

Université du Québec
INRS-Eau, Terre et Environnement

**DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE POUR L'UTILISATION
DE L'INVERTÉBRÉ BENTHIQUE *SIALIS* COMME
BIOMONITEUR POUR L'ESTIMATION DE LA
DISPONIBILITÉ DES MÉTAUX TRACES EN MILIEU
AQUATIQUE**

Par
Louis Croisetière

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Sciences de l'Eau

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dr Philip S. Rainbow Natural History Museum, Londres
Examineur externe	Dr Donald J. Baird Environnement Canada
Examineur interne	Dr Martine Savard Commission Géologique du Canada
Directeur de recherche	Dr Landis Hare INRS-ETE
Co-directeur de recherche	Dr André Tessier INRS-ETE

Septembre 2007

L'important est de n'avoir cesse de questionner
A. Einstein

AVANT-PROPOS

Les différents chapitres qui présentent en détail les résultats de cette thèse sont présentés sous forme d'articles scientifiques. Ces articles sont précédés d'une synthèse qui décrit le contexte de notre étude, sa pertinence, les résultats obtenus et les perspectives de recherche.

Les articles sont :

1. Croisetière L., Hare L. et A. Tessier (2006). A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb and Zn for the aquatic invertebrate *Sialis velata*. *Environmental Science and Technology* 40: 873-879.
2. Croisetière L., Hare L., Tessier A. et G. Cabana (2007). Sulfur isotopes reveal that sediment sustains fish production in lakes (soumis à *Limnology and Oceanography*).
3. Croisetière L., Hare L. et A. Tessier (2007). Relating metal concentrations in a benthic invertebrate to those in sediment. *Environmental Pollution* (à soumettre).

La contribution des auteurs des articles liés aux diverses phases expérimentales s'établit comme suit :

Louis Croisetière : Conception et réalisation des expériences, échantillonnage, analyses de laboratoire, traitement des données et rédaction des articles.

Landis Hare : Conception des projets, contribution à l'interprétation des données et à la rédaction finale des articles.

André Tessier : Conception des projets, contribution à l'interprétation des données et à la rédaction finale des articles.

Gilbert Cabana : Conception du projet, contribution à l'interprétation des données et à la rédaction finale de l'article.

REMERCIEMENTS

Plusieurs années passées à côtoyer mon superviseur de recherche, Landis Hare, ne m'ont permis que de mieux l'apprécier. Le calme, l'écoute et la sagesse décrivent bien son attitude, mais surtout la richesse et les retombées de son enseignement m'ont été de précieux guides. Je ne saurais être assez reconnaissant de son appui. Sa facilité à trouver le mot juste a été mise à rude épreuve plus d'une fois lors de la lecture de mes manuscrits. Le support qu'il m'a offert jusqu'à la toute fin du projet se traduit par un résultat bien concret : la présentation de cette thèse.

Questionnement, rigueur et disponibilité, que de mots pour décrire l'aide précieuse de André Tessier, mon co-directeur. Son apport scientifique constant à toutes les étapes du projet n'a su que me donner confiance en mes idées et très souvent, les éclaircir. Encore une fois, merci.

Certaines personnes sont des sources intarissables de nouvelles idées, Gilbert Cabana en est un. Sa vision systémique m'a permis de pousser un peu plus loin certains éléments de mon projet et je tiens à lui exprimer ma gratitude.

L'ampleur des défis expérimentaux et analytiques a pu être surmontée grâce à l'aide de nombreuses personnes. Lors des expériences de terrain, le support de Pierre Marcoux, Céline Porcher, Anne Gosselin, Jord Orvoine, René Rodrigue, Pierre Barillet, Jord Orvoine, Marie-Noële Croteau, Julie Bastien, Catherine Dion et Eve Therrien a été apprécié dans la réalisation des différentes étapes du projet qui représentaient une charge de travail appréciable.

Ce qui caractérise le mieux le laboratoire de l'INRS, c'est la disponibilité des gens qui y travaillent. L'aide aux étudiants semble pour eux une chose toute naturelle. Mes remerciements s'adressent particulièrement à Michelle G. Bordeleau, Pauline Fournier, René Rodrigue, Lise Rancourt, Stéphane Prémont et Sébastien Duval.

Le choix de faire un Doctorat est une décision bien personnelle, mais, malheureusement pour l'entourage, sa réalisation se partage au quotidien avec les gens les plus proches. La patience de Céline n'est certainement pas étrangère à la réussite de cette aventure. Par sa participation aux expériences et par son soutien constant, elle a participé à ce projet à part entière. À mes parents, Carol et Suzanne, je tiens à souligner que votre support pour amener votre plus jeune fils jusqu'à la dernière marche de l'éducation universitaire a été phénoménal à bien des égards, merci.

La réalisation de ces projets a été possible grâce au support financier du réseau de recherche MITE (Metals In The Environment), du Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et Technologies et du Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie du Canada.

À vous tous, merci.

RÉSUMÉ

L'extraction et le traitement des métaux ont mené à un accroissement de leurs concentrations qui se retrouvent dans plusieurs systèmes aquatiques. Les organismes qui vivent dans ces milieux se retrouvent parfois affectés par l'augmentation de ces concentrations. L'exposition des organismes aquatiques est cependant difficile à caractériser car plusieurs variables influencent la disponibilité des métaux pour les organismes vivants. La mesure de ces concentrations au sein d'un organisme choisi permet d'intégrer tous ces paramètres en une seule mesure. L'organisme alors sélectionné pour représenter un compartiment du système est un *biomoniteur* et son utilisation permet d'estimer l'exposition des organismes dans un système aquatique donné.

Les métaux sédimentaires représentent souvent une fraction très importante des métaux qui se retrouvent en milieu aquatique. Cependant, l'exposition de ces organismes à ces métaux est relativement peu comprise, bien qu'elle ait été étudiée sous plusieurs aspects au fil des années. L'invertébré benthique *Sialis* a été proposé comme biomoniteur des métaux sédimentaires et la mesure des métaux au sein de cet organisme pourrait mener à une estimation plus précise de l'exposition aux métaux sédimentaires. Cependant, des variables importantes se doivent d'être étudiées pour relier la concentration de métaux tissulaires d'un organisme à la concentration des métaux disponibles dans le milieu. Lorsque plusieurs paramètres de prise en charge des métaux sont connus chez un biomoniteur, un modèle peut être établi pour relier avec précision les concentrations mesurées au sein de cet organisme à la concentration des métaux biodisponibles.

Parmi les paramètres importants à connaître dans l'estimation de l'exposition, on retrouve la route de prise en charge des métaux. Dans le cas des organismes prédateurs comme *Sialis*, il importe de connaître si la diète constitue ou non la source principale de métaux accumulés pour modéliser correctement les interactions avec le milieu. Lors de nos expériences, nous avons alterné les voies d'exposition (eau vs nourriture) et nous avons démontré que la diète est très

importante dans l'accumulation de plusieurs éléments (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn) chez *Sialis*. L'intégration de nos résultats expérimentaux à un modèle de bioaccumulation nous a montré que la nourriture constituait pratiquement la source exclusive de ces métaux pour *Sialis*.

Avec une telle importance de la nourriture comme source de métaux, il devenait donc impératif d'amasser plus d'informations sur la diète de *Sialis*. La relation entre *Sialis* et son milieu semble se faire par l'entremise de ses proies. Le comportement alimentaire des proies a donc une incidence directe sur l'exposition de *Sialis* aux éléments traces. Ainsi nous avons déterminé si notre biomoniteur avait une relation plus étroite avec la colonne d'eau ou le sédiment d'un point de vue énergétique. Considérant que les métaux proviennent de la nourriture, nous avons intégré cette information dans le modèle reliant *Sialis* à son milieu. Pour étudier cette relation énergétique, nous avons utilisé les ratios isotopiques de soufre ($\delta^{34}\text{S}$) comme traceur et avons déterminé que *Sialis* tire, par le biais de ses proies, son énergie du compartiment sédimentaire des lacs. A partir de ces résultats, nous avons donc considéré que les concentrations de métaux mesurées dans *Sialis* devaient représenter les concentrations sédimentaires plutôt que celles de la colonne d'eau. Le développement de l'utilisation du ratio $\delta^{34}\text{S}$ pour cette fin a aussi permis de révéler le potentiel de cet outil pour l'étude des échanges énergétiques au sein d'écosystèmes lacustres complets. L'utilisation de cette signature peut révéler l'importance énergétique du compartiment sédimentaire pour une gamme d'organismes allant des détritivores aux prédateurs terminaux des systèmes étudiés. Les signatures de soufre ont révélé la très grande importance du compartiment sédimentaire pour un prédateur comme le Grand Brochet, qui tire jusqu'à 42% de son énergie de ce compartiment par l'entremise de ses proies.

Pour mettre à l'essai le biomoniteur, nous avons visité 10 lacs situés en région minière (Rouyn-Noranda, QC et Sudbury, ON) dans lesquels nous avons prélevé des échantillons de *Sialis* et de sédiments anoxiques. Nous avons alors utilisé deux méthodes d'extractions différentes qui devaient représenter la concentration de métaux plus 'disponibles' dans les sédiments et nous avons tenté de relier ces valeurs aux concentrations tissulaires de métaux mesurées dans *Sialis*. Une

corrélation satisfaisante a été obtenue pour le nickel et le cobalt seulement. Pour les autres éléments, l'exposition sédimentaire n'a pu mener à la prédiction des concentrations mesurées dans *Sialis*. Cependant, ces résultats n'indiquent pas la difficulté de *Sialis* à représenter les concentrations de métaux biodisponibles mais plutôt la difficulté d'estimer cette fraction des métaux dans les sédiments pour les relier à une réponse biologique donnée.



Louis Croisetière



Landis Hare, directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	iii
REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ.....	vi
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES ENCADRÉS	xii
Section 1 - Synthèse.....	1
1- INTRODUCTION	1
1.1 Les métaux dans l'environnement	1
1.2 Suivi des métaux dans l'environnement	3
1.3 Analyse de risque écologique (ARE) et utilisation des biomoniteurs	4
1.4 Utilisation de <i>Sialis</i> comme biomoniteur.....	5
1.5 Accumulation des métaux par les organismes	6
2 - PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	12
2.1 Voies d'exposition	13
2.2 Relations alimentaires	14
2.3 Relations <i>Sialis</i> – environnement.....	15
3 - MATÉRIEL ET MÉTHODES	16
3.1 Phase 1 – Importance de la diète comme voie d'entrée des métaux.....	16
3.2 Phase 2 – Description des échanges énergétiques de <i>Sialis</i>	19
3.3 Phase 3 – Corrélations des concentrations métalliques chez <i>Sialis</i> avec celles de son milieu	21
3.4 Méthodes analytiques.....	22
3.4.1 Métaux.....	22
3.4.2 Anions.....	24
3.4.3 Carbone organique dissous	24
3.4.4 Carbone inorganique dissous	24
3.4.5 Analyses des isotopes stables de carbone ($\delta^{13}\text{C}$) et de soufre ($\delta^{34}\text{S}$)	24
3.4.6 Analyse des données et modélisation	25
3.4.7 Préparation des contenants d'échantillonnage et du matériel d'analyse	25
4 - RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	26
4.1 Phase 1 – Importance de la diète comme voie d'entrée des métaux.....	26
4.2 Phase 2 – Description des échanges énergétiques de <i>Sialis</i>	27
4.3 Phase 3 – Corrélations des concentrations métalliques chez <i>Sialis</i> avec celles de son milieu	30
5 - CONCLUSIONS.....	34
6 - PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	36
6.1 Relations <i>Sialis</i> – environnement.....	36
6.2 Utilisation du rapport $\delta^{34}\text{S}$ comme outil de traçage.....	37
7 - BIBLIOGRAPHIE	39
Section 2 – articles.....	45
8- A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb and Zn for the aquatic invertebrate <i>Sialis velata</i>.....	45
9- Sulfur isotopes reveal that sediment sustains fish production in lakes.....	75

10- Relating metal concentrations in a benthic invertebrate to those in sediment 101

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Relation concentration-réponse des organismes vivants aux métaux essentiels (a) et non-essentiels (b) (Förstner et Wittmann 1981).....	2
Figure 2	Schématisation de la prise en charge et de l'élimination des métaux par un organisme aquatique selon l'équation 1.....	7
Figure 3	Routes possibles de transfert de métaux entre <i>Sialis</i> ③ vivant dans le tube en 'U' et ses proies qui proviennent soit de la zone oxique ① ou anoxique ② des sédiments.	10
Figure 4	Schéma expérimental illustrant les différentes voies d'exposition aux métaux (E : eau; N : nourriture – rouge : contaminé; bleu : non-contaminé). .	17
Figure 5	Méthode de contamination des proies (<i>Chironomus riparius</i>) dans le lac Dufault (contaminé).	18

LISTE DES ENCADRÉS

Encadré 1. Analyse de risque écologique – résumé de l’approche (adapté de Chapman et Wang 2000).	12
Encadré 2. Utilisation des isotopes stables de soufre pour déterminer la provenance de l’énergie – explication par la sulfato-réduction	20

Section 1 - Synthèse

1- INTRODUCTION

1.1 Les métaux dans l'environnement

Notre environnement a été marqué par des changements importants et ce, sur une période relativement brève. L'accroissement de l'activité humaine a causé à lui seul des changements sur l'environnement qui, localement, ont modifié la façon de vivre des gens. L'extraction de substances minérales liées à la fabrication de produits de consommation a ainsi entraîné une mobilisation des métaux présents dans la croûte terrestre (Nriagu et Pacyna 1998). Les métaux libérés lors de la transformation se dispersent par ruissellement ou encore par voie aérienne (Telmer *et al.* 2004) et peuvent ainsi contribuer à l'accroissement des teneurs métalliques dans les endroits éloignés des zones d'utilisation et de traitement des métaux. A certains endroits, l'accroissement a été suffisamment important pour compromettre la présence de la vie. Les endroits moins touchés, quoique nombreux, ont toutefois subi un accroissement des niveaux des contaminants métalliques.

Les contraintes liées aux conséquences de la pollution ont été précurseurs d'une prise de conscience collective. Depuis quelques décennies, certains endroits fortement touchés ont été restaurés et d'autres, moins contaminés, font l'objet d'études et de mesures de conservation (Egan 2003). Des outils de mesure sont nécessaires pour évaluer l'impact des activités qui sont à l'origine de cette contamination. Les méthodes dites 'universelles' de diagnostic, comme le suivi des concentrations de métaux dans les différents compartiments de l'environnement, se sont avérées inefficaces dans plusieurs situations. Les dernières décennies ont donc été marquées par le raffinement de ces techniques de suivi des métaux dans l'environnement (Wenning *et al.* 2005).

Les métaux peuvent être séparés en deux classes (Fig. 1) suivant leur nécessité aux

divers processus biologiques : les métaux essentiels (Al, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) et non-essentiels (Ag, As, Cd, Cr, Hg, Pb) (Förstner et Wittmann 1981). Alors qu'une certaine concentration de métaux essentiels est nécessaire au maintien des fonctions de base de l'organisme, les métaux non-essentiels n'occupent aucune fonction et ne sont que nocifs pour les êtres vivants. Au-delà d'une certaine concentration, les métaux de ces deux groupes peuvent causer des effets néfastes et mesurables chez les organismes vivants (Markert *et al.* 2000). Les effets adverses des métaux sont très variés mais, d'une façon générale, les métaux interfèrent avec différents processus physiologiques soit en se substituant à un élément essentiel, soit en saturant un mécanisme biochimique. La résultante de ces phénomènes peut se traduire ultimement par la déficience d'une fonction essentielle et par des symptômes mesurables chez les êtres vivants (Hoffman *et al.* 1995). Bien que l'étude de l'effet des métaux soit parsemée d'avenues de recherches essentielles et prometteuses, l'objet de cette thèse portera à un autre niveau de la problématique : le développement de méthodes de suivi de l'exposition.

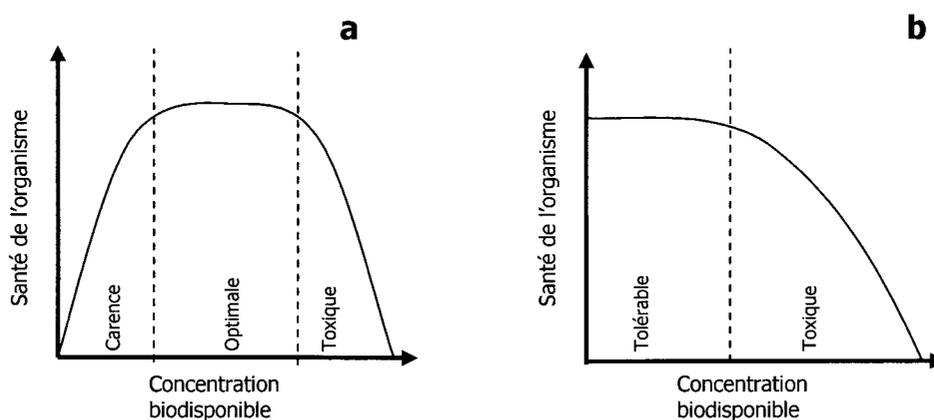


Figure 1 Relation concentration-réponse des organismes vivants aux métaux essentiels (a) et non-essentiels (b) (Förstner et Wittmann 1981).

1.2 Suivi des métaux dans l'environnement

Lors de la deuxième moitié du siècle précédent, une multitude de mesures des concentrations de métaux ont été effectuées sur différents composants de la biosphère. L'évaluation critique de cet ensemble de données a soulevé deux préoccupations : beaucoup de ces mesures se sont avérées peu fiables et même lorsqu'elles l'étaient, le lien entre la concentration du métal mesurée dans le milieu et l'exposition des organismes n'est pas clair. La préoccupation première, soit la validité des concentrations mesurées, vient principalement des contraintes analytiques associées à la mesure de concentrations de métaux à des teneurs environnementales. Ces concentrations, bien qu'importantes d'un point de vue biologique, sont tout de même souvent très faibles d'un point de vue analytique et leur mesure exige des précautions exceptionnelles alors absentes il y a quelques décennies. La deuxième préoccupation, soit le lien entre les concentrations et l'exposition des organismes, est apparue lorsque des chercheurs ont observé que différentes « formes » d'un même métal pouvaient entraîner des réponses biologiques bien différentes (Tessier et Turner 1995). La complexification du problème ne s'est pas arrêtée là : beaucoup de tests d'exposition des animaux aquatiques utilisaient un schéma expérimental basé sur une exposition aux métaux par l'eau uniquement. Cependant, des expériences récentes (Luoma 1995, Roy et Hare 1999, Munger *et al.* 1999, Lee *et al.* 2000, Schlekat *et al.* 2000) ont montré qu'on ne peut présumer une telle chose parce que les métaux peuvent aussi être assimilés par la diète.

Ce développement des connaissances a poussé les agences de contrôle environnemental à prendre des précautions spéciales pour la mesure des concentrations de métaux dans l'environnement mais surtout, elles ne peuvent plus compter sur une bonne partie de la littérature existante sans que les données ne passent par une analyse critique basée sur les connaissances actuelles. Le rôle du gestionnaire de l'environnement ne consiste plus à simplement utiliser les outils et données existantes, mais bien à s'appuyer sur des travaux et mesures qui suivent

une logique scientifique et qui s'appuient sur des expériences fiables et représentatives du milieu naturel.

1.3 Analyse de risque écologique (ARE) et utilisation des biomoniteurs

Un des outils de synthèse scientifique utilisé par les gestionnaires de l'environnement pour l'estimation d'un risque précis dans une situation donnée est l'analyse de risque écologique (ARE). Cette approche est basée sur une analyse de données scientifiques et de mesures sur le site d'étude pour caractériser le risque lié à l'état actuel des choses (Chapman et Wang 2000). Ce constat pourra être à la base d'une prise de décision sur les actions à entreprendre pour minimiser ce risque. Si le risque est trop élevé, par exemple, le gestionnaire pourra suggérer une liste de mesures de correction. Pour l'évaluation du risque, le gestionnaire doit pouvoir estimer précisément l'exposition des organismes et déterminer si cette exposition est de nature à entraîner des effets néfastes sur ces organismes. L'analyse de risque écologique se veut donc une synthèse de l'information disponible en un outil de prise de décision. Plusieurs types de données sont impliqués dans cette évaluation : la mesure des métaux dans l'environnement, l'estimation de l'exposition des organismes aux métaux ainsi que l'estimation de l'effet des métaux sur les organismes.

Cette procédure d'ARE vise l'estimation du risque que représentent les métaux dans l'environnement en passant par la compréhension des processus qui modulent l'exposition des organismes. Nos travaux s'inscrivent dans cette procédure : nos expériences ont porté sur la compréhension de l'exposition des organismes. Plus précisément, nos travaux portent sur l'estimation de l'exposition aux métaux des organismes aquatiques, pour laquelle différents éléments doivent être considérés, notamment la forme sous laquelle se retrouve un métal ou encore sa voie d'entrée chez les organismes. La résultante de tous les facteurs d'exposition des organismes se traduit en une variable mesurable : la concentration de métal au sein de l'organisme lui-même. L'utilisation des concentrations de métaux chez les organismes comme outil de mesure de leur exposition n'est pas nouvelle (Ramade

1992) mais pour rendre l'utilisation de ce type d'outil plus performante, les concentrations de métaux dans l'organisme doivent être reliées à des paramètres d'exposition définis. C'est précisément ce qui différencie les modèles d'exposition purement empiriques des modèles mécanistes : au lieu de mesurer un ensemble de paramètres d'exposition et de tenter de les corrélés à la concentration dans l'organisme, un modèle mécaniste est élaboré à partir d'une base théorique et les paramètres théoriques sont ensuite intégrés au modèle sous forme de variables qui sont elles-mêmes pondérées par des expériences ou mesures bien ciblées. Une série d'expériences précises permettent successivement d'ajouter des variables à un modèle d'exposition pour le rendre plus robuste. L'outil que constitue alors l'organisme (et son modèle) utilisé est un *biomoniteur* (Markert *et al.* 2003). Différents biomoniteurs existent déjà pour le suivi des métaux en milieu aquatique (Luoma et Rainbow 2005) et peuvent être utilisés, entre autres, pour estimer les variations temporelles de métaux biodisponibles (Hornberger *et al.* 2000, Croteau *et al.* 2002). Plusieurs études ont porté sur le suivi des métaux dans la colonne d'eau avec des biomoniteurs, mais jusqu'à maintenant, la contamination métallique des sédiments lacustres s'est avérée difficile avec ces outils. La synthèse de la littérature qui a mené à un modèle commun par Luoma et Rainbow (2005) pour estimer les concentrations de métaux disponibles dans l'eau ne semble pas applicable aux sédiments étant donné que la littérature est beaucoup trop fragmentaire. Bien qu'ils constituent un réservoir important de métaux (Luoma 1989), les sédiments ne bénéficient pas de la même compréhension que la colonne d'eau.

1.4 Utilisation de *Sialis* comme biomoniteur

Un organisme sédimentaire, la larve de l'insecte *Sialis*, a été proposé comme biomoniteur potentiel pour le suivi des métaux en milieu lacustre (Roy et Hare 1998). Des expériences de laboratoire ciblées ont permis d'établir que la majeure partie du Cd accumulé (environ 80%) par *Sialis* utilise la diète comme voie d'entrée (Roy et Hare 1999). Cet organisme montre une large distribution

géographique¹, ses teneurs de Cd sont corrélées à celles de ses proies en laboratoire (Roy et Hare 1999) et semble il répondre à l'exposition ambiante².

Dans les lacs, les larves de ce prédateur ont tendance à s'enfouir en creusant des tubes en 'U' (Charbonneau *et al.* 1997, Charbonneau et Hare 1998) et elles irriguent ces tubes avec de l'eau surnageante (Wang *et al.* 2001).

Le développement de ce biomonitor nécessite toutefois la considération d'autres paramètres qui peuvent être utiles pour élaborer un modèle complet de bioaccumulation. L'utilité d'un tel modèle réside dans l'aspect pratique de l'utilisation du biomonitor : les paramètres du modèle se traduisent par la réponse de l'organisme. Par exemple, si le modèle implique une exposition aux métaux sédimentaires, alors la réponse du biomonitor devra être interprétée en ce sens.

1.5 Accumulation des métaux par les organismes

Les concentrations mesurées au sein d'un biomonitor sont la résultante de différents processus de transfert du métal. Ces transferts peuvent être illustrés comme suit :



où le métal (M) est accumulé dans l'organisme (M_{org}); à partir de son milieu (M_{milieu}), k_1 et k_2 représentent les constantes de taux d'accumulation et d'élimination, respectivement tel qu'illustré à la figure 2 :

¹ La distribution des 22 espèces de *Sialis* présentes en Amérique du Nord (Bowles 1989; Tarter 1988; Whitting 1991) et des espèces d'Europe (Timmermans *et al.* 1991) est assez importante. Des larves ont été récoltées dans le sédiment des lacs ainsi que sous le substrat superficiel en eau courante.

² Les concentrations de Cd de *Sialis* ont été corrélées à celles du sédiment oxygène (après normalisation pour la matière organique) dans une série de 22 lacs du Bouclier Canadien; $R^2=0.85$, $p<0.001$ (L. Hare et A. Tessier, données non-publiées).

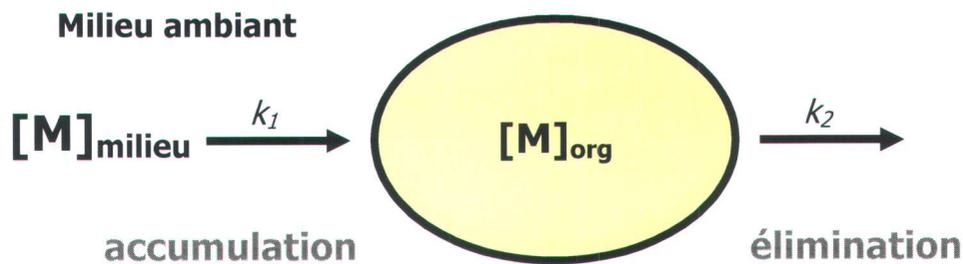


Figure 2 Schématisation de la prise en charge et de l'élimination des métaux par un organisme aquatique selon l'équation 1.

Lorsque l'organisme accumule le métal en fonction du temps, la variation de la concentration au sein de ce dernier peut être exprimée sous la forme :

$$\frac{d[M]_{\text{org}}}{dt} = k_1 [M]_{\text{milieu}} - k_2 [M]_{\text{org}} \quad (2)$$

Si l'état stationnaire est atteint, $d[M]_{\text{org}}/dt$ sera égal à 0 et l'équation 2 pourra s'exprimer sous la forme suivante :

$$[M]_{\text{org}} = \frac{k_1}{k_2} [M]_{\text{milieu}} \quad (3)$$

Son expression la plus simple pourrait prendre la forme suivante:

$$[M]_{\text{org}} = f_1 [M]_{\text{milieu}} \quad (4)$$

où $[M]_{\text{milieu}}$ représente la concentration totale de métal dans le milieu, $[M]_{\text{org}}$ la concentration dans l'organisme et f_1 une constante de proportionnalité qui intègre l'ensemble des processus qui modulent l'accumulation. La résultante de ces processus correspond à la concentration nette de métaux retenue par l'organisme. Différents paramètres, tels l'activité métabolique et le comportement, peuvent

influencer la concentration finale de métaux dans l'organisme et sont inclus de façon implicite dans cette relation. La relation entre $[M]_{\text{org}}$ et $[M]_{\text{milieu}}$ ne peut s'exprimer aussi simplement que si, par exemple, un organisme accumule le métal à partir d'un seul compartiment (eau, proies, particules inorganiques...), que la concentration de métal dans ce compartiment est directement reliée aux concentrations mesurées dans l'organisme et qu'il y a absence de compétition par d'autres ions pour les sites de fixation biologiques (Hare et Tessier 1996, Croteau *et al.* 1998). Cependant, même dans le cas d'une exposition simple à l'eau, la relation entre $[M]_{\text{org}}$ et $[M]_{\text{milieu}}$ ne s'exprime que très rarement d'une façon aussi simple. Par exemple, le métal en solution peut prendre différentes formes (Morel et Hering 1993) qui sont plus ou moins disponibles; en tenir compte rend la relation plus complexe. Suivant la prémisse de base du Modèle de l'Ion Libre (Morell et Hering 1993, Campbell 1995), la réponse biologique à un métal serait proportionnelle à l'activité de l'ion libre en solution. Si on considère que la forme libre du métal constitue la variable de prédiction de l'accumulation, nous pouvons donc exprimer l'équation 4 sous la forme suivante :

$$[M]_{\text{org}} = f_2 \left[M^{Z+} \right]_{\text{milieu}} \quad (5)$$

où $[M^{Z+}]$ représente la concentration du métal libre en solution et f_2 une constante de proportionnalité. Cette relation pourra être observée si l'accumulation se fait à partir de l'eau seulement ou si la nourriture ingérée suit la même relation (reliée directement à $[M^{Z+}]$). Dans le cas où l'accumulation du métal dans l'organisme se fait à la fois à partir de l'eau et de la nourriture, la relation peut prendre la forme suivante :

$$[M]_{\text{org}} = f_3 \left[M^{Z+} \right]_{\text{milieu}} + f_4 [M]_{\text{nour}} \quad (6)$$

où f_3 et f_4 représentent respectivement des constantes de proportionnalité entre la concentration de métal accumulée à partir de l'eau et des sédiments et les concentrations de métal dans ces compartiments, tandis que $[M]_{\text{nour}}$ représente la concentration de métaux dans la nourriture. Dans le cas d'animaux benthiques, ils peuvent être exposés tant à l'eau interstitielle (EI) qu'à l'eau surnageante (ES), l'équation 6 peut alors prendre la forme suivante :

$$[M]_{\text{org}} = f_5 \left[M^{Z+} \right]_{\text{EI}} + f_6 \left[M^{Z+} \right]_{\text{ES}} + f_7 [M]_{\text{nour}} \quad (7)$$

Où f_5 , f_6 et f_7 représentent elles aussi des constantes de proportionnalité pour un compartiment donné. Si l'accumulation à partir de l'eau est négligeable, les deux premiers termes de droite de l'équation 7 deviennent négligeables et la concentration de métal dans l'organisme peut alors être exprimée seulement en fonction de la concentration de métal dans la nourriture (équation 8).

$$[M]_{\text{org}} = f_7 [M]_{\text{nour}} \quad (8)$$

Les organismes benthiques ne sont pas nécessairement exposés à l'eau interstitielle. Leur comportement peut faire en sorte qu'ils vivent dans le sédiment mais qu'ils soient plutôt exposés à l'eau surnageante. Étant donné que *Sialis* irrigue ses tubes avec de l'eau surnageante (Wang *et al.* 2001), il est possible que les larves soient peu exposées à l'eau interstitielle. Dans le cas où il y aurait une relation directe entre la concentration de métal libre dans l'eau surnageante et celle du métal dans la nourriture, la relation entre l'organisme et son milieu pourrait s'exprimer simplement selon l'équation 5, même si une bonne proportion des métaux provient de la nourriture. Avant de simplifier à ce point le modèle d'accumulation, il est important de bien connaître la proportion des métaux qui proviennent de la nourriture mais surtout, il importe de bien connaître l'origine de cette nourriture. La figure 3 illustre les interactions possibles entre *Sialis* et son environnement.

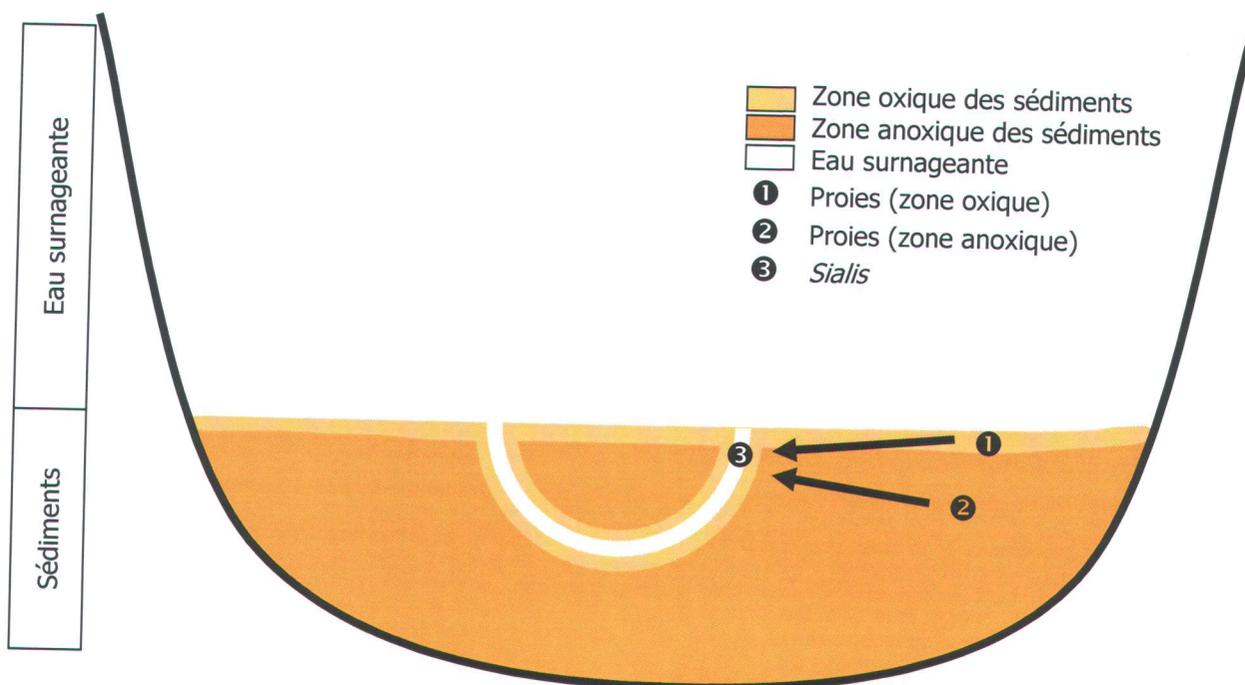


Figure 3 Routes possibles de transfert de métaux entre *Sialis* ③ vivant dans le tube en ‘U’) et ses proies qui proviennent soit de la zone oxygène ① ou anoxique ② des sédiments.

Si nous supposons que *Sialis* a peu ou pas d’échanges directs avec la zone anoxique, la seule voie de transfert des métaux à partir de cette zone serait la nourriture (si les proies de *Sialis* obtiennent leur métal de la zone anoxique). La connaissance de la voie d’entrée des métaux chez *Sialis* et la connaissance de sa diète pourra nous permettre de choisir un des trois scénarios suivants :

A) L’eau est la seule voie d’entrée importante.

Si nous supposons que l’irrigation du tube de *Sialis* résulte en une exposition très limitée à l’eau interstitielle, les concentrations dans l’organisme seront expliquées par l’équation 5 : $[M]_{Sialis} = f_2 [M^{z+}]_{milieu}$.

B) La diète est une voie importante d'entrée des métaux alors que l'eau ne l'est pas.

Si *Sialis* se nourrit de proies ❶, la relation avec la zone anoxique sera très limitée alors qu'avec les proies ❷, la relation avec le compartiment anoxique sera plus étroite. Même si peu de métaux proviennent de l'exposition par l'eau, les concentrations de métaux dans *Sialis* pourraient représenter celles du sédiment (si les proies représentent bien la contamination du sédiment).

Les concentrations de métaux dans *Sialis* pourront être illustrées par l'équation suivante si les proies ❶ sont importantes :

$$[M]_{Sialis} = f_7 [M]_{proies} \quad (9)$$

où $[M]_{proies} = f_8 [M]_{ES} + f_9 [M]_{nour.}$

Si les proies ❷ sont plus importantes, la relation prendra plutôt la forme suivante :

$$[M]_{Sialis} = f_7 [M]_{proies} \quad (10)$$

où $[M]_{proies} = f_{10} [M]_{E1} + f_9 [M]_{nour.}$ (la nourriture serait plus susceptible de représenter le compartiment anoxique)

C) La diète et l'eau sont deux voies importantes d'entrée des métaux.

Toujours en supposant que le contact avec l'eau interstitielle est très limité, les concentrations de métaux dans *Sialis* pourront être illustrées par l'équation suivante si les proies ❶ sont importantes :

$$[M]_{Sialis} = f_7 [M]_{proies} + f_6 [M^{Z+}]_{ES} \quad (11)$$

où $[M]_{proies} = f_8 [M]_{ES} + f_9 [M]_{nour.}$

Si les proies ❷ sont plus importantes, la relation prendra plutôt la forme suivante :

$$[M]_{Sialis} = f_7 [M]_{proies} + f_6 [M^{Z+}]_{ES} \quad (12)$$

$[M]_{proies} = f_{10} [M]_{E1} + f_9 [M]_{nour.}$ (la nourriture serait plus susceptible de représenter le compartiment anoxique)

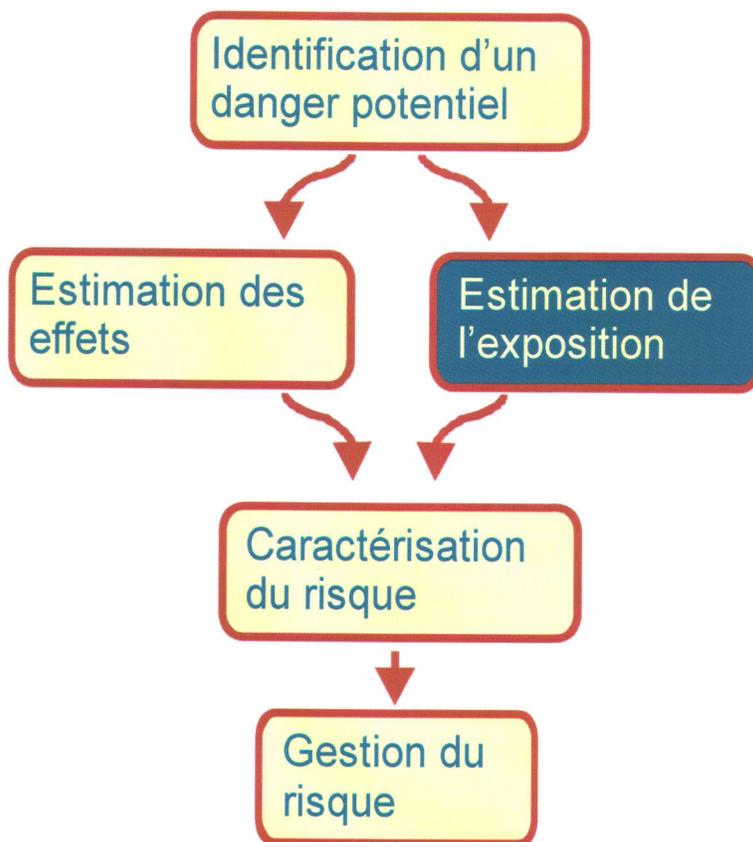
Les paramètres ciblés lors des différentes étapes du projet devraient nous permettre de choisir parmi ces différents scénarios.

2 - PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Le développement de biomoniteurs s'inscrit généralement dans une perspective de suivi environnemental. Par exemple, ils peuvent être utilisés pour caractériser l'exposition dans le cadre d'une ARE (Encadré 1).

Encadré 1. Analyse de risque écologique – résumé de l'approche (adapté de Chapman et Wang 2000).

L'analyse de risque écologique (ARE) des métaux peut se définir comme une procédure d'évaluation des effets écologiques adverses de différents métaux qui résultent de l'exposition à ces contaminants. Cette procédure débute par une étape d'identification du risque et de l'élaboration de la problématique. Une fois la problématique identifiée, la procédure implique une estimation de l'exposition et se termine par une caractérisation complète du risque. Voici la représentation schématique d'une ARE:



La composante en bleu de ce schéma, soit **l'estimation de l'exposition**, est une partie intégrante de l'ARE et est l'objet principal de nos recherches. Le développement d'un biomoniteur se veut un complément au développement des procédures d'analyse de risques écologiques.

Le produit final d'une ARE est une estimation de la probabilité d'effets écologiques adverses qui peuvent survenir ou qui sont en train de survenir.

2.1 Voies d'exposition

L'évaluation des voies d'exposition est à la base de la compréhension de la réponse du biomoniteur (la concentration mesurée). La compréhension de ces voies d'exposition nous évite dans plusieurs cas de relier à tort la concentration dans l'organisme à une composante du système aquatique qui ne lui est pas reliée. Si, par exemple, la nourriture s'avère être une voie importante pour l'entrée des métaux chez *Sialis*, tel que suggéré par Roy et Hare (1999) pour le Cd, l'ensemble des relations *Sialis* – environnement devrait tenir compte de cette variable. Alors qu'une relation étroite de $[M]_{Sialis}$ avec le compartiment sédimentaire pourrait favoriser l'utilisation de l'équation 10, l'équation 9 serait privilégiée si le biomoniteur a une relation plus forte avec la colonne d'eau.

Les résultats obtenus par Roy et Hare (1999) ne considéraient que le Cd et l'expérimentation a été menée en utilisant un protocole d'exposition basé sur une chaîne trophique artificielle. La proportion alors indiquée par les auteurs selon laquelle 20% du Cd serait accumulé par l'eau reste à confirmer avec un schéma expérimental différent. Si, par exemple, les proies sont exposées différemment, cette proportion peut elle aussi varier tout autant, car différents schémas d'exposition pourraient produire des proies ayant différents teneurs en métaux pour une même concentration d'exposition. De plus, dans la perspective d'utilisation de *Sialis* au sein d'une analyse de risque écologique, la réponse du biomoniteur à un plus grand nombre de métaux devra être caractérisée. Une expérience en milieu naturel permet d'étudier simultanément une gamme étendue de métaux et ce, dans les conditions réalistes. Ces éléments réunis ensemble constituent le premier objectif de cette recherche soit : **déterminer l'importance de la nourriture dans la prise en charge des métaux par *Sialis* en milieu naturel.**

2.2 Relations alimentaires

La diète de *Sialis* est relativement peu connue. Nous croyons que ce prédateur adopte un comportement généraliste³ et pourrait alors se nourrir d'un ensemble de proies différentes. La Figure 3 illustre les interactions possibles entre *Sialis* et son milieu selon l'origine des proies consommées (zone oxique ou anoxique des sédiments). La spéciation et la disponibilité des métaux dans les sédiments sont très différentes en anoxie et en présence d'oxygène (Morel et Hering 1993).

Cette variable est importante du fait que *Sialis* serait exposée aux métaux sédimentaires par ses proies. Si les proies sont exposées plutôt à l'eau surnageante qu'aux sédiments, l'exposition de *Sialis* peut s'en retrouver tout autant affectée. Jusqu'à maintenant, peu d'outils nous permettaient de distinguer si l'alimentation de *Sialis* dépendait de l'énergie tirée de la colonne d'eau et du sédiment oxique ou encore du sédiment anoxique.

Si l'énergie consommée par *Sialis* provient ultimement de la photosynthèse benthique, une signature de carbone ($\delta^{13}\text{C}$) distincte de celle du phytoplancton devrait être mesurée (voir le Chapitre 9). Dans le cas où cette photosynthèse benthique est absente, les animaux peuvent quand même utiliser le sédiment comme source d'énergie mais le ratio $\delta^{13}\text{C}$ est alors de peu d'utilité pour distinguer de quel compartiment les organismes tirent leur énergie. De plus, cette signature ne nous indique pas si l'énergie est consommée dans la couche superficielle des sédiments (oxique) ou dans les sédiments anoxiques. Nous avons donc décidé de développer un outil qui ne serait pas tributaire de la lumière comme la signature $\delta^{13}\text{C}$. Ce volet de nos expériences a mené à la mise au point d'un nouvel outil de traçage de liens énergétiques en milieu benthique ($\delta^{34}\text{S}$). L'objectif principal de ce

³ Les larves de *Sialis* sont carnivores et la diète des stades les plus gros serait constituée de larves de Chironomides et d'Oligochètes (Griffiths 1973; Giani et Laville 1973), tandis que les larves plus petites seraient attirées par les crustacés benthiques (Giani et Laville 1973). L'alimentation du premier stade larvaire serait constituée de microorganismes et de détritus (Du Bois et Geigy 1935). D'autres auteurs suggèrent cependant que *Sialis* consommerait les proies sur la simple base de leur densité dans le milieu, en autant que leur taille ne soit pas un obstacle à l'ingestion (Pritchard et Leischner 1973).

deuxième volet était de **déterminer si l'alimentation de *Sialis* est reliée au compartiment oxiq (colonne d'eau et sédiments) ou aux sédiments anoxiques.**

2.3 Relations *Sialis* – environnement

Nous avons axé une importante partie de nos travaux sur la compréhension de variables pour caractériser les échanges de métaux entre *Sialis* et son milieu. Ces expériences devaient nous permettre d'obtenir les paramètres nécessaires pour établir un modèle de bioaccumulation représentatif du milieu naturel.

La finalité du développement d'un biomoniteur est un modèle complet permettant de lier la concentration mesurée dans l'organisme à des variables d'exposition précise. Une fois les paramètres principaux du modèle connus et leur importance quantifiée, la réponse du biomoniteur devrait alors nous permettre d'estimer l'exposition par l'utilisation du modèle. Pour vérifier l'applicabilité du modèle, une validation en condition naturelle s'impose. La réponse du biomoniteur est proportionnelle à son exposition; si nous n'arrivons pas à prédire la réponse de notre outil, il est possible que le modèle soit incomplet.

Lors de la 'calibration' d'un biomoniteur dans la colonne d'eau, la variable d'exposition principale utilisée peut être la concentration de métal libre en solution (Hare et Tessier 1996). Dans les sédiments, aucun modèle analogue n'est aussi précis pour faire l'adéquation de l'exposition et de la réponse du biomoniteur. Après analyse des résultats des deux premières parties du projet, nous avons axé notre modèle vers les métaux contenus dans les sédiments. Nous avons donc utilisé différentes méthodes d'extraction des métaux sédimentaires qui devraient nous permettre d'estimer le mieux possible la fraction du métal 'disponible' dans les sédiments. Ces tentatives d'utilisation de *Sialis* sur le terrain constituaient le troisième et dernier objectif du projet soit : **développer une relation entre les concentrations de métaux chez *Sialis* et celles dans les sédiments en milieu naturel.**

3 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons donc séparé les étapes expérimentales selon les 3 axes de recherches principaux :

- Évaluation de l'importance de la nourriture dans la prise en charge des métaux par *Sialis* en milieu naturel.
- Caractérisation de la source d'énergie utilisée par *Sialis* (sédiments vs colonne d'eau).
- Développement d'une relation entre les concentrations de métaux chez *Sialis* et celles dans les sédiments en milieu naturel.

Pour chacune des parties du projet, les détails spécifiques sur la méthodologie utilisée se retrouvent dans les chapitres respectifs (articles). La présente section illustre les éléments clés constituant le schéma expérimental ainsi qu'une description générale de l'aspect analytique.

3.1 Phase 1 – Importance de la diète comme voie d'entrée des métaux

Pour déterminer l'importance de la diète comme voie d'entrée des métaux pour *Sialis*, nous avons procédé à une expérience de prise en charge des métaux en conditions contrôlées tout en isolant les voies d'entrées (eau et nourriture) pour en évaluer l'importance. La procédure utilisée a été développée pour estimer l'importance de la nourriture dans la prise en charge de plusieurs métaux simultanément et ce, d'une façon qui devait se rapprocher le plus possible du milieu naturel.

Le schéma expérimental retenu est très simple (Figure 4), les 4 traitements choisis nous permettaient d'isoler les différentes voies d'exposition de *Sialis* :

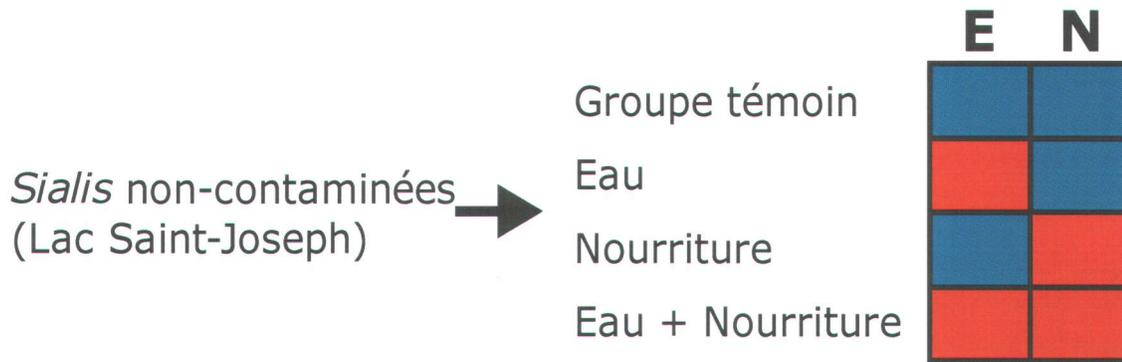


Figure 4 Schéma expérimental illustrant les différentes voies d'exposition aux métaux (E : eau; N : nourriture – rouge : contaminé; bleu : non-contaminé).

Nous avons essayé différentes techniques pour en retenir une qui permettait un contrôle de l'ingestion des proies tout en gardant le plus possible des conditions d'exposition qui ressemblaient au milieu naturel. Pour tous les traitements, des individus de *Sialis velata* ont été prélevés dans le lac St-Joseph près de Québec et utilisés comme point de départ en tant qu'organismes peu contaminés. Ces *Sialis* étaient exposées selon les traitements et récoltées à différentes périodes et analysées pour leur contenu en métaux pour permettre le suivi de la prise en charge pendant l'expérience. Les proies offertes à *Sialis* étaient des chironomides (*Chironomus riparius*) qui étaient contaminés ou non selon le traitement. A la base, tous ces chironomides sont issus d'une culture de laboratoire et présentent de faibles teneurs en métaux. Pour les traitements où la nourriture contaminée était nécessaire, nous avons placé les chironomides d'élevage pendant une semaine au fond d'un lac contaminé (lac Dufault) pour les rendre 'naturellement contaminés' par plusieurs métaux traces et ainsi s'assurer de la représentativité de notre expérience (voir Fig. 5).

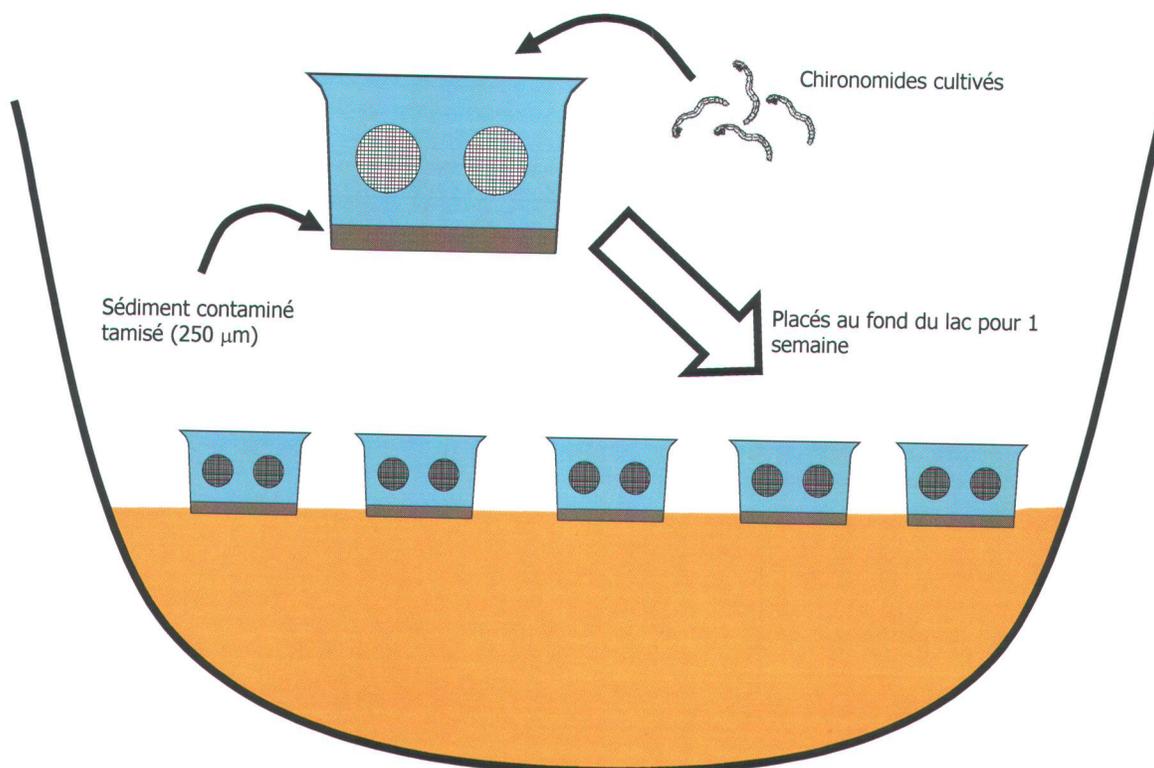


Figure 5 Méthode de contamination des proies (*Chironomus riparius*) dans le lac Dufault (contaminé).

Pour respecter notre schéma expérimental, nous avons aussi besoin de 2 sources d'eau : une d'entre elles devait être plus riche en métaux que l'autre pour créer un contraste de contamination tel qu'indiqué à la figure 4. Nous avons donc prélevé l'eau de 2 lacs pour notre expérience. Le lac 'propre' (lac Opasatica) présentait des teneurs en métaux beaucoup plus faibles que le lac contaminé (lac Dufault), ce qui nous permettait de créer le contraste recherché entre les traitements.

Les individus de *Sialis* étaient nourris selon un régime alimentaire constant, soit une proie par jour et ce, dans tous les traitements expérimentaux. Les paramètres de base tels la température et la lumière, étaient eux aussi contrôlés au cours de l'expérience. Le Chapitre 8 présente tous les détails relatifs à cette procédure.

Parallèlement à l'expérience de prise en charge menée avec les différents traitements (Fig. 4), nous avons mené une expérience pour estimer le taux de perte de différents métaux par *Sialis*. Pour cette expérience, nous avons utilisé des *Sialis* indigènes prélevées dans le lac Dufault (contaminé), les avons placées dans l'eau non-contaminée (lac Opasatica) et nous leur avons offert des proies non-contaminées pendant 2 semaines.

L'équation 13 présente les paramètres mesurés et estimés pour expliquer la prise en charge des métaux par *Sialis* (prédateur) en fonction du temps :

$$[M]_{\text{prédateur}} = \frac{AE \times IR \times [M]_{\text{proie}}}{k_e} \times (1 - e^{-k_e \cdot t}) + [M]_{\text{prédateur}}^0 e^{-k_e \cdot t} \quad (13)$$

La description complète des paramètres et le développement de cette équation sont présentés au Chapitre 8. L'expérience d'élimination permet d'estimer la constante du taux d'élimination (k_e), tandis que l'efficacité d'élimination (AE) a été obtenue en utilisant les données de l'expérience de prise en charge. Les autres paramètres étaient connus ou calculés à partir de données mesurées.

3.2 Phase 2 – Description des échanges énergétiques de *Sialis*

Pour décrire les échanges énergétiques de *Sialis*, nous avons eu recours à une méthode novatrice pour contourner les limites des approches classiques d'étude des comportements alimentaires. Lors de ce type d'étude, une approche très utilisée consiste à prélever les proies ingérées par l'organisme à l'étude et à les identifier. Par contre, cette approche ne fournit pas une représentation intégrée de l'alimentation, mais bien un portrait 'instantané' de la situation. Dans le cas de *Sialis*, le prélèvement de proies dans le tractus est difficile : ce prédateur a tendance à régurgiter son contenu gastrique lorsqu'il subit un stress comme l'échantillonnage. Dans le cas où nous pouvons tout de même prélever des restes alimentaires dans le tractus pour fin d'identification, nous sommes tout de même limités par le fait que les comportements nutritionnel et fouisseur des invertébrés

benthiques, qui sont les proies de *Sialis*, sont peu documentés. Nous avons donc choisi de développer une méthode pour éviter ces limitations et nous permettre de déterminer avec plus de certitude la source d'énergie pour *Sialis* (sédiments ou colonne d'eau). L'encadré 2 présente l'essentiel de la base conceptuelle de cette technique :

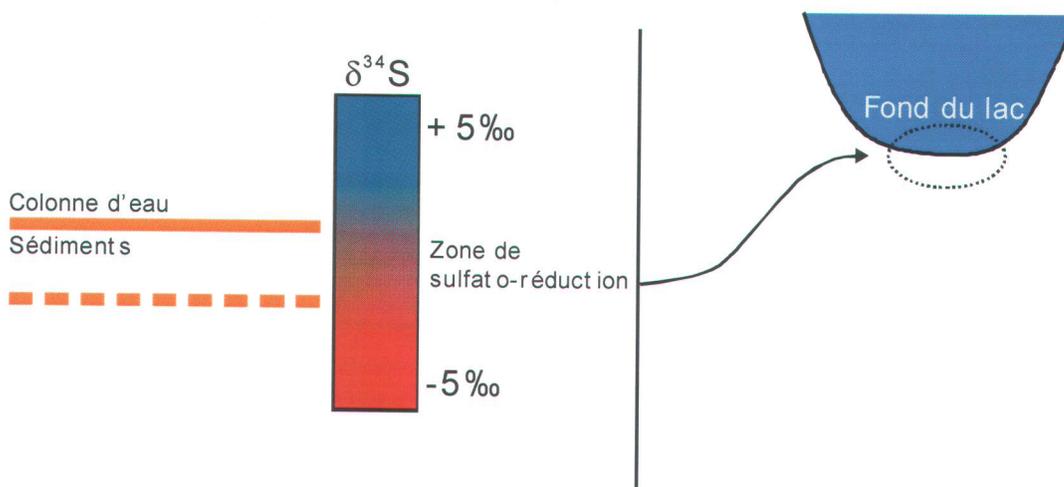
Encadré 2. Utilisation des isotopes stables de soufre pour déterminer la provenance de l'énergie – explication par la sulfato-réduction

Principe d'utilisation du traceur

Le rapport entre 2 isotopes stables de soufre (^{34}S et ^{32}S) change lorsque les bactéries sulfato-réductrices utilisent le soufre pour leur métabolisme (Böttcher *et al.* 1999, Smock *et al.* 1998, Surkov *et al.* 2000). Le produit de cette réaction (les sulfures) est appauvri en ^{32}S . Le rapport entre les isotopes 34 et 32 du soufre, aussi appelé 'signature', s'exprime comme suit :

$$\delta^{34}\text{S} = [(R_{\text{échantillon}} / R_{\text{standard}}) - 1] * 10^3$$

où R est le rapport entre les 2 isotopes stables ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$)



Ce changement de signature peut alors être utilisé comme traceur énergétique : un organisme qui tire son énergie au-delà de la zone de sulfato-réduction aura un rapport $\delta^{34}\text{S}$ plus élevé. Pour interpréter la signature d'un organisme donné, il est comparé à celui d'organismes dont le comportement est connu. Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ dans l'encadré sont données à titre indicatif seulement. **La sulfato-réduction ne semble pas être le seul phénomène impliqué dans les différences de $\delta^{34}\text{S}$ mesurées. Parallèlement à ce phénomène, l'apport de S du bassin versant peut aussi modifier de façon importante la signature du S sédimentaire. Cet apport de S allochtone dans la signature sédimentaire est abordé au Chapitre 9.**

3.3 Phase 3 – Corrélations des concentrations métalliques chez *Sialis* avec celles de son milieu

L'objectif de cette partie de la thèse est de relier les concentrations des métaux chez *Sialis* à celles dans son milieu. Nous avons donc prélevé des échantillons d'eau, de sédiments et de *Sialis*.

Au moment où cette partie du projet a été complétée, les résultats des phases 1 et 2 nous avaient appris que *Sialis* tire son énergie principalement du compartiment sédimentaire et qu'elle accumule ces métaux à partir de la diète (voir Chapitres 8 et 9). Nous avons alors axé nos analyses sur une exposition sédimentaire par le biais de la nourriture.

Nous avons déterminé les concentrations de métaux 'disponibles' dans les sédiments de deux façons. Les deux méthodes d'extraction utilisées étaient des méthodes peu agressives qui ne visaient pas la minéralisation complète du matériel sédimentaire mais qui ont pour objectif d'extraire le métal qui serait potentiellement biodisponible. La première extraction, avec l'acide nitrique (1N), est sensée extraire la fraction labile des métaux dans les sédiments (Gallon *et al.* 2005). Cette fraction, sans être constituée exclusivement de métaux biodisponibles, représente les métaux qui ne sont pas trop fortement liés au matériel sédimentaire. Nous avons aussi tenté de normaliser ces concentrations avec la concentration de carbone organique qui semble réduire la disponibilité des métaux sédimentaires (Besser *et al.* 1995).

La deuxième méthode utilisée se voulait une meilleure représentation de la concentration biodisponible de métaux dans les sédiments. Les résultats du Chapitre 9 indiquent que les organismes détritvires semblent être partie intégrante de la chaîne alimentaire de *Sialis*. Nous croyons que ces organismes digèrent la fraction biodisponible de métaux dans les sédiments, en accumulent une partie, pouvant ainsi transmettre une partie de ce métal à *Sialis*. Nous avons donc utilisé une technique permettant de simuler la digestion des sédiments par les organismes benthiques détritvires. Il existe une littérature abondante sur l'utilisation des fluides digestifs comme matériel de minéralisation des métaux pour extraire la

fraction dite ‘biodisponible’ (Mayer *et al.* 1996, Mayer *et al.* 1997, Chen et Mayer 1998, Chen *et al.* 2000, Chen *et al.* 2002, Weston et Maruya 2002, Weston *et al.* 2004). Cependant, l’utilisation des fluides digestifs de *Sialis* s’est avérée impossible de par le petit volume disponible par rapport à ce qui était nécessaire pour incuber les sédiments. Une alternative aux fluides digestifs naturels réside en l’utilisation de mélanges protéiques commerciaux qui imitent les propriétés de complexation des fluides naturels (Chen et Mayer 1998, D.P. Weston com. pers.). Lorsque placés en présence de ces mélanges, les sédiments libèrent une fraction de leur métal qui peut alors être qualifié de ‘biodisponible’. Bien que cette méthode ne soit pas standardisée, nous avons toutefois cru bon de l’utiliser de façon exploratoire, tout en la comparant à une extraction chimique ‘douce’.

3.4 Méthodes analytiques

3.4.1 Métaux

Les analyses de métaux ont été effectuées d’une façon similaire lors de chaque étape du projet. Les échantillons d’eau ont été récoltés avec des dialyseurs propres placés dans les lacs sous étude pour au moins 3 jours. Les dialyseurs étaient placés 1 m au-dessus du sédiment en zone littorale. A la fin de la période d’équilibration, un échantillon d’eau était prélevé dans chacune des cellules (environ 4 mL) et placé dans une bouteille propre en polyéthylène de basse (LDPE) ou haute densité (HDPE) pré-acidifiée avec de l’acide nitrique à une concentration finale de 0.13%.

Pour les organismes, la récolte s’effectuait avec un filet benthique en plongée sous-marine ou encore avec un aspirateur benthique à air comprimé. Dans les deux cas, les organismes étaient ramenés à la surface et séparés du sédiment. A moins qu’une disposition particulière ne soit indiquée, les organismes étaient placés 24h dans l’eau du lac d’où ils étaient récoltés pour évacuer leur contenu digestif. Les organismes étaient alors égouttés sur une serviette absorbante en polypropylène propre et placés sur une feuille de Téflon qui était elle-même insérée dans un tube de HDPE propre. Le tout était congelé à -20°C jusqu’à analyse.

Alors que les échantillons d’eau récoltés étaient prêts pour l’analyse des métaux dès leur récolte, les échantillons biologiques devaient passer par une étape de

minéralisation pour en solubiliser les métaux tissulaires. Les organismes congelés ont été séchés dans un lyophilisateur jusqu'à un poids constant et ensuite pesés pour nous permettre d'exprimer les concentrations mesurées par unité de poids sec. Nous avons ensuite placé les organismes à l'intérieur de bouteilles de Téflon avec de l'acide nitrique concentré (grade métaux traces) suivant un ratio maximal de 1 mg (sec) par 30 μ L d'acide. Les échantillons étaient alors placés à l'autoclave (121°C) pour une période de 3 heures. Des échantillons de matériel certifié étaient placés dans chacune des séquences de digestion pour s'assurer de la reproductibilité de notre technique de minéralisation.

Les procédures détaillées de traitement des échantillons de sédiments se retrouvent au Chapitre 10 mais on peut dire sommairement que l'extraction acide a été réalisée sur le sédiment sec avec de l'acide nitrique 1N et l'extraction avec le fluide digestif synthétique a été effectuée sur le sédiment humide avec une solution commerciale de sérum d'albumine bovin (Sigma P-5369) dilué à 1000 mM (concentration d'acides aminés). Dans les 2 cas, les métaux ont été dosés dans le surnageant de l'extraction et les résultats sont exprimés en poids sec de sédiment.

Nous avons utilisé deux techniques pour tous les dosages de métaux. Lorsque les échantillons présentaient des teneurs en métaux facilement mesurables (comme le calcium dans l'eau), nous avons utilisé un spectromètre à plasma inductif d'argon couplé à un détecteur multicanaux d'émission atomique (ICP-AES; Varian Vista AX). Pour les analyses des plus faibles teneurs en métaux, un spectromètre à plasma inductif d'argon couplé à un spectromètre de masse (ICP-MS; Thermo Elemental modèle X7) était utilisé. Lors des analyses réalisées par ICP-MS, le rhodium était utilisé comme étalon interne pour effectuer en temps réel une correction pour la dérive du signal de l'appareil et des effets de matrice. L'absence d'effet de matrice dans les échantillons dilués pour analyse était confirmée par la récupération de l'ajout d'un étalon lors du dosage. La qualité des résultats était aussi vérifiée par l'analyse de répliqués (10% des échantillons), de témoins (blancs) analytiques (5% des échantillons) ou encore d'étalons analytiques (5 à 10% des échantillons). De plus, toutes les séquences d'analyses étaient validées à l'aide d'un

échantillon certifié par un organisme reconnu. Dans le cas des échantillons solides, la validation de l'ensemble de la procédure (de la minéralisation au dosage) était effectuée avec les échantillons certifiés solides et avec des échantillons d'eau pour la portion 'dosage' seulement.

3.4.2 Anions

Les anions dans l'eau étaient analysés directement par chromatographie ionique (Dionex DX-300, colonne IONPAC At-14).

3.4.3 Carbone organique dissous

Le carbone organique dissous a été analysé par combustion sur des échantillons d'eau non-traités sur un analyseur Shimadzu (modèle TOC-5000).

3.4.4 Carbone inorganique dissous

Le carbone inorganique dissout (CID) était mesuré par chromatographie en phase gazeuse (Perkin-Elmer modèle Sigma 300, colonne Porapak-Q) dans les fioles hermétiques contenant l'échantillon d'eau (1.5 mL) et 60 µL de HCl 10%. Lors du prélèvement de l'échantillon d'eau, le liquide était injecté avec une aiguille dans la fiole hermétique.

3.4.5 Analyses des isotopes stables de carbone ($\delta^{13}\text{C}$) et de soufre ($\delta^{34}\text{S}$)

Les analyses isotopiques ont été confiées à un laboratoire externe, Iso-Analytical (Sandbach, UK). Elles ont été réalisées sur un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse (ANCA-GSL/20-20, Europa Scientific). Pour les isotopes de carbone, les échantillons prélevés étaient séchés à froid, broyés, pesés et introduits dans une capsule d'étain. Pour les analyses de soufre, la procédure était similaire mais du pentoxyde de vanadium était ajouté dans les capsules d'étain avec l'échantillon pour favoriser la combustion. Les résultats étaient rapportés sous forme de rapports isotopiques qui prennent la forme suivante : $\delta X = [(R_{\text{échantillon}} / R_{\text{standard}}) - 1] \times 10^3$ où X représente soit le ^{13}C ou ^{34}S , R est le rapport des 2 isotopes stables mesurés ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$). La valeur de référence ou 'standard' utilisée pour l'expression des résultats était le VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) pour le

rapport $\delta^{13}\text{C}$ tandis que CDT (Canyon Diablo Trolite) était utilisé pour les analyses isotopiques de soufre.

3.4.6 Analyse des données et modélisation

Pour l'analyse des données, nous avons utilisé le logiciel SPSS (version 13, SPSS inc., Chicago IL) implémenté du module d'analyse de régressions (SPSS Regression Models).

3.4.7 Préparation des contenants d'échantillonnage et du matériel d'analyse

Dans tous les cas, la mention 'propre' attribuée au matériel utilisé représente des conditions particulières de lavage. Dans le cas des contenants pour les échantillons réservés aux analyses de métaux, les tubes et contenants étaient laissés une nuit dans l'acide nitrique 15% (v/v) et ensuite rincés avec de l'eau déminéralisée ultra-pure (18 M Ω cm). Pour les analyses d'anions dans l'eau, la solution acide était remplacée par de l'eau ultra-pure pour le trempage mais le rinçage était similaire. Les contenants pour le carbone organique dissous étaient trempés dans une solution de persulfate de potassium (52 g L⁻¹) à 60°C pendant 1 heure. Les contenants étaient alors rincés à l'eau ultra-pure et placés dans un four à 400°C pendant 6 heures pour éliminer toute trace de carbone organique. Sauf lorsqu'une mention particulière est évoquée, tous les contenants utilisés pour les prélèvements ou la préparation des réactifs étaient placés sous une hotte à flux laminaire pour le séchage. Ce séchage était réduit au minimum et dès que les contenants étaient secs, ils étaient retirés de la hotte pour diminuer le risque de contamination. Une fois les contenants propres et secs, ils étaient emballés avec des sacs de polyéthylène pour les tenir à l'écart de la poussière ambiante.

Pour les analyses d'isotopes stables de carbone et de soufre, le risque de contamination était beaucoup moins critique étant donné que l'analyse s'effectuait sur des éléments tissulaires majeurs. Les organismes récoltés étaient placés dans un contenant en polyéthylène neuf lors de leur prélèvement. Le mortier utilisé pour réduire en poudre les échantillons séchés était rincé avec de l'eau déminéralisée et séché avec une serviette absorbante entre chaque broyage.

4 - RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Phase 1 – Importance de la diète comme voie d'entrée des métaux

Les résultats de la première phase de notre projet ont démontré l'applicabilité de notre protocole expérimental pour estimer l'importance de la diète comme voie d'entrée des métaux. En effet, la méthode de contamination des proies en milieu naturel a montré qu'il était possible d'utiliser des proies de culture et de les placer dans un lac pendant une période donnée pour les utiliser comme source de métaux dans une expérience. Les larves de chironomides utilisées ont montré une prise en charge marquée d'arsenic (As), de cadmium (Cd), de cobalt (Co), de cuivre (Cu), de plomb (Pb) et de zinc (Zn) (Fig. 2, Chapitre 8). Pour la plupart des éléments, l'état stationnaire des concentrations de métaux chez les proies était atteint après environ une semaine. Pour le Cd, la progression de la concentration s'est poursuivie jusqu'à environ 11 jours d'exposition. Nos résultats sont similaires à ceux présentés par Harrahy et Clements (1997) qui montraient que l'état stationnaire était atteint en l'espace d'environ une semaine pour le Cd, le Cu et le Zn chez une espèce (*Chironomus tentans*) du même genre que celle utilisée dans nos expériences (*C. riparius*). Les concentrations illustrées (Fig. 2, Chapitre 8) représentent les concentrations métalliques chez la proie, y compris le contenu de son tractus digestif. Lorsque des proies étaient placées 24 h dans l'eau seulement pour l'évacuation de ce contenu (les triangles dans la Fig. 2, Chapitre 8), les concentrations mesurées étaient similaires, suggérant que les concentrations mesurées sont réellement des concentrations tissulaires et non pas seulement celle du contenu alimentaire en transit lors de l'analyse.

Lorsque ces proies contaminées étaient offertes à *Sialis*, une prise en charge marquée de ces mêmes éléments s'en est suivi (Fig. 3, Chapitre 8). Lorsque nous avons exposé *Sialis* à de l'eau contaminée du Lac Dufault mais en présence de *Chironomus* de culture, la prise en charge était négligeable, voire nulle. En effet, l'importance relative de la nourriture pour la prise en charge de tous ces éléments

atteint presque 100%, sauf pour le Pb (environ 94%). Ces résultats sont similaires à ceux publiés par Roy et Hare (1999) qui ont montré qu'environ 80% du Cd était accumulé par *Sialis* à partir de sa nourriture. Nos résultats attribuent une importance légèrement plus grande à la voie alimentaire pour la prise en charge du Cd. Cette différence serait attribuable au protocole de contamination des proies utilisé par ces auteurs qui différait du nôtre. Pour une même concentration dans l'eau, il semble que leurs proies étaient environ 100 fois moins contaminées que celles utilisées dans notre expérience. Cette différence entre le ratio d'exposition eau/nourriture pourrait expliquer la légère divergence dans le calcul de l'importance relative de la nourriture comme voie d'entrée des métaux chez *Sialis*. D'ailleurs, d'autres auteurs ont rapporté que l'importance relative de la nourriture comme source de métaux pour un prédateur peut varier selon les concentrations métalliques ambiantes (Kraemer *et al.* 2007).

En utilisant l'équation 13, nous avons pu estimer l'efficacité d'assimilation (AE) à partir de nos résultats. Ce paramètre varie de ~9% pour le Pb à environ 32% pour le Cd (Chapitre 8). Roy et Hare (1999) avaient obtenu une efficacité d'assimilation d'environ 50% pour le Cd lors d'une expérience similaire. Encore une fois, les différences dans les teneurs de Cd mesurées dans nos proies et celles utilisées lors de leur expérience pourraient expliquer cette divergence. Il semble qu'une exposition à des proies plus fortement contaminées entraîne une efficacité d'assimilation plus faible (Xu *et al.* 2001).

4.2 Phase 2 – Description des échanges énergétiques de *Sialis*

La deuxième partie du projet nous a permis de déterminer la source de l'énergie utilisée par *Sialis*. Pour obtenir cette information nécessaire au développement de notre modèle, il a fallu réunir plusieurs informations de la littérature et effectuer une expérimentation dont la portée dépassait notre simple question de départ qui était: d'où vient l'énergie utilisée par *Sialis*? Nous avons choisi d'utiliser les isotopes stables de soufre pour répondre à cette question mais les isotopes du carbone pouvaient, selon la littérature existante, y répondre en partie. En effet, les

chaînes trophiques basées sur l'utilisation du carbone qui est issu de la photosynthèse benthique possèdent une signature distincte de celles basées sur le phytoplancton. Le carbone inorganique nécessaire à la photosynthèse est limitant au fond des lacs et la diffusion via la couche limite de diffusion présente à la surface de ces algues benthique favorise la prise en charge du ^{12}C et entraîne un rapport $\delta^{13}\text{C}$ plus élevé. Ce mécanisme de traçage utilise la photosynthèse comme base de séparation et peut éventuellement être utilisé pour discriminer une alimentation benthique d'une alimentation planctonique au sein d'un réseau trophique. Lorsque l'intensité lumineuse est faible au fond d'un lac, la photosynthèse benthique est alors limitée ou inexistante, ce qui entraîne une prédominance de production primaire par le phytoplancton aux dépens du phytobenthos. Dans le cas d'un lac foncé, cette technique ne nous informe que très peu sur les différences alimentaires à l'interface sédimentaire : tous les organismes ont une signature $\delta^{13}\text{C}$ similaire (Hecky et Hesslein 1995). De plus, ce traceur nous informe sur l'endroit où l'énergie est produite, et non pas où sur l'endroit elle est consommée.

En choisissant les rapports isotopiques de soufre comme traceur, le mécanisme de discrimination a une base très différente (voir l'Encadré 2). La base de séparation colonne d'eau / sédiments est en partie le résultat de la sulfato-réduction qui survient en condition d'anoxie qui prévaut dans les sédiments. Il restait cependant à déterminer si la signature sédimentaire est transmise à la chaîne trophique benthique.

Pour cette partie du projet, nous avons effectué deux campagnes d'échantillonnage distinctes. La première visait simplement à déterminer si des organismes vivant près de l'interface eau-sédiments pouvaient avoir des valeurs $\delta^{34}\text{S}$ différentes et si cette différence pouvait aussi être expliquée par les valeurs $\delta^{13}\text{C}$. Dans un premier temps, nous avons donc prélevé 3 organismes différents, deux d'entre eux ayant un comportement alimentaire connu. Nous avons prélevé des bivalves qui sont des organismes filtreurs de la colonne d'eau, des larves d'éphémères détritivores (*Hexagenia*) et des larves de *Sialis* dont le comportement exact restait à décrire.

Cette campagne préliminaire nous a révélé le potentiel des valeurs $\delta^{34}\text{S}$ pour discriminer des organismes de comportements alimentaires différents à l'interface sédimentaire. La signature mesurée dans les larves d'*Hexagenia* était clairement différente de celle mesurée dans les bivalves. *Hexagenia* prend son énergie de la matière organique dégradée et la signature du soufre est clairement différente de celle des bivalves qui tirent leur énergie de la colonne d'eau. Les résultats montrent aussi que *Sialis* possède un comportement étroitement lié au compartiment sédimentaire. Le ratio $\delta^{13}\text{C}$ mesuré chez les mêmes organismes montre une réponse similaire, mais pas dans toutes les situations. Dans le lac Opasatica, par exemple, le carbone ne révèle pas de différence entre la colonne d'eau et les sédiments (Fig. 5, Chapitre 9). De plus, les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ sont beaucoup plus variables (dans *Sialis* par exemple) que celles de $\delta^{34}\text{S}$ mesurées dans les mêmes organismes.

La deuxième campagne d'échantillonnage touchait une plus grande gamme d'organismes aquatiques. Ce sont les résultats issus de cette partie du projet qui ont révélé le grand potentiel de cet outil de traçage qu'est le soufre. Nous avons prélevé différents groupes, des détritivores benthiques à un prédateur planctonique. Ces résultats nous informent, d'un simple coup d'œil (Fig. 4, Chapitre 9), de la relation énergétique d'un organisme donné (benthique vs planctonique). L'utilisation du ratio $\delta^{34}\text{S}$ dans les poissons peut, tout comme avec les invertébrés benthiques, nous informer sur le comportement alimentaire. C'est ainsi que le comportement du Meunier Noir (*Catostomus commersoni*) s'est avéré fortement lié au groupe 'benthique' dans 2 des 4 lacs à l'étude (Fortune et Ollier) tandis qu'il occupait une position plutôt intermédiaire dans les deux autres lacs. Ce poisson est reconnu pour son alimentation benthique mais dans certains cas, il semble que son alimentation soit plutôt mixte (Saint-Jacques *et al.* 2000). Le prédateur planctonique *Chaoborus* s'est avéré strictement planctonique, tel que suggéré par Croteau *et al.* (2003). L'organisme brouteur *Holopedium* retrouvé dans le lac Ollier montre une signature de soufre très similaire à celle des 2 espèces de *Chaoborus* et du plancton (retenu sur un filet de maillage 250 μm) retrouvées dans ce lac. Bref, peu importe l'organisme aquatique, cette méthode semble nous indiquer un potentiel de

marquage qui peut trouver son utilité dans une multitude de champs d'étude. Elle indique aussi certaines limites liées à l'utilisation du ratio $\delta^{13}\text{C}$. Sur la simple analyse des ratios de carbone, il est possible de sous-estimer l'importance des sédiments comme réservoir énergétique d'un écosystème aquatique.

Deux choses sont à retenir des résultats de cette partie : le potentiel du ratio $\delta^{34}\text{S}$ comme outil de traçage et les limites du ratio $\delta^{13}\text{C}$ à mettre en évidence l'importance des flux énergétiques sédimentaires. Cette limite peut être causée par deux phénomènes : **1)** les organismes peuvent utiliser l'énergie sédimentaire même en l'absence de la photosynthèse benthique et **2)** dans les lacs foncés, l'intensité lumineuse réduite à l'interface sédimentaire engendre une activité photosynthétique réduite, ce qui réduit le taux d'assimilation de CO_2 et ainsi, réduit la discrimination isotopique du carbone.

De tous ces résultats, un seul est intégré à notre modèle pour expliquer la bioaccumulation de *Sialis* : **l'énergie utilisée par cet organisme provient principalement du compartiment sédimentaire.**

4.3 Phase 3 – Corrélations des concentrations métalliques chez Sialis avec celles de son milieu

Le développement d'un biomoniteur nécessite la réalisation d'expériences pour cibler les variables importantes dans la bioaccumulation. Une fois toutes ces informations réunies dans un modèle, il importe de mettre à l'essai ce nouvel outil pour évaluer la performance de l'approche et, au besoin, cibler les connaissances manquantes pour améliorer le modèle.

Pour mettre à l'essai *Sialis* comme biomoniteur des métaux sédimentaires, nous avons visité une série de lacs et avons tenté de corréler la réponse du biomoniteur à l'exposition aux métaux présents dans ces lacs. Nos résultats obtenus avec les isotopes stables de soufre suggèrent que *Sialis* tire son énergie du sédiment anoxique par le biais de ses proies. Nous avons retenu ce résultat et considérons *Sialis* comme étroitement liée au compartiment sédimentaire. Les résultats de la

première phase expérimentale soulignent l'importance de la voie alimentaire dans la prise en charge des métaux par *Sialis*. Ainsi pour les corrélations des teneurs métalliques de *Sialis* avec celles de son environnement, le choix des variables explicatives s'est fait sur la base de 2 informations qui sont alors devenues les prémices du modèle: 1) les métaux étudiés sont accumulés à partir de la diète et 2) l'énergie utilisée par *Sialis* provient du compartiment sédimentaire.

Considérant ces observations, nous avons décidé de ne pas comparer les concentrations d'éléments traces chez *Sialis* à celles de la colonne d'eau mais bien à celles du sédiment. Le revers de ce choix était cependant important : il devenait alors impossible d'arrimer nos résultats à ceux de Hare et Tessier (non-publié) comme nous avions prévu à l'étape de la conception de cette expérience. Ces chercheurs avaient eux aussi récolté des individus de *Sialis* dans une série de lacs présentant un gradient de contamination métallique, mais leurs données ne comportaient aucune valeur pour les concentrations de métaux dans la zone anoxique des sédiments. Cet ensemble de données non-publiées nous aurait permis de tripler le nombre de sites différents et ainsi, tester avec plus de robustesse notre approche. L'ensemble de données utilisées pour ce chapitre se trouvait donc limité aux sites visités lors de notre campagne de terrain. Lors de cette campagne, nous avons visité 10 lacs en région minière (Rouyn-Noranda, QC et Sudbury, ON) présentant des concentrations de métaux variées (Tableaux 1 et 2, Chapitre 10). Nous avons tenté de relier les concentrations d'As, Cd, Co, Cu, Ni, Pb, et Zn du sédiment anoxique à celles mesurées dans *Sialis*. Pour expliquer les variations des concentrations mesurées dans *Sialis* (Tableau 2 – Chapitre 10), nous avons tenté de les mettre en relation avec la fraction 'biodisponible' de ces éléments dans les échantillons de sédiments. Pour évaluer la concentration contenue dans cette fraction, nous avons utilisé deux approches différentes. La première était basée sur une extraction dans un acide dilué (1N HNO₃; Gallon 2005) tandis que la seconde était basée sur l'utilisation d'un fluide digestif synthétique. La technique basée sur les fluides digestifs a été utilisée à titre exploratoire mais elle a déjà donné des résultats prometteurs (Chen et Mayer 1998) pour simuler l'extraction des métaux au sein du tractus digestif des animaux détritivores marins. La relation entre les

concentrations de métaux extraits et les concentrations de métaux mesurés dans *Sialis* est indirecte étant donné que ce sont ses proies qui ingèrent le matériel sédimentaire (équation. 10).

Les lacs visités ont présenté une gamme étendue de concentrations pour plusieurs éléments traces, tant pour les concentrations dans l'eau que celles dans les sédiments (Tableaux 1 et 2, Chapitre 10). Cependant, l'adéquation entre l'exposition sédimentaire et la réponse de *Sialis* s'est avérée plutôt faible pour la majorité des métaux étudiés. En effet, une corrélation importante entre les métaux extraits et $[M]_{Sialis}$ n'a été observée que pour le Co et le Ni et ce, pour les deux méthodes d'extractions utilisées sur les sédiments. Pour ces métaux, les concentrations retrouvées dans les sédiments anoxiques expliquent bien les variations de concentrations mesurées dans *Sialis* (jusqu'à 82%). Les deux méthodes d'extraction ont mené à des concentrations fort différentes dans les sédiments (Tableau 2, Chapitre 10) mais l'utilisation de ces deux séries de données a mené à des conclusions similaires.

Nos résultats soulignent bien la difficulté de relier la concentration des métaux sédimentaires à celle des organismes qui y vivent (voir Chapitre 10). Les méthodes utilisées pour 'mimer' l'extraction des métaux biodisponibles lors de la digestion des organismes benthiques s'est avérée inadéquate pour plusieurs éléments, ce qui met en évidence l'aspect empirique de telles approches. Pour que ces techniques trouvent une signification biologique, la composition des fluides digestifs des animaux détritivores benthiques consommés par *Sialis* devrait être caractérisée plus étroitement car l'utilisation d'une technique possédant une base strictement opérationnelle ne pourra que mener à une prédiction très approximative de la biodisponibilité des métaux dans les sédiments.

Nos résultats mettent aussi à l'avant plan l'importance des biomoniteurs : les méthodes d'extraction sont basées sur des connaissances très fragmentaires des processus biologiques et leur utilisation pour prédire l'exposition ne pourrait se substituer à une mesure directe des concentration des métaux dans les organismes. La concentration mesurée dans les organismes nous informe sur la résultante de tous les processus qui modulent la prise en charge des métaux par un simple dosage

des teneurs métalliques tissulaires. Nos données mettent aussi en relief un problème bien concret lors du développement d'un biomoniteur des métaux sédimentaires : celui de choisir une variable d'exposition mesurable pour l'incorporer au modèle. Par exemple, un biomoniteur des métaux dans l'eau pourrait être basé sur l'utilisation de la concentration de métal libre, qui est relativement simple à estimer. Dans le cas des biomoniteurs sédimentaires, bien peu de variables d'exposition facilement mesurables pourraient jouer un tel rôle dans un modèle de bioaccumulation.

5 - CONCLUSIONS

Le développement d'un modèle pour l'utilisation de *Sialis* comme outil de suivi environnemental devait ultimement mener à une explication complète des concentrations de métaux mesurées dans *Sialis* sur la base de paramètres choisis. Bien que nos recherches ne permettent pas à ce jour d'arriver à un résultat aussi éclatant, nous avons récolté des éléments critiques qui devraient être intégrés à un tel modèle explicatif.

Par exemple, la nourriture s'est avérée très importante dans la prise en charge des métaux par *Sialis*, la prise en charge à partir de l'eau s'est avérée négligeable pour l'arsenic, le cadmium, le cobalt, le cuivre et le zinc tandis qu'elle comptait pour environ 6% du plomb accumulé. Cette partie du projet nous a montré, au-delà des résultats, l'applicabilité de l'approche utilisée pour résoudre ce type de problématique. La contamination des proies de culture en milieu naturel s'est avérée très efficace pour l'utilisation dans le type de schéma expérimental choisi. L'ensemble de la procédure expérimentale nous a semblé réaliste car les niveaux de contamination mesurés dans les *Sialis* à la fin de l'expérience étaient similaires à ceux retrouvés dans les *Sialis* indigènes dans le Lac Dufault (à l'exception de l'As). Cette expérience nous indique que la modélisation des échanges métalliques entre *Sialis* et son milieu devrait absolument considérer la prise en charge par la diète.

L'utilisation du rapport des isotopes stables du soufre ($\delta^{34}\text{S}$) nous a permis de répondre assez clairement à la question : d'où provient l'énergie utilisée par *Sialis*? Considérant que la nourriture est une voie d'entrée très importante des métaux, l'origine de sa nourriture est une information clé. Le développement de ce traceur s'est d'ailleurs avéré utile pour la caractérisation de la diète d'une variété d'organismes aquatiques. Cet outil permet, avec une assez bonne résolution, de déterminer si un organisme tire, directement ou non, son énergie des sédiments. Sachant que le compartiment sédimentaire est souvent un réservoir important de contaminants, cet outil promet un spectre d'utilisation assez large dans le domaine de l'écotoxicologie.

La dernière partie du projet nous a rappelé ce qui est connu depuis plusieurs années : il est difficile de relier les concentrations de métaux sédimentaires à celles des organismes qui y vivent. Nous avons utilisé deux méthodes d'extraction très différentes pour estimer la fraction 'biodisponible' des métaux sédimentaires mais ces méthodes se sont avérées efficaces pour le cobalt et le nickel seulement. L'extraction à l'aide de fluides digestifs synthétiques s'est avérée sensible à la contamination générale des sédiments. Par exemple, une très forte concentration de cuivre sédimentaire peut avoir inhibé l'extraction de cadmium. Cette 'compétition' peut survenir au sein des organismes vivants mais lors de l'extraction, cet effet est grandement tributaire des détails du protocole utilisé. Le ratio BSA / sédiment est une variable importante mais il n'est pour l'instant choisi de manière opérationnelle.

L'absence d'une clé d'identification des larves de *Sialis* récoltées dans le cadre de notre étude s'est vraisemblablement traduite par la récolte de plus d'une espèce dans les lacs visités. Des variations de teneurs métalliques inter-spécifiques peuvent aussi expliquer une partie de la variation des concentrations de $[M]_{Sialis}$ et rendre les corrélations avec les teneurs de métaux sédimentaires plus difficiles.

6 - PERSPECTIVES DE RECHERCHE

6.1 Relations *Sialis* – environnement

Nous avons récolté jusqu'ici beaucoup d'informations qui devraient être utiles pour expliquer la prise en charge des métaux par *Sialis* mais le travail n'est toujours pas achevé. Pour plusieurs éléments, la fiabilité de l'explication de la prise en charge *in situ* par les métaux sédimentaires s'est avérée très faible. Warren *et al.* (1998) affirmaient que le Cd accumulé par *Sialis* provenait de la colonne d'eau (à 95%) et non du réservoir sédimentaire. Ces résultats contrastent avec les nôtres et malgré la sensibilité de leurs calculs à certaines variables, les deux ensembles de résultats ne devraient pas diverger si fortement. Dans leur étude, la faible proportion attribuée au compartiment sédimentaire dans la prise en charge peut être tributaire du choix des données à intégrer au modèle que les auteurs ont fait. Ce modèle montre une certaine sensibilité au profil de Cd dans leurs enceintes expérimentales. Lors de leur expérience qui a duré plusieurs mois, la concentration de Cd sédimentaire dans les premiers centimètres de leurs enceintes expérimentale a chuté, ce qui a alors réduit l'exposition des animaux benthiques dans cette petite zone. Si les proies consommées par *Sialis* vivaient dans cette zone (1-2 cm de profondeur), alors l'apport de la colonne d'eau dans la prise en charge du Cd chez *Sialis* pourrait alors être différente. Une expérience relativement simple pourrait déterminer si tel est le cas. L'expérience réalisée par ces auteurs pourrait être répétée, mais sur une période beaucoup plus courte. Au lieu de laisser les bacs enrichis en Cd être colonisés par les organismes indigènes, les organismes pourraient être récoltés et confinés à ces bacs dès le début de l'expérience. *Sialis* pourrait être intégrée aux bacs 1 mois après le début de l'expérience pour permettre aux proies d'être préalablement contaminées. Après 2 semaines d'exposition, les teneurs de métaux de *Sialis* pourraient être mesurées et les calculs utilisés par Warren *et al.* effectués. L'expérience étant beaucoup plus courte, elle ne devrait pas permettre une diminution des concentrations de Cd de surface aussi importante que celle observée par Warren *et al.* Cette expérience pourrait aider à déterminer avec plus de

certitude l'apport du compartiment sédimentaire à la prise en charge de Cd par *Sialis*.

Dans le cas où les proportions colonne d'eau / sédiments de 95% / 5% seraient maintenues, nous devrions interpréter les teneurs métalliques dans *Sialis* par celles de la colonne d'eau et non du sédiment. Ceci indiquerait aussi que les proies ingérées par *Sialis* ingèrent leurs métaux à partir du compartiment de la colonne d'eau même si elles tirent leur énergie du compartiment sédimentaire (tel que révélé par les signatures $\delta^{34}\text{S}$ de *Sialis*)

Les travaux effectués avec le BSA comme fluide d'extraction mériteraient un raffinement analytique. Les proportions sédiment / BSA utilisées lors de nos expériences sont basées sur la littérature et non sur les ratios mesurés chez les proies de *Sialis*. Cette digestion du matériel sédimentaire se fait chez ces proies et leur caractérisation a jusqu'ici été très fragmentaire. *Sialis* est considérée comme un prédateur généraliste mais cette larve possède certainement des préférences alimentaires. Les proies qui constituent l'essentiel de leur diète devraient recevoir une attention particulière car *Sialis* accumule les métaux directement de ces proies. Au-delà de leurs teneurs métalliques, le processus de digestion de ces proies ainsi que leur relation avec le milieu pourrait aussi être caractérisée, ce qui devrait mener à une meilleure compréhension des échanges entre *Sialis* et son milieu.

6.2 Utilisation du rapport $\delta^{34}\text{S}$ comme outil de traçage

L'importance du compartiment sédimentaire est souvent méconnue chez les organismes vivant près de l'interface eau-sédiment. Par exemple, certains organismes comme *Chaoborus* s'enfouissent dans les sédiments mais ne s'y nourrissent pas. Sachant que cette larve d'insecte tire son Cd de la nourriture, une simple analyse de son rapport $\delta^{34}\text{S}$ aurait permis de déterminer si ses teneurs en Cd peuvent être reliées ou non à celles des sédiments. Cette situation n'illustre qu'un exemple d'utilisation de cet outil au sein d'études écotoxicologiques. Le domaine d'applicabilité de cet outil dépasse cependant le domaine de l'écotoxicologie. Ce traceur permet aussi de mesurer l'ampleur de l'exportation de l'énergie

sédimentaire au sein d'une chaîne trophique aquatique et elle permet de déterminer dans quelle proportion les organismes dépendent de ce réservoir énergétique.

L'aspect discriminant des rapports $\delta^{34}\text{S}$ est intéressant pour l'étude des échanges énergétiques avec le compartiment sédimentaire mais un raffinement des connaissances s'impose. Les données récoltées jusqu'à maintenant ne nous permettent pas d'affirmer précisément quel phénomène est à l'origine de la différence de $\delta^{34}\text{S}$ entre les sédiments et la colonne d'eau. Bien que la sulfato-réduction semble être le processus dominant en milieu marin, elle occupe probablement un rôle plus limité en eau douce, étant donné que les profils sédimentaires indiquent un épuisement des sulfates en-deça de la zone de production des sulfures. Malgré l'apport de S du bassin versant, la piste de la sulfato-réduction demeure une avenue de recherche intéressante pour l'explication de ces différences. Bien que les profils sédimentaires de sulfates et sulfures nous laissent croire à une réduction complète, d'autres processus font en sorte que le S ainsi réduit ne demeure pas nécessairement séquestré sous forme réduite. En effet, les sulfures sont réoxydés en sulfates à l'interface sédimentaire dans les lacs (Holmer M. et Storkholm P. 2001) ce qui pourrait alimenter le cycle de sulfato-réduction à nouveau et entraîner un rapport $\delta^{34}\text{S}$ distinct pour ce S ainsi transformé. Nos résultats indiquent du moins que la dépendance énergétique de *Sialis* à la colonne d'eau semble bien improbable. La différence marquée entre les rapports $\delta^{34}\text{S}$ de *Sialis* et ceux des organismes tirant leur énergie de la colonne d'eau est très importante.

7 - BIBLIOGRAPHIE

- Besser J.M., Kubitz J.A., Ingersoll C.G., Braselton E. & Giesy J.P. 1995. Influences on copper bioaccumulation and growth of the midge, *Chironomus tentans*, in metal contaminated sediments. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 4: 157-168.
- Böttcher M.E., Sievert S.M., & Kuever J. 1999. Fractionation of sulfur isotopes during dissimilatory reduction of sulfate by a thermophilic gram-negative bacterium at 60°C. *Archives of Microbiology* 172: 125-128.
- Bowles D.E. 1989. New records of *Sialis* (Megaloptera: Sialidae) from Arkansas and Oklahoma. *Entomological News* 100: 27-28.
- Campbell P.G.C. In Tessier A. & Turner D.R. [Eds.] *Metal speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, 1995, pp 45-102, Wiley, New York.
- Chapman P.M. & Wang F. 2000. Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Human and Ecological Risk Assessment* 6: 965-988
- Charbonneau P. & Hare L. 1998. Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects. *Journal of the North American Benthological Society* 17: 239-249.
- Charbonneau P., Hare L., & Carignan R. 1997. Use of X-Ray images and a contrasting agent to study the behavior of animals in soft sediments. *Limnology and Oceanography* 42: 1823-1828.
- Chen Z. & Mayer L.M. 1998. Digestive proteases of the lugworm, *Arenicola marina*, inhibited by Cu from contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 433-438.
- Chen Z., Mayer L.M., Quetel C., Donard O.F.X., Self R.F.L., Jumars P.A. & Weston D.P. 2000. High concentrations of complexed metals in the guts of deposit feeders. *Limnology and Oceanography* 45: 1358-1367.
- Chen Z., Mayer L.M., Weston D.P., Bock M.J. & Jumars P.A.. 2002. Inhibition of digestive enzyme activities by copper in the guts of various marine benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1243-1248.
- Croteau M.-N., Hare L. & Tessier A. 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environmental Science & Technology* 32: 1348-1353.

- Croteau M.-N., Hare L. & Tessier A. 2002. Increase in food web cadmium following reductions in atmospheric inputs to some lakes. *Environmental Science & Technology* 36: 3079-3082.
- Croteau M.-N., Hare L. & Marcoux P. 2003. Feeding patterns of migratory and non-migratory fourth instar larvae of two coexisting *Chaoborus* species in an acidic and metal contaminated lake: Importance of prey ingestion rate in predicting metal bioaccumulation. *Archives of Hydrobiology* 158: 57-74.
- Du Bois A.M. & Geigy R. 1935. Beiträge zur Ökologie, Fortpflanzungbiologie und Metamorphose von *Sialis lutaria* L. *Revue Suisse de Zoologie* 42 : 169-248.
- Egan, D. 2003. Ecological Restoration and sustainable development. *Ecological Restoration* 21: 161-162.
- Förstner, U. & Wittmann, G.T.W. 1981. Metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlag, New York.
- Gallon C., Tessier A., Gobeil C. & Beaudin L. 2005. Sources and chronology of atmospheric lead deposition to a Canadian Shield lake: Inferences from Pb isotopes and PAH profiles. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69: 3199-3210.
- Giani N. & Laville H. 1973. Cycle biologique et production de *Sialis lutaria* L. (Megaloptera) dans le lac de Port-Bielh (Pyrénées Centrales). *Annales de Limnologie* 9 : 45-61.
- Griffiths D. 1973. The food of animals in an acid moorland pond. *Journal of Animal Ecology* 42: 285-293.
- Harraly E.A. & Clements W.H. 1997. Toxicity and bioaccumulation of a mixture of heavy metals in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in synthetic sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:317-327.
- Hare L. & Tessier A. 1996. Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature* 380: 430-432.
- Hecky, R.E. & Hesslein R.H. 1995. Contributions of benthic algae to lake food webs as revealed by stable isotope analysis. *Journal of North American Benthological Society* 14: 631-653.
- Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A. & Cairns J. [Eds.] *Handbook of Ecotoxicology*, CRC Press, 1995, 755 p.
- Holmer M. & Storkholm P. 2001. Sulfate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review. *Freshwater biology* 46: 431-451

- Hornberger M.I., Luoma S.N., Cain D.J., Parchaso F., Brown C.L., Bouse R.M., Wellise C. & Thompson J.K. 2000. Linkage of bioaccumulation and biological effects to changes in pollutant loads in South San Francisco Bay. *Environmental Science & Technology* 34: 2401-2409
- Kraemer L.D., Campbell P.G.C. & Hare L. 2007. Modeling Cd accumulation in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, soumis.
- Lee B.-G, Griscom S.B., Lee J.S., Choi H.J., Koh C.H, Luoma S.N., Fisher N.S. 2000. Influences of Dietary Uptake and Reactive Sulfides on Metal Bioavailability from Aquatic Sediments. *Science* 287: 282-284.
- Luoma S. N. 1989. Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? *Hydrobiologia* 176/177: 379-396.
- Luoma S.N. Prediction of metal toxicity in nature from bioassays: Limitations and research needs. *In* Tessier A. & Turner D.R. [Eds.] *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Wiley: Chichester, England, 1995, pp 609-659.
- Luoma S.N. & Rainbow P.S. 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science & Technology* 39: 1921-1931.
- Markert B., Kayser G., Korhammer S. & Oehlmann J. Distribution and effects of trace substances in soils, plants and animals *In* B. Markert & K. Friese [Eds.] *Trace elements – Their distribution and effects in the environment*, Elsevier, 2000, pp. 3-32.
- Markert B.A., Breure A.M. & Zechmeister H.G. 2003 *Bioindicators and biomonitoring (Trace metals in the environment)*, Elsevier, 1040 p.
- Mayer L.M., Chen Z., Findlay R.H., Fang J., Sampson S., Self R.F.L., Jumars P.A., Quetel C. & Donard O. 1996. Bioavailability of sedimentary contaminants subject to deposit-feeder digestion. *Environmental Science and Technology* 30:2641-2645.
- Mayer L.M., Schick L.L., Self R.F.L., Jumars P.A., Findlay R.H., Chen Z. & Sampson S. 1997. Digestive environments of benthic macroinvertebrate guts: Enzymes, surfactants and dissolved organic matter. *Journal of Marine Research* 55: 785-812.

- Morel F.M.M. & Hering J.G. Principles and applications of aquatic chemistry, 1993, John Wiley & Sons, inc., New York.
- Munger C., Hare L. & Tessier A. 1999. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in nature. *Limnology and oceanography* 44: 1763–1771.
- Nriagu J.O. & Pacyna J.M. 1998. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139.
- Pritchard G & Leischner T.G. 1973. The life history and feeding habits of *Sialis cornuta* Ross in a series of abandoned beaver ponds (Insecta; Megaloptera). *Canadian Journal of Zoology* 51: 121-131.
- Ramade, F. 1992. Précis d'écotoxicologie. Masson, Paris.
- Roy I. & Hare L. 1998. Eastward range extension in Canada of the alderfly *Sialis velata* Ross (Megaloptera; Sialidae) and the potential of the genus as a contaminant biomonitor. *Entomological News* 109: 285-287.
- Roy I. & Hare L. 1999. Relative importance of water and food as cadmium sources to the predatory insect *Sialis velata* (Megaloptera). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 1143-1149.
- Smock A.M., Böttcher M.E., & Cypionka H. 1998. Fractionation of sulfur isotopes during thiosulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Archives of Microbiology* 169: 460-463.
- Shlekat C.E., Decho A.W. & Chandler G.T. 2000. Bioavailability of particle-associated silver, cadmium, and zinc to the estuarine amphipod *Lepocheirus plumulosus* through dietary ingestion. *Limnology and Oceanography* 45: 11-21.
- St-Jacques N, Harvey H.H. Jackson D.A. 2000 Selective foraging in the white sucker (*Catostomus commersoni*) *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 78(8): 1320-1331.
- Surkov A.V., Böttcher M.E., & Kuever J. 2000. Stable sulfur isotope fractionation during the reduction of thiosulfate by *Desulfovibrio russensis*. *Archives of Microbiology* 174: 448-451.
- Tarter D.C. 1988. New record of the alderfly *Sialis vagans* for West Virginia (Megaloptera: Sialidae). *Entomological News* 99: 63-64.
- Telmer K.; Bonham-Carter G.F.; Kliza D.A. & Hall, G.E.M. 2004. The atmospheric transport and deposition of smelter emissions: Evidence from the

- multi-element geochemistry of snow, Quebec, Canada. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68: 2961-2980.
- Tessier A. & Turner D.R. [Eds.] *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. Wiley: Chichester, England, 1995, 696 p.
- Timmermans K.R., van Hattum B., Peeters W., & Davids K. 1991. Trace metals in the benthic habitat of the Maarsseveen lakes system, the Netherlands. 24: 153-164.
- Wang F., Tessier A., & Hare L. 2001. Oxygen measurements in a freshwater insect burrows. *Freshwater Biology* 46: 317-327.
- Warren L.A., Tessier A., & Hare L. 1998. Modelling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: The relative contributions of sediment and overlying layer water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnology and Oceanography* 43: 1442-1454.
- Wenning R.J., Batley G.E., Ingersoll C.G. & Moore D.W. [Eds.] *Use of sediment quality guidelines*, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 2005, 783 p.
- Weston D.P. & Maruya K.A. 2002. Predicting bioavailability and bioaccumulation with in vitro digestive fluid extraction. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 962-971.
- Weston D.P., Judd J.R. & Mayer L.M. 2004. Effect of extraction conditions on trace element solubilization in deposit feeder digestive fluid. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1834-1841.
- Whitting, M.F. 1991. A distributional study of *Sialis* (Megaloptera: Sialidae) in North America. *Entomological News* 102: 50-56.
- Xu Y., Wang W.-X. & Hsieh, D.P.H. 2001. Influences of metal concentration in phytoplankton and seawater on metal assimilation and elimination in marine copepods. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1067-1077.

Section 2 – articles

8- A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb and Zn for the aquatic invertebrate *Sialis velata*

Environmental Science and Technology (2006) 40: 873-879

LOUIS CROISETIÈRE, LANDIS HARE,* AND ANDRÉ TESSIER

Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE), Université du Québec, 490 rue de la Couronne, Québec, Québec, Canada, G1K 9A9

Running head: Trace element uptake from food and water in the field

*Corresponding author phone: (418)654-2640; fax: (418)654-2600; e-mail: landis@ete.inrs.ca.

Résumé

Nous avons estimé l'importance relative de l'eau et de la nourriture comme sources des éléments traces As, Cd, Co, Cu, Pb et Zn pour l'invertébré benthique *Sialis velata*. Pour y parvenir, nous avons en premier lieu exposé ses proies, les larves de *Chironomus riparius*, dans un lac, caractérisé par de fortes teneurs en métaux, situé dans la région minière de Rouyn-Noranda. Les concentrations de 5 des 6 éléments ont atteint un état quasi-stationnaire dans les larves de *Chironomus* après une semaine d'exposition. Lorsque le prédateur *Sialis* a été exposé à ces proies contaminées, les teneurs de tous les éléments mesurés ont augmenté de façon appréciable. La seule exposition à l'eau du lac contaminé n'a cependant pas mené à une prise en charge mesurable (à l'exception du Pb où une légère prise en charge a été observée). Dans un traitement additionnel où les larves de *Sialis* étaient exposées aux métaux sédimentaires en plus des proies contaminées, nous n'avons observé aucune prise en charge additionnelle. Nous concluons que la nourriture constitue la voie d'entrée principale pour la plupart des éléments étudiés (près de 100% pour As, Cd, Co, Cu, et Zn) et qu'elle compte pour environ 94% de la prise en charge du Pb. L'adéquation entre notre modèle de prise en charge et les données expérimentales est très bonne et une exposition à la nourriture seulement suffit à expliquer la prise en charge par cette larve d'insecte.

Abstract

We measured the relative importance of water and food as sources of the trace elements As, Cd, Co, Cu, Pb and Zn for larvae of the benthic insect *Sialis velata*. To achieve this end, we first exposed its prey, the midge *Chironomus riparius*, to trace elements in a contaminated lake located near a non-ferrous metal smelter in Northwestern Quebec. Concentrations of 5 of the 6 trace elements reached a steady state in prey within one week. When exposed to these contaminated prey, predator trace element concentrations increased markedly for all of the trace elements studied. In contrast, exposure of *S. velata* to contaminated lakewater led to no significant increase in their concentrations of 5 of the 6 trace elements ([Pb] increased only slightly). Additional treatments in which the predator was exposed to these trace elements in both food and water or in a combination of food and water and sediment did not lead to further increases in its contaminant concentrations beyond those measured in the food-only treatment. We conclude that food (prey) is the almost exclusive source of As, Cd, Co, Cu and Zn for *S. velata* and that it is the source of 94% of its Pb. Model curves for trace element accumulation over time by the predator fit our measured data well, and trace element concentrations in food alone are sufficient to model the exchange of these contaminants in this insect.

Acknowledgments

Funding was provided by the Fonds de Recherche du Québec sur la Nature et les Technologies, the Metals In The Environment Research Network (contribution number 53), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Ontario Power Generation Inc., and the Mining Association of Canada. Assistance from J. Bastien, J. Ciborowski, A. Gosselin, P. Marcoux, J. Orvoine, C. Porcher, R. Rodrigue, and E. Therrien is gratefully acknowledged.

Introduction

Centuries of human activity have mobilized trace metals and metalloids from mineral deposits and led to their enrichment in terrestrial and aquatic ecosystems, with toxic consequences for some animal and human communities (1). Ecological risk assessment for trace elements aims to understand and predict the negative consequences of these contaminants on organisms. A key step in this process is exposure characterization, that is, determining to which trace element source (water or food) and at what concentrations, animals are exposed (2). Such information is critical, because ignoring a route of entry could underestimate an animal's exposure to trace elements and thus the potential of this class of contaminants for causing biological damage. For example, toxicity test protocols generally call for the exposure of animals to metals in dissolved form only (3). Such a design assumes that food particles are a negligible source of metal for the test animal, yet information to support this supposition is usually lacking (3). In fact, there is a growing body of evidence indicating that food can be a major route of entry of metals into aquatic animals (4, 5).

Knowledge of how trace elements enter aquatic animals is also important if these organisms are used as biomonitors to assess exposure to these contaminants. Measurements of trace elements in a biomonitor have the advantage that they represent a response to bioavailable trace elements, information that is not available when contaminants are measured in water or food particles (6). The prerequisite for using an animal as a biomonitor is a predictive relationship between the concentration of the trace element in the animal and in its surroundings (7). For

such relationships to be mechanistically sound, we need to know to what environmental compartment its trace element concentrations should be compared; understanding the relative importance of dissolved and particulate trace elements as metal sources is important in this regard.

We set out to determine the relative importance of water and food as As, Cd, Co, Cu, Pb, and Zn sources for the alderfly *Sialis*; larvae of this widespread insect have been proposed as metal biomonitors (8). In the laboratory, larvae of *Sialis velata* are reported to take up the majority of their cadmium (Cd) from prey (9). Our goal was to determine if these laboratory results for Cd could be extrapolated to nature, as well as to determine if food is also the major source of other essential and non-essential trace elements for this insect in the field.

Methods

Experimental set up. To discriminate among trace element sources for *S. velata*, we conducted uptake experiments in the region of Rouyn-Noranda, Quebec, Canada. Our study was centered on two lakes: Lake Dufault, located 2 km downwind from a non-ferrous metal smelter (48°29'N, 79°00'W), has elevated concentrations of many trace elements in its water, sediment and biota, whereas Lake Opasatica, located 30 km upwind from the smelter (48°08'N, 79°20'W), is much less contaminated (10-13; Table 1). These lakes are otherwise similar in their pH and water chemistry, with the exception that sulfate concentrations are more elevated in L. Dufault (Table 1). We used water from these lakes for our experiment as well as prey (described below) that had accumulated their trace elements in contaminated Lake Dufault (Fig. 1).

The experimental system consisted of a temperature-regulated (20°C) basin into which we installed 2 high-density polyethylene (HDPE) channels (1.5 m long x 0.35 m wide x 0.1 m deep) that were fed continuously (residence time 0.5 d), from two 200-L HDPE reservoirs, water from either Lake Opasatica or Lake Dufault (low and high trace element concentrations, respectively; Table 1). Lakewater in these reservoirs was replenished daily using a non-metallic magnetic pump and a 64-µm mesh-aperture in-line Nitex filter to remove plankton that could be consumed by the predator. To verify the constancy of water quality in the exposure system, we suspended diffusion samplers (14) in the reservoirs. Aliquots were taken from cells of the diffusion samplers every 2 d using a Gilson pipette fitted with an acid-washed tip for measurement of trace elements and major ions;

samples for measurement of dissolved inorganic carbon (DIC) were also collected using a plastic disposable syringe purged with nitrogen and then 1.5 mL was injected through a septum into a purged vial containing 60 μ L of 10% HCl. Temperature and pH (Hanna model HI 9025) were measured daily in the reservoirs.

A series of 30-mL HDPE containers that served as exposure units for individual *S. velata* were placed into each channel. Water flowed through these containers via holes cut into their sides that were covered with 500- μ m mesh-aperture netting to retain larvae. By offering to *S. velata* prey that had either low or high concentrations of trace elements, this predator was exposed to trace metals in either: water alone, prey alone, or both prey and water (Fig. 1). These exposure units did not include sediment, but larvae feed and survive well in the laboratory without sediment (< 5% mortality over one month). To determine if sediments could be a direct source of trace metals for this predator, which is a burrower in nature (15), we exposed larvae to trace elements in sediment, water and food. For this additional treatment, we half-filled exposure units with contaminated sediment from Lake Dufault and left them for 24 h to allow settling before adding *S. velata*. Lastly, as a control treatment, *S. velata* were exposed to uncontaminated water and prey. We covered the channels with opaque plastic sheets during the experiment to keep insects in the dark.

Food. As food for *Sialis* we chose chironomid larvae, which are a key component of the benthic fauna in many lakes (16) and an important source of energy for higher trophic levels (17), including this predator (18). We first attempted to collect chironomid larvae from lakes Dufault and Opatatica, but were unable to obtain

sufficient numbers of a single chironomid species that could be easily identified when alive; use of a single species is necessary because sympatric congeners can differ by an order of magnitude in their metal concentrations (19). Thus, we reared *Chironomus riparius* larvae in the laboratory as prey for *Sialis*. Egg masses of *C. riparius* (Environmental Consulting and Testing, Superior, WI) were left to hatch in aquaria containing fine sand and the resulting larvae were fed Purina rabbit food. This food has lower trace element concentrations than many of the tropical fish foods that we tested (data not shown), which allowed us to obtain prey having low concentrations of trace elements. We transported second-instar larvae of *C. riparius* to our field site to use as prey for *S. velata*.

Uncontaminated prey consisted of reared *C. riparius* larvae (Fig. 1). To obtain contaminated prey, divers placed second-instar *C. riparius* larvae in plastic containers (25 x 35 x 25 cm) on the bottom of impacted Lake Dufault (4 m depth). Holes in the containers' walls (covered by 250- μ m mesh aperture netting to retain chironomids) allowed exchange of lakewater with the surroundings. Each container held ~200 *C. riparius* and was filled with 5 cm of contaminated sediment from Lake Dufault (uppermost 5 cm of sediment collected at 4 m water depth and sieved using a 250- μ m mesh-aperture net to remove large native chironomids). An aliquot of sieved sediment was analyzed for trace elements. *Chironomus riparius* were held under these conditions for 1 week before being used as contaminated prey for *S. velata*. We monitored prey trace element accumulation by collecting 5 *C. riparius* larvae periodically (times shown in Fig. 2) from a separate series of containers;

these undepurated prey were prepared for trace element measurements as described below.

Uptake and loss experiments. For measurement of trace element uptake by the predator, we collected larvae of *Sialis velata* from Lake Saint Joseph (46°53' N, 71°38' W), a Precambrian Shield lake located near Quebec City (Québec, Canada) and in which concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn are relatively low in sediments, overlying water and *S. velata* (20, 21; Croisetière, unpublished data). During the acclimation period, that is, a month prior to the uptake experiment, larvae of *S. velata* were held in water from Lake St-Joseph, in the dark, at 10 °C and fed 1 uncontaminated *C. riparius* larva every 2 d. Mortality of *S. velata* during this period was <5%. For the uptake experiment, we sorted *S. velata* into groups of 4 according to their fresh weights so that both the mean weight and the distribution of individual weights would be similar among groups. The mean individual dry weight of all *S. velata* used in our experiments was 3.8 mg, and the standard deviation about this mean was 0.38 mg (for the 17 groups of 4 larvae). We fed this predator either one contaminated or one uncontaminated *C. riparius* nightly. Prey offered to *S. velata* were large enough to fill their digestive tract, after which time no additional prey can be ingested for at least 15 h (9). Thus the ration we offered is likely near the maximum that this insect is able to consume. Contaminated prey were not depurated because in nature *Sialis velata* eats prey whole (including gut contents), whereas uncontaminated prey were depurated so as to obtain prey having the lowest possible trace element concentrations. *Sialis velata* consume prey rapidly (in < 10 min in the laboratory; 9), and we confirmed this during our

experiment by verifying that all prey had been consumed 1 h after being offered to the predator. At each of the 5 sampling times (Fig. 3), we removed groups of 4 *S. velata* from each treatment (trace elements in water alone, food alone, or water+food; Fig. 1). Exceptionally, predators subject to the water + food + sediment treatment ($n = 5$) were sampled only on day 6; for these larvae, we confirmed that prey were ingested rapidly by sieving the sediment at the time of sampling. The day prior to their removal, *S. velata* were not fed to allow excretion of their last meal (appearance of a fecal pellet in the container allowed us to confirm that gut contents had been eliminated).

To measure trace element loss from the predator, we fed contaminated *Sialis* sp. larvae collected from Lake Dufault (3-5 m depth) on uncontaminated, second-instar *C. riparius* larvae for 14 d; we sacrificed 4 *Sialis* sp. larvae at days 0, 1, 3, 6, 10 and 14 for trace element analyses.

Analyses. All labware used for trace element analyses was soaked in a 15% HNO₃ solution overnight, rinsed thoroughly with ultrapure water (>18 MΩ cm) and dried under a laminar flow hood. All insects collected for trace element analysis were placed on a weighed piece of Teflon sheeting in a plastic micro-centrifuge tube and stored at -20 °C. Frozen samples of *Sialis* and *C. riparius* were freeze-dried, weighed on a micro balance, placed in thick-walled Teflon vials and digested at 121 °C for 3 h in concentrated HNO₃ (Fisher Scientific Trace Metal Grade; maximum 1 mg of dry tissue per 30 µL HNO₃). Similar-sized samples of a certified reference material (lobster hepatopancreas, TORT-1, National Research Council of Canada, Ottawa) were digested at the same time to ensure the efficacy of the

digestion procedure. For As, Cd, Cu and Zn, measured values were within 10% of the certified value, whereas for Co and Pb they were within 25%. Once cooled, digested samples and blanks (>5% of samples) were diluted with ultrapure water and trace elements were measured by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS; Thermo Electron Corporation, model X7) using external calibration with standards and rhodium as an internal standard.

Water samples were analyzed by ICP-MS for trace elements and by ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy; Varian Vista AX) for major cations. We determined Cl^- and SO_4^{2-} concentrations by ion chromatography (Dionex DX-300, IONPAC At-14 column), DIC by gas chromatography (Perkin-Elmer Sigma 300, Porapak-Q column) and dissolved organic carbon (DOC) by combustion on a Shimadzu (Model TOC-5000) analyzer.

Samples of lyophilized sediment (~0.1 g dry weight, n = 3) used in the Lake Dufault containers were left for 12 h in 1N HNO_3 (5 mL) at 20 °C for trace element extraction prior to analysis by ICP-MS, for As and Co, or by ICP-AES for Cd, Cu, Pb, and Zn.

For all sample types, we ensured the quality of our results by verifying that there was: 1) <10% difference between duplicate samples; 2) no significant contamination in the laboratory and field blanks; 3) no deviation > 5% from initial calibration for a sequence of analyses. For trace metal analyses, we used certified reference materials (SLRS-4, TORT-1; NRCC, Ottawa, Canada) or QC samples from inter-laboratory studies to insure the consistency of our reported values. Lastly, we duplicated the analysis of at least 10% of the samples, and at frequent

intervals analyzed blanks (5% of analyses) and calibration standards (10% of analyses).

Results and Discussion

Trace elements in lakewater and in prey. Trace element concentrations in water from uncontaminated Lake Opasatica were much lower than those measured in water from contaminated Lake Dufault (Table 1). Likewise, sediment metal concentrations in the contaminated lake (extraction in 1M HNO₃) were elevated, that is, in $\mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight, As, 5.7; Cd, 1.7; Co, 4.9; Cu, 132; Pb, 31; Zn, 380, respectively, compared to those reported for Lake Opasatica and other unimpacted lakes in the same region (22, 23). Chemical composition of the lake waters used in our experiments remained constant and was similar to that of water in the lakes themselves. Exceptionally, Zn concentrations increased during the elimination experiment (Table 1), likely due to the inadvertent contamination of lakewater; since *S. velata* does not take up Zn from water (see below), this should not have influenced our measurements of Zn loss.

Trace-element concentrations in prey (*C. riparius*) held on the bottom of contaminated Lake Dufault increased over time, and reached a steady state within ≈ 1 week for all elements except Cd, the concentrations of which continued to increase up to ≈ 11 d (Fig. 2). A previous study on *Chironomus tentans*, showed that its concentrations of several trace metals (Cd, Cu, Zn) reach a steady state within ≈ 1 week (24). At steady state, trace element concentrations in contaminated *C.*

riparius far exceeded those measured in larvae taken directly from culture (Table 2), that is, the ratios of trace element concentrations in contaminated prey to those in uncontaminated prey were 43 for As, 38 for Cd, >75 for Co, 23 for Cu, 23 for Pb and 3 for Zn. Although prey on which these measurements are based contained contaminated gut contents, the similarity in trace element concentrations between undepurated and depurated *C. riparius* (circles and triangles, respectively, on day 14 in Fig. 2) suggest that trace elements available to the predator were located almost entirely in prey tissues rather than in their gut contents (sediment; 25). Net uptake rates ($\text{nmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$, estimated for days 0-4) of Cu and Zn (2300 and 4200, respectively) were far higher than those for As (43), Cd (45), Co (27) and Pb (150), as were the steady state concentrations of Cu and Zn (Fig. 2). Concentrations of Cu and Zn in water (Table 1) and sediment (see above) from contaminated Lake Dufault (Table 1) were correspondingly much higher than those of the other trace elements. The inability of *C. riparius* to counter increases in its trace element concentrations, as well as its capacity to accumulate these contaminants to high concentrations, suggests that this insect would be useful in sediment quality assessments (e.g., 26).

Trace elements in the predator. When *S. velata* was exposed to As, Cd, Co, Cu, Pb, and Zn in contaminated lakewater alone, the concentrations of all of these elements, except Pb, did not increase over time ($p > 0.05$, ANOVA; Fig. 3). Thus our data suggest that water is a negligible source of As, Cd, Co, Cu, and Zn for this predator. In contrast, when *S. velata* consumed contaminated prey, concentrations of all of these trace elements showed significant increases over time in this predator

(Fig. 3), indicating that its food was a source of these elements. In a previous laboratory experiment, Cd was also reported to be taken up mainly from food ($\approx 80\%$) by *S. velata* (9). The somewhat lower importance of food as a Cd source in this previous study compared to that measured in our study ($\approx 100\%$) is likely explained by the fact that the prey species used in the laboratory study (*Cryptochironomus* sp.) was different from ours and was exposed to Cd through a mixture of protozoans and other micro-organisms feeding on lettuce, rather than in sediment as in our study. The result of this difference in food chain character was that Cd concentrations in the laboratory-contaminated prey were 2 orders of magnitude lower than those in our study (that is, 1-2 nmol Cd g⁻¹ in the laboratory versus ≈ 500 nmol Cd g⁻¹ in our study). However, even at the artificially low prey Cd concentrations used in the laboratory study, food remained the major source of Cd for *S. velata*.

Since water was a source of Pb to *S. velata*, we determined its relative importance by comparing the slopes (linear regressions) of the water-only (0.35 ± 0.12 , nmol g⁻¹ d⁻¹ \pm SE) and the food+water (5.6 ± 0.9 , nmol g⁻¹ d⁻¹ \pm SE) treatments; from this we determined that water accounted for only 6% of the Pb accumulated by this predator. To rule out the possibility that prey took up Pb from water while being fed to *S. velata*, we exposed 10 *C. riparius* to contaminated water from lake Dufault for 15 min (longer than *S. velata* takes to ingest its prey) and measured no significant difference in the trace element concentrations of exposed and unexposed prey (t-test; $p > 0.05$).

Knowing that water was a negligible source of As, Cd, Co, Cu and Zn for *S. velata* in our experiment, we can express the rate of change in its trace element concentrations as the difference between that which it takes up from food and that which it loses through physiological efflux and dilution due to growth, that is,

$$\frac{d[M]_{\text{predator}}}{dt} = \underbrace{(AE \times IR \times [M]_{\text{prey}})}_{\text{M uptake from food}} - \underbrace{(k_e [M]_{\text{predator}})}_{\text{M efflux}} - \underbrace{(k_g [M]_{\text{predator}})}_{\text{M dilution by growth}} \quad (1)$$

where $[M]_{\text{predator}}$ and $[M]_{\text{prey}}$ are the trace element concentrations measured in *Sialis* and *C. riparius*, respectively, IR (g prey g predator⁻¹ d⁻¹) is the rate at which prey are ingested, AE (%) is the efficiency with which a trace element is assimilated from prey, k_e (d⁻¹) is the efflux rate constant, k_g (d⁻¹) is the growth rate constant, and t (d) is time (27, 28, 29). Because growth of *S. velata* was negligible during our uptake experiment ($p > 0.05$, ANOVA; data not shown), we can ignore the growth rate term in equation 1; integrating the remaining terms gives

$$[M]_{\text{predator}} = \frac{AE \times IR \times [M]_{\text{prey}}}{k_e} \times (1 - e^{-k_e t}) + [M]_{\text{predator}}^p e^{-k_e t} \quad (2)$$

where $[M]_{\text{predator}}^p$ is the initial trace element concentration in *Sialis*.

We first estimated the value of k_e using data from our efflux experiment (inserts in Fig. 3). Because we can assume that trace element uptake was negligible during our efflux experiment, integration of equation 1 gives

$$[M]_{\text{predator}} = [M]_{\text{predator}}^{0, \text{efflux}} e^{-k_e t} \quad (3)$$

where $[M]_{\text{predator}}^{0, \text{efflux}}$ is the concentration of an element in the predator at the beginning of the efflux experiment. Using equation 3, we obtained the k_e values listed in Table 2.

Estimates of the loss rate constant k_e are often uncertain (30), which makes comparisons of k_e among species difficult. Nevertheless, our k_e values for most elements fall within the range of those reported for some aquatic insects (30, 31). Zinc is exceptional because there was no significant loss of this metal during our 2 week efflux experiment ($p > 0.05$, ANOVA; Fig. 3). However, because there was considerable uncertainty around the k_e value for Zn, some loss of this metal is possible. Because equation 2 cannot be solved with a null k_e value, we arbitrarily set a low value of 0.0001 h^{-1} (0.0024 d^{-1}) for the Zn efflux rate constant. We performed a sensitivity analysis to determine if this value had high leverage on AE in equation 2. This was not the case because k_e values of 0.024, 0.0024 and 0.00024 d^{-1} for Zn yielded estimates for AE that differed little (16.2, 12.8 and 12.4 %, respectively; see calculations below).

We used equation 2, our estimates of k_e and measured values for IR, $[M]_{\text{prey}}$ and $[M]_{\text{predator}}^p$ (Table 2) to estimate trace element assimilation efficiencies by adjustment using a sequential quadratic algorithm along with bootstrapping to obtain error estimates (Regression Models module in SPSS v13.0 software; SPSS inc.). We calculated a mean IR knowing that each predator consumed daily 1 prey having a mean dry weight of 0.32 mg. Prey biomass and trace element concentrations were measured in sub-samples of prey that we collected daily and mean values (Table 2) are used in our calculations. We then estimated AE for each

trace element. Because the predator took up a small proportion of its Pb from water (6%), we subtracted the Pb concentrations of *S. velata* exposed to this metal in the water-only treatment from those it achieved when exposed to Pb in both water and food so as to obtain Pb concentrations that represent uptake from food alone.

Estimated AE values range from ~9% for Pb to 32% for Cd (Table 2). Our value for Cd is somewhat lower than that reported for *S. velata* feeding on a chironomid (*Cryptochironomus* sp.) in the laboratory (50%; 9). However, as stated above, Cd concentrations in our prey species were 2 orders of magnitude higher than those of the prey used in the laboratory study. Likewise, the results of studies on copepods suggest that these herbivores assimilate Cd more efficiently from algae having lower Cd concentrations (32). However, comparisons such as this between species should be made with caution because variables including the quality and quantity of food consumed, the rate of digestion, and the subcellular partitioning of trace elements in food are likely to influence the efficiency with which a given consumer assimilates trace elements (33, 34).

To verify that conditions in our experiment were realistic, we compared trace element concentrations in *S. velata* that had been exposed to contaminated water and food for 1 week (Fig. 3) to trace element concentrations in indigenous *Sialis* sp. from contaminated Lake Dufault. We assumed that trace element concentrations in *S. velata* were near steady state because data for Cd and Pb from a similar, but longer (2 weeks), experiment showed that *S. velata* reach a steady state in their concentrations of Cd and Pb after \approx 1 week of exposure to these metals in contaminated water and prey (*C. riparius*; Croisetière, unpublished). There were

no significant differences in trace element concentrations between *S. velata* at the end of our uptake experiment and *Sialis* sp. collected in contaminated Lake Dufault (t-test; $p > 0.05$), with the exception of As, for which concentrations were higher in Lake Dufault *Sialis* sp. (40 ± 0.3 (SE) nmol g⁻¹, $n = 7$) than in our experimental *S. velata* (11 ± 1 nmol g⁻¹, $n = 4$). This similarity between trace element concentrations in experimental and field *Sialis* suggests that the conditions under which we exposed this predator to trace elements were representative of those in nature. Therefore, our conclusion that food is its only important source of the trace elements that we studied should be valid. We suggest that the experimental approach we used be applied to other types of invertebrates, so that the extent to which this conclusion can be applied to various types of animals occupying different trophic levels can be assessed.

In conclusion, our results point to food as being by far the major source of several trace elements for a predatory insect. Because the insect we studied has the potential to be a biomonitor (8), such information could be useful in the design of mechanistic models to relate its trace element concentrations to those in its surroundings; such models are the precursor to using a species as an effective contaminant biomonitor (7). Furthermore, our results are useful in the context of an ecological risk assessment, where it is necessary to estimate the exposure of benthic organisms to contaminants in various ecosystem compartments (2). For example, a model based only on trace element exposure in water could lead to large underestimates of contaminant exposure for organisms such as *Sialis velata* that take up their trace elements almost entirely from their food.

References

- (1) Chapman, P. M.; Wang F.; Janssen, C. R.; Goulet, R. R.; Kamunde, C. N. Conducting ecological risk assessments of inorganic metals and metalloids: current status. *Human Ecol. Risk Assess.* **2003**, *9*, 641-697.
- (2) Chapman, P. M.; Wang, F. Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Human Ecol. Risk Assess.* **2000**, *6*, 965-988.
- (3) Luoma, S. N. *Prediction of metal toxicity in nature from bioassays: Limitations and research needs.* In A. Tessier and D. R. Turner, Eds.; *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems.* Wiley: Chichester, England, 1995; pp 609-659.
- (4) Schlekot, C. E.; Lee, B.-G.; Luoma, S. N. *Dietary metals exposure and toxicity to aquatic organisms: Implications for ecological risk assessment.* In M. Newman, Ed.; *Coastal and Estuarine Risk Assessment.* CRC Press: Boca Raton, FL, 2001; pp 261-314.
- (5) Hare, L.; Tessier, A.; Borgmann, U. Metal sources for freshwater invertebrates: pertinence for risk assessment. *Human Ecol. Risk Assess.* **2003**, *9*, 779-793.
- (6) Phillips, D. J. H.; Rainbow, P.S. 1993. *Biomonitoring of trace aquatic contaminants.* Elsevier, London.
- (7) Hare, L.; Tessier, A. Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature.* **1996**, *380*, 430-432.
- (8) Roy, I.; Hare, L. First Quebec record, outside the Montreal region, of the alderfly *Sialis velata* Ross (Megaloptera; Sialidae) and the potential of the genus as a contaminant biomonitor. *Entomological News.* **1998**, *109*, 285-287.

- (9) Roy, I.; Hare, L. Relative importance of water and food as Cd sources to the predatory insect *Sialis velata* (Megaloptera). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1999**, *56*, 1143-1149.
- (10) Croteau, M.-N.; Hare, L.; Tessier, A. Increases in food web cadmium following reductions in atmospheric inputs to some lakes. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 3079-3082.
- (11) Telmer, K.; Bonham-Carter, G. F.; Kliza, D. A.; Hall, G. E. M. The atmospheric transport and deposition of smelter emissions: Evidence from the multi-element geochemistry of snow, Quebec, Canada. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **2004**, *68*, 2961-2980.
- (12) Borgmann, U.; Nowierski, M.; Grapentine, L. C.; Dixon, D. G. Assessing the cause of impacts on benthic organisms near Rouyn-Noranda, Quebec. *Environ. Pollut.* **2004**, *129*, 39-48.
- (13) Kraemer, L. D.; Campbell, P. G. C.; Hare, L. A field study examining the relative importance of food and water as sources of Cd for juvenile yellow perch. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2006**, *63*, in press.
- (14) Croteau, M.-N.; Hare, L.; Tessier, A. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 1348-1353.
- (15) Charbonneau, P.; Hare, L. Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects. *J. N. Amer. Benthol. Soc.* **1998**, *17*, 239-249.

- (16) Butler, M. G.; Anderson, D. H. Cohort structure, biomass, and production of a merovoltine *Chironomus* population in a Wisconsin lake. *J. N. Amer. Benthol. Soc.* **1990**, *9*, 180-192.
- (17) Bay, E. C.; Anderson, L. D. Studies with the mosquitofish, *Gambusia affinis*, as a *Chironomus* control. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* **1966**, *59*, 150-153.
- (18) Pritchard, G.; Leischner, T. G. The life history and feeding habits of *Sialis cornuta* Ross in a series of abandoned beaver ponds (Insecta; Megaloptera). *Can. J. Zool.* **1973**, *51*, 121-131.
- (19) Martin, S. Étude des facteurs influençant l'accumulation de métaux traces (cadmium, cuivre et zinc) chez deux espèces sympatriques d'insecte aquatique (*Chironomus* gr. *plumosus* spp). M. Sc. Thesis no. 310, INRS-Eau, Université du Québec, Québec, Canada, 1992.
- (20) Hare, L.; Campbell, P. G. C. Temporal variations of trace metals in aquatic insects. *Freshwat. Biol.* **1992**, *27*, 13-27.
- (21) Warren, L.; Tessier, A.; Hare, L. Modelling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: the relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnol. Oceanogr.* **1998**, *43*, 1442-1454.
- (22) Couillard, Y.; Campbell, P. G. C.; Tessier, A. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnol. Oceanogr.* **1993**, *38*, 299-313.
- (23) Hare, L.; Tessier, A. The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace elements in lakes. *Limnol. Oceanogr.* **1998**, *43*, 1850-1859.

- (24) Harrahy, E. A.; Clements, W. H. Toxicity and bioaccumulation of a mixture of heavy metals in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in synthetic sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* **1997**, *16*, 317-327.
- (25) Rasmussen, J. B. Comparison of gut contents and assimilation efficiency of fourth instar larvae of two coexisting chironomids, *Chironomus riparius* Meigen and *Glyptotendipes paripes* (Edwards). *Can. J. Zool.* **1984**, *62*, 1022-1026.
- (26) Borgmann, U.; Norwood, W. P.; Reynoldson, T. B.; Rosa, F. Identifying cause in sediment assessments: bioavailability and the Sediment Quality Triad. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2001**, *58*, 950-960.
- (27) Thomann, R. V. Equilibrium model of fate of microcontaminants in diverse aquatic food chains. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1981**, *38*, 280-296.
- (28) Croteau, M. N.; Hare, L.; Tessier, A. Explaining differences in Cd content among species of the lake-dwelling biomonitor *Chaoborus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2001**, *58*, 1737-1746.
- (29) Luoma, S. N.; Rainbow, P. S. Why is metal accumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1921-1931.
- (30) Croteau, M. N.; Hare, L.; Tessier A. Influence of temperature on Cd accumulation by species of the biomonitor *Chaoborus*. *Limnol. Oceanogr.* **2002**, *47*, 505-514.

- (31) Michaud, A.; Hare, L.; Campbell, P. G. C. Exchange rates of cadmium between a burrowing mayfly and its surroundings in nature. *Limnol. Oceanogr.* **2005**, *50*, 1701-1717.
- (32) Xu, Y.; Wang, W.-X.; Hsieh, D. P. H. Influences of metal concentration in phytoplankton and seawater on metal assimilation and elimination in marine copepods. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20*, 1067-1077.
- (33) Wang, W.-X.; Fischer, N. S. Assimilation Efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, *18*, 2034-2045.
- (34) Campbell, P. G. C.; Giguère, A.; Bonneris, E.; Hare, L. Cadmium-handling strategies in two chronically exposed indigenous freshwater organisms - the yellow perch (*Perca flavescens*) and the floater mollusc (*Pyganodon grandis*). *Aquat. Toxicol.* **2005**, *72*, 83-97.

TABLE 1. Characteristics of uncontaminated and contaminated lakewater used in the experimental reservoirs, as well as *in situ*. Trace element concentrations are ‘total dissolved’ concentrations. The coefficient of variation of all values was <10% for major elements and <15% for trace elements. DIC, dissolved inorganic carbon; DOC, dissolved organic carbon.

Lake		pH	Temp (°C)	Cl (µM)	SO ₄ (µM)	DIC (mM)	Na (µM)	K (µM)	Ca (µM)	Mg (µM)	DOC (mg L ⁻¹)	As (nM)	Cd (nM)	Co (nM)	Cu (nM)	Pb (nM)	Zn (nM)
Opasatica (uncontaminated)	Lake	7.57	19.9	134	107	0.40	164	18.4	272	123	10.6	3.7	<0.03	<0.1	45.7	1.3	55.0
	Uptake experiment	7.72	19.9	137	109	0.35	165	19.4	272	119	11.8	4.3	0.05	<0.1	45.7	1.3	124
	Loss experiment	7.46	19.9	137	108	0.21	143	19.7	280	119	10.6	3.9	0.05	<0.1	48.8	1.3	1200
Dufault (contaminated)	Lake	7.56	20.1	140	389	0.38	176	16.1	434	136	7.9	19.3	3.2	<0.1	194	1.4	510
	Uptake experiment	7.54	19.9	158	390	0.15	190	17.4	436	136	7.9	20.8	3.4	<0.1	202	3.4	740

TABLE 2. Mean values for all treatments (\pm SE) of parameters for trace element uptake and loss that we either measured or extracted from our experimental data. All masses are dry weights. *Value chosen arbitrarily (see text).

Parameter	Units	Abbreviation or symbol	Mean \pm SE					
			As	Cd	Co	Cu	Pb	Zn
Uptake experiment								
<i>Sialis velata</i> ; initial [M] ($n = 10$)	nmol g ⁻¹	$[M]_{\text{predator}}^0$	6.8 \pm 1.0	19.7 \pm 4.5	7.7 \pm 1.9	417 \pm 28	2.4 \pm 0.3	4,150 \pm 275
[M] in contaminated <i>Chironomus riparius</i> ($n = 19$)	nmol g ⁻¹	$[M]_{\text{prey}}$	230 \pm 15	490 \pm 47	150 \pm 14	15,100 \pm 1,800	730 \pm 64	21,000 \pm 1,500
Ingestion Rate ($n = 73$)	g prey·g predator ⁻¹ ·d ⁻¹	IR	0.103 \pm 0.007					
Assimilation Efficiency	%	AE	9.7 \pm 0.6	31.9 \pm 2.4	21.5 \pm 1.6	17.3 \pm 1.5	9.1 \pm 0.7	17.3 \pm 5.5
Loss experiment								
<i>Sialis</i> sp.; initial [M] ($n = 4$)	nmol g ⁻¹	$[M]_{\text{predator}}^{0,\text{efflux}}$	19.2 \pm 3.3	100 \pm 9	28.1 \pm 4.7	960 \pm 140	15.6 \pm 2.4	4880 \pm 175
Loss rate constant	d ⁻¹	k_e	0.17 \pm 0.08	0.029 \pm 0.015	0.10 \pm 0.03	0.044 \pm 0.019	0.11 \pm 0.04	0.0024*
[M] in uncontaminated <i>Chironomus riparius</i> ($n = 15$)	nmol g ⁻¹	$[M]_{\text{prey}}$	5.4 \pm 1.0	13 \pm 3	<2	660 \pm 50	32 \pm 7	7,600 \pm 380

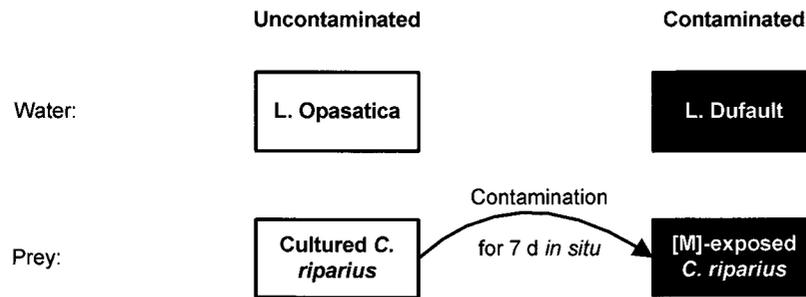
Figure Captions

Figure 1. Experimental procedure and the various treatments used to determine the relative importance of water and food as trace element sources for larvae of the alderfly *Sialis velata* feeding on *Chironomus riparius*.

Figure 2. Temporal changes in mean (\pm SE, $n = 5$) trace element concentrations (nmol g^{-1} dry weight) of cultured prey (*Chironomus riparius*) held in contaminated Lake Dufault. Filled circles are mean concentrations of non-depurated prey, whereas open triangles represent prey held in uncontaminated lakewater for 1 d to evacuate their gut contents.

Figure 3. Temporal changes in mean (\pm SE, $n = 4$) trace element concentrations (nmol g^{-1} dry weight) in the predator *Sialis velata* during the uptake experiment (large panels). Treatments are as follows: Control (filled circles); contaminated water only (open circles); contaminated food only (solid triangles); contaminated water and food (open triangles); contaminated water, food and sediment (solid squares). Curves for trace element uptake are model predictions for the food-only treatment that were generated using equation 2 (see text for explanation). Also included (as inserts) are our data for trace element loss from *Sialis* sp., with curves for model predictions generated using equation 3.

Fig. 1. Croisetière *et al.*



Uptake Experiment; Treatment Levels

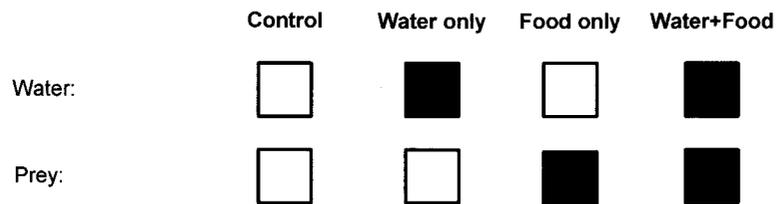


Fig. 2 Croisetière *et al.*

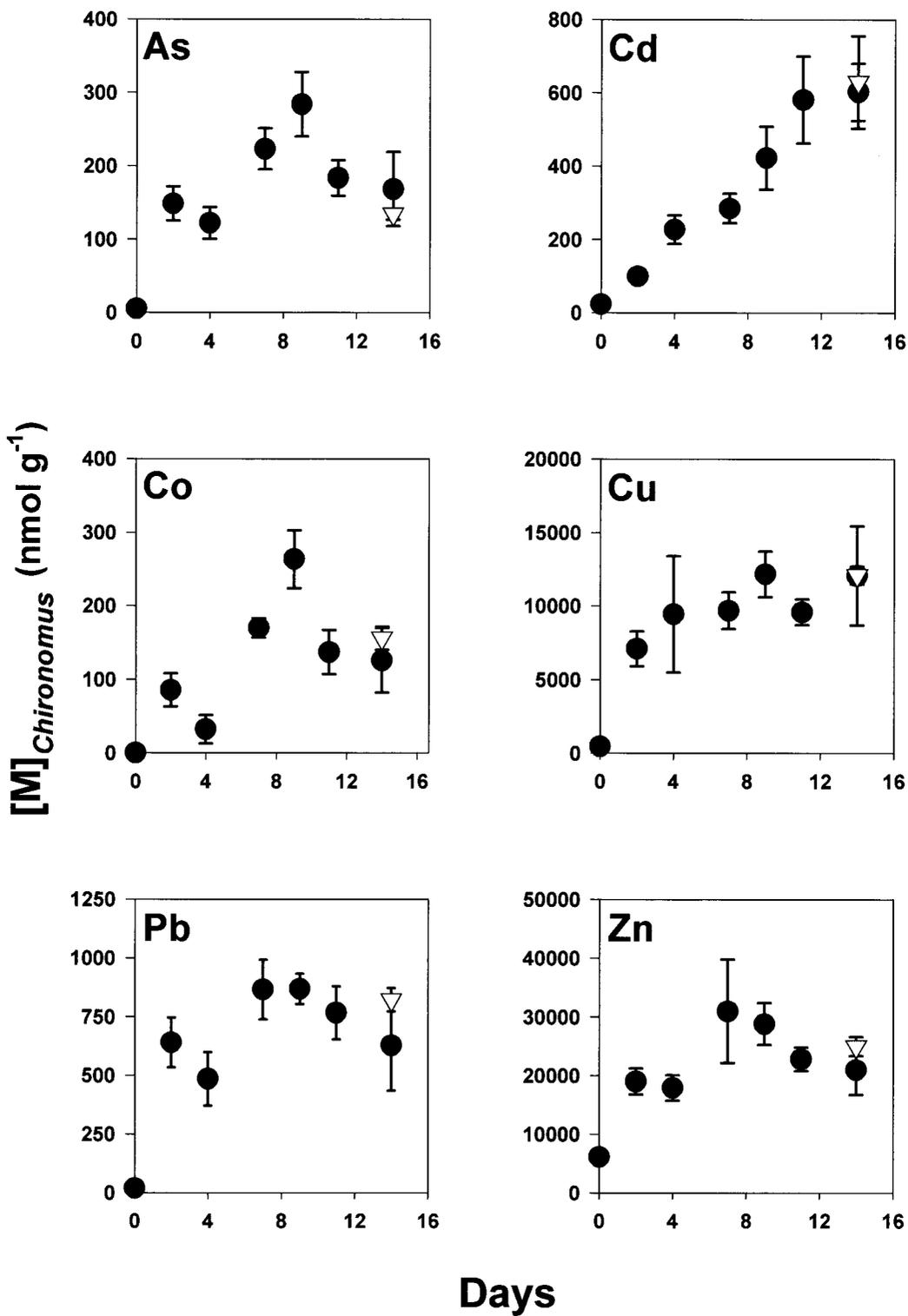
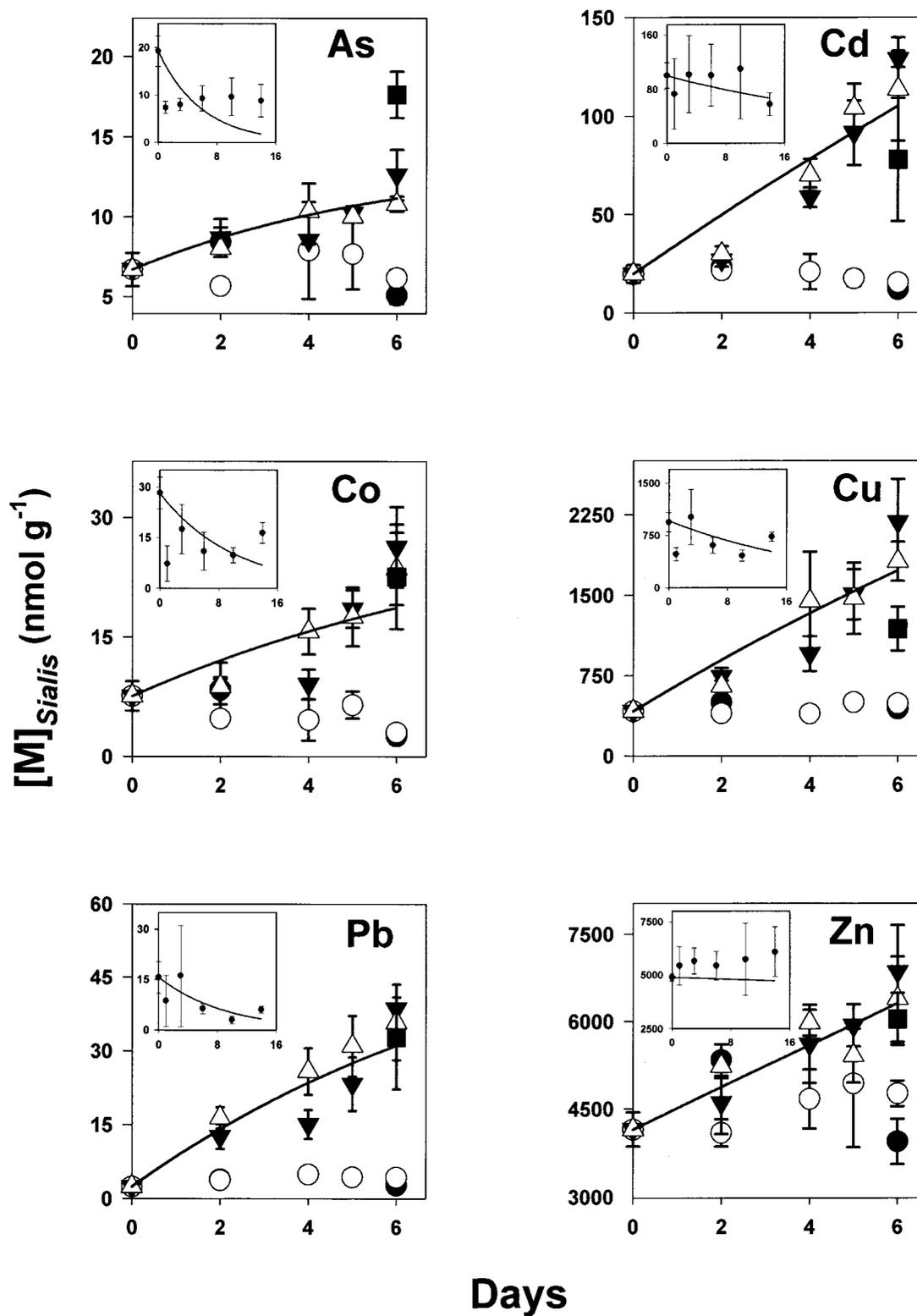


Fig. 3, Croisetière et al.



9- Sulfur isotopes reveal that sediment sustains fish production in lakes

Soumis au périodique *Limnology and Oceanography* (2007)

Louis Croisetière,¹ Landis Hare,^{1*} André Tessier,¹ Gilbert Cabana²

¹Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE), Université du Québec, 490 rue de la Couronne, Québec, Québec, G1K 9A9, Canada. ²Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7, Canada.

*Author to whom correspondence should be addressed: landis@ete.inrs.ca; Tel: 418-654-2640; Fax: 418-654-2600

Running head: S stable isotopes reveal that sediment sustains fish

Résumé

Les connaissances actuelles en écologie nous indiquent que les écosystèmes d'eau douce sont plus stables si les prédateurs supérieurs, tels les poissons, sont en mesure de tirer leur énergie de multiples canaux qui sont eux-mêmes basés sur une variété de sources telles que les algues planctoniques et la matière organique sédimentaire.

La validation de ces connaissances est difficile parce que les outils pour identifier l'origine énergétique des animaux aquatiques sont limités. Dans quatre lacs boréaux, nous avons constaté que les rapports des isotopes stables de soufre ($\delta^{34}\text{S}$) ont différencié sensiblement entre la colonne d'eau et les sédiments. Nous avons alors exploité ces différences de $\delta^{34}\text{S}$ pour démontrer que, dans un lac donné, les insectes s'alimentant du sédiment (directement ou par l'intermédiaire de la prédation) ont eu des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ semblables à celles du sédiment, tandis que les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des invertébrés planctoniques et des bivalves benthiques s'alimentant principalement sur les particules en suspension étaient près de celles du sulfate de la colonne d'eau. En comparant les valeurs isotopiques de S des organismes à celles d'organismes au comportement alimentaire connu, il est possible d'utiliser un modèle de mélange à 2 sources pour déterminer la proportion de leur énergie qui provient du compartiment sédimentaire. L'utilisation d'un tel modèle nous démontre que les poissons dans les lacs boréaux obtiennent leur énergie des canaux nutritifs planctoniques et sédimentaires. Les poissons étudiés ont montré une dépendance énergétique à la colonne de l'eau et à des sources de matière organique

sédimentaire, ce qui devrait contribuer à stabiliser leurs populations face aux perturbations anthropiques ou naturelles.

Mots-clé : réseaux trophiques, isotopes stables, soufre, poissons, lacs, chaînes trophiques.

Abstract

Ecological theory predicts that freshwater ecosystems are more stable if top predators such as fish obtain their nutrients and energy from multiple channels that are based on a variety of sources such as planktonic algae and sedimentary organic matter. Testing this precept in the field is difficult because the tools for determining from where aquatic animals obtain their nutrients are limited. In four boreal lakes, we found that the ratios of sulfur stable-isotopes ($\delta^{34}\text{S}$) differed substantially between the water column and the sediments. We then exploited these differences in $\delta^{34}\text{S}$ to demonstrate that, within a given lake, insects feeding on sediment (directly or via predation) had $\delta^{34}\text{S}$ values similar to those of sediment, whereas the $\delta^{34}\text{S}$ values of planktonic invertebrates and benthic bivalves feeding mainly on suspended particles were close to those of sulfate in the water column. Using the S isotopic values of animals that obtain their S from either the sediment or the water-column as end members in a two-source mixing model, we demonstrate that fish in boreal lakes obtain their nutrients from both planktonic and sedimentary nutrient channels. Thus fish are shown to depend on both water column and sedimentary sources of organic matter, which should contribute to stabilizing their populations in the face of human-induced or natural perturbations.

Key words – food webs, stable isotopes, sulfur, fish, lakes, food chains.

Acknowledgments

We thank J.-C. Auclair, A. Bertolo, D. Baird, P. G. C. Campbell, D. Gerdeaux, C. Gobeil, K. McCann, P. S. Rainbow, N. Rooney and M. Savard for their helpful comments as well as C. Dion, P. Marcoux and P. Barillet for their technical assistance. We are grateful to the Ministère des Ressources naturelles et Faune Québec (Abitibi-Temiscamingue regional office) for their logistical help in the field. This research was supported by grants from the Metals in the Environment Research Network, the National Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies.

Introduction

The productivity of lake-dwelling fish is most often estimated solely from that of living algae (Håkanson and Boulion 2001), despite the fact that detritus in organic-rich sediment is a potential source of energy and nutrients for these consumers (Lindeman 1942; Moore et al. 2004). Indeed, the addition of ^{13}C to forest ponds has shown that sedimentary detritus can support an important fraction of fish production; although it is uncertain to what extent these results can be extrapolated to fish in lakes that are less influenced by riparian vegetation (Cole et al. 2006). It is increasingly clear that we need to consider nutrients in both planktonic and benthic habitats to predict fish production (Vadeboncoeur et al. 2002) as well as the functioning (Schindler and Scheuerell 2002) and stability (Rooney et al. 2006) of whole aquatic ecosystems. The difficulty comes in reliably measuring from where fish in natural ecosystems obtain their energy and nutrients.

One means used to identify nutrient channels between lower and upper trophic levels is to measure carbon stable isotopic ratios ($\delta^{13}\text{C}$) in organisms, the distribution of which tends to differ between the members of food chains based on either planktonic or benthic algae (Hecky and Hesslein 1995; Vadeboncoeur et al. 2002). However, C stable isotopes are not very effective in tracing the contribution of detritus to lake food webs because the $\delta^{13}\text{C}$ values of detritus often overlap with those of living planktonic and benthic algae (France 1996). Sulfur stable isotopes have potential in this regard, at least in marine systems where the $\delta^{34}\text{S}$ values of water-column sulfate (the S source for planktonic primary producers) differ from those of sedimentary S (Peterson 1999). Such differences have been used to explain

the $\delta^{34}\text{S}$ values of some marine plants (Stribling et al. 1998; Fry 2006) and their consumers (Peterson and Fry 1987; McCutchan et al. 2003). We set out to determine if the S isotopic composition of fish can be used to determine their nutrient sources in fresh waters, where the sulfate available for bacterial reduction in sediments is present at much smaller concentrations than in marine systems.

Methods

We collected water, sediment and animals at littoral sites (3-8 m depth) in lakes located in north-western Quebec, Canada, that is, Lakes Évain (48°08'49" N 79°01'55" W, lake area (A) 205 ha, Secchi depth (Z_s) 2.5 m, $[\text{SO}_4]$ in the water column ($[\text{SO}_4]_{\text{water}}$) 60 μM), Fortune (48°11'22" N 79°18'23" W, A 150 ha, Z_s 7.0 m, $[\text{SO}_4]_{\text{water}}$ 200 μM), Ollier (48°10'17" N 79°16'55" W, A 80 ha, Z_s 3.9 m, $[\text{SO}_4]_{\text{water}}$ 230 μM), and Opatatica (48°10' N 79°19' W, A 5360 ha, Z_s 3.1 m, $[\text{SO}_4]_{\text{water}}$ 165 μM). The forested drainage basins of these oligotrophic lakes (total P 1.4-2.1 $\mu\text{g L}^{-1}$) are little-influenced by humans.

Water overlying the sediment was collected for the measurement of both the concentration and S isotopic composition of sulfate. For the S isotopic measurements, we extracted SO_4 from lakewater using the BaSO_4 precipitation method (Carmody et al. 1998). Sediment pore waters were collected for measurements of SO_4 and sulfide ($\Sigma\text{S}(-\text{II})$); the techniques for porewater collection and S analyses are described elsewhere (Alfaro - De la Torre and Tessier 2002). Oxygen concentrations were measured by polarography in both the water column (YSI analyzer) and in sediments (Diamond General 737GC Clark-style micro-

electrode fitted to an *in situ* micromanipulator). In the sediments, oxygen was consumed within the top 1 cm and sulfate was consumed within the top 2-3 cm (except for *L. Opasatica*; see depth profiles of [O₂] (Fig. 1) and [SO₄] (Fig. 2)). Sediment cores were collected by divers from each lake and sliced into 1-cm layers (to a depth of 5 cm). Samples of *Chaoborus* spp., bulk zooplankton, and *Holopedium gibberum* were collected using plankton nets and contained 100-300 pooled individuals, whereas those of benthic insects (*Hexagenia limbata* and *Sialis* sp. without gut contents) were composed of 1-3 individuals. Stable S isotopic ratios for individual bivalves (collected by divers) and adult fish (caught by gill net) are for subsamples of foot or dorsal muscle, respectively. Biological and sediment samples were frozen at -20°C and freeze-dried prior to analysis.

Isotopic ratios are reported as: $\delta X = [(R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}}) - 1] \times 10^3$ where X is either ¹³C, ³⁴S or ¹⁵N, R is the ratio ¹³C/¹²C, ³⁴S/³²S or ¹⁵N/¹⁴N, and the standards used were S from the Canyon Diablo troilite (CDT), C from Vienna Peedee Belemnite (VPDB) or N in the atmosphere. Stable S isotopes were measured at Iso-Analytical Ltd (Sandbach, UK), on an elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometer (ANCA-GSL/20-20, Europa Scientific, Crewe, UK). The ³⁴S/³²S ratios were derived by monitoring the *m/z* 48, 49 and 50 of SO⁺ produced from SO₂. The certified reference material used in the analysis of samples was NBS 127 (barium sulfate, $\delta^{34}\text{S} = +20.3 \text{ ‰}$; IAEA, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria). NBS 127, IAEA-S-1 (silver sulfide, $\delta^{34}\text{S} = -0.3 \text{ ‰}$; IAEA) and IA-R025 (barium sulfate, $\delta^{34}\text{S} = +8.5 \text{ ‰}$; Iso-Analytical) were used for the calibration and correction of the ¹⁸O contribution to the SO⁺ ion beam. Samples of

NBS-1577A (powdered bovine liver, $\delta^{34}\text{S} = 7.9$; NIST, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA) were analyzed as controls. Carbon stable isotope measurements were carried out by the Environmental Isotope Laboratory (EIL) at the University of Waterloo (Waterloo, ON, Canada) with an Isochrom continuous flow stable isotope mass spectrometer (Micromass) coupled to a Carlo Erba elemental analyzer (CHNS-O EA1108). Nitrogen stable isotope measurements were carried out by the Stable Isotopes in Nature Laboratory at the University of New Brunswick using a Thermo Finnigan Delta XP continuous flow stable isotope mass spectrometer coupled to a Carlo Erba NC2500 elemental analyzer. The reference material used was IAEA-CH6 and the results were corrected to the EIL-70b fish tissue internal standard. Deviation from duplicate samples (20% of total number of samples) was 0.4 ‰ for $\delta^{34}\text{S}$, 0.2 ‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and 0.1 ‰ for $\delta^{15}\text{N}$.

Results and Discussion

To discriminate between sediment- and plankton-based food webs in fresh waters, we first compared the $\delta^{34}\text{S}$ values of sulfate in lakewater with those of total S in sediment that we collected from 4 lakes in the boreal forest of eastern Canada. Mean sediment $\delta^{34}\text{S}$ values were 7.6 ‰ (± 2.6 ‰ SD) lower than those for water-column sulfate (Fig. 3). This difference in $\delta^{34}\text{S}$ values can be attributed to several possible mechanisms. First, the situation in freshwater sediments is not the same as that in marine systems (where such differences are ascribed primarily to S isotopic fractionation by bacterial sulfate reduction) because in our freshwater sediments

sulfate is completely reduced within 2-3 cm of the sediment-water interface (in 3 of our 4 lakes; Fig. 1). In fresh waters, diffusion of SO_4^{2-} across the sediment-water interface could have contributed to the observed differences in isotopic composition (Peterson and Fry 1987). Another plausible explanation is that S fractionation occurs in the drainage basins of these lakes. Indeed, a major portion of sedimentary organic matter in lakes is usually allochthonous (Cole et al. 2006) and a large part of sedimentary S in lakes is associated with organic matter (Nriagu and Soon 1985). Historical changes in the isotopic composition of sulfate, due to variations in atmospheric SO_2 sources (Nriagu and Soon 1985), could also have contributed to our measured differences in $\delta^{34}\text{S}$ values between sulfate and sedimentary S.

These differences in $\delta^{34}\text{S}$ values between sulfate and sedimentary S (whatever the mechanism behind them) suggest that the isotopic composition of planktonic primary producers, which obtain their S from sulfate in the water column, and that of animals that feed on sediment should differ from one another and should be similar to those of their respective S sources ($\delta^{34}\text{S}$ values change little with trophic level; Peterson and Fry 1987; McCutchan et al. 2003). To determine if this is the case, we measured S isotopic ratios in animals that obtain their food mainly from these two S pools. To represent water-column food chains we used: the planktonic herbivore *Holopedium gibberum*; samples of bulk zooplankton; a zooplankton predator (the insect *Chaoborus* spp.); and a filter-feeding bivalve (*Pyganodon grandis*) that integrates the isotopic signatures of water-column particulate organic matter (Cabana and Rasmussen 1994). To represent sedimentary S, we selected

burrowing insects that feed either on sediment (the mayfly *Hexagenia limbata*; Charbonneau and Hare 1998) or on other benthic invertebrates (the alderfly *Sialis* sp.; Charbonneau and Hare 1998).

As expected, animals feeding in the water-column had $\delta^{34}\text{S}$ values that were consistently higher than those of animals feeding directly or indirectly on sediment (Fig. 4). It is striking that even among benthic invertebrates, $\delta^{34}\text{S}$ values differ depending on whether their food comes from the water column (the bivalve) or the sediments (the insects). The sediment-feeding insect *Chironomus* is also reported to have very negative S signatures in lakes (Grey and Deines 2005). The $\delta^{34}\text{S}$ values of organisms feeding in the water column were close to, but somewhat lower than, those measured for sulfate (Fig. 4), whereas the $\delta^{34}\text{S}$ values of sediment-feeding invertebrates tended to be greater than or similar to those in sediment (in 3 of 4 lakes). Differences between $\delta^{34}\text{S}$ values of sediment and sediment-feeding invertebrates are likely explained by the fact that we measured S isotopic ratios in bulk sediment rather than in the specific detritus-rich sediment fraction that is generally selected by sediment-feeding invertebrates (Eller et al. 2005). An alternative hypothesis, that values for the insects are higher than those in sediment because they consume benthic algae growing at the sediment-water interface, can be discounted for the mayfly because it does not feed on surface sediment but on sediment in its burrow (Charbonneau and Hare 1998). This is not to say that benthic algae are not an important source of food for some littoral invertebrates.

In contrast to the discrimination achieved using $\delta^{34}\text{S}$ values, those for $\delta^{13}\text{C}$ did not differ consistently between the two groups of benthic animals (Fig. 5) and thus,

as expected (France 1996), were less effective at distinguishing between sediment- and plankton-based food webs.

We also measured stable S isotopes in two fish species that are reported to feed mainly either on detritus and benthic invertebrates (*Catostomus commersoni*, white sucker; Ahlgren 1996) or on other fish (*Esox lucius*, northern pike; Skov et al. 2003) as adults. Thus, as expected, pike were at a higher trophic level than white sucker in all of our study lakes, with their mean (\pm SD) trophic positions being 2.7 ± 0.2 and 2.0 ± 0.3 , respectively (as determined by comparing N isotopic values in fish and *Pyganodon grandis*; Cabana and Rasmussen 1996). The S isotopic signatures of the two fish species were generally intermediate between those of the planktonic invertebrates and those associated with sediment-based food webs. We determined the major compartment from which these fish obtain their S by applying a two-source mixing model, in which end-members for the sediment- and plankton-based food webs are the sediment-feeding mayfly *Hexagenia limbata* and the plankton-feeding bivalve *Pyganodon grandis*, respectively. For this purpose, we assumed that there is no S isotopic fractionation between trophic levels (Peterson and Fry 1987; McCutchan et al. 2003). The model has the form $f_s = (\delta^{34}\text{S}_{\text{fish}} - \delta^{34}\text{S}_{\text{Pyganodon}}) / (\delta^{34}\text{S}_{\text{Hexagenia}} - \delta^{34}\text{S}_{\text{Pyganodon}})$ where f_s is the fraction of S contributed to fish by sediment. Our calculations suggest that the mainly benthic-feeding *C. commersoni* obtains a mean of ~60% (range 26-100%, Fig. 4) of its S from sedimentary food webs, whereas the top predator *E. lucius* derives ~20% (range 0-42%, Fig. 4) of its S from sediment. The ranges in values among lakes are likely a consequence of the feeding habits of these fish, which allow them to vary

their diet depending on prey availability in a given lake. Thus *C. commersoni* can feed on both benthic and planktonic invertebrates (Saint-Jacques et al. 2000), whereas adult *E. lucius* feed on both plankton- and benthos-eating fish. The range in $\delta^{34}\text{S}$ values was somewhat wider for *C. commersoni* than for *E. lucius* which is consistent with predictions that consumers near the base of a food web are likely to vary more widely in their dependence on sedimentary detritus than those at the top (Rooney et al. 2006).

We conclude that even predatory fish depend in part on nutrients that originate in sediment, which supports the hypothesis that upper trophic levels obtain their nutrients from both water-column and sedimentary channels and that this diversity of sources likely imparts stability to aquatic ecosystems (Rooney et al. 2006). Our results also underline the utility of S stable isotopes for distinguishing between sediment-based and water-column-based food webs. We suggest that they will prove equally useful for detecting human disruptions in nutrient channels. For example, eutrophication-induced hypolimnetic oxygen deficiencies have eliminated the sediment-dwelling mayfly *Hexagenia* from parts of the Laurentian Great Lakes (Kolar et al. 1997), which has led to changes in food web interactions (Rose et al. 1999) and fish stocks (Ritchie and Colby 1988). Because nutrient transfer between sediment and fish has been altered, changes in fish $\delta^{34}\text{S}$ values could be used to corroborate such impacts. Furthermore, because sediments can be an important sink for contaminants, the $\delta^{34}\text{S}$ signatures of benthic organisms could be useful for revealing their propensity for remobilizing potentially toxic substances into aquatic food webs.

Currently, most trophic studies in fresh waters use stable isotopes of C to delineate food chains (Hecky and Hesslein 1995; Vadeboncoeur et al. 2002) and N to estimate trophic level (Cabana and Rasmussen 1996). Our results suggest that many such studies would benefit by adding measurements of S stable isotopes because they reveal a unique type of nutrient pathway (sediment to water-column) that cannot be distinguished using $\delta^{13}\text{C}$ values (which serve to contrast food webs based on either planktonic or benthic algae; Vadeboncoeur et al. 2002). Although measurements of S stable isotopes were at one time more difficult to make than those of C and N, they are now readily available at reasonable cost (Fry 2006) and can be conducted on samples of very small mass (Grey and Deines 2005). Using stable isotopes of C and S in concert should allow researchers to distinguish between food chains that depend either on particles in the water column or sedimentary detritus (S isotopes) or on living phytoplankton or living benthic algae (C isotopes).

References

- AHLGREN, M. 1996. Selective ingestion of detritus by a north temperate omnivorous fish, the juvenile white sucker, *Catostomus commersoni*. Environ. Biol. Fishes **46**: 375-381.
- ALFARO - DE LA TORRE, M. C., AND A. TESSIER. 2002. Cadmium deposition and mobility in the sediments of an acidic oligotrophic lake. Geochim. Cosmochim. Acta **66**: 3549-3562.
- CABANA, G., AND J. B. RASMUSSEN. 1994. Modelling food chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. Nature **372**: 255-257.
- CABANA, G., AND J. B. RASMUSSEN. 1996. Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. Proc. Natl. Acad. Sci. **93**: 10844-10847.
- CARMODY, R. W., L. N. PLUMMER, E. BUSENBERG, AND T. B. COPLEN. 1998. Methods for collection of dissolved sulfate and sulfide and analysis of their sulfur isotopic composition. U. S. Geological Survey Open-File Report 97-234, 91 p.
- CHARBONNEAU, P., AND L. HARE. 1998. Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects. J. N. Am. Benthol. Soc. **17**: 239-249.
- COLE, J. J., S. R. CARPENTER, M. L. PACE, M. C. VAN DE BOGERT, J. L. KITCHELL, AND J. R. HODGSON. 2006. Differential support of lake food webs by three types of terrestrial organic carbon. Ecol. Lett. **9**: 558-568.

- ELLER, G., P. DEINES, J. GREY, H.-H. RICHNOW, AND M. KRÜGER. 2005. Methane cycling in lake sediments and its influence on chironomid larval $\delta^{13}\text{C}$. F. E. M. S. Microb. Ecol. **54**: 339-350.
- FRANCE, R. L. 1996. Scope for use of stable carbon isotopes in discerning the incorporation of forest detritus into aquatic foodwebs. Hydrobiol. **325**: 219-222.
- FRY, B. 2006. Stable isotope ecology. Springer.
- GREY, J., AND P. DEINES. 2005. Differential assimilation of methanotrophic and chemoautotrophic bacteria by lake chironomid larvae. Aquat. Microb. Ecol. **40**: 61-66.
- HÅKANSON, L., AND V. V. BOULION. 2001. Regularities in primary production, Secchi depth and fish yield and a new system to define trophic and humic state indices for lake ecosystems. Internat. Rev. Hydrol. **86**: 23-62.
- HECKY, R. E., AND R. H. HESSLEIN. 1995. Contributions of benthic algae to lake food webs as revealed by stable isotope analysis. J. N. Am. Benthol. Soc. **14**: 631-653.
- KOLAR, C. S., P. L. HUDSON, AND J. F. SAVINO. 1997. Conditions for the return and simulation of the recovery of burrowing mayflies in western Lake Erie. Ecol. Applic. **7**: 665-676.
- LINDEMAN, R. L. 1942. The trophic dynamic aspect of ecology. Ecology **23**: 399-417.

- MCCUTCHAN, J. H., W. M. LEWIS, C. KENDALL, AND C. C. MCGRATH. 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulphur. *Oikos* **102**: 378-390.
- MOORE, J. C., AND OTHERS. 2004. Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecol. Lett.* **7**: 584-600.
- NRIAGU, J. O., AND Y. K. SOON. 1985. Distribution and isotopic composition of sulfur in lake sediments of northern Ontario. *Geochim. Cosmochim. Acta* **49**: 823-834.
- PETERSON, B. J. 1999. Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs: a review. *Acta Oecolog.* **20**: 479-487.
- PETERSON B. J., AND B. FRY. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 293-320.
- PHILLIPS, D. L., AND J. W. GREGG. 2003. Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia* **136**: 261-269.
- RITCHIE, B. J., AND P. J. COLBY. 1988. Even-odd year differences in walleye year-class strength related to mayfly production. *N. Am. J. Fish Managm.* **8**: 210-215.
- ROONEY, N., K. MCCANN, G. GELLNER, AND J. C. MOORE. 2006. Structural asymmetry and the stability of diverse food webs. *Nature* **442**: 265-269.
- ROSE, K. A., E. S. RUTHERFORD, D. S. MCDERMOT, J. L. FORNEY, AND E. L. MILLS. 1999. Individual-based model of yellow-perch and walleye populations in Oneida Lake. *Ecol. Monogr.* **69**: 127-154.

- SAINT-JACQUES, N., H. H. HARVEY, AND D. A. JACKSON. 2000. Selective foraging in the white sucker (*Catostomus commersoni*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **78**: 1320-1331.
- SCHINDLER, D. E., AND M. D. SCHEUERELL. 2002. Habitat coupling in lake ecosystems. *Oikos* **98**: 177-189.
- SKOV, C., O. LOUSDAL, P. H. JOHANSEN, AND S. BERG. 2003. Piscivory of 0+ pike (*Esox lucius* L.) in a small eutrophic lake and its implication for biomanipulation. *Hydrobiol.* **506-509**: 481-487.
- STRIBLING, J. M., J. C. CORNWELL, AND C. CURRIN. 1998. Variability of stable sulfur isotopic ratios in *Spartina alterniflora*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **166**: 73-85.
- VADEBONCOEUR, Y., J. VANDER ZANDEN, AND D. M. LODGE. 2002. Putting the lake back together: reintegrating benthic pathways into lake food web models. *BioSci.* **5**: 44-54.

Figure captions

Fig. 1. Oxygen profiles measured in the sediments using a microelectrode. Duplicate profiles (open and solid circles) were made in the sediment of each lake. Horizontal dotted lines indicate the sediment-water interface. Inserts are oxygen profiles in the water column at the same sites. Zero values on the vertical axes represent the sediment-water interface.

Fig. 2. Replicate sulfate (left panels) and sulfide (right panels) profiles measured in 4 boreal lakes (horizontal dotted lines represent the sediment-water interface).

Fig. 3. Depth profiles of $\delta^{34}\text{S}$ values in 3 sediment cores from the littoral zone of each of four boreal lakes (0 on the y axis represents the sediment-water interface). Open diamonds represent mean (± 1 SD) $\delta^{34}\text{S}$ values for SO_4 in the overlying water-column.

Fig. 4. Mean (± 1 SD) $\delta^{34}\text{S}$ signatures of lakewater sulfate, total S in sediments, and S in animals collected from 4 boreal lakes. Included are members of plankton-based food webs (open symbols), sediment-based food webs (solid symbols), and fish (grey symbols) that take up variable proportions of their S from sedimentary (“% sediment”) and planktonic food webs. Standard errors (calculated as in Phillips and Gregg 2003) for the “% sediment” values for *Esox* and *Catostomus*,

respectively, are as follows: Évain 8%, 6%; Fortune 10%, 29%; Ollier 6%, 12%; Opasatica 5%, 11%.

Fig. 5. Mean (± 1 SD) $\delta^{13}\text{C}$ values of water-column feeding bivalves (open symbols; *Pyganodon grandis*, *Elliptio complanata* and *Lampsilis radiata*) compared to those of benthic-feeding insects (solid symbols, *Hexagenia limbata* and *Sialis* sp.) from 4 boreal lakes.

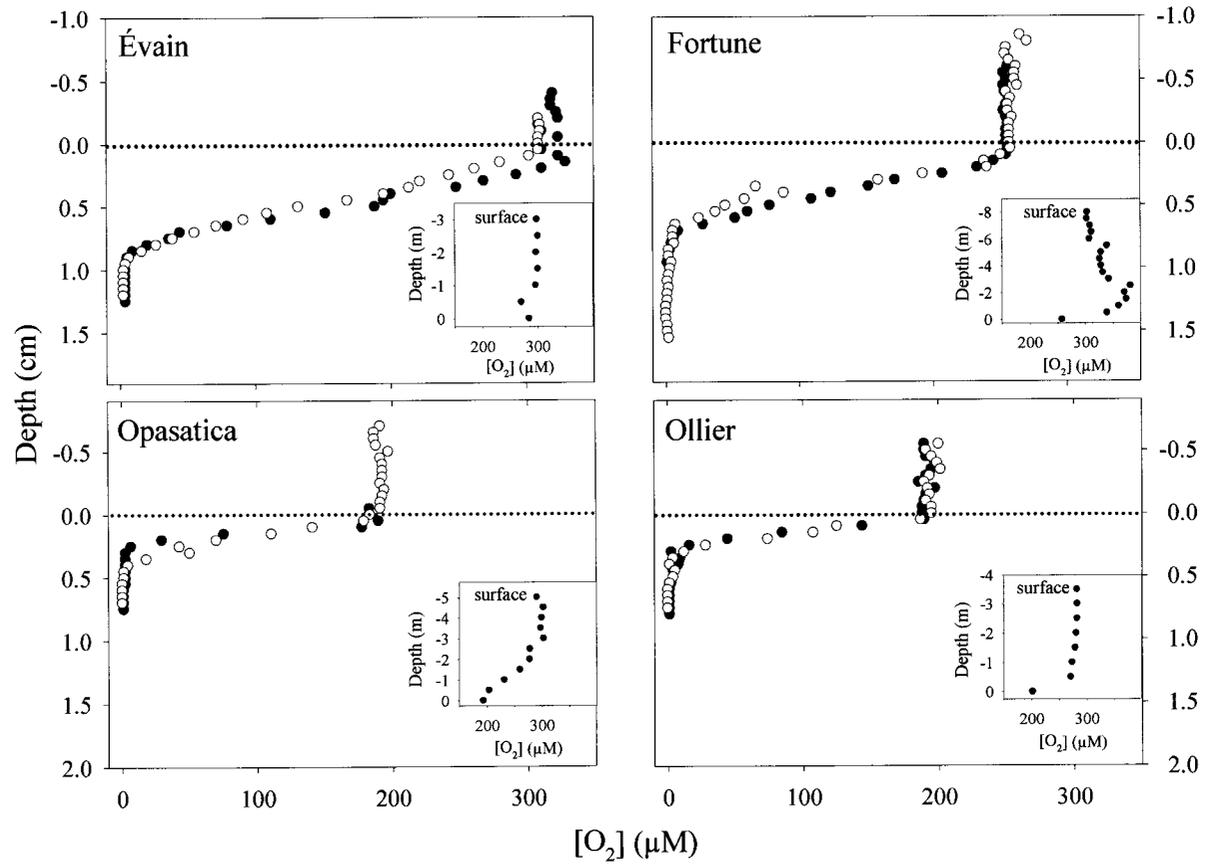


Figure 1, Croisetièrre et al.

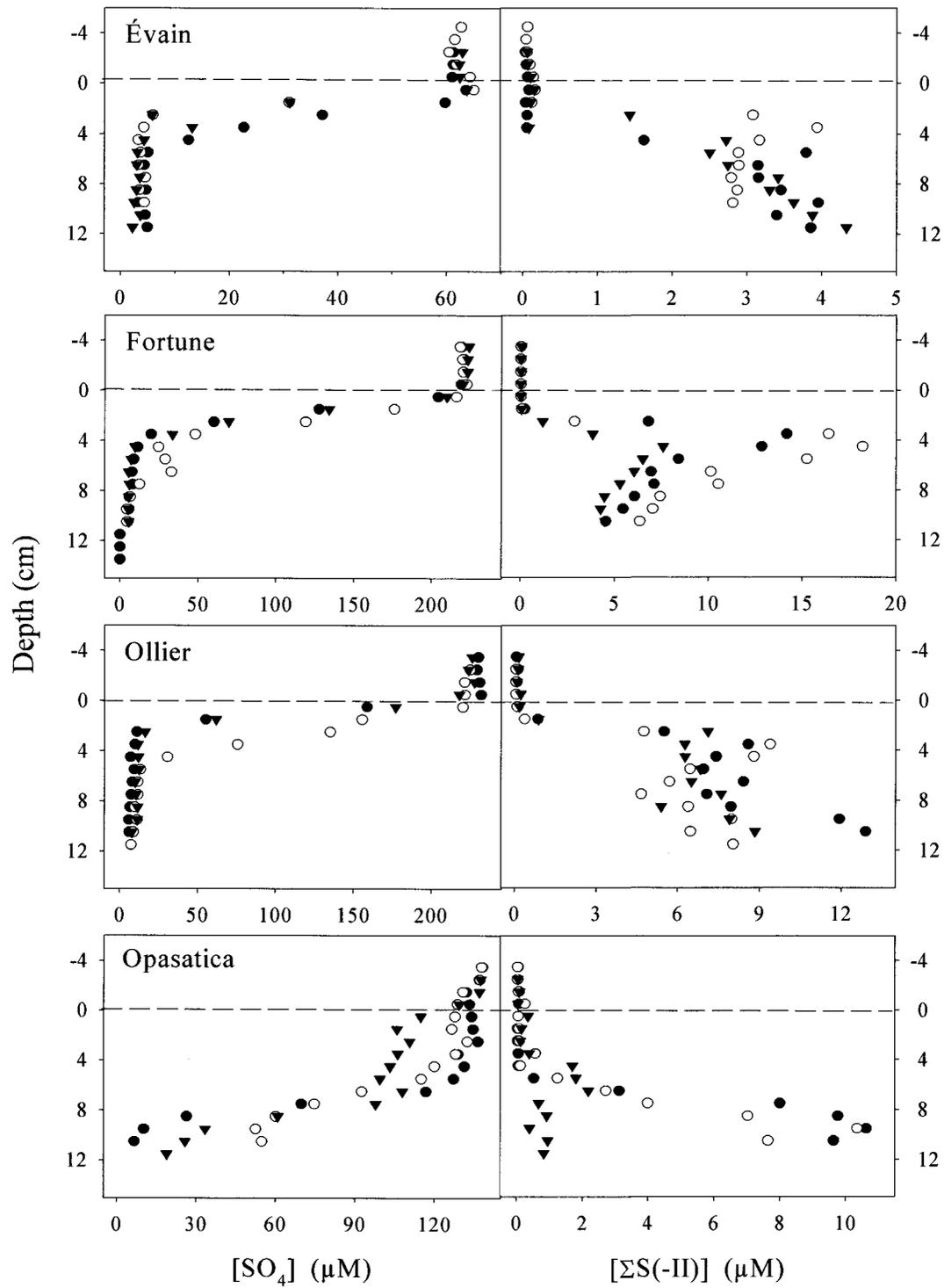


Figure 2, Croisetièrre et al.

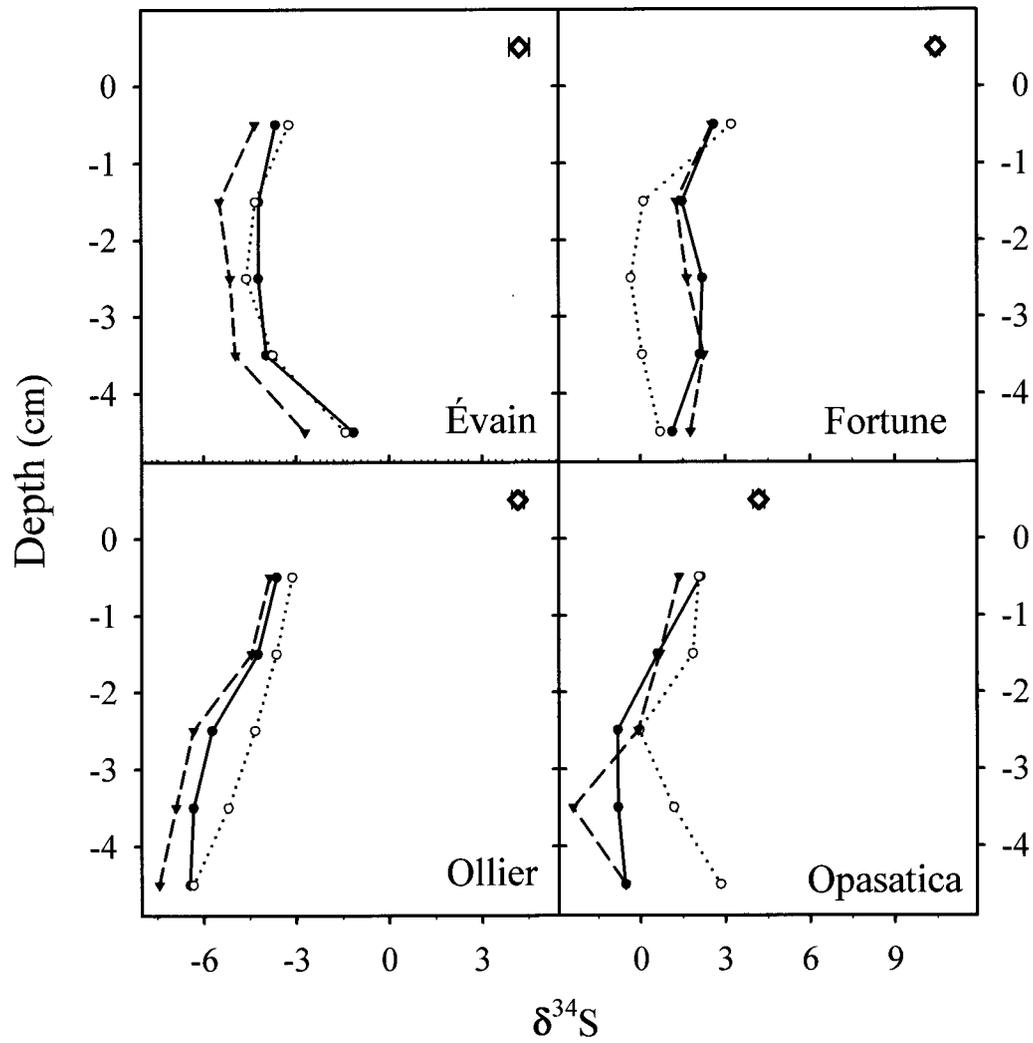


Figure 3, Croisetière et al.

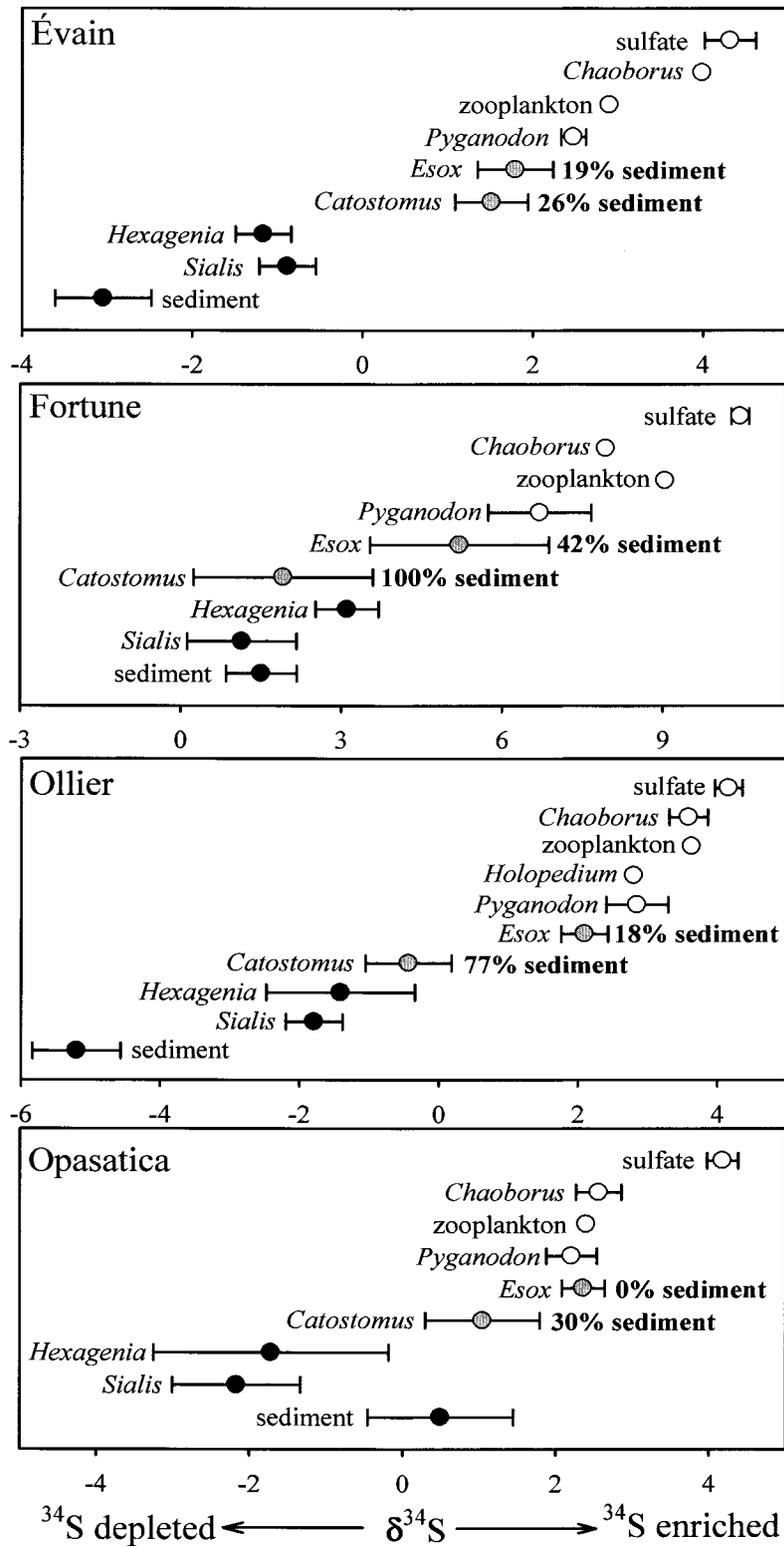


Figure 4, Croisetièrre et al.

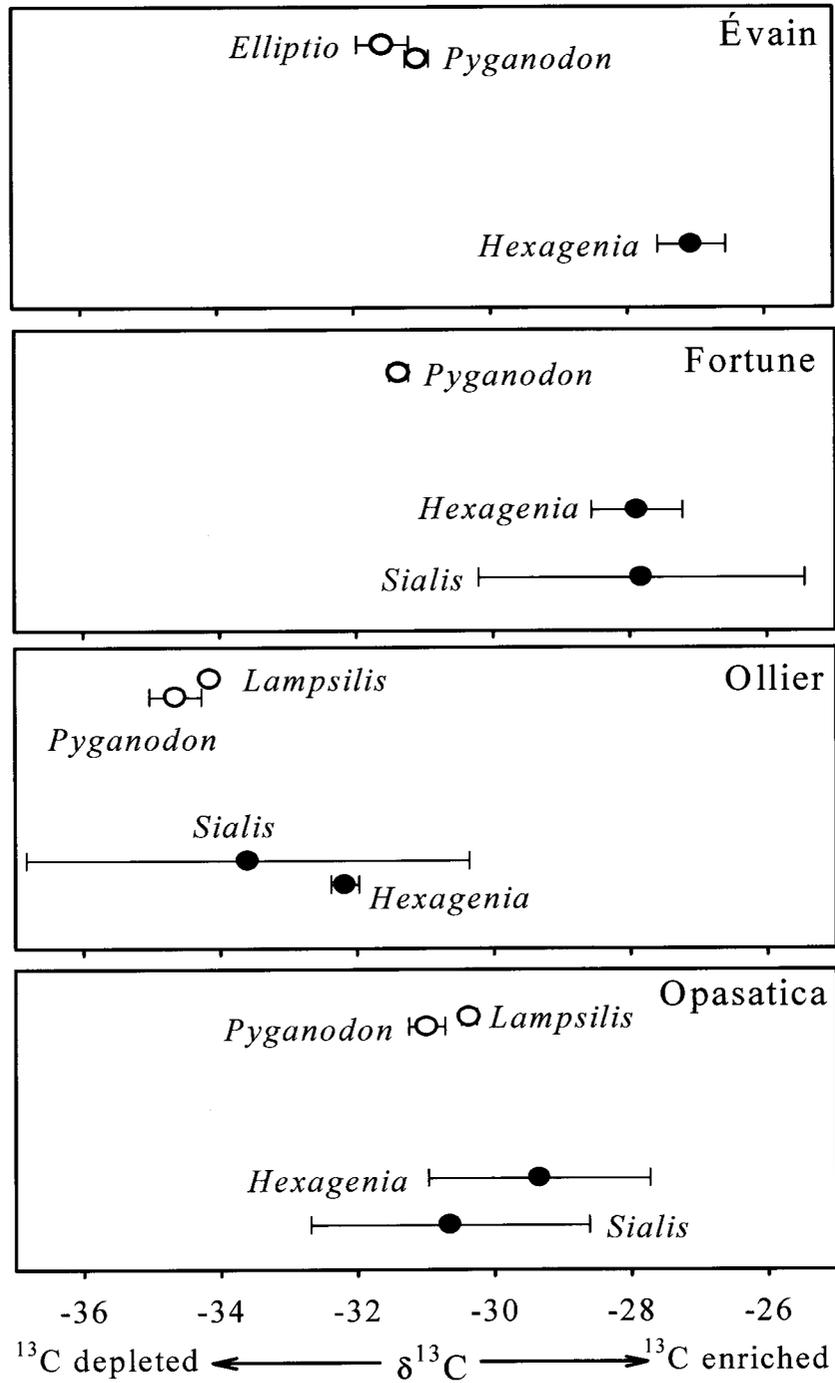


Figure 5, Croisetière et al.

10- Relating metal concentrations in a benthic invertebrate to those in sediment

À soumettre au périodique Environmental Pollution

Running head: Relating metals in insects and sediments

Louis Croisetière, Landis Hare,¹ and André Tessier

Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)

Université du Québec, 490 rue de la Couronne, Quebec City, Québec, Canada, G1K 9A9

¹Corresponding author (landis@ete.inrs.ca)

Résumé

Nous avons mesuré les concentrations d'As, Cd, Co, Cu, Ni et Zn dans les sédiments et les tissus de l'invertébré benthique *Sialis* qui ont été prélevés dans une série de 10 lacs situés en région minière afin de déterminer si cet organisme pouvait être utilisé pour estimer la biodisponibilité des métaux dans les sédiments. Pour extraire les métaux sédimentaires, nous avons utilisé deux méthodes différentes : une extraction avec l'acide nitrique (1N) et une autre avec le sérum d'albumine bovin (BSA) : cette dernière méthode devait *mimer* l'extraction biologique des métaux lors du passage des sédiments dans le tractus des animaux. Les concentrations de Co et de Ni mesurées à partir des deux méthodes d'extractions sont corrélées aux concentrations tissulaires de ces métaux chez *Sialis*. Cependant, la concentration des autres métaux mesurés dans *Sialis* ne montrent pas de corrélations avec les métaux extraits dans les sédiments, ce qui suggère que ces méthodes d'extraction ne permettent pas d'estimer la biodisponibilité de ces métaux pour *Sialis*.

Abstract

We measured the concentrations of As, Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn in sediment and in a benthic insect larva (the alderfly *Sialis*) that we collected from 10 lakes to determine if this invertebrate could be used to monitor the bioavailability of these trace elements in sediment. To extract trace elements from sediment, we compared the efficacy of two methods: extraction in dilute HNO₃ (1N) or in bovine serum albumin, a protein mixture that is purported to mimic animal digestive fluids. As expected, the latter extractant, being less aggressive, released trace elements in lower concentrations from sediment. Concentrations of Co and Ni released by both of the extractants correlated strongly with those measured in the biomonitor *Sialis*, which suggests that both of these extraction procedures are effective for these metals. However, concentrations of the other trace elements in *Sialis* were not correlated with those extracted from sediment, which suggests that neither procedure succeeds in extracting only the bioavailable fraction of these contaminants.

Introduction

Sedimentary material often forms the predominant pool of metals and metalloids in aquatic systems (Luoma 1989). Assessing the risk associated with trace elements in this compartment is difficult because the availability of these contaminants to animals is poorly understood. We used concentrations of trace elements in the alderfly *Sialis* to represent bioavailable trace elements in sediment. We chose this insect because, in addition to having ecological qualities that make it a good biomonitor (Roy and Hare, 1998), it obtains the majority of its trace elements from prey (Croisetière *et al.* 2006), which in turn take up their nutrients (and likely trace elements) from sedimentary detritus (Croisetière *et al.* 2007). Using trace element concentrations in *Sialis* as a benchmark, we then determined whether digesting sediment in various ways would allow us to correlate trace element concentrations in this biomonitor to those in its surroundings.

To achieve our goal, we collected *Sialis* larvae and sediment from a series of lakes located at various distance from trace element point sources. To estimate bioavailable trace element concentrations in sediment we compared two partial digestion techniques that are purported to extract labile metals or mimic conditions in the guts of animals, that is, dilute HNO₃ (Gallon *et al.* 2005) and a commercially available protein solution (Chen and Mayer 1998, Weston and Maruya 2002). We normalized values obtained from the HNO₃ extraction for the carbon content of the sediments because trace elements bound to this fraction are purported to be less available for uptake by some animals (Besser *et al.* 1995). If one or both of these digestion techniques do indeed

release only bioavailable trace elements from sediments, then the concentrations obtained should be correlated with those in the insect.

Methods

Collection and treatment of samples

We collected *Sialis* larvae and sediment from 10 lakes located along contamination gradients in the areas of Sudbury (NE Ontario, Canada) and Rouyn-Noranda (NW Quebec, Canada). The Sudbury area has been impacted by nickel smelting (Borgmann et al. 2001), whereas the Rouyn-Noranda area is known for a copper-smelting facility that has released a variety of metals and metalloids (Telmer *et al.* 2004) to the detriment of nearby aquatic communities (Borgmann *et al.* 2004). To collect insect larvae, divers drew a mesh net (250- μ m mesh-aperture) along the sediment surface so as to collect the uppermost ~10-cm of sediment or, when insect larva densities were low, used an air-lift device that sucked surface sediment via a tube into a 250- μ m mesh-aperture at the surface. Larvae retained by these methods were transferred to the laboratory in plastic bags containing lakewater in coolers.

In the laboratory, live *Sialis* were sorted, left in lakewater for 24 h to allow defecation of their gut contents, then placed on acid-washed Teflon sheeting, in clean microcentrifuge tubes and frozen at -20 °C. *Sialis* were not identified further because taxonomic keys are not yet available for North American species. Frozen samples of *Sialis* were freeze-dried and digested for 3 h at 121 °C in concentrated HNO₃ in thick-walled Teflon vials (Fisher

Scientific Trace Metal Grade acid; maximum 1 mg of dry tissue per 30 μL HNO_3). Similar-sized samples of a reference material (lobster hepatopancreas, TORT-1, National Research Council of Canada, Ottawa) were digested at the same time to ensure the efficacy of the digestion procedure. Digestion blanks were prepared using the same reagents and procedure. Once cooled, the digested samples and blanks were diluted with ultrapure water and trace elements were measured by Inductively Coupled Plasma mass spectrometry (ICP-MS; Thermo Electron Corporation, model X7) using external calibration with standards and rhodium as an internal standard. We duplicated the analysis of at least 10% of the samples and at frequent intervals analyzed blanks (5% of analyses) and calibration standards (10% of analyses).

Divers collected three 5-cm sediment cores from each lake in acrylic tubes (10 cm diameter), and the oxic (upper 0.5 cm) and anoxic (remaining 4.5 cm) portions were stored in separate containers. We chose a core length of 5 cm because most *Sialis* burrows are reported to lie within this depth (Charbonneau and Hare 1998). We used only the anoxic portion of each core for trace element analyses since $\delta^{34}\text{S}$ ratios measured in *Sialis* revealed that this insect takes up most trace elements from prey (Croisetière *et al.* 2006) and that the ultimate source of nutrients for its prey is anoxic sediment (Croisetière *et al.* 2007).

We extracted trace elements from anoxic sediment using one of two methods. In the first method, 0.1 - 0.15 g of freeze-dried sediment were extracted with 5 mL of HNO_3 in 10-mL, high-density polyethylene (HDPE) tubes at 20 °C under constant agitation (400 rpm)

for 12 h (Gallon *et al.* 2005). After extraction, the tubes were centrifuged at 4,000 g for 5 min and the supernatant collected. In the second method, 0.5 g of wet sediment was added to 0.8 mL of a Bovine Serum Albumen solution (BSA, Sigma P-5369) to 1,000 mM amino acid concentration in a 0.85 % NaCl solution in 10-mL HDPE tubes held for 1 h on a rotary shaker (400 rpm) at 20 °C; tubes were then centrifuged (4,000 g) for 10 min, the supernatant was collected. Supernatants from both extraction protocols were analyzed for trace elements by ICP-MS and these results are reported as extracted metals per unit dry weight of sediment. For both methods, we extracted and analyzed duplicate sub-samples from each core.

To better characterize our study lakes, we measured pH (Hanna model HI 9025) in each lake and we collected water samples for the measurement of trace elements, major ions and dissolved organic carbon using diffusion samplers (Croteau *et al.* 1998) suspended 1 m above the sediment in the littoral zone. After 3-days of equilibration, aliquots were taken from various cells of the diffusion samplers using a Gilson pipette fitted with an acid-washed tip for the measurement of As, Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. Samples (1.5 mL) for measurement of dissolved inorganic carbon (DIC) were collected using a plastic disposable syringe purged with nitrogen and was injected through a septum into a N₂-purged vial containing 60 µL of 10% HCl. Water samples were analyzed by ICP-MS for trace elements and by ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy; Varian Vista AX) for major cations. We determined Cl⁻ and SO₄²⁻ concentrations by ion chromatography (Dionex DX-300, IONPAC At-14 column), DIC

by gas chromatography (Perkin-Elmer Sigma 300, Porapak-Q column) and dissolved organic carbon (DOC) by combustion on a Shimadzu (Model TOC-5000) analyzer.

All labware used for trace element analyses was soaked overnight in 15% HNO₃ and rinsed thoroughly with ultrapure water (18 MΩ cm). Samples for DOC analysis were stored in bottles pre-cleaned with a hot (60 °C) potassium persulfate solution (52 g L⁻¹; for 1 h), rinsed with ultrapure water and placed at 400 °C (6 h) to remove any trace of organic carbon.

Results & Discussion

Measurements in water (Table 1) and sediment (Table 2) confirm that the lakes we sampled encompass a wide range of trace element concentrations, with values for a given trace element differing by more than an order of magnitude among lakes. Comparing the two regions, lakes located near Sudbury are notable in their high concentrations of Ni (Tables 1 & 2), and this metal is reported to have compromised the diversity of some aquatic communities in the Sudbury area (Borgmann et al. 2001).

Trace element concentrations in *Sialis* varied substantially among lakes (by at least a factor of 3, Table 2), which suggests that this insect does not maintain constant its concentrations of these elements and thus could be useful to monitor contamination levels in lakes. In some of our study lakes, trace element concentrations varied considerably among individual *Sialis* larvae (Figures 1 and 2). Size differences among larvae are not likely to explain this variation because a wide range of larval sizes was taken from all lakes. Moreover, collection of different size classes in one of the lakes (Vaudray) allowed

us to determine that organism size does not appear to influence its Cd concentration (ANOVA; $p > 0.05$; $n = 8$; weight range: 1-11 mg). Variability among individual larvae could also be explained if more than one *Sialis* species was collected (species are not distinguishable in the larval stage) and if trace element concentrations varied among species (unknown at present). Knowing that *Sialis* larvae take up trace elements from prey (Croisetière *et al.* 2005a), variations in the types of prey consumed could also lead to variability in predator contaminant concentrations (trace element concentrations can vary widely among prey types; van Hattum *et al.* 1991, Croteau *et al.* 2003). Lastly, variation in trace element concentrations could be the consequence of heterogeneity in sediment contaminant concentrations. A means of countering variations in trace metal concentrations among individuals would be to pool larvae as to obtain samples that are representative for the population as a whole. Unpublished data (Hare and Tessier) suggests that pooling individuals in *Sialis* for trace element analyses substantially reduces variability.

To relate trace element concentrations in *Sialis* to those in its surroundings, we first need to consider the environmental compartment to which we should compare its contaminant concentrations. This predator is reported to take up many trace elements (As, Cd, Co, Cu, Pb, and Zn) from its prey rather than directly from lakewater or sediment (Croisetière *et al.* 2006). Thus trace element concentrations in *Sialis* can be related to those in its prey by the following equation:

$$[M]_{Sialis} = f_1 [M]_{prey} \quad (1)$$

where $[M]_{Sialis}$ and $[M]_{prey}$ are the concentrations of a given element in *Sialis* and its prey,

respectively, and f_1 is a proportionality constant between the two. Roy and Hare (1999) have shown experimentally that Cd concentrations in *Sialis velata* are directly related to those in their prey, as suggested by equation 1. The question then becomes from where do preys of *Sialis* obtain their trace elements?

Warren *et al.* (1998) suggested that 95% of the Cd taken up by this predator comes indirectly, via prey, from the oxic portion of lakes, that is, surface sediment, overlying water and/or suspended particles. They based this conclusion on the results of a field experiment in which they added various quantities of Cd to containers placed on the bottom of a lake that were then left to be colonized by invertebrates from the environs. To test this possibility we compared Cd concentrations in *Sialis* to $[Cd^{2+}]$ (estimated using WHAM 6 software code) in overlying water. The two were not correlated ($p > 0.05$, ANOVA), even when we took into account differences in pH among our study lakes (as per the approach described in Croteau *et al.* 1998). Because we did not measure Cd concentrations in particles suspended in the water column (a potential source of Cd for prey of *Sialis*), we do not know if Cd concentrations in this medium might have been correlated with those of Cd in *Sialis*.

In contrast to the results of Warren *et al.* (1998), Croisetière *et al.* (2007) showed that *Sialis* takes up its sulfur from sediment, which suggests that most of the prey consumed by *Sialis* also take up their energy from sediment. The apparent contradiction between the conclusions of Warren *et al.* (1998) and Croisetière *et al.* (2006) can be resolved if we assume that in the lake studied by the former experimenters most of the prey eaten by *Sialis* took up their Cd from the oxic portion of the lake (e.g., insects), whereas in the lakes from which the lattermost researchers collected *Sialis* a substantial proportion of the

prey eaten took up their Cd from anoxic sediments (e.g., oligochaetes). However, this does not seem likely because S signatures for *Sialis* from the lake studied by Warren et al. (1998) indicate that larvae in this lake also obtain their S from the anoxic sediment compartment.

If we assume that prey of *Sialis* take up their energy and trace elements from sediment, we can relate trace element concentrations in prey to those in sediment by the following equation

$$[M]_{\text{prey}} = f_2 [M]_{\text{sediment}} \quad (2)$$

where $[M]_{\text{sediment}}$ is the concentration of a given trace metal in sediment. Combining equations (1) and (2), gives

$$[M]_{\text{Sialis}} = f_3 [M]_{\text{sediment}} \quad (3)$$

where $f_3 = f_1 f_2$, which provides us with a conceptual basis for using *Sialis* to monitor trace element concentrations in sediment even though this insect does not itself feed on sediment.

To test equation 3 in the field, we compared trace element concentrations in *Sialis* larvae to those extracted from anoxic sediment by either acid (HNO₃) or a protein solution (BSA). We did not use the Acid Volatile Sulfide (AVS) approach because its past success in predicting metal bioaccumulation, as opposed to toxicity, is limited (Ankley 1996, Warren et al. 1998, Lee et al. 2000, Hare et al. 2001). Using an acidic extraction of anoxic sediment (Fig. 1), significant (ANOVA; $p < 0.05$) relationships were observed for both Co ($R^2 = 0.72$) and Ni ($R^2 = 0.80$). However, linear regressions for most of the other

elements studied were either not significant (ANOVA; $p > 0.05$) or if significant ($p < 0.05$) depended on a single data point (Pb) (Figures 1 and 2). When we normalized to the organic carbon content of sediment sedimentary metal concentrations (results not shown), there was no substantial improvement to the relationships shown in Fig. 1.

Although variability among individual *Sialis* within a lake (discussed above) did not facilitate comparisons between trace element concentrations in this insect and those in sediment, it is likely that the major factor limiting our capacity to correlate these variables is the manner in which trace elements were extracted from the sediment. Conditions in the digestive tract of sediment-feeding prey (*Sialis* takes up its trace elements from prey, Croisetière et al. 2006), likely differ substantially from those created by the acidic extraction we tested. For example, the gut pH of many aquatic invertebrates is circum-neutral or mildly acidic (Hare 1992), which is a far cry from the very strong acid digestion that we employed.

Extraction of trace elements in protein solutions such as BSA is reported to offer a more realistic alternative to acid digestions (Mayer *et al.* 1996). Extraction by this means yielded trace element concentrations that were several orders of magnitude lower than those when sediments were digested with HNO₃ (n-molar versus μ -molar, respectively, Table 2). The concentrations of trace elements extracted by the two methods were correlated (ANOVA; $p < 0.01$) for As, Co, Ni, Pb and Zn, even though the milder extractant (BSA) acts differently from the acidic one. The milder sediment extractant did not yield correlations between sedimentary and animal trace element concentrations that were markedly stronger than those obtained with the acidic digestion, that is, linear regressions for most elements were either not significant (ANOVA; $p > 0.05$) or if

significant ($p < 0.05$) depended on a single data point (Pb) (Fig. 2). However, as with the acidic extraction, strong relationships (ANOVA; $p < 0.05$) were observed for Co ($R^2 = 0.75$) and for Ni ($R^2 = 0.82$).

The apparent lack of success of the BSA extractant could be related to the fact that trace elements compete with one another during the extraction process such that high concentrations of some trace metals could reduce the extraction of others from the sediment (Weston *et al.* 2002). For example, in our study, very little Cd was extracted from Lake Dufault sediments, in spite of the high concentration of this metal, likely because these sediments also contained very high concentrations of Cu and Zn (Chen and Mayer 1999). Increasing the BSA/sediment ratio used during the extraction would likely allow greater quantities of trace elements to be extracted. Thus the ratio of the quantities of BSA to sediment is likely critical to the results obtained using this extractant. Ideally, this ratio should be representative of that of the protein/sediment ratio in the gut of prey. However, this value is not known for most aquatic invertebrates, which points to the operational nature of this type of extraction.

Overall, although we obtained strong correlations for Co and Ni, our lack of success in relating the concentrations of other trace elements in sediment to those in *Sialis* suggests that the sediment extractions we tested do not mimic well processes in the gut of its sediment-feeding prey. However, we cannot exclude the possibility that the lack of a correlation between the concentration of a given trace element in *Sialis* and in sediment is not due to the extractions but to differences among the lakes we studied in the types of prey available for this predator.

Our results underline the challenge of developing a sedimentary metal biomonitor. Finding the right variable(s) to explain the biomonitor's response is not simple. We suggest that more success might be achieved if contaminant concentrations in organisms were viewed as the 'gold standard' due to the fact that they are an expression of all of the geochemical and biological processes impinging on the organism. We should then look to the organisms surroundings and use our geochemical knowledge to discover environmental variables to which organism trace element concentrations are correlated. In practice, researchers tend to do the opposite, that is, measure contaminants in sediment or water and then hope to 'fit' organism values to these geochemical variables. We suggest using biomonitors to help us better explain trace element bioavailability, rather than the reverse.

Acknowledgments

Funding was provided by the Fonds de Recherche du Québec sur la Nature et les Technologies, the Metals In The Environment Research Network (contribution number 55), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Ontario Power Generation and the Mining Association of Canada. Assistance from J. Bastien, E. Therrien and the laboratory personnel at INRS-ETE is gratefully acknowledged. N. Belzile (Laurentian University, Sudbury, ON) provided laboratory facilities during the field work.

References

- Ankley G.T. 1996. Evaluation of metal/acid-volatile sulfide relationships in the prediction of metal bioaccumulation by benthic macroinvertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 2138-2146.
- Besser J.M., Kubitz J.A., Ingersoll C.G., Braselton E. & Giesy J.P. 1995. Influences on copper bioaccumulation and growth of the midge, *Chironomus tentans*, in metal contaminated sediments. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 4: 157-168.
- Borgmann U., Norwood W.P., Reynoldson T.B. & Rosa F. 2001. Identifying cause in sediment assessments: bioavailability and the Sediment Quality Triad. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 950-960.
- Borgmann U., Nowierski M., Grapentine L.C. & Dixon D.G. 2004. Assessing the cause of impacts on benthic organisms near Rouyn-Noranda, Quebec. *Environmental Pollution* 129: 39-48.
- Charbonneau P. & Hare L. 1998. Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects. *Journal of the North American Benthological Society* 17: 239-249.
- Chen Z. & Mayer L.M. 1998. Digestive proteases of the lugworm, *Arenicola marina*, inhibited by Cu from contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 433-438.
- Chen Z. and Mayer L.M. 1999. Sedimentary metal bioavailability determined by the digestive constraints of marine deposit feeders: Gut retention time and dissolved amino acids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 176: 139–151.
- Croisetière L., Hare L. & Tessier A. 2006. A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb and Zn for the aquatic invertebrate *Sialis velata*. *Environmental Science and Technology* 40: 873-879.
- Croisetière L., Hare L., Cabana G. & Tessier A. 2007. Sulfur isotopes reveal that sediment sustains fish production in lakes. Submitted to *Limnology & Oceanography*.
- Croteau M.-N., Hare L. & Tessier A. 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environmental Science & Technology* 32: 1348-1353.
- Fry B. 1986. Sources of carbon and sulfur nutrition for consumers in three meromictic lakes of New York State. *Limnology and Oceanography* 31: 79–88.

- Gallon C., Tessier A., Gobeil C. & Beaudin L. 2005. Sources and chronology of atmospheric lead deposition to a Canadian Shield lake: Inferences from Pb isotopes and PAH profiles. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69: 3199-3210.
- Hare L. 1992. Aquatic insects and trace metals: Bioavailability, bioaccumulation and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 22: 327-369.
- Hare L., Tessier A. & Warren L. 2001. Cadmium accumulation by invertebrates living at the sediment-water interface. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 880-889.
- Lee B.-G, Griscom S.B., Lee J.S., Choi H.J., Koh C.H, Luoma S.N. & Fisher N.S. 2000. Influences of Dietary Uptake and Reactive Sulfides on Metal Bioavailability from Aquatic Sediments. *Science* 287: 282-284.
- Luoma S.N. 1989. Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? *Hydrobiologia* 176/177: 379-396.
- Mayer L.M., Chen Z., Findlay R.H., Fang J., Sampson S., Self R.F.L., Jumars P.A., Quetel C. & Donard O. 1996. Bioavailability of sedimentary contaminants subject to deposit-feeder digestion. *Environmental Science and Technology* 30: 2641-2645.
- Roy I. & Hare L. 1998. Eastward range extension in Canada of the alderfly *Sialis velata* Ross (Megaloptera; Sialidae) and the potential of the genus as a contaminant biomonitor. *Entomological News* 109: 285-287.
- Roy I. & Hare L. 1999. Relative importance of water and food as cadmium sources to the predatory insect *Sialis velata* (Megaloptera). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 1143-1149.
- Telmer K., Bonham-Carter G.F., Kliza D.A. & Hall G.E.M. 2004. The atmospheric transport and deposition of smelter emissions: Evidence from the multi-element geochemistry of snow, Quebec, Canada. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68: 2961-2980.
- van Hattum B., Timmermans K.R. & Govers H.A. 1991. Abiotic and biotic factors influencing in situ trace metal levels in macroinvertebrates in freshwater ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 10: 275-292.
- Warren L.A., Tessier A., & Hare L. 1998. Modelling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: The relative contributions of sediment and overlying layer water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnology and Oceanography* 43: 1442-1454.
- Weston D.P., Millward R.N., Mayer L.M., Voparil I. & Lotufo G.R. 2002. Sediment extraction using deposit-feeder gut fluids: a potential rapid tool for assessing

bioaccumulation potential of sediment-associated contaminants. ERDC/EL TR-02-18, U.S. Army Engineer and Development Center, Vicksburg, MS.

Weston D.P. & Maruya K.A. 2002. Predicting bioavailability and bioaccumulation with in vitro digestive fluid extraction. *Environmental Toxicology and chemistry* 21: 962-971.

TABLE 1. The location, pH and total dissolved concentrations of carbon, major ions, and trace elements in the water column of our study lakes.

<i>Region & Lake</i>	Code	Location	pH	DOC mg L ⁻¹	DIC mM	Cl μM	SO ₄ μM	Ca μM	Mg μM	Na μM	K μM	As nM	Cd nM	Co nM	Cu nM	Ni nM	Pb nM	Zn nM
<i>Sudbury</i>																		
Clearwater	CL	46°22'N 81°03'W	6.28	3.1	0.02	215	118	110	44	134	15	5.0	2.1	20	150	1190	0.7	256
Crooked	CR	46°25'N 81°02'W	5.29	3.5	0.02	165	102	74	48	62	15	10	5.3	110	600	3100	2.6	410
McFarlane	MC	46°25'N 80°57'W	8.02	5.8	0.27	2230	193	340	190	1967	51	4.2	0.7	2.7	150	1310	0.3	59
Ramsey	RY	46°28'N 81°59'W	7.64	3.7	0.35	2220	205	350	190	1962	52	16	0.6	1.3	195	1110	1.2	43
Richard	RI	46°26'N 80°55'W	7.66	3.1	0.20	980	111	200	110	888	25	<1	0.5	0.8	130	1140	0.7	59
Silver	SI	46°26'N,81°01'W	5.54	0.1	<0.02	2470	203	165	105	2042	45	<1	4.9	150	565	2950	2.4	370
<i>Rouyn-Noranda</i>																		
Caron	CA	48°01'N 78°54'W	7.16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Dufault	DU	48°18'N 79°01'W	7.74	8.8	0.23	145	383	380	125	155	17	7.7	8.1	3.4	285	<15	5.1	1500
Savard	SA	48°20'N 78°52'W	7.40	8.8	0.27	33	72.1	180	95	63	17	11	0.5	0.7	86	<15	0.8	69
Vaudray	VA	48°07'N 78°40'W	6.82	11.6	0.08	9.9	63.0	74	35	25	6.2	<1	0.7	0.6	47	<15	0.7	44
<i>Max./Min.</i>				120	>17	250	6	5	5	82	7	>16	250	250	13	>200	17	34

NA: Data not available.

TABLE 2. Trace element concentrations in *Sialis* larvae (nmol g⁻¹) and in sediment. Sediment results are for 2 types of extractions: upper value, HNO₃ extraction (µmol g⁻¹); italic value, BSA extraction (nmol g⁻¹).

<i>Region & Lake</i>	<i>Sialis</i> (nmol g ⁻¹)							Sediment							
	As	Cd	Co	Cu	Ni	Pb	Zn	C %	As	Cd	Co	Cu	Ni	Pb	Zn
<i>Sudbury</i>															
Clearwater	27	52.2	63.7	682	194	4.6	3044	6.3	2.60 <i>3.04</i>	0.09 <i>0.80</i>	1.75 <i>12.6</i>	38 <i>63</i>	33 <i>700</i>	4.14 <i>2.32</i>	7.6 <i>64</i>
Crooked	89	19.3	14.9	1068	469	8.5	2629	12.0	6.92 <i>17.8</i>	0.14 <i>1.56</i>	1.34 <i>8.27</i>	78 <i>330</i>	42 <i>740</i>	4.96 <i>6.12</i>	5.9 <i>64</i>
McFarlane	6.5	24.5	22.5	584	212	1.9	2780	2.2	1.50 <i>3.06</i>	0.16 <i>1.85</i>	3.11 <i>5.74</i>	32 <i>7.7</i>	76 <i>1070</i>	1.17 <i>0.94</i>	16 <i>175</i>
Ramsey	15	40.1	39.6	1168	421	4.5	3004	7.2	4.73 <i>10.0</i>	0.34 <i>2.02</i>	4.15 <i>10.2</i>	160 <i>225</i>	200 <i>1150</i>	6.34 <i>4.80</i>	35 <i>200</i>
Richard	6.4	82.3	60.0	549	459	3.6	2271	6.2	5.12 <i>4.47</i>	0.44 <i>11.4</i>	13.8 <i>20.1</i>	140 <i>930</i>	320 <i>3090</i>	4.33 <i>2.99</i>	35 <i>440</i>
Silver	88	13.2	6.3	1660	89.0	11.3	2710	7.3	4.04 <i>5.23</i>	0.04 <i>0.98</i>	0.83 <i>4.13</i>	51 <i>850</i>	17 <i>392</i>	2.67 <i>1.94</i>	3.8 <i>85</i>
<i>Rouyn-Noranda</i>															
Caron	18	116	12.5	449	23.8	2.87	3382	1.7	1.97 <i>1.80</i>	0.38 <i>2.53</i>	1.66 <i>3.10</i>	9.8 <i>40</i>	1.29 <i>8.30</i>	1.83 <i>0.81</i>	32 <i>250</i>
Dufault	41	93.4	20.0	1357	7.77	23.0	4871	4.9	4.67 <i>3.05</i>	1.46 <i>0.83</i>	6.74 <i>20.7</i>	165 <i>59</i>	1.56 <i>7.46</i>	32.1 <i>9.73</i>	340 <i>2210</i>
Savard	11	134	7.0	465	15.6	3.4	3328	3.8	0.33 <i>0.47</i>	0.14 <i>2.38</i>	0.35 <i>0.90</i>	2.9 <i>15</i>	0.63 <i>4.14</i>	1.11 <i>0.50</i>	3.7 <i>37</i>
Vaudray	20	115	15.0	644	69.0	8.1	7725	3.7	0.34 <i>0.64</i>	0.18 <i>1.32</i>	0.30 <i>1.08</i>	3.0 <i>27</i>	0.72 <i>6.25</i>	1.53 <i>2.08</i>	8.3 <i>82</i>
<i>Max./Min.</i>	14	10	10	3.7	60	12	3.4	7.1	21 <i>38</i>	36 <i>14</i>	46 <i>23</i>	57 <i>121</i>	510 <i>4900</i>	29 <i>20</i>	89 <i>60</i>

Figure captions.

Figure 1. Mean (\pm SD) concentrations of trace elements in *Sialis* and those of these contaminants extracted from anoxic sediment using 1N HNO₃ in 10 Canadian Shield lakes.

Figure 2. Mean (\pm SD) concentrations of trace elements in *Sialis* and those of these contaminants extracted from anoxic sediment using a 1000 mM (AA) BSA solution in 10 Canadian Shield lakes.

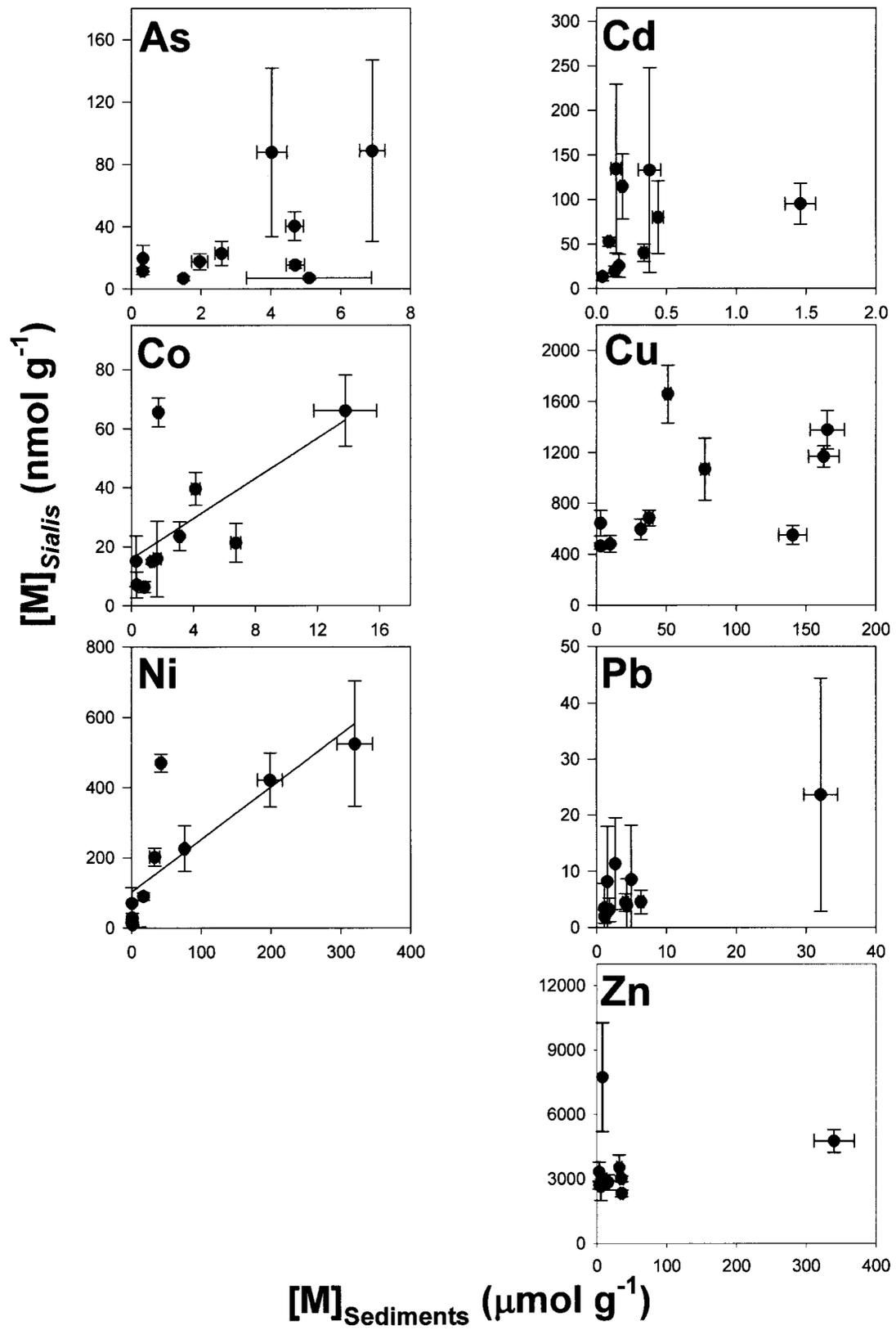


Fig. 1. Croisetière et al.

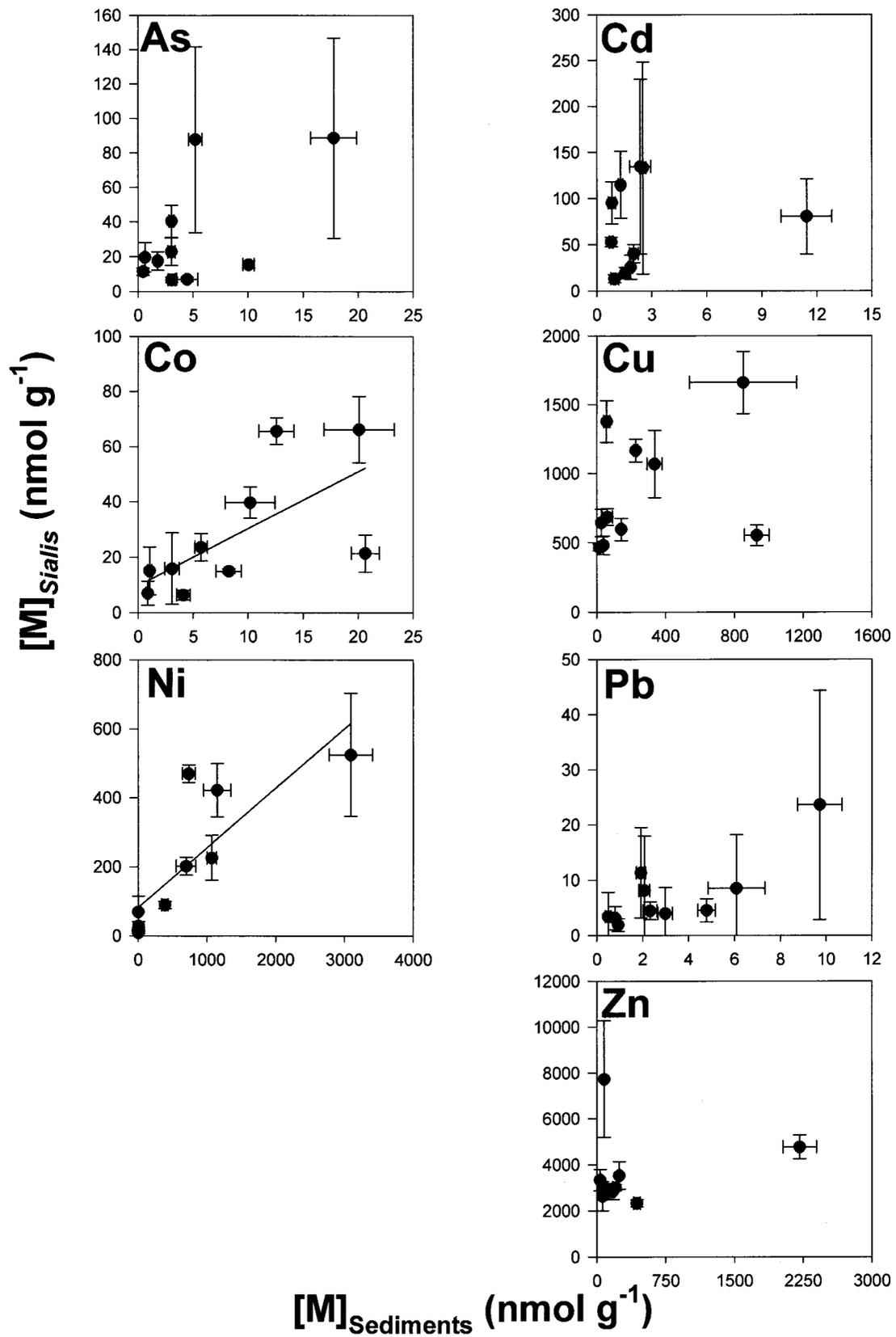


Fig. 2. Croisitière et al.

*Le connu est fini, l'inconnu infini;
ce que nous comprenons n'est qu'un îlot perdu
dans l'océan illimité de l'inexplicable*
T.H. Huxley

