Tessier, A., 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. Environ. Sci. Technol., 32: 1348-1353.
- Dodson, S.I. and Frey, D.G., 1991. Cladocera and other Branchiopoda. In: J.H. Thorp and A.P. Covich (Editors), Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press, San Diego, pp. 723-786.
- Environment Canada, 1992. Biological test method: Test of reproduction and survival using the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Report EPS 1/RM/21. Environmental Protection Publishers, Environment Canada, Ottawa.
- Griffiths, P.R.E., 1980. Morphological and ultrastructural effects of sublethal cadmium poisoning on *Daphnia*. Environ. Res., 22: 277-284.
- Hare, L. and Tessier, A., 1996. Predicting animal cadmium concentrations in lakes. Nature, 380: 430-432.

- Hare, L., Saouter, E., Campbell, P.G.C., Tessier, A., Ribeyre, F. and Boudou, A., 1991. Dynamics of cadmium, lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* (Ephemeroptera) and the environment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 39-47.
- Jannasch, H.W., Honeyman, B.D., Balistrieri, L.S. and Murray, J.W., 1988. Kinetics of trace metal uptake by marine particles. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52: 567-577.
- Kay, S.H., 1985. Cadmium in aquatic food webs. *Res. Reviews*, 96: 13-43.
- Malley, D.F., 1996. Cadmium whole-lake experiment at the experimental lakes area: an anachronism? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 1862-1870.
- Munger, C. and Hare, L., 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.
- Murakami, M. and Webb, M., 1981. A morphological and biochemical study of the effects of L-cysteine on the renal uptake and nephrotoxicity of cadmium. *Br. J. exp. Pathol.*, 62: 115-130.
- Pauling, L. (Editor), 1960. *The nature of the chemical bond*, 3rd edition. Cornell University Press, Ithaca, N.Y., 644 pp.
- Reinfelder, J.R. and Fisher, N.S., 1994. Retention of elements absorbed by juvenile fish (*Menidia menidia*, *Menidia beryllina*) from zooplankton prey. *Limnol. Oceanogr.*, 39: 1783-1789.
- Simkiss, K. and Taylor, M.G., 1995. Transport of metals across membranes. In: A. Tessier and D.R. Turner (Editors), *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. John Wiley and Sons, N.Y., pp. 1-44.
- Schultz, T.W. and Kennedy, J.R., 1976. The fine structure of the digestive system of *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera). *Tissue Cell*, 8: 479-490.
- Starr, R.C. and Zeikus, J.A., 1993. UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.*, 29 (Suppl.): 1-106.

- Taylor, C.W., 1986. Calcium regulation in insects. In: P.D. Evans and V.B. Wigglesworth (Editors), *Advances in insect physiology*. Academic Press, London, pp. 155-186.
- Tessier, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C. and Auclair, J.-C., 1993. Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*. *Limnol. Oceanogr.*, 38: 1-17.
- White, S.L. and Rainbow, P.S., 1986. Accumulation of cadmium by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Biol.*, 32: 17-25.
- Williams, K.A., Green, D.W.J. and Pascoe, D., 1985. Studies on the acute toxicity of pollutants to freshwater macroinvertebrates 1. cadmium. *Arch. Hydrobiol.*, 102: 461-471.
- Wright, D.A., 1980. Cadmium and calcium interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Freshwat. Biol.*, 10: 123-133.
- Wright, D.A. and Welbourn, P.M., 1994. Cd in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ. Rev.*, 2: 187-214.

Annexe B

Distribution interne du ^{109}Cd chez la larve aquatique de *Chaoborus punctipennis* (Insecta, Diptera) suite à une exposition via l'eau et/ou la nourriture, mesurée par autoradiographie

Méthodologie

Collecte des organismes

Les larves de *Chaoborus punctipennis* proviennent du lac St-Joseph (30 km NO de la ville de Québec). Elles ont été collectées dans la colonne d'eau à l'aide d'un filet à plancton de $350\ \mu\text{M}$, pendant la nuit à la mi-septembre. Une fois au laboratoire, les individus ont été soigneusement triés puis acclimatés, pendant 24 heures avant le début de l'expérience, dans une eau de même composition en sels que celle du lac St-Joseph.

Contamination en ^{109}Cd .

Les expériences impliquant *Chaoborus* ont été réalisées dans une chambre à environnement contrôlé maintenue à 10°C sans lumière. Elles ont été menées, en duplicat, dans des microcosmes en HDPE (high density polyethylene, 1 L) contenant chacun une trentaine de *Chaoborus* et 850 ml d'eau du lac reconstituée. Deux traitements d'exposition au cadmium radioactif ont été réalisés, soient "nourriture", et, "eau + nourriture". Notons que le choix des traitements repose sur un modèle additif d'entrée des métaux, suggérant que la somme de métal entrant par la nourriture et l'eau égale la quantité totale de métal entrant dans l'organisme (Hare, 1992). Aussi, le traitement "Eau" seulement n'a pas été réalisé, craignant le biais biologique qu'entraîne la comparaison entre des animaux nourris et à jeun. L'eau du traitement "eau + nourriture" a été enrichie de 10 nM de cadmium sous la forme $^{109}\text{CdCl}_2$ (activité spécifique = 4,52 Ci/g). La nourriture des deux traitements "nourriture" et "eau + nourriture", ajoutée en excès quotidiennement, était constituée d'une culture du cladocère *Ceriodaphnia dubia* dont la concentration était en équilibre avec son environnement (10 nM Cd_{total}) puisque contaminée depuis plusieurs générations via l'eau et les algues (Munger et al. 1999). Le changement journalier du 3/4 de l'eau de chaque microcosme permettait d'enlever les cladocères restants et de garder les concentrations de cadmium dans l'eau aux niveaux désirés; des analyses en cadmium sur des échantillons d'eau prélevés juste avant le

changement ont d'ailleurs démontré des concentrations non-déetectables. Aussi, des analyses de teneurs en Cd réalisées chez les cladocères qui n'avaient pas été mangés après 24 heures ont démontré une perte négligeable de Cd, même pour ceux dans l'eau non contaminée.

Échantillonnage

Après 7 jours d'exposition, les *Chaoborus* ont été échantillonnés et trempés dans 10 μ M d'EDTA pour enlever le métal adsorbé sur l'exosquelette. Une dépuratation de 24 heures dans de l'eau et des cladocères sans cadmium a précédé l'analyse au compteur gamma pour leur teneur en cadmium radioactif.

Préparation pour l'autoradiographie

Après avoir été endormis aux vapeurs de chloroforme pendant 30 secondes, les organismes ont été fixés à 4 °C pendant 12 à 14 heures avec le glutaraldéhyde 1% dans un mélange d'alcool éthylique 95%, d'acide acétique glacial, de formaldéhyde et d'acide tannique. Les individus ont été graduellement déshydratés jusqu'au toluène puis enrobés, deux à deux, dans la paraffine. Des coupes de 10 μ m ont été placées sur des lames puis autoradiographiées après avoir été déparaffinées.

Autoradiographie

Dans une enceinte à 25°C saturée à 80-85% en humidité, les lames ont été trempées dans l'émulsion NTB-3 de Kodak, remontées automatiquement de façon à former une couche uniforme, et asséchées pendant 45 minutes. Elles ont été exposées dans le noir total pendant 35 jours à 4°C puis développées à 14°C avec le révélateur D-19 et fixateur Kodafix, de Kodak. Les sections ont finalement été colorées au bleu de méthylène avant d'être montées au Permout et observées au microscope photonique.

Résultats

Les concentrations de Cd accumulées après 7 jours par des larves d'insectes exposées à l'eau et la nourriture ou à la nourriture contaminée seulement, ont été mesurées chez des organismes entiers avant leur préparation histologique pour l'autoradiographie. Le tableau 1 n'indique aucune différence significative (test *t*, $\alpha=0,005$) entre les deux groupes d'animaux. Ceci suggère que l'eau compterait de façon négligeable pour l'accumulation du cadmium. Vu l'importance de la nourriture pour la contamination de *Chaoborus* et sa présence dans les deux traitements expérimentaux, la distribution interne a été comparée chez des animaux ayant tous la même teneur en Cd.

Tableau 1. Moyennes des concentrations de Cd accumulé par *Chaoborus punctipennis* après une exposition via l'“Eau et la Nourriture” à la fois, vs via la “Nourriture” seulement. Mesures réalisées sur des organismes entiers avant leur préparation histologique pour l'autoradiographie. (Chaque échantillon (n) est composé de 20 organismes)

Type d'exposition	[Cd]	É-T
Eau + Nourriture (n= 3)	0,21 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ p.s.	± 0,01
Nourriture (n= 3)	0,26 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ p.s.	± 0,03

Notons que lors de cette expérience, la concentration de cadmium dans l'eau du traitement “Eau + Nourriture” est demeurée stable à 8,1 nM (CV= 4%) et celle du traitement “Nourriture” est demeurée négligeable à 24 pM (CV= 76%). La concentration des cladocères donnés comme nourriture a été supposée stable à 2,6 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ p.s (CV= 19%) puisqu'il s'agissait d'organismes élevés depuis plusieurs générations dans le milieu contaminé.

Afin de mieux visualiser, à l'échelle d'un diptère, les lieux où le métal se distribue, la Figure 1 présente l'anatomie interne de *Chaoborus*. Cette vue schématique d'un organisme entier permet, en l'occurrence, de distinguer les trois parties du tractus digestif : le stomodéum ou la partie antérieure, le mésentéron ou la partie centrale, et le proctodéum ou la partie postérieure.

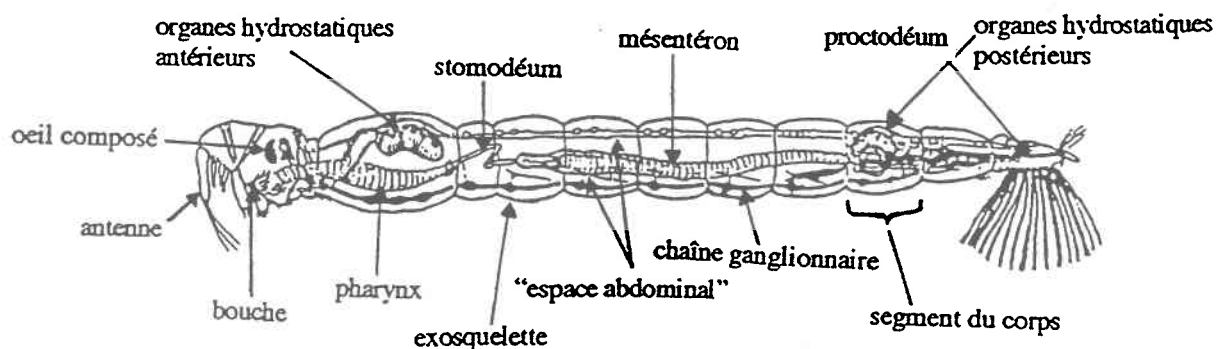


Figure 1. Schéma d'une larve de *Chaoborus* présentant l'anatomie interne en vue latérale. (Sæther, 1972, d'après SCHÖNFELD, 1957).

Les sites d'accumulation du ^{109}Cd pour toutes les larves d'insecte aquatique *Chaoborus punctipennis* qui ont été autoradiographiées sont : le mésentéron (Figure 2), le pharynx (Figure 3), les organes hydrostatiques (Figure 4) et l'exosquelette (Figure 5).

De façon détaillée, il semble que la paroi du mésentéron des organismes autoradiographiés serait un lieu d'accumulation du métal, tant pour les animaux exposés à l'eau et la nourriture contaminés que pour ceux exposés à la nourriture contaminée seulement. La Figure 2 (c,d,e et f) présente quatre exemples de cette observation. Bien que le marquage soit discret, on remarque que le mésentéron des organismes autoradiographiés est révélé en comparaison avec celui des organismes non autoradiographiés (Figure 2, a et b). Cette comparaison entre mésentérons d'organismes qui ont subi ou non l'autoradiographie indique aussi que l'émulsion photographique est en effet responsable de la révélation des sites d'entrée, et ce visiblement par oxydation des grains d'argent de l'émulsion sous l'effet de la radioactivité. Bien que la Figure 2 présente des photographies du milieu du mésentéron, les parties antérieure et postérieure semblent aussi révélées ; cependant le marquage y est encore moins évident.

Le mésentéron n'est peut-être pas la seule partie du tractus digestif à accumuler le cadmium. Selon la Figure 3, la paroi du pharynx des *Chaoborus* ayant subi les deux traitements semble aussi marquée. La Figure 3 (a) présente le diaphragme du pharynx d'un *Chaoborus* exposé au cadmium via l'eau et la nourriture, alors que la Figure 3 (b) montre le pharynx en amont du diaphragme, contenant une proie non-contaminée. Cette proie a été ingérée pendant la période de dépuración.

D'autre part, la Figure 4 montre que l'entrée et/ou l'accumulation du cadmium se fait par l'exosquelette. De façon surprenante, tant les animaux exposés à la nourriture seulement (Figure 4, a) que ceux exposés aux deux voies d'entrée (Figure 4, b) semblent avoir un exosquelette marqué. Malgré la discrétion du marquage, le rôle de l'exosquelette dans l'entrée et/ou l'accumulation des métaux peut être non négligeable compte tenu du fait que la section photographiée ne présente qu'une infime portion de l'exosquelette entier.

Enfin, les dernières structures dont le marquage s'avère identique pour les animaux des deux traitements sont les organes hydrostatiques antérieurs et postérieurs par rapport à l'organisme. Selon nos observations, le métal serait spécifiquement associé aux points de pigmentation, contenus dans la paroi des organes hydrostatiques (Figure 5, b et c). Ces points de pigmentation sont évidents chez un organisme non autoradiographié puisqu'ils sont noirs (Figure 5, a). Le marquage chez les organismes autoradiographiés est révélé par un nuage de points noirs au pourtour des points de pigmentation.

À titre d'observation, il est intéressant de souligner que deux *Chaoborus* sur environ quinze observés suite à l'exposition à la nourriture contaminée seulement, avaient un

marquage distinctif. La Figure 6 (a) présente une distribution homogène du marquage au niveau du milieu du mésentéron. En effet, tant l'exosquelette, les muscles, l'espace abdominal que le mésentéron lui-même semblent révélés. Chez un de ces individus, les muscles formant la jonction entre deux segments du corps sont particulièrement révélés (Figure 6,b). La raison de ces marquages distinctifs est inconnue ; ils constituent peut-être des artefacts.

Par ailleurs, la Figure 7 met en évidence deux problèmes associés à l'émulsion autoradiographique qui rend difficile l'interprétation des résultats. D'abord, l'émulsion s'est plus ou moins déplacé sur les lames lors de leur développement, entraînant avec elle les grains d'argent révélés (Figure 7, a). Puisque les lames dont l'émulsion s'était déplacée ont été éliminées, seulement une quinzaine de *Chaoborus* de chaque traitement étaient observables après autoradiographie. Aussi, il est parfois possible d'observer du marquage dans deux plans différents ; la Figure 7 (b) présente la même partie d'un *Chaoborus* qu'en Figure 7 (a) mais avec une mise au point différente. En (a), on remarque que principalement l'exosquelette est marqué, alors qu'en (b), les muscles le deviennent. Ces problèmes d'émulsion sont probablement dus à une couche trop épaisse qui adhère moins bien aux lames et prend une apparence "ondulée" après développement. L'épaisseur de la couche d'émulsion sur les lames est modulée tant par la viscosité de l'émulsion liquide lors du trempage que par la vitesse de séchage. On suppose que l'utilisation d'une nouvelle enceinte à environnement contrôlé aurait accéléré le séchage au point de faire figer l'émulsion rapidement après le trempage, l'empêchant ainsi de s'écouler le long de la lame.

Il est également intéressant de voir l'effet du fixateur glutaraldéhyde utilisé seul, (3% dans le tampon cacodylate) sur les tissus de *Chaoborus*. Tel que le présente la Figure 8, il ne possède pas le pouvoir préservatif du mélange glutaraldéhyde (1%), formaldéhyde, acide acétique, alcool éthylique, mélange utilisé chez les animaux qui font l'objet des résultats.

Il est à noter que les résultats des Figure 6, 7 et 8 ont été présentés à titre d'information seulement ; ils ne feront pas l'objet de la discussion.

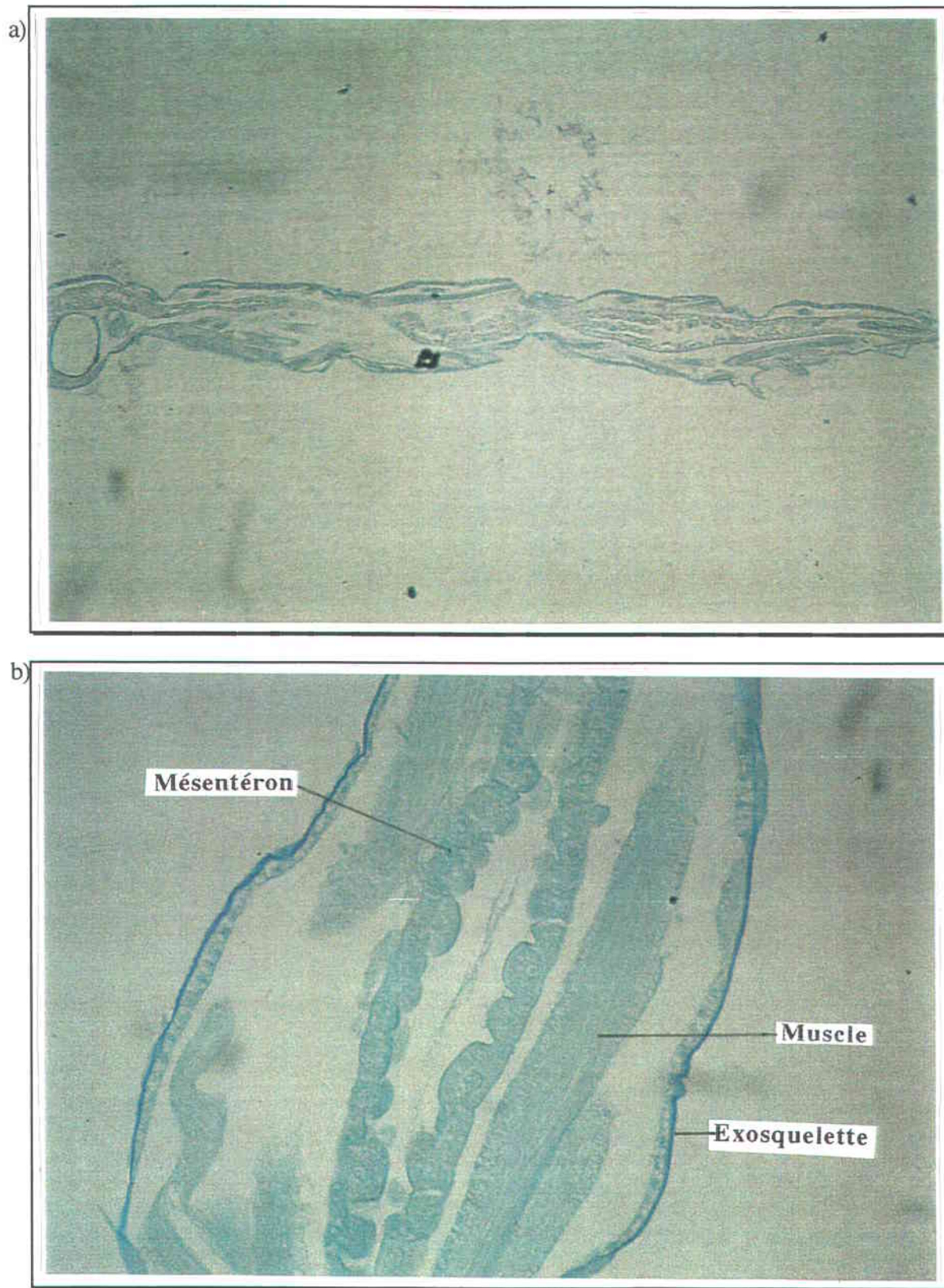


Figure 2. Microphotographies photoniques du milieu du mésentéron, en coupe longitudinale, chez : (a) et (b) deux *Chaoborus* non autoradiographiés (12,5X et 62,5 X);

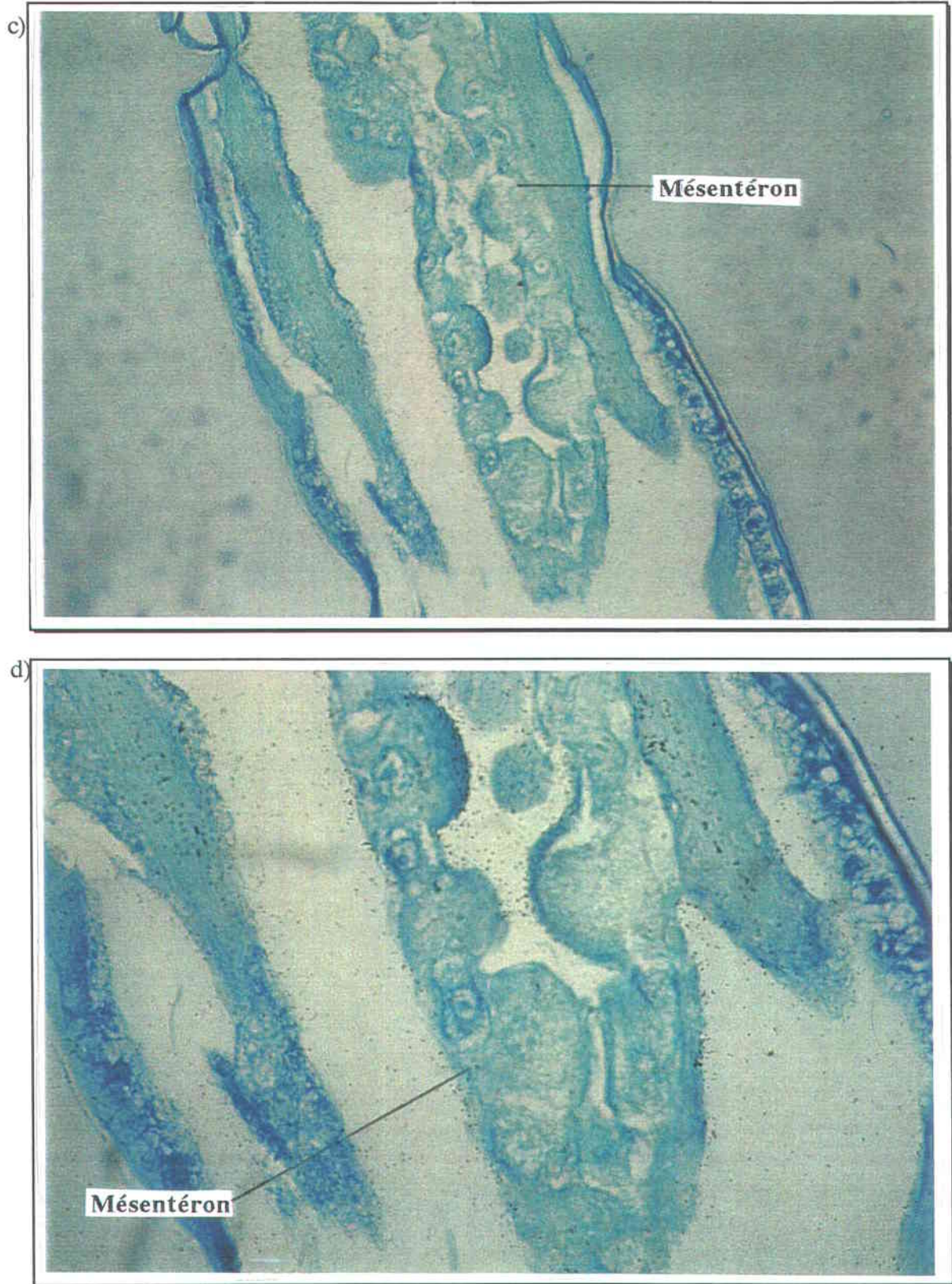


Figure 2. Microphotographies photoniques du milieu du mésentéron, en coupe longitudinale, chez : (c) et (d) un *Chaoborus* autoradiographié, exposé au Cd via l'eau et la nourriture (62,5X et 125X);

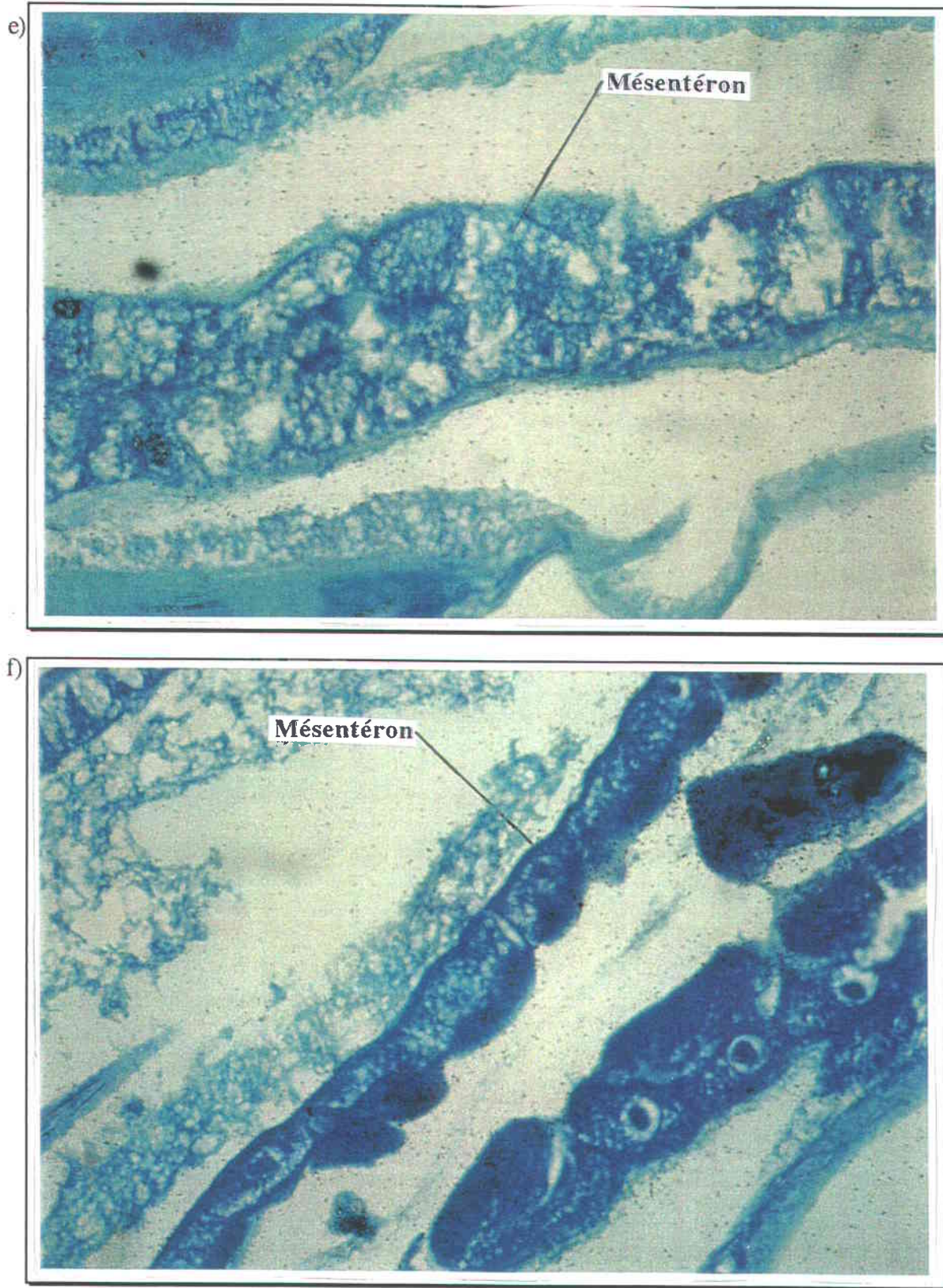


Figure 2. Microphotographies photoniques du milieu du mésentéron, en coupe longitudinale, chez : (e) et (f) deux *Chaoborus* autoradiographiés, exposés au cadmium via la nourriture seulement (125X).

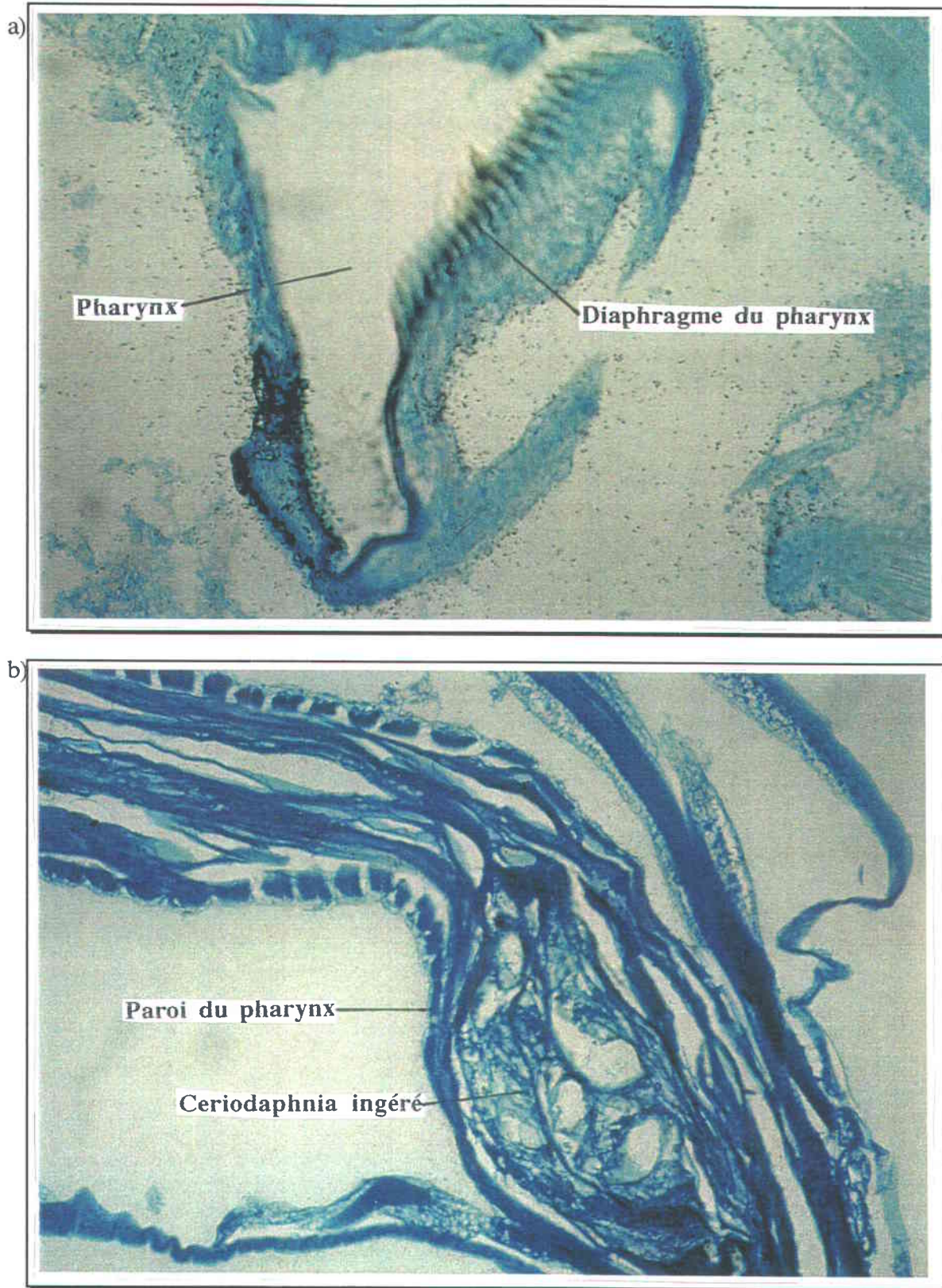


Figure 3. Microphotographies photoniques montrant l'accumulation du ^{109}Cd dans la paroi du pharynx de *Chaoborus*, suite à une exposition (a) via l'eau et la nourriture (125X), et (b) via la nourriture seulement (125X).

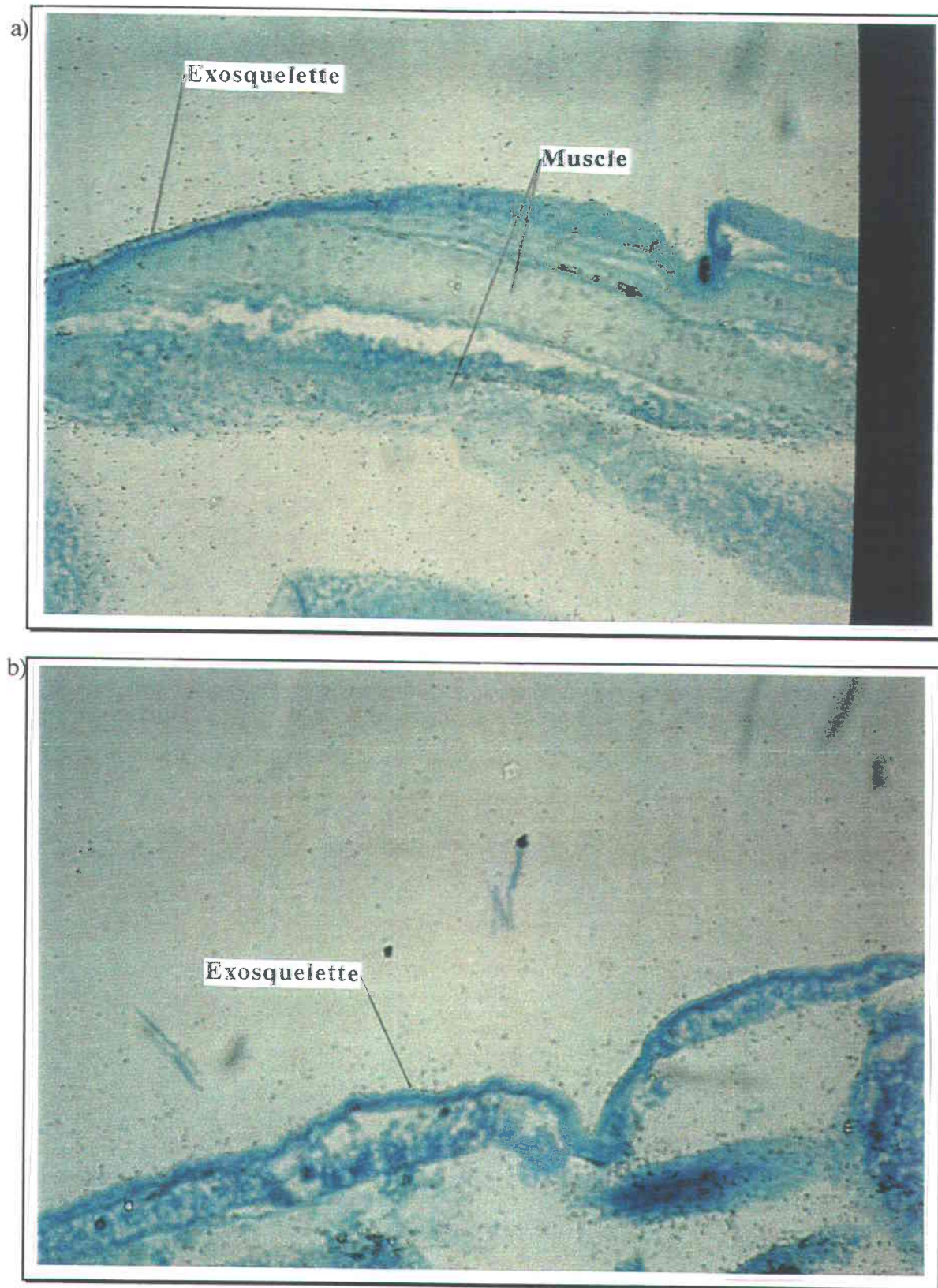


Figure 4. Microphotographies photoniques montrant l'accumulation du ^{109}Cd dans l'exosquelette de *Chaoborus*, suite à une exposition (a) via l'eau et la nourriture (125X), et (b) via la nourriture seulement (125X).

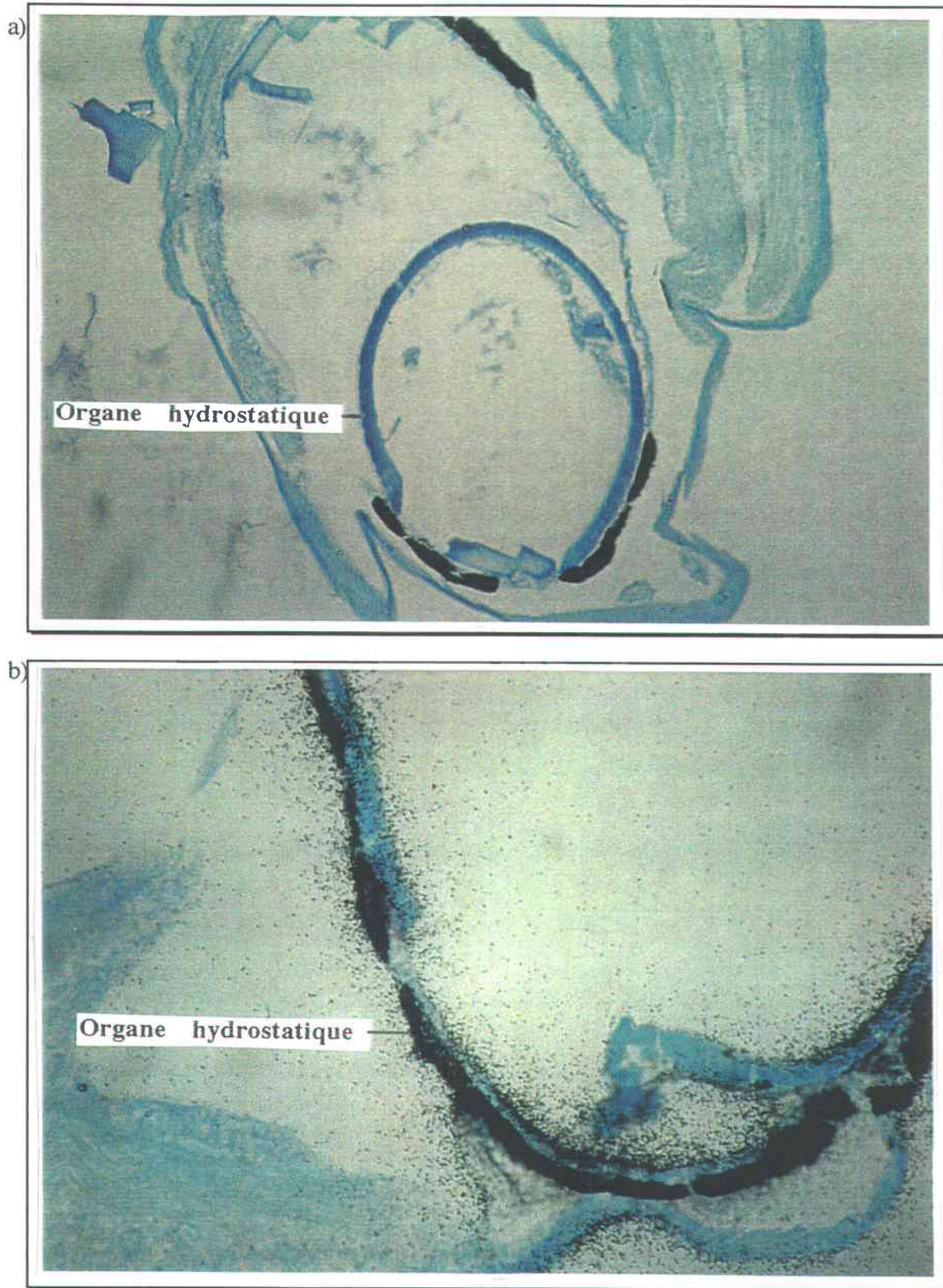


Figure 5. Microphotographies photoniques des organes hydrostatiques (antérieurs ou postérieurs), en coupe longitudinale, chez: (a) un *Chaoborus* non autoradiographié (62,5 X); (b) un *Chaoborus* autoradiographié, exposé au Cd via l'eau et la nourriture (125X);

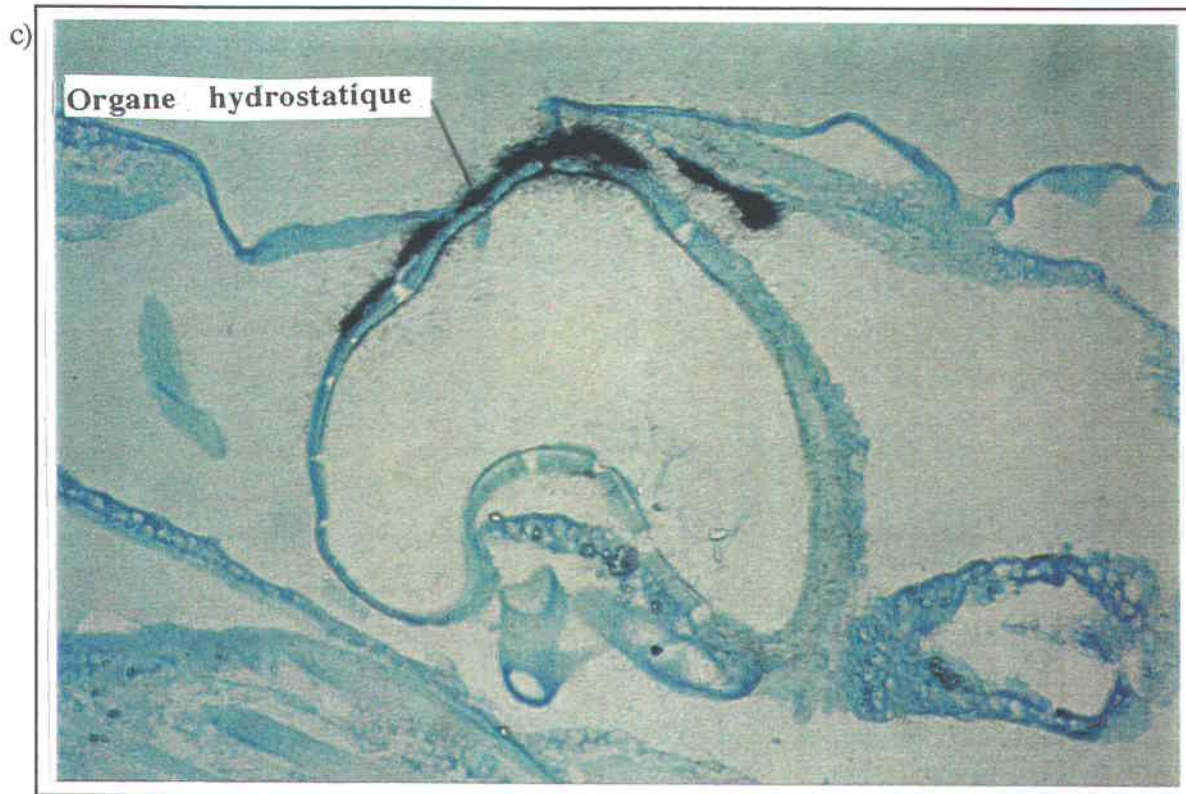


Figure 5. Microphotographies photoniques des organes hydrostatiques (antérieurs ou postérieurs), en coupe longitudinale, chez : (c), un *Chaoborus* autoradiographié, exposé au Cd via la nourriture seulement (62,5X).

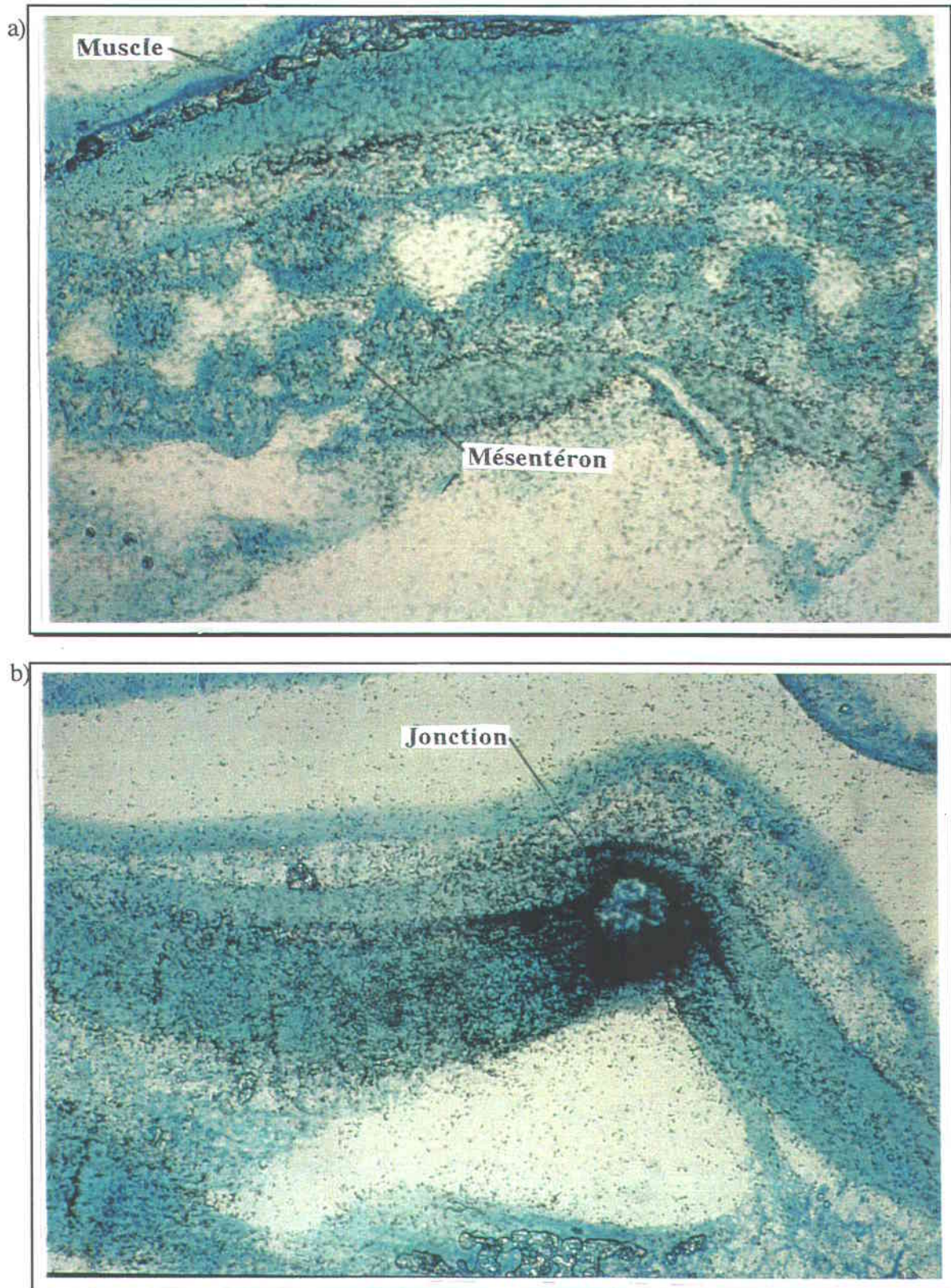


Figure 6. Microphotographies photoniques montrant une super-accumulation du ^{109}Cd dans deux *Chaoborus* exposés à la nourriture contaminée seulement : (a) dans le mésentéron et l'exosquelette (62,5X), (b) dans la jonction de deux segments du corps (125X).

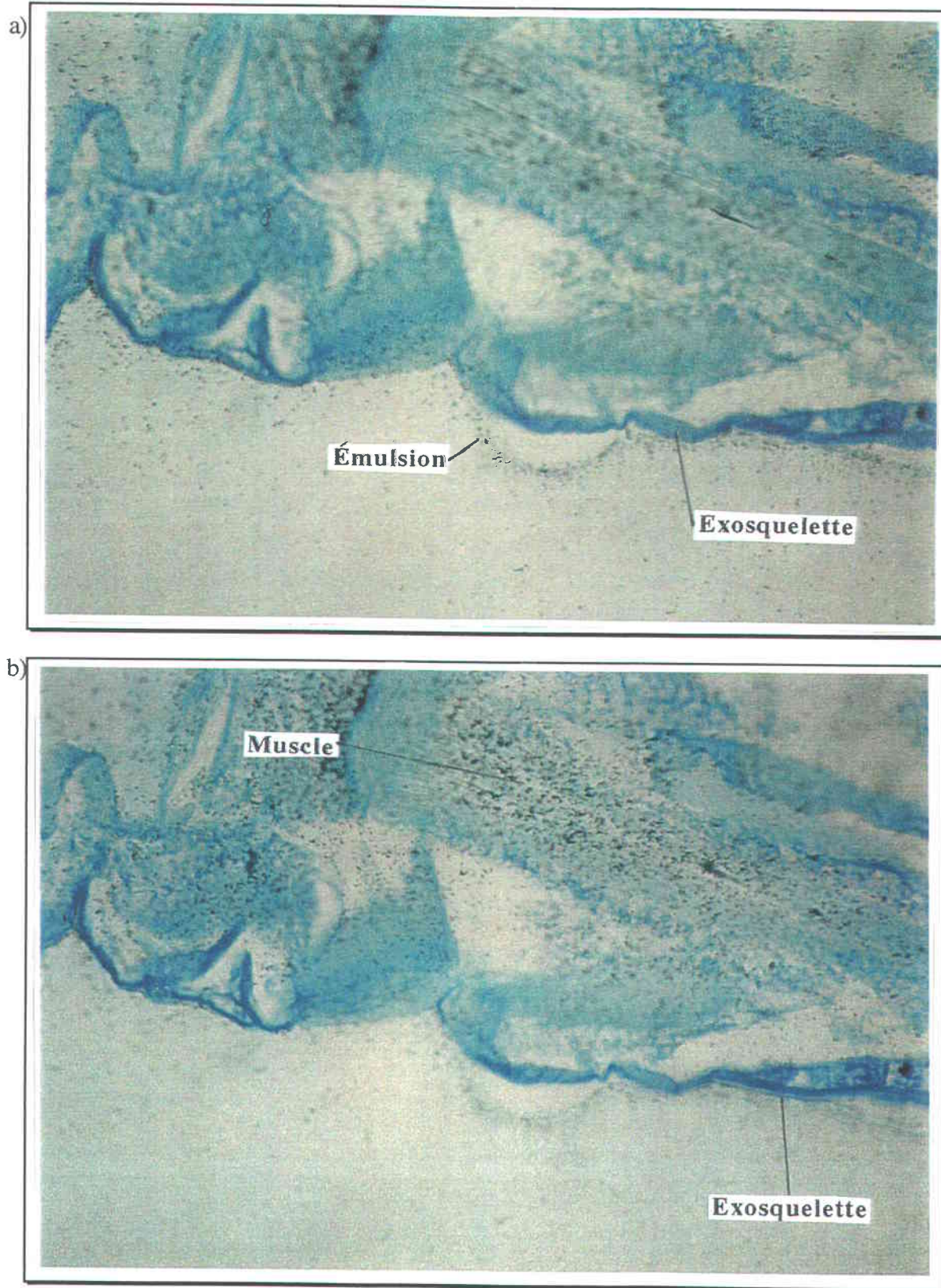


Figure 7. Microphotographies photoniques de la même partie d'un *Chaoborus* exposé à l'eau et la nourriture contaminées, selon que la mise au point est faite sur les grains d'argent révélés par une accumulation dans (a) l'exosquelette, montrant le déplacement de l'émulsion marquée (125X), et (b) le muscle (125X).

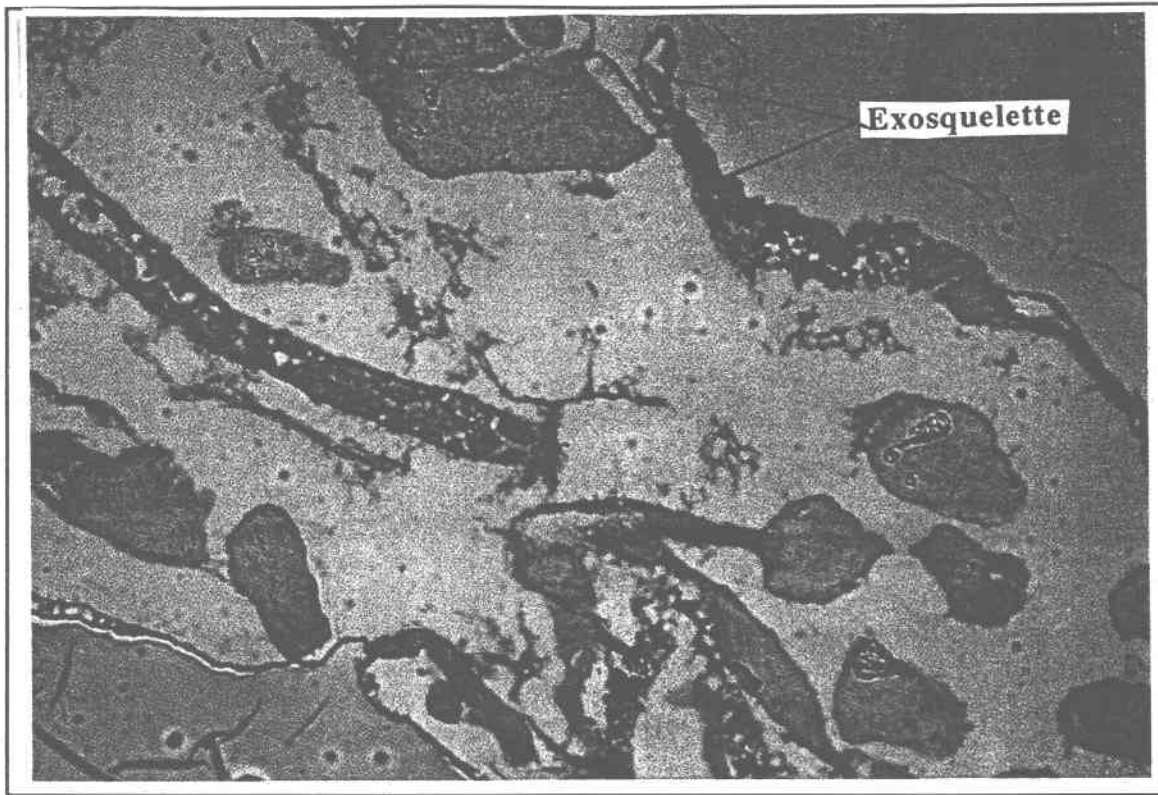


Figure 8. Microphotographie photonique d'un *Chaoborus* fixé au glutaraldéhyde 3% seulement (sans alcool, formaldéhyde et acide acétique) (31,25X).

Discussion

Les quantités de cadmium accumulées après 7 jours, mesurées avant l'autoradiographie, démontrent que la nourriture est responsable de la majorité du cadmium accumulé par les animaux. Cette nouvelle preuve appuie les résultats obtenus antérieurement, concluant à la prépondérance de la nourriture sur l'eau pour la contamination de *Chaoborus*.

Aussi, l'étude de la distribution du ^{109}Cd n'a démontré, quant à elle, aucune différence entre les patrons créés après une exposition via l'eau et la nourriture et ceux créés après exposition à la nourriture contaminée seulement. Les sites d'accumulation du Cd provenant de l'eau ($\text{Cd}_{\text{H}_2\text{O}}$) n'ont pas été mis en évidence chez les animaux exposés aux 2 vecteurs à la fois. On peut supposer que ces sites sont les mêmes que ceux pour le Cd provenant de la nourriture ($\text{Cd}_{\text{nourriture}}$) ou que la prépondérance des sites d'accumulation du Cd via la nourriture crée un effet de camouflage des sites d'accumulation du Cd via l'eau.

Les sites majeurs pour l'entrée et/ou l'accumulation du Cd chez *Chaoborus punctipennis* seraient le mésentéron, le pharynx, l'exosquelette et les organes hydrostatiques. Le mésentéron semble être un site privilégié pour l'accumulation du cadmium non seulement pour le diptère *Chaoborus*, mais aussi pour le diptère *Chironomus*, i.e soit pour *Chironomus thummi* (Seidman *et al.*, 1986), et *Chironomus* sp. (identification ultérieure) (Craig *et al.*, en préparation). Ces deux groupes d'auteurs ont, en effet, conclu à une accumulation majeure du Cd dans le mésentéron des animaux suite à des études autoradiographiques. Aussi, les glandes digestives et le tractus digestif seraient les sites majeurs de séquestration du Cd chez les différentes espèces d'insectes, de mollusques et de crustacés aquatiques (Seidman *et al.*, 1986).

De plus, une étude menée par Hare (non-publié) suggère que 95% du Cd accumulé de façon naturelle par des larves de *Chaoborus punctipennis* serait situé dans le tractus digestif. Bien que nos résultats soient qualitatifs, la concentration de Cd observée dans le mésentéron, partie du tractus digestif, corrobore les résultats de terrain.

Le mésentéron, en plus d'être le siège de l'accumulation du cadmium, serait responsable de l'absorption des nutriments, de l'entreposage et du métabolisme du glycogène et des lipides, du transport des nutriments à l'hémolymphes et de la synthèse des protéines pour la sécrétion (Seidman *et al.*, 1986). Son implication physiologique et métabolique à l'égard des nutriments apporte une autre évidence au fait que le mésentéron serait le lieu d'assimilation du cadmium. D'ailleurs, selon Luoma (1983), le cadmium lui-

même emprunterait des mécanismes d'entrée qui s'opèrent aux sites d'assimilation des nutriments : (1) transport via des transporteurs spécifiques aux cations essentiels (e.g. Ca, Mo, Zn); (2) transport «accidentel» ou immobilisation à l'interface externe de la membrane d'un complexe non-spécifique entre un métal et une molécule de transport ; (3) transport de complexes "métaux-nutriments essentiels" par transporteurs spécifiques aux nutriments; (4) transport de complexes de métaux essentiels pour la nutrition.

Bien que le mésentéron serait impliqué dans l'accumulation du cadmium, d'autres parties du tractus digestif, comme le pharynx, pourraient aussi y être impliquées. Le pharynx joue un rôle important dans la digestion mécanique des proies (comm.pers. Landis Hare). La diaphragme du pharynx (Figure 2, a), typique à une espèce, effectuerait en bonne partie ce travail. La Figure 2 (b) présente d'ailleurs une proie (cladocère) en voie d'être macérée afin de séparer l'exosquelette des parties digestibles "liquides" ; l'exosquelette est ensuite rejeté par la bouche. Puisque c'est dans le pharynx que les proies sont décortiquées, il se peut que le métal y soit adsorbé et non accumulé. D'ailleurs, nous n'avons répertorié aucune étude associant au pharynx un rôle d'assimilation des nutriments. Si le pharynx était un site de stockage du cadmium, il ne serait vraisemblablement pas un site d'entrée.

À part le tractus digestif, l'exosquelette a aussi été révélé suite à l'autoradiographie. Deux mécanismes de liaison du métal à l'exosquelette sont possibles : par adsorption sur les parois à partir de l'eau extérieure, ou intégration dans la paroi via les processus métaboliques (e.g. lors de la formation de l'exosquelette). Rappelons que le phénomène d'adsorption a été contrôlé par un trempage dans un ligand servant à dissocier le cadmium de l'exosquelette. Selon nos résultats, l'exosquelette des animaux exposés à la nourriture contaminée est aussi révélé que celui des animaux exposés aux deux vecteurs à la fois. Ces observations nous portent à croire qu'au moins une partie du cadmium dans l'exosquelette aurait emprunté la voie métabolique.

Enfin, la raison pour laquelle le cadmium serait associé aux points de pigmentation des organes hydrostatiques (ou de flottaison) demeure un mystère. On sait que ce sont ces organes qui rendent les migrations diurnes possibles : lorsque la nuit approche, *Chaoborus* quitte les sédiments dans lequel il niche le jour, et monte dans la colonne d'eau pour se nourrir auprès du zooplancton. Lorsque le jour se lève, il redescend dans les sédiments, craignant la prédation. Vu leur rôle hydrostatique, on peut imaginer que les organes de flottaison peuvent accumuler le cadmium provenant de l'eau contaminée. De façon surprenante, les organes des organismes exposés à la nourriture contaminée seulement sont aussi marqués que ceux contaminés via les deux voies d'entrées. Les organes hydrostatiques

seraient donc, au moins, un lieu de stockage du cadmium venant de la nourriture. Cependant, selon les résultats de Hare (non-publié), ce site accumulerait une quantité négligeable de cadmium, comparativement au mésentéron (95%). On voit ici toute la puissance de la technique autoradiographique à révéler des sites de concentration du métal radioactif.

En résumé, le présent travail nous a permis de confirmer l'implication du tractus digestif, de l'exosquelette et des organes hydrostatiques, pour l'accumulation du cadmium chez *Chaoborus punctipennis* lorsque celui-ci est contaminé via la nourriture, au moins. Que la larve ait été contaminée via l'eau et la nourriture ou la nourriture seulement, les patrons d'accumulation du ^{109}Cd sont les mêmes. Ceci suggère que la nourriture jouerait un rôle de premier plan pour la contamination en Cd de cette larve puisqu'elle compte, en plus, pour une plus grande proportion du cadmium assimilé que l'eau ; la contamination via l'eau compterait en effet pour une quantité négligeable lorsque la nourriture contaminée est présente.

Le travail réalisé a permis de développer et d'appliquer la technique d'autoradiographie à la larve d'insecte *Chaoborus*. Les fixateur et colorant de choix pour *Chaoborus* se sont avérés être différents que ceux utilisés avec la proie *Ceriodaphnia* (Munger et al. 1999) et le Chironomide, *Chironomus* sp., par Craig et al. 1998. Aussi, de nouvelles méthodes de trempage dans l'émulsion autoradiographique, de séchage et de développement ont dû être testées lors de cette expérience. Cependant, pour des fins de publication, il serait utile d'autoradiographier des organismes non radioactifs afin de prouver que l'oxydation des grains d'argent de l'émulsion est causée par l'isotope radioactif du cadmium. De même, il serait préférable d'utiliser des individus davantage radioactifs afin de diminuer le temps d'exposition de l'émulsion sur la lame et de favoriser le marquage ciblé en des endroits précis. En effet, plus le temps d'exposition est long, plus le marquage est éparé.

Références

- Craig, A., L.Hare et P.M. Charest. (1998) Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in *Chironomus staegeri* larvae (Insecta, Diptera). *Aquat. Toxicol.* 41: 265-275.
- Hare, L. (1992) Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 327-369.

- Luoma, S.N. (1983) Bioavailability of trace metals to aquatic organisms - a review. *Sci. Total Environm.* 28, 1-22.
- Munger, C., L. Hare, A. Craig et P.-M. Charest. (1999) Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. *Aquat. Toxicol.* In press.
- Seidman L.A., G. Bergtrom, D.J. Gingrich et C.C. Remsen. (1986) Accumulation of cadmium by the fourth instar larva of the fly *Chironomus thummi*. *Tissue & Cell.* 18, 395-405.

Annexe C

Technique de séparation de proies

Introduction

Le but de ces travaux est de développer une méthode de séparation des espèces de zooplancton à partir d'un mélange naturel.

La technique de séparation de proies la plus évidente est basée sur la taille du zooplancton. À l'aide de filets de différents grosseurs de mailles, le zooplancton serait séparé en grands groupes de tailles. Bien que rapide, cette technique de séparation s'avère imparfaite pour trois raisons; d'abord, elle ne permet pas de différencier les taxons, deuxièmement, elle inflige un choc mécanique au zooplancton, et enfin, elle n'est efficace que si les proies sont ingérées rapidement, les petites proies pouvant devenir de grosses proies avec le temps. Différentes autres techniques sont aussi possibles :

- 1) Exposition à différentes longueurs d'ondes (lumière infrarouge, U.V., rouge, bleu, jaune,...) : séparation selon leur réponse phototrophe ;
- 2) Exposition à différents débits d'eau : séparation selon leur rapidité à se mouvoir dans un courant, un contre-courant ou en absence de courant ;
- 3) Exposition à différentes concentrations de narcotiques (club soda, chloroforme) : séparation selon leur vitesse de sédimentation (anesthésie réversible).

Ces techniques innovatrices ont été éprouvées dans l'ordre jusqu'à ce que l'une d'elles se soit avérée satisfaisante.

Méthodes

Le zooplancton a été collecté dans le lac St-Joseph à l'aide d'un filet à plancton de 64 μ m (4 tirs horizontaux de 5 minutes). Dès leur arrivée, les organismes ont été dilués \approx 1:10 avec de l'eau du lac. Les expériences ont été menées en octobre 1995 sur un mélange de zooplancton composé à 63% de rotifères, 25% de cladocères excluant *H. gibberum*, 8% de copépodes, et 4% de cladocères *H. gibberum*. Une fois au laboratoire, les animaux ont été dilués (1:10) avec de l'eau du lac, et ont été distribués parmi 3 aquariums de 4,5 L et 4 microcosmes de 2 L. Un aquarium et 2 microcosmes ont été exposés à la lumière jaune (550-600nm), un aquarium et un microcosme sur fond noir et un microcosme sur fond blanc; deux autres paires aquarium-microcosme ont été exposés à la lumière bleue (450-500nm), une paire placée sur fond noir, l'autre sur fond blanc (Figure 1). Les deux montages étaient séparés physiquement. La lumière était fournie par quatre fluorescents de type "plant growth", deux recouverts d'un filtre jaune et deux d'un filtre bleu, disposés à \approx 25 cm au-dessus des récipients. Après 17 heures d'exposition à 25°C environ 50 ml d'eau ont été prélevés à la surface et dans le fond de chaque récipient à l'aide d'un siphon. Les animaux ont été narcotisés au club soda puis observés sous loupe binoculaire à 25X pour estimation qualitative de la composition zooplanctonique.

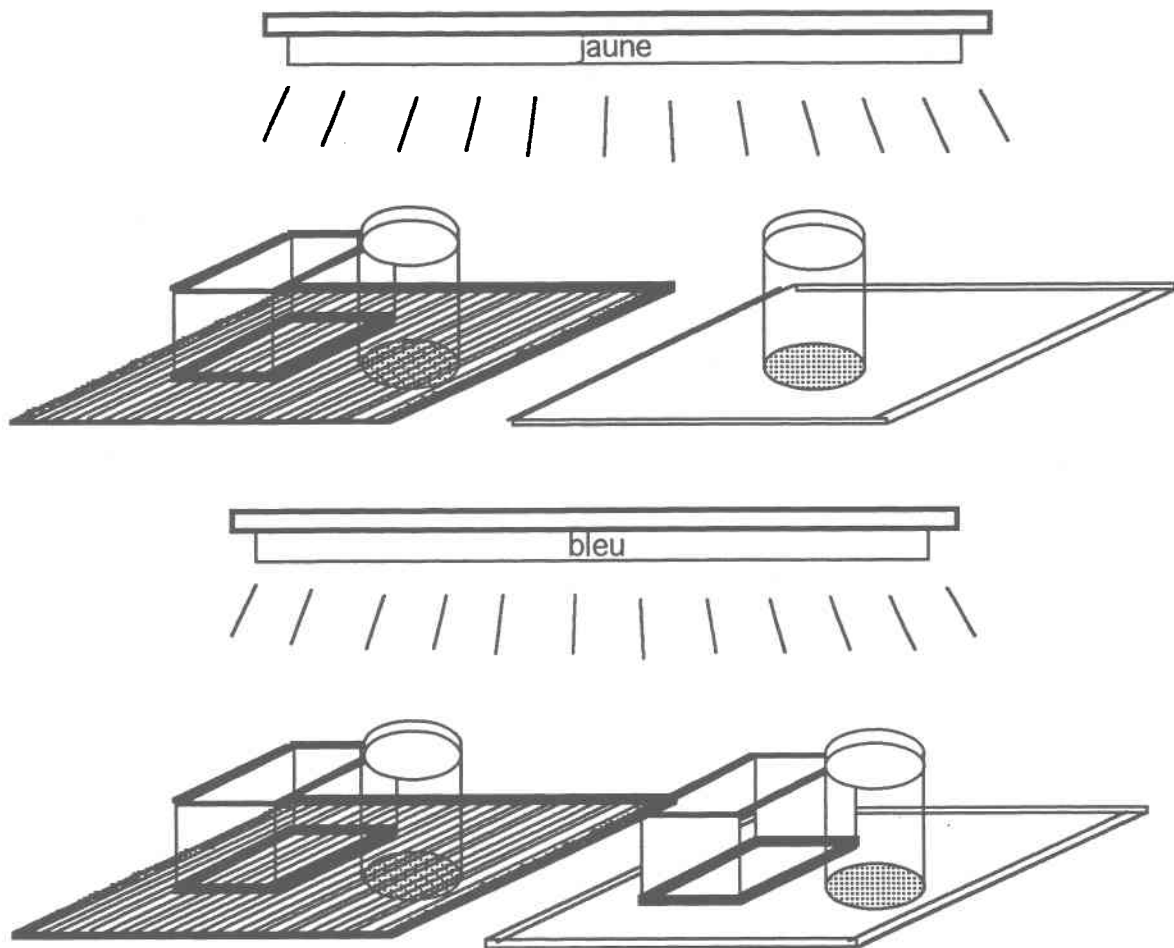


Figure 1. Exposition d'un mélange de zooplancton à 2 longueurs d'ondes différentes : bleu et jaune. Des aquariums en verre de 4,5 L et des microcosmes de plastique de 2 L ont été utilisés comme contenants et disposés sur fond noir ou blanc tel que représenté. (Un seul aquarium a été exposé à la lumière jaune) Les sources lumineuses ont été dispensées par des fluorescents (plant growth) recouverts d'un filtre jaune ou bleu et placés à environ 25 cm au-dessus des contenants.

Résultats

Les résultats sont exprimés selon que l'échantillon provient du haut ou du bas du contenant, s'il a été exposé à la lumière bleu ou jaune, dans un aquarium de 4,5 L ou un microcosme de 2 L et sur fond blanc (B) ou noir (N). L'exposition à la lumière jaune dans un aquarium sur fond noir s'est avérée la méthode la plus efficace pour isoler les cladocères du mélange de zooplancton, le groupe de cladocères se concentrant exclusivement dans le haut de l'aquarium (Tableau 1). En effet on constate que suite à une exposition à la lumière jaune pendant 17 heures, seul le groupe de cladocères semble attiré par la source lumineuse

les isolant parfaitement du reste du mélange qui demeure au fond de l'aquarium. En microcosme cependant, le fond blanc semble plus efficace que le fond noir pour distinguer les cladocères du mélange initial, sous cette même lumière jaune (Tableau 1). Ainsi, la deuxième méthode la plus efficace pour isoler les cladocères a été le microcosme sur fond blanc exposé à la lumière jaune, celle-ci étant cependant moins sélective pour les rotifères que la précédente. En comparant ces deux résultats, on peut déduire que la lumière jaune semble attirer uniquement les cladocères et que le meilleur contenant serait l'aquarium; plus d'informations seraient nécessaires pour vérifier si la couleur du fond a un effet ou non, le blanc réfléchissant les rayons lumineux, le noir les absorbant. Aucun résultat probant n'a été observé suite à une exposition à la lumière bleue. Si l'aquarium exposé au bleu sur fond blanc semble attirer les copépodes, le même contenant sur fond noir attirerait davantage les rotifères et les autres cladocères. Enfin, lorsque placés dans un microcosme, les groupes d'organismes semblent à peu près indifférents à la lumière bleue.

Tableau 1. Estimation qualitative de l'abondance des groupes de zooplancton de beaucoup (++++) à pas du tout (-). Les échantillons ont été exposés à la lumière bleu ou jaune, dans un aquarium de verre de 4,5 L ou un microcosme de plastique de 2 L placé sur fond blanc (B) ou noir (N). La collection de l'échantillon a été faite dans le haut ou le bas du contenant. (L'importance relative des groupes d'organismes doit être comparée à l'intérieur d'un même échantillon mais pas entre les échantillons.)

	Copépodes	Rotifères	Cladocères
Mélange initial	++	+	++++
<u>Jaune:</u>			
Haut aquarium N	-	-	+++++
Bas aquarium N	++	+	-
Haut micro. B	-	+	++++
Bas micro. B	++	+	++
Haut micro. N	-	++	++
Bas micro. N	++	++	-
<u>Bleu:</u>			
Haut aquarium B	++	-	+
Bas aquarium B	-	-	-
Haut aquarium N	-	++	++
Bas aquarium N	+	++	-
Haut micro. B	++	++	++
Bas micro. B	++	++	+++
Haut micro. N	+	+	+
Bas micro. N	++	+	+++

Discussion

La technique des longueurs d'ondes semble satisfaisante pour isoler les cladocères. Ce résultat est peu surprenant lorsqu'on suit l'ascension des connaissances sur le phototropisme des cladocères, lesquelles visaient à comprendre les mécanismes qui motivent les migrations verticales chez les cladocères.

Tout d'abord, Viaud (1948) aurait observé chez certaines espèces de *Daphnia* que leur comportement natatoire était optimum suite à une exposition aux lumières jaune-verte (600 et

500 nm) de même qu'aux lumières mauve-UV (< 450 nm). Par la suite, Smith & Baylor (1953) ont étudié le comportement de différents cladocères suite à une exposition à différentes couleurs. Lorsqu'exposés à une lumière pourpre (350-450 nm) provenant du dessus de l'aquarium, les cladocères fuient la source lumineuse alors qu'ils nagent vers les lumières jaune ou rouge (> 550 nm). Observés en premier lieu chez *Daphnia magna*, ces constatations ont été confirmées chez *Daphnia longispina hyalina*, *Simocephalus vetulus*, *Simocephalus serrulatus*, *Ceriodaphnia reticulata*, *Moina affinis*, *Bosmina obtusirostris*, *Kurzia latissima*, *Chydorus globosus* et *Leptodora kindtii*.

En ce qui à trait plus spécifiquement aux patrons natatoires ces mêmes auteurs constatent que sous un éclairage de plus de 550 nm, les organismes nagent vers le haut de l'aquarium avec un petit vecteur horizontal; la population semble calme. Sous une lumière de moins de 500 nm la population est agitée, le vecteur horizontal est grand et la mort des organismes peut s'en suivre si l'exposition est prolongée. Les auteurs concluent que le plus long vecteur de déplacement est toujours orienté à angle droit par rapport à une lumière pourpre-bleue alors qu'il est toujours parallèle à la ligne de propagation de la lumière jaune-rouge.

Ces premières observations ont été confirmées par McNaught (1971) qui mentionne que la plus part des espèces de cladocères possèdent 4 pigments visuels possédant une sensibilité maximale autour de 370 (UV), 430 (pourpre), 560 (vert-jaune) et 670 nm (rouge). Il mentionne même la possibilité de séparer différentes espèces du genre *Daphnia* sur la base de ces pigments visuels.

Par la suite, les recherches ont été focalisées sur l'oeil de *Daphnia*. Young (1974) a trouvé que l'oeil d'un organisme maintenu immobile était plus sensible à la lumière bleue provenant du dessus et à la lumière jaune-verte provenant du côté. Smith & Macagno (1990) ont enfin trouvé que chacun des ommatidies ventrales et dorsales possédaient les quatre classes spectrales de photorécepteurs dont le maximum de sensibilité se situe à 348 (UV), 434 (pourpre), 525 (vert) et 608 nm (jaune-rouge). Leur attirance pour le jaune, dans notre cas, pourrait probablement être dû au photorécepteur dont la sensibilité maximale se situe à 608 nm.

Outre la longueur d'onde, un autre facteur auquel les organismes sont sensibles est l'intensité lumineuse. Le fait d'atténuer la lumière provoque un déplacement des cladocères vers le haut, qu'ils soient exposés à la lumière rouge ou bleu. Cependant, ce déplacement disparaît après 15 à 20 minutes laissant les organismes vers le haut de l'aquarium si la

lumière demeure affaiblie, ou les incitant à descendre au fond de l'aquarium si l'atténuation est suivie d'une forte illumination (Smith & Baylor, 1953). Ayant étudiés l'effet de l'intensité lumineuse chez trois espèces de *Daphnia* dans un lac (*D. schodleri*, *D. galeata mendotae* et *D. retrocurva*), McNaught & Hasler (1964) concluent que l'intensité lumineuse doit être considérée comme un facteur majeur dans le contrôle des migrations verticales dans la nature.

Références

- McNaught, D.C. and A.D. Hasler. (1964) Rate of movement of populations of *Daphnia* in relation to changes in light intensity. *J. Fish. Res. Bd. Canada*. 21, 291-317.
- McNaught, D.C. (1971) Plasticity of cladoceran visual systems to environmental changes. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 90, 113-114.
- Smith, F.E. and E.R. Baylor. (1953) Color responses in the cladocera and their ecological significance. *Am. Natur.* 87, 49-55.
- Smith, K.C. and E.R. Macagno. (1990) UV photoreceptors in the compound eye of *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda). A fourth spectral class in single ommatidia. *J. Comp. Physiol. A* 166, 597-606.
- Viaud, G. (1948) Le phototropisme et les deux modes de la photoréception. *Experient.* 5, 81-120.
- Young, S. (1974) Directional differences in the colour sensitivity of *Daphnia magna*. *Exp. Biol.* 61, 261-267.

Annexe D

Influence du type et de quantité de proies sur le contenu en cadmium de la larve de *Chaoborus*: Expérience *in situ*

Méthodologie

Le design expérimental utilisé s'inspirait de celui utilisé dans l'expérience eau vs nourriture: *in situ* (Chapitre 3). Des larves de *C. punctipennis* collectées dans un lac peu contaminé (lac St-Joseph, Québec) ont été transférées dans des mésocosmes perméables à l'eau mais non aux proies > 64 μm dans un lac contaminé (lac Crowley, Sudbury). L'ensemencement de 120 larves dans chacun des 15 mésocosmes utilisés a été réalisée à l'intérieur de 48 heures après leur collection dans le lac québécois. Les larves ont été exposées aux fortes concentrations de Cd dans l'eau du lac contaminé et à deux quantités de copépodes ou cladocères. Le zooplancton offert a été collecté dans le lac contaminé, a été tamisé sur tamis en nylon de 500 μm puis séparé en suivant la procédure suivante, adaptée pour des gros volumes à partir des résultats obtenus en Annexe C. Un échantillon de zooplancton a été placé dans un récipient opaque de 10 L contenant 5 L d'eau du lac Crowley puis exposé à la température et la lumière ambiante (fluorescents cool white) d'un laboratoire. Après 30 min l'eau et le zooplancton ont été siphonnés près de la surface et des parois de côté du récipient pour collecter principalement les cladocères (majoritairement *Diaphanosoma* sp.), puis dans le bas centre du récipient pour récolter les copépodes (majoritairement *Diaptomus minutus*). Un sous échantillon des deux groupes de plancton collectés a été endormi et dénombré sous microscope à dissection (25X). Des lots de proies de chaque groupes ont été préparés pour ensemercer les mésocosmes. Les quantités désirées de 0, 35 et 225 copépodes ou cladocères larve⁻¹ ont été vérifiées à chaque 2 jours en prenant un sous échantillon d'eau dans chaque mésocosmes à l'aide d'un tube en Plexiglass® et des proies nouvellement collectées étaient ajoutées si nécessaire. Nous avons exploité leur comportement migratoire normal pour collecter les larves à tous les 4 jours sans déranger les animaux et les mésocosmes. Les larves ont été capturées pendant la nuit lors de leur migration descendante à l'aide d'une trappe en entonnoir installée dans chaque mésocosme pendant le jour précédent. Les 15 larves collectées par mésocosme ont été dépurées pendant 24 heures dans l'eau du lac Crowley puis placées sur un morceau de Teflon® pré-lavé à l'acide en vue de leur analyse (section Method, Chapitre 3).

Résultats

La technique de séparation de proies a été un succès pour concentrer les cladocères *Diaphanosoma* sp. surtout vers la fin de l'expérience. Le succès relatif de la technique pour concentrer les copépodes serait attribuable au fait que les copépodes *Diaptomus minutus* semblent fuir le siphon quelques secondes après le début du siphonnage. Afin d'obtenir des quantités suffisantes de copépodes nous avons dû poursuivre le siphonnage qui a entraîné des cladocères au fil du temps.

Tableau 1. Composition en crustacés copépodes et cladocères dans le lac avant et après séparation par exposition à la lumière ambiante pendant 30 min puis siphonnage dans le bas centre d'un récipient opaque pour récolter les copépodes, et dans le haut et près des parois pour récolter les cladocères. Suite à leur séparation, les copépodes et cladocères ont été offerts aux larves dans les mésocosmes. (cop signifie copépodes, clad signifie cladocères).

Jours	% Cop lac	% Clad lac	% Cop après sép.	% Clad après sép.
0 - 2	53	47	41	78
3 - 4	0	0	0	67
5 - 6	0	0	0	88
7 - 8	40	60	65	100
9 - 10	50	50	0	97

Les résultats de la Figure 1 montrent une accumulation de Cd semblable dans les larves de tous les traitements y compris pour les larves exposées au Cd dans l'eau seulement. Ceci peut être attribuable à la difficulté technique d'offrir une grande quantité de proies aux larves exposées à 225 proies larve⁻¹, et à l'état physiologique particulier des très jeunes larves du stade larvaire IV utilisées qui venaient de subir une période de jeûne de 48 heures (voir explication section Discussion générale). Nous pensons que les larves auraient compensé le faible taux d'ingestion par une grande efficacité d'assimilation (voir section Discussion générale). Le maximum d'efficacité d'assimilation aurait été observé chez les larves exposées à aucune proies ajoutée (traitement eau seulement) mais pouvant quand même consommer le très faible nombre de proies < 64 μ m entrant dans le mésocosme via les parois (9 proies larve⁻¹).

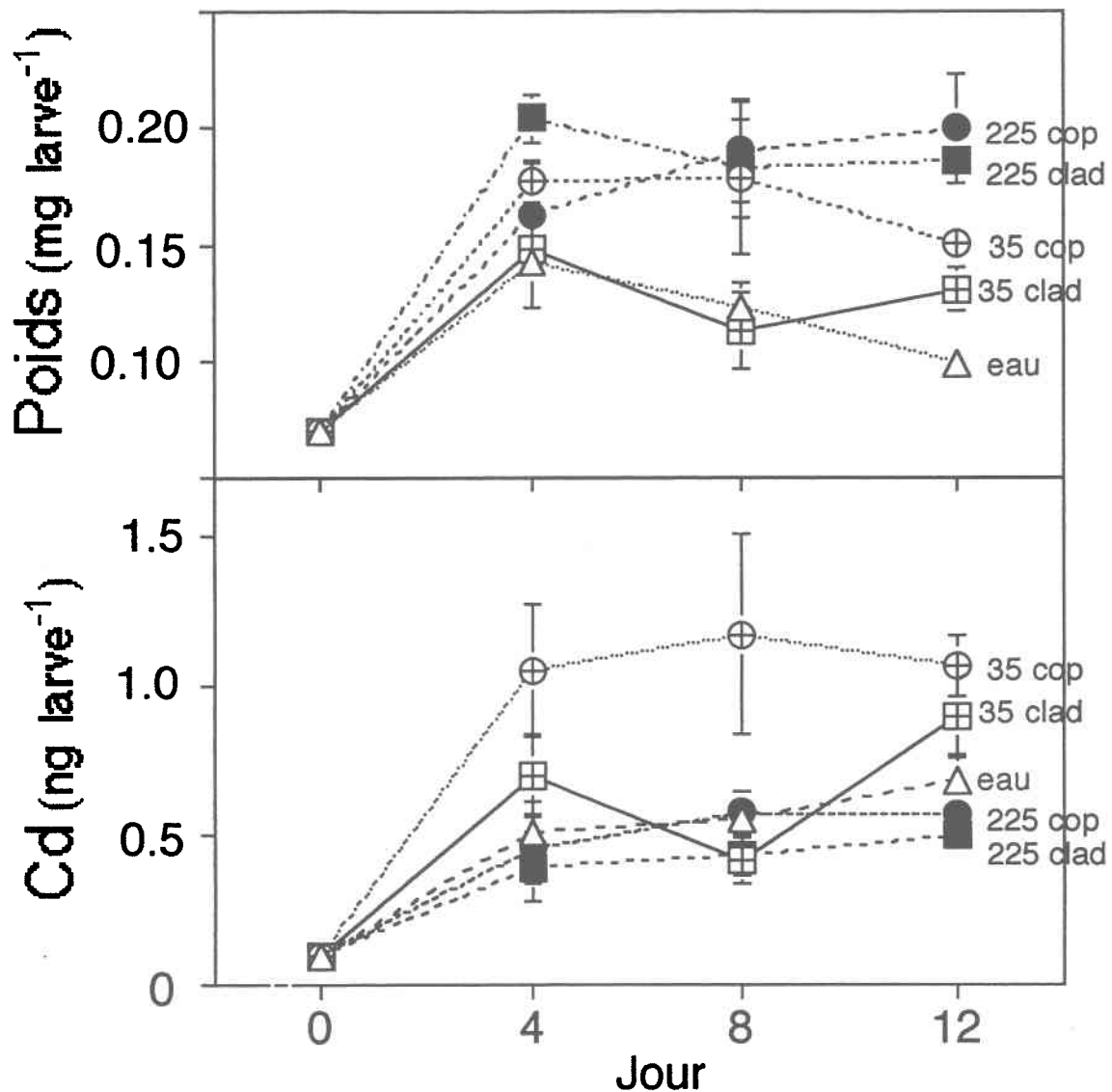


Figure 1. Changements temporel du (A) poids et (B) contenu en Cd des larves de *C. punctipennis* exposées au Cd dans l'eau seulement ou dans l'eau et à l'une des deux quantités de cladocères ou copépodes riches en Cd. Les valeurs sont des moyennes (\pm SE) pour les 3 mésocosmes de chaque niveau de traitement. Les valeurs sur les axes verticaux sont des augmentations nettes de poids larvaire et de contenu en Cd au-dessus de la valeur initiale au début de l'expérience (0.07 ± 0.02 (\pm SD) mg p.s. larve⁻¹, $n = 6$, et 0.23 ± 0.01 (\pm SD) ng Cd larve⁻¹, $n = 3$, respectivement). (cop signifie copépodes, clad signifie cladocères, 35 et 225 signifient le nombre de proies offert larve⁻¹, water signifie aucune proie ajoutée).

Annexe E

Élimination de Cd par une expérience *in situ*: *Chaoborus flavicans*

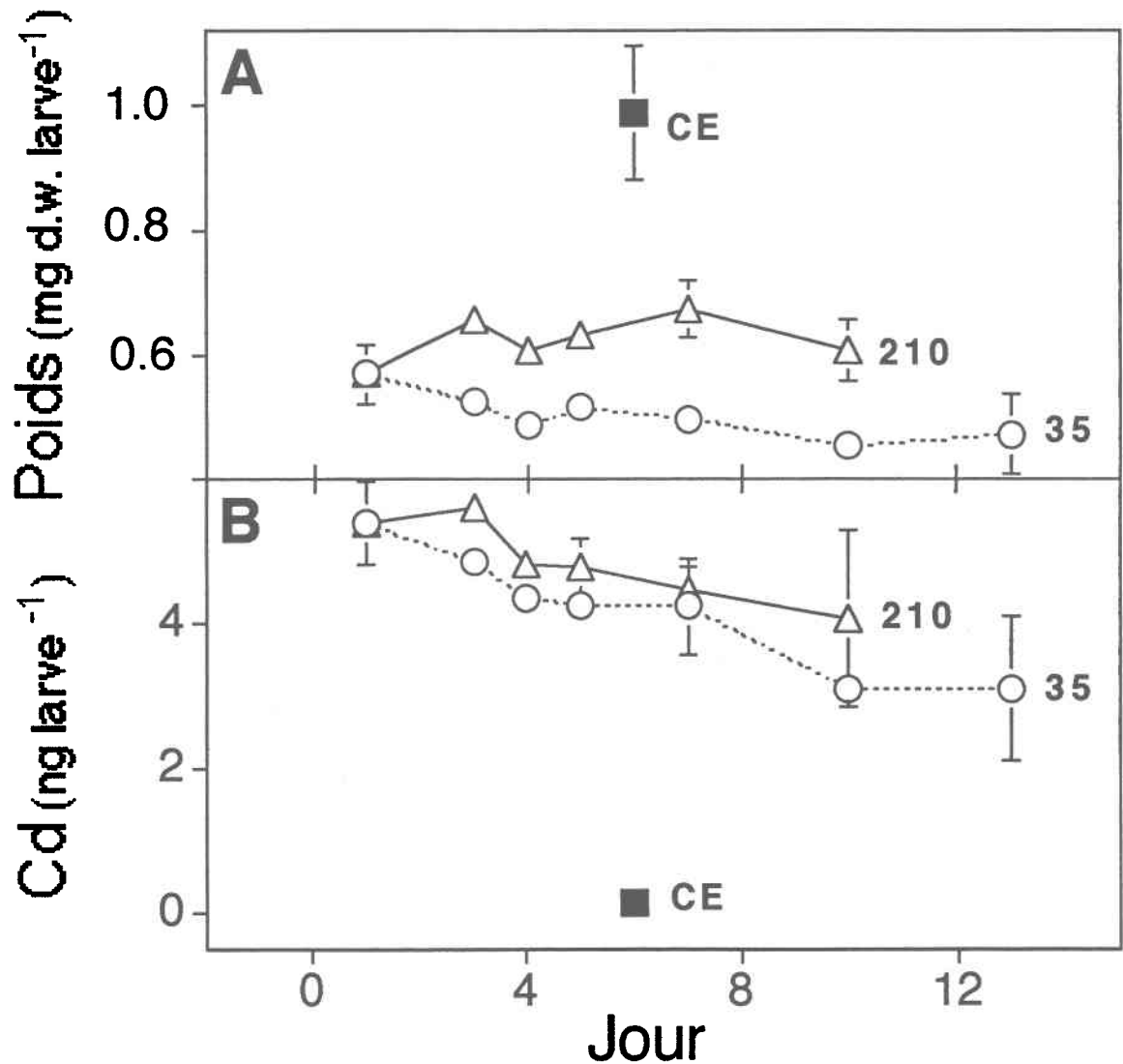


Figure 1. Changements temporels du (A) poids et (B) du contenu en Cd des larves de *Chaoborus flavicans* transférées d'un lac riche en Cd, le lac Crowley (Sudbury, ON) et exposées à deux quantités de crustacés peu contaminés du lac au Cèdre: 35 et 210 proies larve⁻¹. Les valeurs sont des moyennes (\pm SE) pour 1 à 6 échantillons de ≈ 5 *C. flavicans* pour chaque niveau de traitement. Les carrés noirs indiquent les valeurs mesurées dans des larves de *C. flavicans* indigènes du lac au Cèdre.