Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique Eau, Terre et Environnement

Utilisation de la larve de l'insecte *Chaoborus* comme biomoniteur de contamination en nickel dans les lacs et dynamiques d'échange de nickel entre le biomoniteur et son environnement

Par

Dominic Ponton (B.Sc. Biologie)

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

# Jury d'évaluation

Examinateur externe

Nelson Belzile Université Laurentienne

Examinateur interne

Directeur de recherche

Claude Fortin INRS-Eau, Terre et Environnement

Landis Hare INRS-Eau, Terre et Environnement

#### 2009

<sup>©</sup> Droits réservés de Dominic Ponton



#### AVANT PROPOS

Ce mémoire est présenté sous forme d'articles. Il commencera par une synthèse (Partie 1) qui comprendra une introduction générale sur les métaux dans l'environnement et plus spécifiquement sur le nickel. Les deux chapitres subséquents (2 et 3) résumeront les deux articles scientifiques présentés à la fin du mémoire (Partie 2). Le premier article porte sur l'utilisation de la larve de la mouche fantôme du genre *Chaoborus* comme biomoniteur des concentrations de Ni biodisponibles dans les lacs de régions minières et le deuxième examine la dynamique d'échange de Ni entre *Chaoborus flavicans* et son environnement. Ces deux articles, en anglais, sont présentés plus en profondeur que la synthèse. Pour plus de détails, veuillez vous y référer. Je vous souhaite une bonne lecture.

Les contributions des auteurs des deux articles sont

Dominic Ponton :

- Conception et réalisation du projet
- Développement des méthodes
- Échantillonnage
- Réalisation des expériences
- Traitement et interprétation des données
- Rédaction de la synthèse et des articles

Landis Hare :

- Conception du projet
- Développement des méthodes
- Contribution au traitement et à l'interprétation des données
- Correction de la synthèse et des articles



#### REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier grandement mon professeur Landis Hare, de l'INRS-ETE qui m'a supervisé et a toujours été présent pour répondre à mes interrogations diverses tant sur le point de vue professionnel que personnel. Il m'a fait découvrir une passion, la recherche. Il est un excellent chercheur avec qui il me fait plaisir de continuer au doctorat. Je tiens à remercier mes examinateurs interne et externe, Claude Fortin et Nelson Belzile qui ont révisé les articles et mon mémoire. Je n'aurais pu effectuer mes travaux de terrain à Sudbury sans l'aide d'Isabelle Proulx et Victor Thomasson, respectivement étudiante au doctorat et stagiaire d'été en 2007. Les travaux de laboratoire en été 2008 ont été faits avec l'aide de ma collègue au doctorat, Dominique Lapointe et notre stagiaire Bérangère Leclercq. De plus, je veux remercier les techniciens de l'INRS-ETE, Sébastien Duval, René Rodrigue, Michelle Bordeleau et Pauline Fournier qui ont été d'une aide formidable.



# RÉSUMÉ

L'utilisation de biomoniteurs facilite grandement l'évaluation du risque venant des métaux en milieu naturel contaminé. L'étude de Borgmann et al. (2001) a démontré que le nickel (Ni) dans la région de Sudbury est le principal élément causant un effet toxique dans les lacs de la région. Comme la larve de la mouche fantôme Chaoborus s'est avérée un excellent biomoniteur de contamination de cadmium dans les lacs, nous avons investigué le potentiel de Chaoborus comme biomoniteur des concentrations biodisponibles de Ni dans les lacs. Pour ce faire, nous avons récolté des larves dans 15 lacs, dont deux à Rouyn-Noranda, et avons récolté de l'eau afin d'estimer la spéciation du Ni. Les concentrations de Ni chez Chaoborus varient entre les lacs et sont hautement corrélées avec les concentrations de l'ion libre de Ni dans l'eau si l'interaction avec les ions H<sup>+</sup> aux sites de prise en charge biologiques est prise en considération dans un modèle déterministe simple. De plus, ce phénomène de compétition a été vérifié en laboratoire. Les larves de *Chaoborus* s'avèrent être un excellent outil afin de classifier les lacs selon la contamination en Ni et d'estimer les concentrations de l'ion libre (si le pH est mesuré) d'un lac donné et ainsi, connaître l'exposition au Ni des autres organismes de ce même lac.

Les normes environnementales d'exposition des organismes en milieu aquatique sont souvent basées sur les concentrations de métaux dans l'eau sans prendre en compte l'entrée de métal par la nourriture. Nous avons donc évalué la dynamique des échanges de Ni entre la larve de *Chaoborus* et son environnement. Nous avons premièrement exposé *Chaoborus flavicans* à différentes sources de Ni; par l'eau, par la nourriture (*Daphnia magna*) et par les deux voies combinées (eau et nourriture). Nous avons constaté que C. flavicans obtient 2/3 de son Ni par l'eau et 1/3 de sa nourriture. La grande variabilité des valeurs d'efficacité d'assimilation de Chaoborus pour le Ni de ses proies est due à la variabilité de son taux d'ingestion, ainsi, le prédateur assimile moins de Ni lorsque qu'il ingère un plus grand nombre de proies. La faible proportion de Ni venant de la nourriture est la conséquence d'une faible moyenne d'efficacité d'assimilation (12%) qui ne correspond pas à la proportion de Ni présente dans les fractions trophiquement biodisponibles de la proie D. magna. Il semble que Chaoborus puisse réguler, en partie, son assimilation de Ni dans le tractus digestif. Parce que la majorité du Ni de Chaoborus provient de l'eau, nous avons, de plus, estimé les constantes de taux d'entrée  $(k_{uw})$  et de taux de perte ( $k_e$ ) de Ni qui sont respectivement de 0,019 ± 0,002 L g<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> et 0,19 ± 0,03 j<sup>-1</sup> <sup>1</sup>. Ces paramètres physiologiques spécifiques au Ni et à Chaoborus flavicans ont été vérifiés en estimant les concentrations de Ni des larves récoltées dans les lacs de Sudbury et en les comparant avec celles mesurées. Le rapport des valeurs estimées : mesurées obtenu est de 3,5 et permet de conclure que les paramètres physiologiques estimés sont suffisamment robustes pour pouvoir expliquer les phénomènes d'échange de Ni de Chaoborus en nature.

La larve de la mouche fantôme *Chaoborus* est un excellent biomoniteur pour évaluer la contamination de Ni dans les lacs en régions minières. Les études en laboratoire permettent de confirmer que l'eau et la nourriture sont deux vecteurs importants d'entrée de Ni chez cet insecte et que cet animal semble réguler, en partie, ses concentrations de Ni.

# TABLE DES MATIÈRES

AVANT PROPOS III
REMERCIEMENTSV
RÉSUMÉVII
TABLE DES MATIÈRES IX
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUXXVII
PREMIÈRE PARTIE - SYNTHÈSE 1
Premier Chapitre - Introduction11.1. Métaux dans l'environnement.11.2. Essentialité des métaux31.3. Spéciation et biodisponibilité des métaux dans l'eau51.3.1. Spéciation chimique des métaux51.3.2. Compétition des métaux avec les cations91.4. Métaux dans les sédiments et leur biodisponibilité111.5. Bioaccumulation des métaux traces131.5.1. Cinétique d'échange des métaux traces131.5.2. Accumulation de métaux par la nourriture131.6. Biomoniteurs151.7. Toxicité des métaux161.7.1. Protection cellulaire contre les métaux161.7.2. Biomarqueurs181.7.3. Bioindicateurs191.8. Régions minières de Rouyn-Noranda et Sudbury191.9. Chaoborus comme biomoniteur en lac231.10. Nickel231.10.1. Caractéristiques du nickel231.10.2. Biodisponibilité du nickel dans l'eau douce241.10.3. Compétiteurs du nickel dans l'eau pour l'entrée dans les organismes261.10.4. Caractère essentiel du nickel271.10.5. Biodynamique du nickel28
Deuxième Chapitre - Utilisation de la mouche fantôme <i>Chaoborus</i> comme biomoniteur de contamination en nickel dans les lacs

<ul> <li>2.2. Validation et comparaison du modèle pour le cadmium</li> <li>2.3. Nickel dans <i>Chaoborus</i> et sa relation avec le nickel dans l'eau des lacs</li> <li>2.4. Compétition entre les ions H<sup>+</sup> et Ni<sup>2+</sup> au laboratoire</li> <li>2.5. Modèle pour les quatre espèces</li> <li>2.6. Conclusion</li> </ul>	. 35 . 41 . 45 . 47 . 48
Troisième Chapitre - Dynamique du nickel chez le biomoniteur Chaoborus flavice	ins
<ul> <li>3.1. Chaîne trophique expérimentale et le milieu artificiel</li> <li>3.2. Croissance de l'algue <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> en présence de nickel</li> <li>3.3. Voies d'entrée du nickel chez <i>Daphnia magna</i></li></ul>	. 49 . 49 . 50 . 52 . 54 . 56 . 59 . 64 . 68
Quatrième Chapitre - Conclusion générale et perspectives de recherche         4.1. Synthèse des résultats         4.2. Perspectives de recherche	. <b>69</b> . 69 . 71
Cinquième Chapitre – Références	. 73
Sixième Chapitre - Annexe	. 83
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES	<b>. 83</b> . 85
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge <i>Chaobon</i>	. 83 . 85 . 85
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge <i>Chaobon</i> as a Biomonitor	. 83 . 85 . 85 . 87
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé Abstract	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 88
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé Abstract Introduction	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 88 . 90
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES. Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé Abstract Introduction Materials and Methods Describe end Disconsister	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 90 . 91
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé Abstract Introduction Materials and Methods Results and Discussion	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 90 . 91 . 96
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé Abstract Introduction Materials and Methods Results and Discussion Acknowledgements	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 90 . 91 . 96 107
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES. Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé. Abstract. Introduction. Materials and Methods. Results and Discussion Acknowledgements. Literature Cited	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 90 . 91 . 96 107 107
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé Abstract Introduction Materials and Methods Results and Discussion Acknowledgements Literature Cited Nickel Dynamics in the Lakewater Biomonitor Chaoborus	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 90 . 91 . 96 107 107 113
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé Abstract Introduction Materials and Methods Results and Discussion Acknowledgements Literature Cited Nickel Dynamics in the Lakewater Biomonitor Chaoborus Résumé	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 90 . 91 . 96 107 107 107 <b>113</b> 114
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé Abstract Introduction Materials and Methods Results and Discussion Acknowledgements Literature Cited Nickel Dynamics in the Lakewater Biomonitor Chaoborus Résumé Abstract	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 90 . 91 . 96 107 107 107 <b>113</b> 114 115
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé. Abstract Introduction Materials and Methods. Results and Discussion Acknowledgements Literature Cited Nickel Dynamics in the Lakewater Biomonitor Chaoborus Résumé. Abstract 1. Introduction	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 90 . 91 . 96 107 107 113 114 115 117
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé. Abstract Introduction Materials and Methods. Results and Discussion Acknowledgements Literature Cited Nickel Dynamics in the Lakewater Biomonitor Chaoborus Résumé. Abstract 1. Introduction 2. Methods.	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 90 . 91 . 96 107 107 <b>113</b> 114 115 117 118
Sixième Chapitre - Annexe DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES. Assessment of Nickel Contamination in Lakes using the Phantom Midge Chaobon as a Biomonitor Résumé Abstract Introduction Materials and Methods. Results and Discussion Acknowledgements. Literature Cited Nickel Dynamics in the Lakewater Biomonitor Chaoborus Résumé Abstract 1. Introduction 2. Methods. 3. Results and discussion	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 90 . 91 . 96 107 107 107 113 114 115 117 118 126
Sixième Chapitre - Annexe	. 83 . 85 . 85 . 87 . 88 . 88 . 90 . 91 . 96 107 107 113 114 115 117 118 126 140

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. : Bassin de sédimentation dans la région d'Oujé-Bougoumou, Québec.	1
Figure 1.2. : Vue de la cheminée « Superstack » de la fonderie Vale-Inco Inc. à Sudbury, ON.	2
<b>Figure 1.3. :</b> Schéma d'une courbe dose-performance physiologique pour les métaux essentiels. La partie de gauche représente une carence, au milieu une dose optimale et à droite une dose toxique.	4
<b>Figure 1.4. :</b> Schéma général de la spéciation possible d'un métal trace « M » dans l'eau : au centre l'ion libre hydraté, à gauche en haut les hydroxydes, à gauche en bas les ligands organiques (acides aminés), en haut à droite la liaison aux anions inorganiques, en bas à droite avec les substances humiques, ainsi que les constantes d'affinité entre chaque ligand et l'ion libre. Adapté de Pelletier <i>et al.</i> (2004).	6
<b>Figure 1.5.</b> : Photo de l'eau brunâtre (en raison de la matière organique) du lac Bousquet près de Rouyn-Noranda, QC.	7
<b>Figure 1.6.</b> : Schéma de la relation entre l'ion libre d'un métal $(M^{z^+})$ et les organismes d'une chaîne alimentaire. L'ion libre peut se lier à des ligands et dans ce cas, seulement l'algue et le consommateur primaire peuvent obtenir le métal par la voie aqueuse avec possibilité de compétition avec d'autres cations aux sites de prise en charge biologiques. Dans cet exemple, l'herbivore ( <i>Daphnia</i> sp.) et le prédateur ( <i>Chaoborus</i> ) peuvent obtenir le métal par leur nourriture. Les flèches des organismes vers l'ion libre représentent la perte physiologique de métal. Adapté de Munger et Hare (1997).	9
<b>Figure 1.7.:</b> Représentation schématique des processus biogéochimiques importants dans l'eau et les sédiments. Les compartiments du lac sont encadrés et les processus accompagnés de flèche. Adaptée de Belzile et Morris (1995).	
<b>Figure 1.8.</b> : Granules de phosphate de calcium dans une cellule à calcium d'une limace. La barre représente 0,5 µm. Tirée de Marigomez <i>et al.</i> (2002).	17
Figure 1.9. : Localisation et géologie générale du « Sudbury Basin ». Tirée de Gunn (1995).	20
<b>Figure 1.10. :</b> Trois stades majeurs de <i>Chaoborus</i> : la larve (en haut), la pupe (à droite) et l'adulte (à gauche). Source inconnue.	22
<b>Figure 2.1. :</b> Localisation des lacs de la région de Sudbury échantillonnés en 2007 et 2009 (Chief et Swan) ainsi que le positionnement de la fonderie Vale Inco. Image satellite tirée de Goolge Earth.	
Figure 2.2.: Montage des dialyseurs comprenant une brique, une corde, trois dialyseurs, un fil à pêche et finalement un flotteur.	34
Figure 22 : Concentrations de codmium de Chachemus (Sementia) autorité et	

**Figure 2.3.**: Concentrations de cadmium de *Chaoborus (Sayomia) punctipennis* et *Chaoborus (Sayomia) albatus* (nmol g<sup>-1</sup>;  $\pm$  ET; n = 5-8) en fonction des concentrations de Cd totales (panneau A; nmol L<sup>-1</sup>;  $\pm$  ET), des concentrations de l'ion libre de Cd

**Figure 2.5.**: Concentrations de nickel chez *Chaoborus (Sayomia) punctipennis* et *Chaoborus (Sayomia) albatus* (nmol g<sup>-1</sup>;  $\pm$  ET; n = 5-8) en fonction des concentrations de Ni totales (panneau A; µmol L<sup>-1</sup>;  $\pm$  ET), des concentrations de l'ion libre de Ni (panneau B; µmol L<sup>-1</sup>;  $\pm$  ET) et en fonction de l'ion libre corrigé pour l'effet compétiteur des ions H<sup>+</sup> aux sites de prise en charge biologiques (décrites par l'équation 2.1; panneau C). Les valeurs ( $\pm$  ES) de la pente (F<sub>H</sub> dans l'équation 2.1) et de l'intersection avec l'axe des y de la régression dans le panneau C sont 229  $\pm$  69 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0,005) et 0,8  $\pm$  2,0 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0,7), respectivement. La valeur de K<sub>a</sub> est 6,08  $\pm$  1,99 µmol L<sup>-1</sup> (estimée par analyse des moindres carrés; p = 0,009).

42

**Figure 2.6.** : Concentrations de Ni (nmol  $g^{-1}$ ; ± ET; symboles ouverts) chez *Chaoborus punctipennis* exposé à 1600 nM de Ni<sup>2+</sup> à différents pH. Le cercle noir est la concentration de Ni chez *C. albatus* provenant du lac Pine ([Ni<sup>2+</sup>] = 1512 nM; pH 4,7). Les lettres différentes représentent des différences significatives (p < 0,05; ANOVA suivi d'un test en paire de Tukey). Les carrés sont les prédictions du modèle (équation 2.1).

nickel ajouté (à droite).

<b>Figure 3.3.</b> : Concentrations moyennes de Ni (nmol g <sup>-1</sup> ; $\pm$ ET) chez <i>Daphnia magna</i> exposé à quatre traitements pendant 4 jours: témoin (T), nourriture seulement (N; <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> contaminée sans Ni dans l'eau), eau seulement (E; pas nourri et Ni dans l'eau) et par l'eau et la nourriture (N et E; Ni dans l'eau et dans les algues). Les lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0.05$ ; ANOVA suivit d'un test en paire de Tukey).	
<b>Figure 3.4.</b> : Concentrations moyennes de Ni (nmol $g^{-1}$ ; ± E.T.) chez <i>Chaoborus flavicans</i> exposé à quatre traitements : témoin (T ; eau et daphnies sans Ni), nourriture seulement (N; <i>D. magna</i> contaminé sans Ni dans l'eau), eau seulement (E; pas nourri et Ni dans l'eau) et par l'eau et la nourriture (NE; Ni dans l'eau et dans la nourriture). La dernière colonne représente l'addition mathématique du traitement N et E (N + E). Les lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0.05$ ; ANOVA suivit d'un test en paire de Tukey).	
<b>Figure 3.5.</b> : Changement dans le temps (j) de la moyenne ( $\pm$ ET; $n = 4$ ) des concentrations de Ni de <i>Chaoborus flavicans</i> exposé à 300 nM de Ni <sup>2+</sup> libre dans le milieu de culture Bristol, sans nourriture, pendant 8 jours (symboles noirs) et ensuite à de l'eau sans Ni pendant 8 autres jours (symboles blancs). Les courbes modélisées pour la prise en charge (longs traits) et la sortie (courts traits) ont été estimées en utilisant l'équation 3.4 et 3.3, respectivement.	
<b>Figure 3.6.:</b> Efficacité d'assimilation individuelle (EA; %) de <i>Chaoborus flavicans</i> pour le nickel de ses proies <i>Daphnia magna</i> juvéniles ingérées à des taux variés (TI; g poids sec de proie g <sup>-1</sup> poids sec de <i>Chaoborus</i> d <sup>-1</sup> ). La courbe décrit la fonction $y = a \cdot e^{-bx}$ où les valeurs (± ES) de « a » est 60 ± 11 % et « b » est 18,5 ± 3,0.	60
<b>Figure 3.7. :</b> Protocole de fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle afin d'obtenir les fractions présentées en caractère gras. Adapté de Dumas et Hare (2008).	61
<b>Figure 3.8. :</b> Proportion de Ni (%; $\pm$ ET) dans les différentes fractions subcellulaires de <i>Daphnia magna</i> . De gauche à droite les mitochondries (Mito.), les organelles (Org.), les protéines dénaturées à la chaleur (PDC), les protéines stables à la chaleur (PSC), les granules (Gran.) et les débris (Deb.). Les barres blanches représentent les fractions biodisponibles.	
<b>Figure 3.9.</b> : Absence de corrélation ( $p = 0.62$ ) entre les concentrations de Ni chez <i>Chaoborus</i> (nmol g <sup>-1</sup> ; $n = 5$ -8) et le Ni dans le zooplancton brut (nmol g <sup>-1</sup> ; $\pm$ ET; $n = 3$ ) de deux fractions (50 à 125 µm : cercles noir et 125 à 500 µm : cercles blancs).	66
<b>Figure 3.10.</b> : Concentrations de nickel (nmol g <sup>-1</sup> ) de <i>Chaoborus</i> estimées selon l'équation 3.5 en fonction des [Ni] chez <i>Chaoborus</i> des différents lacs échantillonnés en 2007. La ligne pointillée représente le rapport 1:1.	
<b>Figure 1.</b> Relationships between mean ( $\pm$ SD; $n = 4-8$ ) Ni concentrations (nmol g <sup>-1</sup> dry weight) in <i>Chaoborus</i> larvae (combined data for the sister species <i>C. (Sayomyia) punctipennis</i> and <i>C. (Sayomyia) albatus</i> ) and (A) mean ( $\pm$ SD; $n = 3$ ) total dissolved Ni concentrations in lakewater, (B) mean ( $\pm$ SD; $n = 3$ ) estimated free Ni <sup>2+</sup> ion	

concentrations ( $[Ni^{2+}]$ ) in lakewater, and (C)  $[Ni^{2+}]$  in lakewater considering the influence of hydrogen ions ( $[H^+]$ ) at biological uptake sites for Ni (as described by

equation 2). The values ( $\pm$  SE) of the slope (F<sub>H</sub> in equation 2) and the *y*-intercept of the regression in panel C are 229 ± 69 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0.005) and 0.8 ± 2.0 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0.7), respectively, whereas K<sub>a</sub> is 6.08 ± 1.99 µmol L<sup>-1</sup> (estimated by least-squares analysis; p = 0.009).\_\_\_\_\_100

**Figure 2.** Mean ( $\pm$  SD; n = 5) Ni concentrations (nmol g<sup>-1</sup> dry weight) in *Chaoborus punctipennis* larvae exposed to a constant [Ni<sup>2+</sup>] of 1.6 µM at five different pHs (open symbols). Also shown, for comparative purposes, are the corresponding values for *Chaoborus albatus* from Pine Lake (closed symbol). Different letters represent statistically significant differences among treatment levels (ANOVA followed by a pairwise Tukey test; p < 0.05).\_\_\_\_\_104

**Figure 3.** Relationship between Ni concentrations (nmol  $g^{-1}$  dry weight) in larvae of four *Chaoborus* species (*C. albatus, C. americanus, C. flavicans* and *C. punctipennis*) and [Ni<sup>2+</sup>] in lakewater taking into account the influence of hydrogen ions (H<sup>+</sup>) at biological uptake sites for Ni (as described by equation 2). For lakes containing more than one species, values are means ( $\pm$  SD; n = 5-13) of all *Chaoborus* samples. The values ( $\pm$  SE) of the slope (F<sub>H</sub> in eq. 2) and the *y*-intercept of the regression are 125  $\pm$  39 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0.006) and 2.2  $\pm$  2.0 (p = 0.3) nmol g<sup>-1</sup>, respectively, whereas K<sub>a</sub> is  $3.37 \pm 1.17 \mu$ mol L<sup>-1</sup> (estimated by least squares analysis; p = 0.013).

**Fig. 2.** Changes over time in mean  $(\pm$  SD) Ni concentrations measured in *Chaoborus flavicans* exposed to Ni in artificial lakewater for 8 days (closed symbols) and then held in uncontaminated water for a further 8 days (open symbols). Model curves for Ni uptake (long dashes) and efflux (dotted line) were estimated using equations 4 and 3, respectively.

**Fig. 3.** Nickel assimilation efficiencies (%) of individual *Chaoborus flavicans* consuming juvenile *Daphnia magna* at various rates (g prey g<sup>-1</sup> body dry weight *Chaoborus* d<sup>-1</sup>). The curve describes the function  $y = a \cdot e^{-bx}$  where the value (± SE) of "a" is  $72 \pm 14\%$  and "b" is  $19.0 \pm 3.3$ .

**Fig. 4.** Proportional distribution (%;  $\pm$  SD; n = 10) of Ni in various subcellular fractions of *Daphnia magna*: mitochondria (Mito.), other organelles (Org.), cytosolic heat denatured proteins (HDP), cytosolic heat stable proteins (HSP), granules (Gran.), and cellular debris (Debr.); open bars represent Ni that is purported to be available for transfer to a predator, the grey bar represents Ni that is not available for trophic transfer is uncertain.

**Fig. 5.** Measured mean  $(\pm$  SD) values of [Ni] in *Chaoborus* larvae from lakes situated along a Ni gradient in the vicinity of metal smelters in the city of Sudbury, Ontario,

Canada compared to predicted values obtained using equation 6 (see text for details).	
The broken line represents a 1:1 relationship.	138



# LISTE DES TABLEAUX

<b>TABLEAU 2.1.:</b> Concentrations de Cd (nmol g <sup>-1</sup> ) de Chaoborus punctipennis et Chaoborus albatus (Lac Pine; 2007) échantillonnés dans différents lacs en 2007 (cette étude) et auparavant (données transmises de L. Hare, INRS-ETE, Québec) ainsi que le pH et les concentrations estimées de l'ion libre de Cd (nmol L <sup>-1</sup> ).*: [Cd] totale dissoute
<b>TABLEAU 2.2.</b> : Coordonnées géographiques, données physicochimiques de l'eau et moyennes ( $\pm$ ET, $n = 3-8$ ) des concentrations de nickel des quatre espèces de <i>Chaoborus</i> (nmol g <sup>-1</sup> poids sec) de 15 lacs situés près de deux fonderies canadiennes40
<b>TABLEAU 3. :</b> Concentrations totales de macronutriments et concentrations libres des micronutriments (calculées avec MINEQL+) dans le milieu de culture Bristol modifié utilisé pour toutes les expositions au nickel. Le tampon métallique EDTA (concentrations variables) et le tampon à pH MOPS (10 mM) étaient aussi présents dans le milieu
<b>TABLEAU 6. :</b> Valeurs moyennes $(n = 3)$ des constituants chimiques de l'eau pour 15lacs canadiens situés près des fonderies de Rouyn-Noranda, QC (Lacs Marlon andOpasatica) et de Sudbury, ON (autres lacs). n.d. : non déterminé
<b>TABLE 1.</b> Locations, water chemistry and mean ( $\pm$ SD, $n = 3-8$ ) nickel concentrations in larvae of four <i>Chaoborus</i> species (nmol g <sup>-1</sup> dry weight) collected from 15 lakes located in the vicinity of two Canadian metal smelters
<b>Table 1.</b> Total macronutrient concentrations and trace metal (free ion) concentrations(calculated using MINEQL+) in the modified Bristol medium used in our experiments.The metal buffer EDTA and the pH buffer MOPS were also present in the medium120
<b>Table 2.</b> Nickel concentrations in artificial lakewater ( $[Ni^{2+}]$ ), and in members of the laboratory food chain composed of the alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ( $[Ni]_{algac}$ ), the herbivore <i>Daphnia magna</i> ( $[Ni]_{prey}$ ) and the predator <i>Chaoborus flavicans</i> ( $[Ni]_{Chaoborus}$ ; Figures 1 and 2). Also given are measurements of herbivore weight ( $W_{prey}$ ) and estimated values of model variables and parameters (see 2.9.) including the uptake rate constant of Ni from water ( $k_{uw}$ ), the assimilation efficiency (AE) of Ni in prey ingested by the predator, the predator's ingestion rate (IR; as used in field extrapolations; see 3.3), the Ni efflux rate constant ( $k_e$ ), and the predator's growth rate constant ( $k_g$ ; the value for fed larvae (from Croteau et al., 2001) was used in field extrapolations).



## PREMIÈRE PARTIE - SYNTHÈSE

# **PREMIER CHAPITRE - INTRODUCTION**

## 1.1. Métaux dans l'environnement

Les métaux sont d'une importance inestimable dans notre société. Certains métaux comme le fer ou l'aluminium servent pour construire des objets de grande dimension (avion, pont, voiture, etc.), mais d'autres, comme l'or ou le cadmium, sont utilisés en bijouterie ou en électronique. Mais d'où viennent-ils? Les métaux sont extraits de minerais qui en contiennent, selon la région, des concentrations plus ou moins élevées. L'extraction de ceux-ci nécessite plusieurs étapes qui, selon le procédé, vont rejeter des résidus indésirables par voie atmosphérique, à partir des cheminées des fonderies, et par voie aquatique sous forme d'eau et de boue qui seront déversées à l'intérieur de bassins de sédimentation (Figure 1.1.). Le pH de l'eau de ces bassins est ajusté (souvent à la hausse) et après la sédimentation des particules, l'eau s'écoule généralement vers les rivières et les lacs.



**Figure 1.1. :** Bassin de sédimentation dans la région d'Oujé-Bougoumou, Québec.

1

Les métaux rejetés par les fonderies (Figure 1.2.) peuvent contaminer les sols, les forêts, les lacs et les rivières aux alentours. Par exemple, autrefois extrêmement riches en soufre et en métaux, les rejets atmosphériques des fonderies de Sudbury (Ontario) ont causé une acidification et une contamination métallique qui ont engendré des dommages terrestres et aquatiques importants (Gunn 1995). Malgré que le problème d'acidification des lacs par les pluies acides soit connu depuis longtemps (Oden 1968), c'est seulement pendant les années 80 que le phénomène est devenu d'ampleur internationale (Cowling 1982). Au début des années 70, les rejets de dioxyde de souffre dans la région ont diminués permettant au pH d'augmenter graduellement, mais en 1990, une autre diminution importante des rejets a fait grimper le pH rapidement et il est aujourd'hui, pour la plupart des lacs supérieur à 6 (Keller 2009). Malgré ces efforts de diminution des émissions, les concentrations de Cu et de Ni demeurent importantes dans les lacs dans un rayon de 30 km des fonderies (Keller *et al.* 1999).



**Figure 1.2. :** Vue de la cheminée « Superstack » de la fonderie Vale-Inco Inc. à Sudbury, ON.

Le terme « métaux traces » est un terme plus approprié que celui de « métaux lourds », souvent mal utilisé (Duffus 2002). Ce premier terme sera utilisé concernant les métaux présents en faibles concentrations (aux alentours de parties par milliard ou de  $\mu$ g L<sup>-1</sup> dans l'eau), et présentant un intérêt environnemental comme par exemple le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le mercure (Hg), le nickel (Ni), le plomb (Pb), le zinc (Zn). Ces concentrations « traces » peuvent tout de même mener à une accumulation substantielle dans les organismes et causer des effets toxiques.

## 1.2. Essentialité des métaux

Les organismes ont, depuis toujours, évolué en présence de métaux dans leur environnement et se sont adaptés à leur présence grâce à des processus biochimiques et physiologiques variés et, dans certains cas, ces métaux sont devenus essentiels à leur métabolisme. Pour certains organismes, le cobalt (Co), le Cu, le fer (Fe), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le Ni, le sélénium (Se) et le Zn sont essentiels à leur fonctionnement (Luoma et Rainbow 2008), mais peuvent aussi devenir toxiques à concentrations élevées. La courbe dose-performance des métaux essentiels chez un organisme ressemble à la forme d'une cloche (Figure 1.3.; présentée ici comme un trapèze).



**Figure 1.3. :** Schéma d'une courbe dose-performance physiologique pour les métaux essentiels. La partie de gauche représente une carence, au milieu une dose optimale et à droite une dose toxique.

Il y a carence ou performance physiologique diminuée lorsque les concentrations du métal essentiel disponibles pour l'organisme sont trop faibles (partie gauche du trapèze). Ce phénomène est souvent observé lors de culture d'organisme au laboratoire (Elendt et Bias 1990). Le haut du trapèze représente la gamme de concentrations où les organismes peuvent bien gérer les métaux et où aucun effet n'est observable. Selon le métal essentiel, le haut de la cloche (ici trapèze) sera plus ou moins large. Par exemple, dans le cas du Se, cette partie est très mince et il est donc difficile de connaître les concentrations optimales de cet élément (Luoma and Rainbow, 2008). La droite du trapèze représente les concentrations biodisponibles élevées où les organismes ne peuvent plus réguler le métal essentiel et où il se produit un effet toxique.

Afin de prédire l'accumulation et la toxicité d'un métal, il est important de connaître sa spéciation chimique, car elle permet d'évaluer sa biodisponibilité potentielle

en milieux aqueux. La prochaine section portera donc sur les formes, ou « espèces » de métaux traces présents dans les eaux douces.

# 1.3. Spéciation et biodisponibilité des métaux dans l'eau

# 1.3.1. Spéciation chimique des métaux

Les métaux dans l'eau sont présents sous une forme particulaire (> 0,2  $\mu$ m; taille arbitraire) qui constituent, dans la plupart des cas, une quantité plus importante (au niveau de la masse) que la forme dissoute (< 0,2  $\mu$ m), mais cette dernière est plus importante du point de vue de l'accumulation par voie aqueuse.

Les métaux (M) dissous dans l'environnement aquatique peuvent être présents sous différentes formes, ou « espèces » (Figure 1.4.), selon les conditions physicochimiques du milieu. Ils peuvent être sous forme d'hydroxo-complexes (M-OH), de complexes inorganiques avec des anions (M- : Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, etc.), de complexes organiques (M-acides aminés), sous forme liée avec les substances humiques (M-SH) ou sous forme ionique libre ( $M^{z+}$ ). Selon le compartiment environnemental étudié (sol, eau douce, eau marine, sédiment), la proportion relative que représente chaque espèce sera différente. Certaines formes chimiques sont plus susceptibles d'être prises en charge par les organismes.



**Figure 1.4. :** Schéma général de la spéciation possible d'un métal trace « M » dans l'eau : au centre l'ion libre hydraté, à gauche en haut les hydroxydes, à gauche en bas les ligands organiques (acides aminés), en haut à droite la liaison aux anions inorganiques, en bas à droite avec les substances humiques, ainsi que les constantes d'affinité entre chaque ligand et l'ion libre. Adapté de Pelletier *et al.* (2004).

Parmi ces espèces chimiques, c'est la fraction libre du métal (M<sup>2+</sup>) qui est celle qui prédit le mieux la bioaccumulation et les effets toxiques (Modèle de l'Ion Libre; MIL ; Morel 1983; Campbell 1995). Il existe des exceptions au modèle qui sont mentionnées dans l'ouvrage de Campbell (1995). Il est important de noter qu'aucune espèce n'est plus biodisponible qu'une autre, mais que dans un système à l'équilibre, l'ion libre reflète la réactivité chimique du métal et celle-ci détermine l'activité qu'il aura sur les membranes biologiques et ainsi, sa biodisponibilité (Morel 1983; Campbell 1995).

La matière organique dissoute (MOD) est souvent le ligand principal qui lie les métaux traces dans les eaux douces du Bouclier Canadien. Elle est la cause de l'aspect brunâtre de certains plans d'eau (Figure 1.5.) et est formée par la décomposition d'organismes morts provenant du lac (autochtone) ou du bassin versant (allochtone).



**Figure 1.5. :** Photo de l'eau brunâtre (en raison de la matière organique) du lac Bousquet près de Rouyn-Noranda, QC.

La MOD est composée de substances humiques (SH) qui sont de larges molécules constituées de groupements fonctionnels (-COOH et –OH, phénolique ou alcool) connus comme participants à la complexation des métaux (Gamble et Schnitzer 1973). Les substances humiques sont des complexants de caractéristiques hétérogènes, polyfonctionnelles et ubiquistes dans les eaux douces (Mandal *et al.* 1999a, 1999b). Il est possible d'estimer les concentrations de SH dans l'eau en mesurant les concentrations de carbone organique dissous ([COD]) puisque les SH contiennent environ 50 % de carbone (Buffle 1988; Ritchie et Perdue 2003; Belzile *et al.* 1997). Les SH peuvent être divisées en deux classes de molécules, les acides humiques (AH) et les acides fulviques (AF) et le rapport AF:AH est estimé à environ 9:1 selon Thurman (1985) et de 3 :1, selon Ritchie et Perdue (2003).

D'autres molécules ou éléments chimiques dissous qui peuvent lier les métaux traces sont plutôt inorganiques et incluent, par exemple, les chlorures (Cl<sup>-</sup>), les carbonates  $(CO_3^{2^-})$  et les hydroxydes (OH<sup>-</sup>).

La liaison plus ou moins forte d'un métal  $(M^+)$  avec un ligand (L) dépend de l'affinité de l'un pour l'autre et s'exprime ainsi,

$$M^{z+} + L \stackrel{^{\Lambda_{ML}}}{\leftrightarrow} ML \tag{1.1}$$

Donc pour les ions libres d'un métal  $(\mathcal{M}^+)$  et un ligand (L) en solution, il y aura un équilibre thermodynamique entre les réactifs  $(\mathcal{M}^+ \text{ et } L)$  et le produit de liaison  $(\mathcal{M}L)$  qui peut être quantifié par une constante d'équilibre  $(K_{\mathcal{M}L})$ . La concentration de métal lié au ligand  $([\mathcal{M}L])$  dépendra donc de trois choses : la constante  $K_{\mathcal{M}L}$ , la  $[\mathcal{M}^+]$  et la [L], laquelle peut être exprimée selon l'équation suivante :

$$[ML] = K_{ML} * [M^{z+}] * [L]$$
(1.2)

Si les constantes d'affinité ( $K_{ML}$ ) pour chaque métal avec chaque ligand (inorganique et organique) sont connues, il est possible d'estimer la spéciation chimique des métaux à l'aide de logiciels d'équilibre chimique thermodynamique. Des logiciels de spéciation chimique, comme le Windermere Humic Aqueous Model (WHAM) ou MINTEQ (US EPA), incorporent l'ensemble de ces constantes (Modèle VI de Tipping (1998) seulement pour WHAM) afin de connaître les concentrations des espèces chimiques de chaque métal d'un plan d'eau en question. L'utilisation de tels modèles doit être faite avec précaution étant donné que plus d'une configuration des paramètres est possible (voir section 2.3). Les mesures physicochimiques de l'eau les plus précises et complètes que possible doivent être insérées dans le logiciel afin de refléter la réalité chimique de l'eau. Les principaux constituants dissous dans l'eau que l'on doit mesurer sont les cations majeurs (Al, Ca, Fe, K, Mg, Na), les métaux traces (Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn), les anions (Cl, NO<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub>) le carbone organique (COD) et le carbone inorganique (CID). Il faut noter que les valeurs employées pour le rapport des AF aux AH (par ex. 9:1 ou 3 :1) sont assez arbitraires et la valeur dans une région donnée peut varier dans l'espace (par ex. entre bassins versants) et dans le temps (par ex. avant et après une coupe forestière). Chaque année, de nouvelles recherches s'effectuent dans le but d'ajuster les constantes d'équilibre de liaison des constituants chimiques de l'eau et ainsi améliorer les logiciels de spéciation chimique.

## 1.3.2. Compétition des métaux avec les cations

La compétition entre différents types d'ion aux sites de prise en charge biologiques peut influencer la bioaccumulation des métaux traces, comme illustrée à la Figure 1.6.



**Figure 1.6.** : Schéma de la relation entre l'ion libre d'un métal ( $M^{z^+}$ ) et les organismes d'une chaîne alimentaire. L'ion libre peut se lier à des ligands et dans ce cas, seulement l'algue et le consommateur primaire peuvent obtenir le métal par la voie aqueuse avec possibilité de compétition avec d'autres cations aux sites de prise en charge biologiques. Dans cet exemple, l'herbivore (*Daphnia* sp.) et le prédateur (*Chaoborus*) peuvent obtenir le métal par leur nourriture. Les flèches des organismes vers l'ion libre représentent la perte physiologique de métal. Adapté de Munger et Hare (1997).

Le type de compétition le plus connu est celui où les ions majeurs compétitifs (par ex. Ca, Mg) ont un rayon ionique similaire au métal et qu'ils entrent dans les cellules par les mêmes transporteurs ioniques sur les membranes biologiques. Dans le cas du Ni, le magnésium (Mg) est l'ion le plus semblable chimiquement (Oxtoby et Nachtrieb 1996) et est celui qui démontre le plus d'effet (Pane *et al.* 2003; Deleebeeck *et al.* 2007, 2008, 2009) comme compétiteur. Pour les poissons exposés au Cu, c'est le sodium dans l'eau et la nourriture qui semble être le compétiteur majeur pour un site de prise en charge commun (Pyle *et al.* 2003). Plusieurs autres interactions compétitives, parfois indirectes, entre ions sont connues et peuvent diminuer l'entrée de métaux toxiques chez les organismes. Il a été démontré par plusieurs chercheurs que le Ca, le Mn et le Zn (Mn et Zn : à moindres mesures) diminuent l'accumulation ou la toxicité du Cd (Töpperwien *et al.* 2007; Tan et Wang 2008). Par contre, dans une trentaine de lacs du Bouclier Canadien, Hare et Tessier (1998) ont démontré que le seul compétiteur d'importance du Cd est l'ion hydrogène (H<sup>+</sup>). Cette compétition ne pouvait être due à la spécificité de l'organisme (*Chaoborus*) car l'entrée de Cd provient seulement de sa nourriture (Munger et Hare 1997; Munger *et al.* 1999) et l'effet de compétition entre les ions H<sup>+</sup> et Cd<sup>2+</sup> se déroule donc à un niveau plus bas de la chaîne alimentaire, au niveau des algues et du zooplancton (Orvoine *et al.* 2006).

Effectivement, les ions hydrogène ( $H^+$ ) peuvent diminuer l'accumulation et la réponse biologique de certains métaux traces (Cd, Cu, Zn : Campbell et Stokes 1985 et le Ni : Deleebeeck *et al.* 2007, 2008, 2009; Cusimano *et al.* 1986). Cette interaction est possible pour des sites de liaison sur des ligands inorganiques et des ligands organiques (vivants et non-vivants). Par contre, ce type de « compétition » avec les ions hydrogènes ( $H^+$ ), tout comme certains autres phénomènes de compétition (par ex. avec le Ca<sup>2+</sup> et le Mg<sup>2+</sup>) semblent, dans certains cas, être de nature différente que la compétition entre deux ions semblables. Une théorie laisse plutôt croire à un changement du potentiel électrique de la membrane biologique (devenant plus positive) lorsqu'il y a augmentation des concentrations de cations, ce qui diminuerait l'interaction du métal avec la membrane

biologique (Kinraide 2006). Ce phénomène serait dépendant des cations et irait en ce sens :  $Al^{3+} > H^+ > Cu^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Na^+ > K^+$ .

#### 1.4. Métaux dans les sédiments et leur biodisponibilité

Les sédiments peuvent être le site de déposition ultime des métaux traces introduits dans l'environnement aquatique (Belzile et Morris 1995). Par contre, l'activité des invertébrés fouisseurs peuvent contribuer à mobiliser et redistribuer les métaux traces sédimentaires (Gosselin et Hare 2003) et de plus, être une source de contamination pour les animaux s'y nourrissant, comme les poissons.



**Figure 1.7.:** Représentation schématique des processus biogéochimiques importants dans l'eau et les sédiments. Les compartiments du lac sont encadrés et les processus accompagnés de flèche. Adaptée de Belzile et Morris (1995).

Plusieurs processus entraînent les métaux vers les sédiments (Figure 1.7.). Les métaux traces peuvent être **ab**sorbés par le plancton ou **ad**sorbés sur les organismes morts ou vivants; ces particules organiques, qui ont une forte capacité de liaison, sédimentent ensuite pour atteindre le fond et permet aux métaux de rester au fond (Sigg *et al.* 1987; Belzile et Morris 1995). L'**ad**sorption des métaux traces aux particules inorganiques (p. ex., oxydes de fer et de manganèse) et la subséquente sédimentation de ces particules fait aussi descendre les métaux de la colonne d'eau vers les sédiments. Si les sédiments de l'interface eau-sédiment sont oxygénés, les métaux traces ont tendance à rester associés aux oxyhydroxides de fer et de manganèse. Si l'hypolimnion devient anoxique, les métaux traces peuvent se dissocier de ces phases sédimentaires et diffuser ensuite vers la colonne d'eau. Ceci ne dure guère, car à la rencontre d'oxygène plus haut dans la colonne d'eau, le Fe et le Mn s'oxydent de nouveau pour précipiter et entraîner les métaux vers le fond (Belzile et Morris 1995).

Le souffre peut jouer aussi un rôle important dans la dynamique des éléments traces sédimentaires. Dans un sédiment riche en sulfure et faible en oxygène, la précipitation des sulfures de métaux sera importante et limitera la solubilité de plusieurs éléments traces (Carignan et Nriagu 1985). Ceci arrive, car les sulfates  $(SO_4^{2-})$  sont rapidement réduits dans les sédiments anoxiques pour former en partie des sulfures d'hydrogène (H<sub>2</sub>S et HS<sup>-</sup>) qui peuvent être libérés sous forme de gaz hautement réactif (Stumm et Morgan 1981). Les sulfures d'hydrogène réagissent rapidement pour précipiter sous forme de sulfures de métaux divers (Belzile et Morris 1995). La dynamique du souffre avec les métaux traces est d'ailleurs la base du modèle dénommé *Acid Volatile Sulfide* (SEM-AVS) qui tente de prédire la biodisponibilité des métaux des sédiments et

qui est largement utilisé aux États-Unis, mais non sans controverse (Campbell *et al.* 2006). Puisque les métaux dans les sédiments ne sont pas sujets primaires à ce mémoire, je n'aborderai pas le sujet plus en profondeur.

## 1.5. Bioaccumulation des métaux traces

#### 1.5.1. Cinétique d'échange des métaux traces

Si on considère un animal comme un compartiment unique, la variation de ses concentrations en métaux traces ( $[M]_{animal}$ ; nmol g<sup>-1</sup> poids sec (PS)) en fonction du temps  $(d[M]_{animal}/dt)$  peut être décrite par l'équation suivante (Thomann 1981),

$$\frac{d[M]_{animal}}{dt} = k_{uw}[M^{z+}] + EA \cdot TI \cdot [M]_{nourriture} - k_e[M]_{animal} - k_g[M]_{animal}$$
(1.3)  
(entrée par l'eau) (entrée par nourriture) (perte physiologique) (perte par la croissance)

où l'entrée d'un métal par l'eau se quantifie par la constante de taux de prise en charge par l'eau  $k_{uw}$  (L g<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) et par la concentration de l'ion libre dans l'eau ([M<sup>z+</sup>]; nmol L<sup>-1</sup>). La prise en charge par la nourriture est la multiplication de l'efficacité d'assimilation (EA; g M retenu g<sup>-1</sup> M ingéré; PS), du taux d'ingestion (TI; g de nourriture g<sup>-1</sup> de poids corporel; PS) et de la concentration de métal dans la nourriture ([M]<sub>nourriture</sub>; nmol g<sup>-1</sup> PS). La perte physiologique d'un métal dépend de la constante de taux de perte  $k_e$  (j<sup>-1</sup>) et de la concentration dans l'animal ([M<sub>animal</sub>]). La dilution par la croissance dépend aussi de la [M<sub>animal</sub>] et de  $k_g$  (j<sup>-1</sup>) qui est la constante de taux de croissance. Si un animal a une croissance rapide, il est possible que la [M] diminue parce que la prise en charge n'est pas assez rapide, de là l'importance de considérer cette variable.

#### 1.5.2. Accumulation de métaux par la nourriture

Comme le décrit l'équation 1.3, la quantité de métal accumulée par la nourriture dépend de trois facteurs : la [M] dans la nourriture, le taux d'ingestion (TI) et l'efficacité d'assimilation (EA). L'efficacité d'assimilation (EA) dépend de la physiologie de l'animal en question et en partie de la distribution subcellulaire du métal dans la nourriture qui réfère au compartiment où se trouve le métal dans les cellules.

L'étude de Reinfelder et Fisher (1994) a démontré que pour une larve d'huître et un copépode (Crassostrea virginica et Mercenaria mercenaria, respectivement), l'efficacité d'assimilation (EA) pour neuf éléments était en relation directe (rapport 1 : 1) avec la proportion de ces éléments présente dans le cytosol d'une algue (Zsochrysis gulbana). Plusieurs autres études ont ensuite démontré que la proportion de métal présent dans les fractions trophiquement disponibles du cytosol (TAM : Trophically Available Metal), correspondait directement (rapport 1 :1) avec la proportion de métal assimilé par le consommateur (Wallace et Luoma 2003). Ces fractions correspondent aux organelles, aux protéines stables à la chaleur (par ex. la métallothionéine; MT) et aux protéines se dénaturants à la chaleur (c.-à-d. les enzymes). Cela a été démontré avec succès pour une variété d'invertébrés (Wallace et Luoma 2003: Dubois et Hare 2009a, b; Dumas et Hare 2008; Ng et al. 2007), mais la corrélation directement proportionnelle entre l'EA et les fractions TAM a échoué plus d'une fois dans le cas des poissons (Goto et Wallace 2009a, b; Steen-Redecker et al. 2007; Seebaugh et al. 2005; Ng et Wood 2008; Zhang et Wang 2006; Lapointe et al. 2009; Lapointe et Couture 2009). Ces dernières études ont démontré que malgré la grande proportion de Cd (40 à 90%) et de Ni (50 et 84%; Daphnia magna et Tubifex tubifex respectivement; Lapointe et al. 2009) dans les fractions protéiniques des proies, seulement 0,9 à 19% du Cd et 10% du Ni (Lapointe et al. 2009) ont été assimilés par les différentes espèces de poisson. L'étude récente de Goto et Wallace (2009a) indique que le Cd dans les proies est bien disponible lors de la digestion (vérifié en soumettant les proies aux fluides intestinaux des poissons), mais que c'est au niveau des cellules de transport de la paroi intestinale que l'entrée est régulée. Donc, les poissons, contrairement aux invertébrés, ont un système digestif apparament plus complexe qui semble être plus spécifique (Goto and Wallace 2009a).

#### **1.6. Biomoniteurs**

Récolter de l'eau et des sédiments afin de mesurer leurs concentrations en métaux traces n'indique pas nécessairement la proportion de ces contaminants qui peut potentiellement entrer dans les organismes vivants (notion de biodisponibilité; section 1.3.). Face à ce problème, certains chercheurs ont choisi de mesurer la contamination métallique à l'intérieur des organismes, c'est-à-dire les employer comme biomoniteurs, au lieu de mesurer la contamination de leur milieu.

Les biomoniteurs facilitent grandement l'évaluation du risque environnemental des métaux traces (Phillips et Rainbow 1993). Ils sont généralement des organismes **tolérants** aux contaminants, ubiquistes, abondants, faciles à récolter et qui accumulent les métaux traces. Une autre propriété importante d'un bon biomoniteur est son identification facile, puisque des différences d'accumulation interspécifiques sont souvent observées (Martin *et al.* 2008, Croteau *et al.* 2001) et peuvent entraîner beaucoup de variabilité dans les résultats. Tous ces avantages permettent aux évaluateurs du risque environnemental d'effectuer leur tâche avec beaucoup plus de simplicité.

Les mesures de [M] chez les biomoniteurs sont intégratrices des variables faisant varier la biodisponibilité. De plus, cette [M] incorpore les métaux venant de l'eau et de la nourriture. Selon le milieu ou le compartiment aquatique étudié (océan, rivière, lac, sédiments), les biomoniteurs choisis seront variables. Par exemple en milieu marin côtier,

15

les bivalves comme *Mytilus* spp. ou *Perna* spp. (Luoma and Rainbow, 2008; O'Connor 1996; Golberg *et al.* 1978, 1983) sont beaucoup utilisés, en milieu estuarien ce seront plutôt les palourdes (p. ex. Tellinidae), dans les eaux douces courantes, les trichoptères (*Hydropsyche*; Luoma and Rainbow 2008), en eau douce lacustre la perchaude (*Perca flavescens*; Campbell *et al.* 2003) et la larve de la mouche fantôme *Chaoborus* (Hare *et al.* 2008).

#### 1.7. Toxicité des métaux

#### 1.7.1. Protection cellulaire contre les métaux

La toxicité peut être déterminée par des tests de toxicologie classique, mais ces études ne correspondent pas toujours à ce qui se passe en nature. Entre autres, l'exposition par la nourriture, la spéciation chimique et les concentrations de métaux utilisées ne sont pas représentatives. Il est donc important de trouver des indices de toxicité en nature, autres que la mortalité.

La distribution subcellulaire permet de protéger les cellules des effets délétères des métaux. Ainsi, des populations seront plus tolérantes à la contamination métallique grâce à leur capacité de séquestration (Perceval *et al.* 2004; Buchwalter *et al.* 2007; Campbell *et al.* 2006). Un des processus qui permet la séquestration subcellulaire et par conséquent protège les constituants cellulaires sensibles est la synthèse de molécules ayant une affinité élevée pour les métaux. La métallothionéine (MT) est un exemple de protéine de faible poids moléculaire (6000-10000 Da), contenant des cystéines (30 %; Buhler et Kägi 1974) et un grand nombre de groupements thiols (-SH; Cherian et Goyer 1978). Ces groupements fixent les métaux par liaison mercaptide qui implique le remplacement d'un groupement cystéine ou thiol par le métal (Cherian et Goyer 1978;

Kojima et Kägi 1978). La synthèse de MT peut être activée dans plusieurs organes (chez les mammifères; Phipps *et al.* 2002) et l'est, plus ou moins, selon les métaux présents. Le Cd, le Cu et le Zn semblent induire fortement la synthèse de MT (Campbell *et al.* 2006), mais le Ni, quant à lui, a été qualifié comme un faible inducteur de synthèse de MT (Campbell *et al.* 2006; Niebor *et al.* 1988; Tabata et Sarka. 1992; Alikhan et Zia 1989). Les granules sont aussi responsables d'une liaison importante de métaux dans les cellules, mais ne sont pas de nature protéinique et ne participent pas au transfert de métaux d'un maillon à l'autre de la chaîne alimentaire.



**Figure 1.8. :** Granules de phosphate de calcium dans une cellule à calcium d'une limace. La barre représente 0,5 µm. Tirée de Marigomez *et al.* (2002).

Ces deux derniers compartiments cellulaires (MT et granule) sont des sites dits « non sensibles » car ils ne participent pas à des fonctions physiologiques importantes. Lorsque les métaux se retrouvent dans d'autres fractions (lors d'un débordement ou « spill-over ») comme vers les organelles ou vers d'autres enzymes sensibles, une toxicité peut s'en suivre. Ce débordement est commun lors d'études de laboratoire ou de transplantation (Couillard *et al.* 1995; Baudrimont *et al.* 1999) mais des études récentes (Campbell *et al.* 2003; Perceval *et al.* 2004) ont démontré qu'en milieu naturel chez des organismes autochtones, le débordement cellulaire ne se fait pas et que les [M] dans chaque fraction augmentent de façon proportionnelle au niveau de contamination. Ce résultat est une indication qu'il existe une limite à l'utilisation du débordement subcellulaire en tant qu'indice de toxicité pour les fractions sensibles et indique que d'autres biomarqueurs sont nécessaires afin de réellement observer un effet.

## 1.7.2. Biomarqueurs

Les biomarqueurs sont généralement à un niveau d'organisation biologique plus bas que l'individu (cellulaire, biochimique, tissulaire) et sont importants afin de mesurer les effets des contaminants. Afin d'observer une telle réponse, il est préférable de récolter un biomoniteur en nature et d'effectuer les analyses du biomarqueur ciblé au laboratoire.

Un dommage à l'ADN est un exemple de biomarqueur qui peut être mesuré au niveau d'organisation le plus bas de l'organisme. Ces dommages peuvent causer ultimement des tumeurs. Les protéines, comme la MT, peuvent être mesurées afin de connaître l'exposition relative, mais leurs présences n'impliquent pas nécessairement d'effet toxique. Au niveau des organelles, la stabilité membranaire des lysosomes, leur nombre ou leur taille peuvent être des indices de toxicité. Du point de vue histopathologique, les tissus anormaux comme les branchies, le foie et les gonades peuvent être des indices de toxicité importants qui peuvent mener, par exemple, à un fonctionnement anormal de la sécrétion d'hormone (par ex. cortisol) et entrainer un changement dans le comportement de l'organisme (Luoma et Rainbow 2008; Campbell *et al.* 2003).

18
L'utilisation des biomarqueurs liée à l'utilisation des biomoniteurs est une solution efficace afin de lier l'accumulation et l'effet. Un excellent exemple d'une synthèse d'études sur les effets des métaux chez la perchaude dans les écosystèmes lacustres en région minière est celle de Campbell *et al.* (2003). Elle mentionne que des effets directs et indirects ont été observés chez la perchaude (le biomoniteur) tels une diminution de la capacité à sécréter du cortisol et de l'hormone thyroïdienne T4 et T3 chez les poissons adultes, l'absence de perchaudes âgées, une malformation des organes et une efficacité de croissance perturbée par l'absence de macrozoobenthos, empêchant un bon changement de type de proie pendant la croissance.

### 1.7.3. Bioindicateurs

Il est important de faire la distinction entre biomoniteur (*voir 1.6.*) et bioindicateur. Les bioindicateurs sont des organismes **sensibles** qui sont présents, absents ou affectés selon le niveau de contamination. Un exemple est celui dénommé l'approche EPT, qui réfère à trois ordres d'insectes : les Éphémères, les Plécoptères, et les Trichoptères. Ces taxons sont généralement présents dans les eaux courantes peu contaminées et donc leur faible abondance peut être indicatrice de la contamination métallique. Par contre, ils peuvent être absents pour d'autres raisons que la contamination; il se peut qu'ils aient émergé, ou que le substrat ne soit pas adéquat pour eux.

#### 1.8. Régions minières de Rouyn-Noranda et Sudbury

À Rouyn-Noranda, au Québec, malgré que le Cu soit le métal exploité dans cette région, c'est le Cd qui est le principal métal causant une pollution des lacs (la pollution implique des effets néfastes contrairement à la contamination qui indique la présence des métaux traces à concentrations élevées; Borgmann *et al.* 2004). Le Cd est un des sous-produits de

19

l'exploitation minière qui ne peut être exploité dans cette région, car il est trop faible en concentration dans le minerai. Hare et ses collaborateurs (Hare *et al.* 2008) ont longtemps étudié le Cd dans les lacs de la région de Rouyn-Noranda et ont utilisé la larve de l'insecte *Chaoborus* afin de classifier les lacs selon la contamination et la biodisponibilité du Cd. Ils ne l'ont pas fait pour le Cu et Zn car cet animal régule très bien ses concentrations internes de ces deux métaux essentiels même à des concentrations très différentes dans l'eau (trois ordres de grandeur).

Dans la région de Sudbury, aux alentours des années 1880, le nickel a commencé à être exploité. La principale cause de la richesse du minerai dans cette région est un impact météoritique il y a environ 1,85 milliards d'années. Les mines sont d'ailleurs installées sur le contour de ce qu'on appelle le « Sudbury Basin » (Figure 1.9.)



**Figure 1.9. :** Localisation et géologie générale du « Sudbury Basin ». Tirée de Gunn (1995).

La situation s'est grandement améliorée dans cette région, mais la contamination est toujours présente. Certains métaux (Cd, Co, Cu, Ni) sont toujours présents à des concentrations élevées dans les lacs de cette région. Mais quel métal est celui qui cause les effets toxiques? Afin de connaître le métal causant un effet toxique à Sudbury, Borgmann *et al.* (2001) ont exposé *Hyalella azteca* en laboratoire (un organisme relativement sensible), à de l'eau et des sédiments de certains lacs de cette région et ont mesuré plusieurs métaux susceptibles de causer des effets toxiques. Le seul métal s'étant accumulé suffisamment chez *H. azteca* pour provoquer des effets toxiques fut le Ni. C'est ainsi qu'ils en sont venus à la conclusion que le Ni est le métal causant les effets toxiques à Sudbury. Cette étude peut être critiquée puisqu'ils ont modifié la stabilité des sédiments en les déplaçant et parce que la nourriture offerte à *H. azteca* n'était pas naturelle, mais les conclusions sont tout de même convaincantes.

Cette même étude nous a permis de constater que le Ni est **le** métal d'intérêt environnemental à Sudbury et puisqu'aucun biomoniteur de contamination en Ni n'a été élaboré, nous nous sommes demandés si la larve de la mouche fantôme *Chaoborus* pourrait être une candidate afin de classifier les lacs de Sudbury selon les [Ni] dans cet insecte.

#### 1.9. Chaoborus comme biomoniteur en lac

La mouche fantôme *Chaoborus* (Figure 1.10.) fait partie de l'ordre des diptères et de la famille des Chaoboridae, qui est très proche de la famille des moustiques (Culicidé). Il est possible d'observer d'impressionnants essaims au-dessus des lacs; l'adulte est généralement identifiable à sa couleur blanchâtre. Sous forme de larve, il vit dans les lacs et les étangs où il passe de un mois (Hare et Carter 1987) à deux années (Carter et Kwik 1977), selon le climat.



**Figure 1.10. :** Trois stades majeurs de *Chaoborus* : la larve (en haut), la pupe (à droite) et l'adulte (à gauche). Source inconnue.

Selon l'espèce, la larve de *Chaoborus* peut mesurer jusqu'à 2 cm de longueur et est un prédateur pélagique se nourrissant de plancton (copépodes, cladocères, etc.). Généralement, pendant les mois productifs de l'année, selon l'espèce et selon la présence de prédateurs, elle se cache dans les sédiments durant le jour et va se nourrir pendant la nuit. Les larves sont donc faciles à récolter le jour avec une benne et la nuit avec un filet à plancton. *Chaoborus* est très abondant, de bonne taille, il a une répartition géographique autour du globe et est très résistant aux eaux acides (généralement présentes dans les régions minières) et aux concentrations de métaux traces élevées. De plus, il est facilement identifiable au niveau de l'espèce. Ces caractéristiques font de *Chaoborus* un biomoniteur potentiel très pratique et efficace. Avant de considérer son utilisation comme biomoniteur, attardons-nous au métal d'intérêt.

### 1.10. Nickel

## 1.10.1. Caractéristiques du nickel

Le nickel porte le numéro atomique 28, a un poids atomique de 58,69 g et est à concentration naturelle de 1,2  $\mu$ mol g<sup>-1</sup> dans la croûte terrestre, ce qui lui donne le 24<sup>e</sup> rang des éléments en abondance (Chau et Kulikovsky-Cordeiro 1995). Dans sa forme élémentaire, le nickel est un métal arborant une couleur blanc argenté, ce qui lui a d'ailleurs valu d'être souvent confondu avec l'argent. Il fait partie des métaux de transition, c'est-à-dire qu'il possède un mélange des propriétés des métaux ferreux et non ferreux. Bien qu'il puisse présenter sous de nombreux états d'oxydation, l'espèce couramment retrouvée dans la nature est le Ni<sup>2+</sup> (Nieboer *et al.* 1988).

Environ 65% du nickel provenant de la production primaire sert à la fabrication de l'acier inoxydable. Les propriétés du nickel confèrent à l'acier inoxydable une plus grande résistance à la corrosion, une ductilité accrue et augmente la durabilité du matériau. Les principaux produits retrouvés sur le marché nord-américain, faits à partir d'acier inoxydable sont : les appareils électroménagers; l'équipement d'industries de transformation, dont celles de la chimie, du pétrole, du nucléaire et de l'agroalimentaire; les moyens de transport comme l'automobile; et le secteur de la construction. Le nickel entre également dans la composition des superalliages (présentant des combinaisons de métaux complexes) utilisés dans l'industrie aéronautique et spatiale. Il sert aussi, dans une moindre proportion, à la fabrication des piles rechargeables et de la monnaie (Nriagu 1980).

Les sources anthropiques aériennes de Ni sont importantes et principalement sous forme d'aérosol provenant de l'activité minière, de la combustion du mazout et de

23

l'incinération des déchets (Jaques 1987). Seulement pour les fonderies, les émissions atmosphériques de nickel pour l'année 2002 constituaient 54 % des émissions totales de ce métal (Nriagu 1980). La forme de Ni sur les particules d'aérosol varie selon l'origine, ainsi les émissions provenant de la combustion d'huile et de charbon rejettent le Ni sous forme de sulfates et de monoxydes de Ni (Henry et Knapp 1980) et les émissions de l'extraction minière et de la fonte du minerai émettent des sulfates de Ni, des disulfures de trinickel et des monoxydes de Ni (Gilman et Ruckerbauer 1962).

Les concentrations totales de Ni dissous dans les systèmes aquatiques non perturbés près de Sudbury sont d'environ 15 à 170 nmol L<sup>-1</sup> (Cooperative Freshwater Ecology Unit, Laurentian University; Pyle *et al.* 2005) tandis qu'à Rouyn-Noranda, à environ 400 km de Sudbury, le Ni n'est pas abondant dans le minerai et les [Ni] sont d'environ 10 à 27 nmol L<sup>-1</sup> dans les lacs (n = 5, lacs exposés à la fonderie et références; Guthrie *et al.* 2005; voir Tableau 2.2., page 39). Le lac Crooked est un des plus contaminés de Sudbury et en 1998, sa concentration totale dissoute de Ni était de 5000 nmol L<sup>-1</sup> (Croteau *et al.* 1998) et en 2007, de 2100 nmol L<sup>-1</sup> (Tableau 2.2.).

#### 1.10.2. Biodisponibilité du nickel dans l'eau douce

Plusieurs études s'entendent sur une cinétique de complexation lente du Ni avec la matière organique en milieu naturel (Xue *et al.* 2001; Guthrie *et al.* 2003). De façon générale, la cinétique réactionnelle du Ni est lente en raison de la configuration électronique de ces électrons de valence. Cette caractéristique s'illustre par un  $k_{-w}$  faible. Cette constante décrit la perte d'une molécule d'eau dans la sphère d'hydratation du métal (Stumm et Morgan 1981).

Lorsque les concentrations de Ni dissous sont faibles (4 à 30 nM), la complexation du Ni avec la matière organique est de forte affinité (log K 12.1-14.9; Xue *et al.* 2001) et lorsque le rapport Ni/COD augmente et devient représentatif d'une région contaminée, la majorité du Ni est libre et une proportion du Ni lié est labile pour la prise en charge par les organismes (Doig et Liber 2007; Unsworth *et al.* 2006).

La fraction AH complexe plus de Ni que la fraction AF pour un même rapport Ni/COD (Doig et Liber 2007; Guthrie *et al.* 2003). De plus, les AH complexent le Ni de manière plus forte et le relâchent plus lentement que les AF. La structure chimique des deux formes de SH semble plus en cause que le nombre de sites de fixation; c'est-à-dire que la probabilité qu'il y ait un groupement carboxyle et un groupement phénolique près l'un de l'autre sur les anneaux aromatiques des AH est plus grande que sur les AF, ce qui entraînerait une complexation plus forte (ex : chélation; Guthrie *et al.* 2003). Malgré cela, les études de Van Laer *et al.* (2006) mentionnent qu'en utilisant le logiciel WHAM 6 modèle VI (Tipping 1998), au lieu d'un rapport AF:AH de 9:1, il serait plus convenable que le rapport soit de 4:0 ignorant ainsi la liaison du Ni avec les AH et augmentant l'affinité du Ni avec les AF (K<sub>Ni-AF</sub> à 1,75).

Le logiciel WHAM semble prédire adéquatement le pourcentage de changement de  $[Ni^{2+}]$  selon la concentration d'AF lorsque les concentrations de métal ou de COD ne sont pas trop basses (Unsworth *et al.* 2006; Doig et Liber 2007). Le logiciel semble sous-estimer la complexation avec les AH (Doig et Liber 2007) comparativement à d'autres logiciels de spéciation (Unsworth *et al.* 2006).

Les AF « bien caractérisés » comprennent de 90 à 99 % de sites à liaison faible et de 1 à 10 % de sites à liaison forte et que lorsqu'il y a présence de  $Co^{2+}$ , de  $Cu^{2+}$ , de

25

Mg<sup>2+</sup>, de Ca<sup>2+</sup> ou de Zn<sup>2+</sup> en excès (Mandal 2002, 1999a, b), ceux-ci occuperont tous les sites de liaison forte sur les AF parce qu'ils ont une affinité plus grande que le Ni pour ceux-ci. Les liaisons sur les sites de faibles affinités semblent être considérés labiles, car le Ni peut s'en dissocier facilement. Ainsi, des ligands biologiques de haute affinité pourront prendre en charge ce Ni complexé, labile. Donc, une eau riche en éléments traces diminuera la liaison de Ni à la matière organique dissoute et augmentera la proportion d'ions libres; mais mentionnons tout de même que cette compétition peut aussi avoir lieu pour la prise en charge chez les organismes.

# 1.10.3. Compétiteurs du nickel dans l'eau pour l'entrée dans les organismes

Comme mentionnés précédemment, les phénomènes de compétition sont possibles tant sur la matière organique que sur les membranes biologiques (Fig. 1.6). L'étude de Pane *et al.* (2003) a tenté d'élucider quel était le mécanisme de compétition entre le Ni et le Mg chez *Daphnia magna*, un crustacé planctonique. Les concentrations internes de Mg chez *Daphnia magna* ont diminué de 18 % lors des expositions aiguës au Ni (12 µmol L<sup>-1</sup>, 48 heures) et chroniques (14 jours, 2 µmol L<sup>-1</sup>) et le taux d'entrée unidirectionnel du Mg a diminué de 49 et 47 %, respectivement. L'homéostasie du sodium, du potassium et du calcium est restée inchangée, n'indiquant aucun effet du Ni sur l'ionorégulation de ces éléments. Le Ni agirait donc comme un antagoniste du Mg à l'entrée dans les cellules ou comme inhibiteur du transport de Mg. Ceci n'est pas surprenant puisque ces deux éléments sont chimiquement similaires, possédant un rayon ionique déshydraté de 0,066 nm (Ni<sup>2+</sup>) et de 0,069 nm (Mg<sup>2+</sup>) (Oxtoby et Nachtrieb, 1996). Les études de Deleebeeck *et al.* (2007, 2008, 2009) ont démontré ce phénomène de compétition pour trois organismes aquatiques très différents : l'algue verte *Pseudikirchneriella subcapitata*, le cladocère *Daphnia magna* et la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*. En plus de la compétition avec le  $Mg^{2+}$ , ils ont démontré un effet compétitif, à moindre mesure, entre les ions H<sup>+</sup> et Ni<sup>2+</sup>. L'étude de Schubauer-Berigan *et al.* (1993) a démontré que la toxicité du Ni est plus faible à pH 6,3 qu'à un pH de 8,3 pour quatre organismes aquatiques : *Ceriodaphnia dubia, Pimephales promelas, Hyalella azteca* et *Lumbriculus variegatus.* À pH près de la neutralité, des modélisations d'équilibre chimique indiquent que l'hydrolyse du Ni (NiOH<sup>+</sup>) est peu importante (Mandal *et al.* 2002), mais la proportion de NiCO<sub>3</sub>, quant à elle, peut être assez élevée et devrait, selon certains auteurs, être considérée comme biodisponible (Hoang *et al.* 2004). Par contre, si cette dernière espèce chimique est biodisponible, cela constituerait une exception au modèle de l'ion libre. À faible pH, l'espèce ionique (Ni<sup>2+</sup>) sera prédominante, mais les ions H<sup>+</sup> sont bien connus pour leur effet compétitif.

## 1.10.4. Caractère essentiel du nickel

Il a été démontré que le Ni est un métal trace nutritionnel essentiel pour plusieurs organismes terrestres (oiseaux, mammifères, plantes), pour des bactéries (Denkaus et Salnikow 2002; Phipps *et al.* 2002), des plantes et des algues aquatiques (Muyssen *et al.* 2004). Chez les plantes et les cyanobactéries, c'est la fonction de deux métalloenzymes, l'uréase et l'hydrogénase, entre autres, qui nécessite le Ni, ce qui indique bien son caractère essentiel. Chez les animaux, il a été démontré qu'une déficience en nickel cause des effets divers, mais le rôle physiologique précis du Ni est toujours au stade hypothétique avec quelques indications de mécanismes (Spears 1999). Une métalloprotéine a été découverte dans le plasma animal, la nickeloplasmine, une glycoprotéine qui servirait de ligand intracellulaire, de transport extracellulaire,

d'excrétion urinaire et biliaire. Il a été démontré que le Ni n'induit que faiblement la synthèse de métallothionéine dans les reins et le foie humain et chez l'écrevisse et la perchaude (Niebor *et al.* 1988; Tabata et Sarkar 1992; Alikhan et Zia 1989; Campbell *et al.* 2003), ce qui indique probablement l'existence d'un autre mode de transport d'importance.

## 1.10.5. Biodynamique du nickel

Le poisson Tête-de-Boule (Pimephales promelas) obtient son Ni en parts égales de l'eau et de la nourriture (Lapointe et Couture 2009). Dans le cas du cladocère vedette D. magna, les études de Watras et al. (1985) et de Komjarova et Blust (2009) ont démontré qu'il obtient son Ni de l'eau et que les algues contaminées (Scenedesmus obliquus et *Pseudokirneriella subcapitata*, respectivement) ne sont pas une source importante de Ni. Les efficacités d'assimilation (EA) de Ni de deux copépodes marins (Calanus sinicus et Labidocera euchaeta) se nourrissant des algues Prorocentrum donghiense et Skeletonema costatum varient de 10 à 17 % (Wang et al. 2007). Dans le cas de la palourde, Gafrarium tumidum, et des huîtres tropicales, Isognomon isognomon et Malleus regula, qui se nourrissent de phytoplancton, elles ont des EA de 61 et 17 %, respectivement (Hédoin et al. 2007). Une étude récente de Croteau et Luoma (2009) avec le gastéropode, Lymnaea stagnalis, rapporte une EA moyenne de 78 % et une constante de perte  $(k_e)$  de Ni de 0,17 d<sup>-1</sup>. Le Ni transféré de deux proies benthiques (*Chironomus riparius* et *Tubifex tubifex*) à un prédateur benthique, Sialis velata, dépendait de la localisation du Ni dans les cellules des proies. Ainsi, la proportion de Ni située dans les fractions protéiniques était directement proportionnelle (1:1) avec l'efficacité d'assimilation (60 à 80%) du prédateur (Dumas et Hare 2008), mais chez le poisson Tête-de-Boule (Pimephales promelas),

l'efficacité d'assimilation est faible (10%) même si le Ni chez deux proies, *D. magna et T. tubifex*, est principalement situé dans les fractions trophiquement biodisponible (Lapointe *et al.* 2009).

### 1.11. Conclusion et objectifs d'étude

Les métaux sont partie intégrante de notre biosphère et se concentrent à certains endroits de la croûte terrestre. Les industries minières les concentrent plus encore pour que d'autres en fassent des produits de consommation. Ces processus impliquent des pertes qui se retrouvent dans l'environnement. Dans l'eau, les métaux traces peuvent être libres ou associés aux ligands organiques et inorganiques. Selon les concentrations de métaux et les processus biogéochimiques, les êtres vivants pourront les accumuler et être ainsi affectés de façon négative. Selon l'étude de Borgmann *et al.* (2001), c'est le Ni qui est responsable des effets toxiques dans les lacs près des raffineries situées à Sudbury, mais aucun biomoniteur n'est connu pour classer ces lacs selon leurs concentrations en Ni biodisponibles.

Les larves de l'insecte *Chaoborus* se sont montrées efficaces comme biomoniteur de Cd dans les eaux lacustres. Le <u>premier objectif</u> de cette étude est donc de déterminer si les larves de *Chaoborus* peuvent également servir comme biomoniteur de contamination en Ni dans l'eau des lacs. Le <u>deuxième objectif</u> est d'estimer les proportions relatives du Ni chez *Chaoborus* qui provient de ces proies et de l'eau ambiante. Le troisième objectif est de mesurer et modéliser la dynamique des échanges de Ni entre *Chaoborus* et son environnement afin de prédire les [Ni] chez les larves en nature.

29



# DEUXIÈME CHAPITRE - UTILISATION DE LA MOUCHE FANTÔME Chaoborus comme biomoniteur de contamination en nickel dans LES LACS

Afin de guider mes lecteurs vers une histoire suivant une lignée logique et agréable, j'ai rédigé les deux prochains chapitres sous formes succinctes, non standards et selon mon cheminement vécu pendant ces trois années de maîtrise. Lorsque les détails manqueront pour satisfaire votre intérêt, je vous suggère maintenant de consulter à votre aise les deux articles scientifiques présentés à la fin de cet ouvrage. Le premier article et ce chapitre porte sur l'utilisation de la larve de la mouche fantôme *Chaoborus* comme biomoniteur de contamination en Ni dans les lacs de la région de Sudbury.

## 2.1. Échantillonnage, Méthodes et Analyses

Nous avons récolté des larves de *Chaoborus* dans 13 lacs de la région de Sudbury et deux lacs près de Rouyn-Noranda (Figure 2.1.; coordonnées géographiques : Tableau 2.2.; p.39). Nous les avons échantillonnés pendant la nuit à l'aide d'un filet à plancton et le jour dans les sédiments, avec une benne Ekman. Les *Chaoborus* ont été maintenus dans l'eau du lac, dans des sacs de plastique, dans une glacière conservée froide (avec *ice pack*) et ensuite à 4°C pendant environ 8 heures jusqu'au tri des espèces. Les *Chaoborus* de stade 4 (Carter et Kwik, 1977) ont été identifiés au niveau de l'espèce (Saether, 1972; Tableau 2.2.), apposées (5 à 12 par échantillon) sur une feuille de type Teflon préalablement lavée à l'acide nitrique (qualité Omni Trace; 15% v/v) et rincée sept fois avec de l'eau ultra pure (> 18 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>). Le tout était inséré dans un tube à centrifugation Eppendorf (1,5 mL), aussi lavé à l'acide et rincé sept fois. Lorsque le nombre le

permettait, nous effectuions 5 à 8 échantillons qui étaient ensuite congelés (-20 °C) pour les futures analyses.



**Figure 2.1. :** Localisation des lacs de la région de Sudbury échantillonnés en 2007 et 2009 (Chief et Swan) ainsi que le positionnement de la fonderie Vale Inco. Image satellite tirée de Goolge Earth.

Sur le lac, après avoir trouvé un nombre suffisant de *Chaoborus*, nous installions des dialyseurs (Croteau *et al.* 1998) dans la colonne d'eau à l'aide du dispositif photographié à la Figure 2.2. Les dialyseurs étaient situés à un mètre de profondeur et permettent d'échantillonner l'eau pendant une période de trois jours durant laquelle il se crée un équilibre par diffusion entre les constituants dissous de l'eau du lac et ceux à l'intérieur des compartiments (8 x 4 mL) du dialyseur. Ces derniers sont préalablement remplis d'eau ultra pure et séparés de l'eau du lac par une membrane en polysulfone de 0,2 µm.



**Figure 2.2.:** Montage des dialyseurs comprenant une brique, une corde, trois dialyseurs, un fil à pêche et finalement un flotteur.

Après trois jours, les dialyseurs étaient retirés du lac et des sous-échantillons étaient prélevés immédiatement pour les éventuelles analyses et estimations de spéciation chimique (WHAM 6 ; modèle VI : Tipping 1998). Les anions (SO<sub>4</sub>, Cl, NO<sub>3</sub>) ont été analysés par chromatographie ionique (Dionex, système ICS-2000; colonne AS-18), les cations majeurs par plasma inductif couplé à spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES; Varian Vista AX CCD), les métaux traces par ICP à spectromètre de masse (MS; Thermo Elemental X Series), le carbone organique par transformation en CO<sub>2</sub> (Shimadzu TOC-5000A) et le carbone inorganique par chromatographie en phase gazeuse (Varian 3800 avec injection CombiPal et colonne CP-PoraPLOT). Pour tous les détails des concentrations des constituants chimiques de l'eau des 15 lacs, consulter le Tableau 6 en Annexe.

Les larves de *Chaoborus* ont été séchées à froid avec un lyophilisateur, pesées et digérées avec de l'acide nitrique (qualité Omni Trace; 100  $\mu$ L mg<sup>-1</sup> tissu) pendant 2 jours, du peroxyde d'hydrogène (30% v/v; 40  $\mu$ L mg<sup>-1</sup> tissu) pendant une journée et le volume a été complété à 1 mL mg<sup>-1</sup> tissu avec de l'eau ultra pure. Un matériel de référence (hépatopancréas de homard; TORT-2; Conseil National de Recherche du Canada) a été soumis au même protocole de digestion. Les organismes digérés et le matériel de référence ont ensuite été analysés à l'ICP-MS. Le Ni et le Cd ont été mesurés et ce dernier a servi à titre comparatif entre les concentrations de Cd chez *Chaoborus* mesurées auparavant (1987, 1997) et celles de 2007 (Tableau 2.1.). De plus, les valeurs récentes permettent de renforcer le modèle préétabli (Hare et Tessier 1996, 1998) et de vérifier si la méthode de modélisation utilisée était adéquate.

### 2.2. Validation et comparaison du modèle pour le cadmium

Le Tableau 2.1. indique une augmentation des [Cd] chez *C. punctipennis* de certains lacs (Crooked, Clearwater, Tilton et Raft). L'augmentation des [Cd] chez *C. punctipennis* des lacs Crooked et Clearwater semblent être due à une augmentation des valeurs de pH,

tandis que pour les autres lacs (Tilton et Raft), le pH ne paraît pas être la cause, ni les [Cd] de l'eau. Les [Cd] de *Chaoborus* du lac Mc Farlane ont diminué de façon importante et doivent être la conséquence d'une diminution des [Cd] dans l'eau.

Une progression des pH vers la neutralité depuis les deux dernières décennies a été très remarquable (Keller 2009) et l'augmentation des [Cd] de *Chaoborus* relative à ce changement de pH à d'ailleurs été observée et modélisée par Croteau *et al.* (2002).Effectivement, il existe une relation compétitive entre les ions Cd<sup>2+</sup> et H<sup>+</sup> chez la larve de *Chaoborus* (Hare et Tessier, 1996,1998; Croteau *et al.* 1998; Orvoine *et al.* 2006) et lorsque l'eau des lacs était plus acide, *Chaoborus* et probablement d'autres organismes accumulaient moins de Cd que dans d'autres lacs présentant les mêmes [Cd<sup>2+</sup>], mais à pH plus neutre. Par contre, il ne faut pas croire qu'il est favorable que les lacs soient acides, car plusieurs organismes (Ephemeroptera, bivalves et poissons) ne peuvent survivre aux basses valeurs de pH et de plus, l'acidité mobilise les éléments et augmente les concentrations de métaux dans l'eau.

**TABLEAU 2.1.** : Concentrations de Cd (nmol g<sup>-1</sup>) de *Chaoborus punctipennis* et *Chaoborus albatus* (Lac Pine; 2007) échantillonnés dans différents lacs en 2007 (cette étude) et auparavant (données transmises de L. Hare, INRS-ETE, Québec) ainsi que le pH et les concentrations estimées de l'ion libre de Cd (nmol L<sup>-1</sup>).\* : [Cd] totale dissoute.

Lac	Année	pН	[Cd <sup>2+</sup> ] (nmol L <sup>-1</sup> )	[Cd] C. punctipennis (n mol g <sup>-1</sup> )
	1993	4,5	6,29	12
Crooked	2000	5,8	1,84	71
	2007	6,4	1,44	120
	1987	4,8	2,67	36
Clearwater	2000	6,3	1,13	45
	2007	6,2	1,29	87
Crowley	1993	5,8	1,82	116
	1997	6,9	0,66	98
	2007	6,3	0,51	99
Tilton	1987	5,9	1,00	69
	1997	6,6	0,94	68
	2007	6,6	0,45	85
	1992	6,9	0,66	43
Marlon	1999	7,2	0,32	44
	2007	7,1	0,35	32
Pine	1998	4,3	1,75	35
	2007	4,7	2,54	25
Ma Forlar	1987	7,4	0,42*	113
ivic Fallalle	2007	7,8	0,12	33
Paft	1987	6,7	1,63*	40
Nati	2007	6,8	0,51	86

\* [Cd] totales dissoutes

La Figure 2.3. présente les [Cd] (nmol g<sup>-1</sup>) de *Chaoborus punctipennis* des 11 lacs échantillonnés en 2007 en fonction de la [Cd] totale dissoute dans l'eau (panneau A), de la concentration estiméee de l'ion libre de Cd ([Cd<sup>2+</sup>]; panneau B) et en fonction du modèle (Hare et Tessier 1996, 1998; panneau C) tenant compte de la compétition entre le Cd libre et les ions hydrogènes aux sites de prise en charge biologiques. Les résultats démontrent que le modèle préétabli fonctionne toujours. Selon ces résultats, il est essentiel d'estimer les concentrations de l'ion libre et de vérifier s'il existe des compétiteurs afin de bien prédire la bioaccumulation du Cd chez *Chaoborus*.



**Figure 2.3.**: Concentrations de cadmium de *Chaoborus* (*Sayomia*) *punctipennis* et *Chaoborus* (*Sayomia*) *albatus* (nmol  $g^{-1}$ ;  $\pm$  ET; n = 5-8) en fonction des concentrations de Cd totales (panneau A; nmol  $L^{-1}$ ;  $\pm$  ET), des concentrations de l'ion libre de Cd (Cd<sup>2+</sup>; panneau B; nmol  $L^{-1}$ ;  $\pm$  écart-type (ET)) et en fonction de l'ion libre corrigé pour l'effet compétiteur des ions H<sup>+</sup> aux sites de prise en charge biologiques (décrites par l'équation de Hare et Tessier 1996; panneau C). Les valeurs ( $\pm$  erreur-type (ES)) de la pente (F<sub>H</sub>) et de l'intersection avec l'axe des y de la régression dans le panneau C sont 90  $\pm$  30 µmol g<sup>-1</sup> (p = 0,01) et 15  $\pm$  13 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0,27), respectivement. La valeur de K<sub>a</sub> est de 433  $\pm$  215 nmol L<sup>-1</sup> (estimée par analyse des moindres carrés; p = 0,07).

La Figure 2.4. présente le modèle avec les données tirées de Hare et Tessier (1996; panneau A) et la combinaison des résultats de notre étude (panneau C; Figure 2.3.) et des résultats de Hare et Tessier (1996; Figure 2.4.; panneau B). En ajoutant les récents résultats, le  $r^2$  passe de 0,86 à 0,68.



Figure 2.4.: Concentrations de cadmium chez Chaoborus  $g^{-1}$ ) (Sayomia) punctipennis (nmol en fonction des concentrations de l'ion libre corrigées pour l'effet compétiteur des ions H<sup>+</sup> aux sites biologiques de prise en charge (Modèle de Hare et Tessier 1996, 1998). Données tirées de Hare et Tessier (1996; panneau A) et les résultats du panneau A et du panneau C (Figure 2.3.) combinés (panneau B). Les valeurs (± ES) de la pente (F<sub>H</sub> dans l'équation de Hare et Tessier 1996) et de l'intersection avec l'axe des y de la régression dans le panneau B sont  $152 \pm 37 \ \mu \text{mol g}^{-1}$  (p < 0,001) et  $6 \pm 5 \ \text{nmol g}^{-1}$ (p = 0,68), respectivement. La valeur de K<sub>a</sub> (± ES) est 1182 ± 379 nmol L<sup>-1</sup> (estimée par analyse des moindres carrés; p =0,004) et est similaire à celle du panneau A (1874  $\pm$  416 nmol  $L^{-1}$ ).

Lac	Localisation	Chimie de l'eau					[Ni] des larves de Chaoborus			
		pН	[COD] (mg L <sup>-1</sup> )	[Mg] (µM)	[Ca] (µM)	[Ni] (µM)	<i>C. punctipennis</i> (nmol g <sup>-1</sup> )	<i>C. albatus</i> (nmol g <sup>-1</sup> )	<i>C. flavicans</i> (nmol g <sup>-1</sup> )	<i>C. americanus</i> (nmol g <sup>-1</sup> )
Bibby	46°22'N, 80°58'W	6,8	4,4	45	69	0,99	$20,8\pm1,9$		$19,6 \pm 3,2$	
Chief	46°21'N, 81°01'W	5,6	2,1	22	40	1,16	$17,7 \pm 7,0$			
Clearwater	46°22'N, 81°03'W	6,2	2,4	43	109	1,12	$29,4 \pm 2,2$			
Crooked	46°22'N, 81°02'W	6,4	3,7	48	71	2,11	$50,0\pm7,5$		$31,9 \pm 8,4$	
Crowley	46°23'N, 80°59'W	6,3	3,2	31	58	0,87	$25{,}3\pm5{,}3$			
Hannah	46°26'N, 81°02'W	7,4	3,7	151	265	2,11	$49{,}4\pm5{,}0$			
Laurentian	46°27'N, 80°56'W	6,7	4,5	63	105	0,72		$9,0\pm1,8$		
Marlon	48°16'N, 79°04'W	7,1	8,4	58	160	0,01	$0,\!03\pm0,\!7*$	$1,5 \pm 1,0*$		
McFarlane	46°25'N, 80°57'W	7,8	4,2	209	401	0,89	$25,1 \pm 2,5$		$28,9 \pm 3,5$	
Opasatica	48°08'N, 79°20'W	7,5	5,7	115	213	0,01	$0,6 \pm 0,5*$		$0,3 \pm 0,4*$	
Pine	46°22'N, 81°02'W	4,7	0,9	17	33	1,68		$15,3 \pm 1,8$		$9,5 \pm 4,4$
Raft	46°24'N, 80°57'W	6,8	2,4	45	81	1,05	$27,7 \pm 3,3$		$32,9 \pm 9,3$	
Silver	46°22'N, 81°03'W	5,9	2,7	117	194	1,59	$38,1 \pm 4,7$		$21,2 \pm 2,8$	
Swan	46°21'N, 81°03'W	5,9	2,1	22	71	1,10	$32,8 \pm 4,7$			$11,9 \pm 4,7$
Tilton	46°22'N, 81°04'W	6,6	2,3	40	89	0,68	$16,1 \pm 5,6$		$15,3 \pm 3,7$	
Max./min.		433 <sup>#</sup>	9,3	12,3	12,2	211	58,8 <sup>&amp;</sup>	18,0*	38,7*	1,3*

**TABLEAU 2.2.**: Coordonnées géographiques, données physicochimiques de l'eau et moyennes ( $\pm$  ET, n = 3-8) des concentrations de nickel des quatre espèces de *Chaoborus* (nmol g<sup>-1</sup> poids sec) de 15 lacs situés près de deux fonderies canadiennes.

\* en dessous de la limite de détection calculée de 1,7 nmol  $g^{-1}$ . # calculé selon les [H<sup>+</sup>].

<sup>&</sup> pour les valeurs sous la limite de détection, nous avons utilisé une [Ni] de 0.85 nmol g<sup>-1</sup>

#### 2.3. Nickel dans *Chaoborus* et sa relation avec le nickel dans l'eau des lacs

Le Tableau 2.2. présente les [Ni] chez les quatre espèces de *Chaoborus* retrouvées. Contrairement au Cu et au Zn (Hare et Tessier, 1998), les [Ni] de *Chaoborus* varient de façon significative (p < 0,05) entre les lacs, ce qui est un pré-requis pour son utilisation comme biomoniteur. Les larves de *Chaoborus* vivant dans des lacs dont les concentrations de Cu et de Zn varient de trois ordres de grandeur peuvent maintenir leur concentration totale de Cu et de Zn stable (Hare et Tessier, 1998). L'essentialité de ces deux métaux est bien connue et celle du Ni a été démontré pour plusieurs plantes et animaux, mais pour les invertébrés, aucune étude n'en fait cas jusqu'à maintenant (Phipps, 2002).

Les [Ni] dans l'eau varient aussi entre les lacs (Tableau 2.2.) et nous avons tenté d'observer si elles étaient liées avec les [Ni] chez *Chaoborus*. Ces dernières sont présentées en fonction des concentrations totales dissoutes de Ni (Figure 2.5.; panneau A) et en fonction des concentrations de l'ion libre (panneau B). Selon le modèle de l'ion libre, la corrélation avec les [Ni<sup>2+</sup>] (panneau B) devrait être supérieure à celle obtenue avec les [Ni] totales dissoutes (panneau A).



**Figure 2.5.** : Concentrations de nickel chez *Chaoborus (Sayomia) punctipennis* et *Chaoborus (Sayomia) albatus* (nmol g<sup>-1</sup>; ± ET; n = 5-8) en fonction des concentrations de Ni totales (panneau A; µmol L<sup>-1</sup>; ± ET), des concentrations de l'ion libre de Ni (panneau B; µmol L<sup>-1</sup>; ± ET) et en fonction de l'ion libre corrigé pour l'effet compétiteur des ions H<sup>+</sup> aux sites de prise en charge biologiques (décrites par l'équation 2.1; panneau C). Les valeurs (± ES) de la pente (F<sub>H</sub> dans l'équation 2.1) et de l'intersection avec l'axe des *y* de la régression dans le panneau C sont 229 ± 69 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0,005) et 0,8 ± 2,0 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0,7), respectivement. La valeur de K<sub>a</sub> est 6,08 ± 1,99 µmol L<sup>-1</sup> (estimée par analyse des moindres carrés; p = 0,009).

Nous avons émis l'hypothèse que les calculs de spéciation soient erronés, car nous avions effectué une modification aux constantes de liaison entre les métaux et les ligands inorganiques selon une source de données thermodynamique fiable (Martell *et al.* 2004; base de données fournie par C. Fortin, INRS-ETE). La complexation du Ni avec les bicarbonates et les carbonates a été le principal effet de ces changements. Nous avons estimé de nouveau les  $[Ni^{2+}]$  avec les changements suggérés par Van Laer *et al.* (2006), c'est-à-dire qu'au lieu d'utiliser une proportion AF: AH de 9:1, nous avons remplacé la répartition des SH par celle de 4:0 ignorant les AH comme ligand et augmentant la valeur de la constante d'affinité (K<sub>Ni-AF</sub>) entre le Ni et les AF à 1,75 (Base de données fournie par P.G.C. Campbell, INRS-ETE). Ce changement n'a pas amélioré la corrélation entre l'ion libre et les [Ni] de *Chaoborus (r<sup>2</sup>* passant de 0,62 à 0,53).

Le fait que les [Ni] totales dissoutes prédisent si bien les concentrations de [Ni] chez *Chaoborus* est principalement expliqué par la forte proportion (57 à 90%) de Ni libre dans l'eau des lacs de Sudbury et parce que les [Ni] totales et les [Ni] libres sont hautement corrélées ( $r^2 = 0,94$ ; corrélation non présentée). Étant donné que le lac Pine est très acide (pH 4.7), il se distingue de façon importante par rapport aux autres lacs selon les [Ni<sup>2+</sup>]; ceci est la principale raison de la baisse de la valeur du r<sup>2</sup> entre le panneau A et B de la Figure 2.5.

Étant donné les basses [Ni] chez les *Chaoborus* provenant du lac Pine comparativement aux concentrations élevées de Ni<sup>2+</sup> dans l'eau, nous avons soupçonné une compétition avec les ions H<sup>+</sup> dans ce lac acide. Le même phénomène, mais de façon plus subtile peut être observé pour le lac Chief. Ces deux lacs sont les plus acides (pH  $\leq$ 5,6) de tous les lacs échantillonnés et un effet protecteur des ions H<sup>+</sup> avait déjà été rapporté pour le Cd dans des lacs de pH < 5,5 (Croteau *et al.*, 1998). Nous avons donc utilisé le modèle de Hare et Tessier (1996, 1998) afin de tenir compte de ce compétiteur potentiel. Le modèle appliqué au Ni va comme suit :

$$[Ni]_{Chaoborus} = F_{H} \frac{[Ni^{2+}]}{[H^{+}] + K_{a}}$$
(2.1)

où F<sub>H</sub> est une constante de proportionnalité et K<sub>a</sub> une constante d'équilibre (spécifique au Ni) entre l'affinité des ions H<sup>+</sup> et les transporteurs membranaires. Cette dernière est estimée selon la méthode des moindres carrés et la valeur est présentée dans la légende de la Figure 2.5. Après avoir appliqué le modèle aux données (panneau C), la corrélation s'est beaucoup améliorée ( $r^2 = 0.93$ ; p < 0.001), ce qui démontre l'applicabilité de ce modèle et l'intérêt d'employer Chaoborus comme biomoniteur de Ni dans les eaux lacustres. Nous avons aussi tenté d'expliquer le phénomène de compétition selon l'hypothèse que d'autres ions pourraient être compétiteurs pour l'accumulation de Ni. Selon la méthode employée par Croteau et al. (1998), d'autres cations (Ca<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, etc.) ont été soumis au modèle comme compétiteurs potentiels et seulement le Cu<sup>2+</sup> améliorait la corrélation de façon comparable, mais elle ne s'est pas améliorée autant qu'en utilisant les ions  $H^+$  ( $r^2$  de 0,78 au lieu de 0,93; corrélation non présentée). Même si une étude récente (Komjarova et Blust, 2008) suggère que les [Ni] de l'invertébré aquatique Daphnia magna diminue faiblement (de 7 %) lorsque les concentrations de Cu dissous augmentent d'un facteur 10, ces résultats sont difficilement interprétables, car la spéciation chimique n'a pas été considérée et parce que les [Ni] étaient extrêmement élevées (100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> ou ~50 fois celles du lac le plus contaminé de notre étude).

# 2.4. Compétition entre les ions H<sup>+</sup> et Ni<sup>2+</sup> au laboratoire

Afin de confirmer que les ions H<sup>+</sup> étaient bien responsables de la moindre accumulation dans les lacs Pine et Chief, nous avons vérifié cette hypothèse en laboratoire en exposant *Chaoborus punctipennis* sans nourriture, dans un milieu Bristol à une  $[Ni^{2+}]$  de 1600 nmol L<sup>-1</sup> (calculée à l'aide de MINEQL+) maintenue constante à différents pH de 5,2 à 7,2. Les autres [M] traces libres (Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) ont aussi été contrôlées afin qu'elles restent stables en variant le pH (milieu Bristol : Tableau 3.). Cette concentration de Ni libre est comparable de celle du lac Pine (1512 nmol L<sup>-1</sup>) où le pH est de 4,7. Les [Ni] de *Chaoborus albatus* de ce lac sont aussi présentées à titre comparatif dans la Figure 2.6.



**Figure 2.6.**: Concentrations de Ni (nmol g<sup>-1</sup>;  $\pm$  ET; symboles ouverts) chez *Chaoborus punctipennis* exposé à 1600 nM de Ni<sup>2+</sup> à différents pH. Le cercle noir est la concentration de Ni chez *C. albatus* provenant du lac Pine ([Ni<sup>2+</sup>] = 1512 nM; pH 4,7). Les lettres différentes représentent des différences significatives (p < 0,05; ANOVA suivi d'un test en paire de Tukey). Les carrés sont les prédictions du modèle (équation 2.1).

Comme il est possible de le remarquer, *C. punctipennis* accumule plus de Ni à pH élevé (traitements 6,6 et 7,2). À partir du traitement à pH 6,2 jusqu'au plus bas pH 5,2, les larves accumulent la même concentration de Ni (p > 0,05) et celles-ci sont similaires à celles observées chez *Chaoborus albatus* du lac Pine (cercle noir). Cette expérience au laboratoire démontre clairement qu'il existe une interaction compétitive entre les ions H<sup>+</sup> et Ni<sup>2+</sup> aux sites de prise en charge du Ni chez *Chaoborus*. Les études de Deleebeeck *et al.* (2007, 2008, 2009) ont démontré un effet de compétition entre les ions Ni<sup>2+</sup> et les ions H<sup>+</sup> pour trois niveaux trophiques aquatiques, l'algue *Pseudikirchneriella subcapitata* (2009), le cladocère *Daphnia magna* (2008) et la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (2007).

Le modèle (équation 2.1) a été testé avec les données de cette expérience au laboratoire afin de vérifier s'il peut prédire les concentrations de Ni chez *Chaoborus* à différents pH. Le modèle surestime à faible pH et sous-estime à pH plus neutre. L'effet compétitif des ions  $H^+$  semble être présent à partir d'un pH seuil, entre 6,0 et 6,5. À pH de 6,5, le modèle prédit bien l'accumulation et à pH 7, le modèle représente plus ce qui se passe en nature. C'est-à-dire qu'à Sudbury, les lacs les plus contaminés, Crooked et Hannah, ont des [Ni<sup>2+</sup>] dans l'eau de 1480 et 1344 nmol L<sup>-1</sup> et les *Chaoborus* accumulent 50 nmol de Ni g<sup>-1</sup>, ce qui est deux fois plus que l'accumulation au laboratoire pour une [Ni<sup>2+</sup>] semblable (1600 nmol L<sup>-1</sup>). Par contre, le modèle prédit l'accumulation d'environ 50 nmol g<sup>-1</sup>. Je crois qu'un problème lié à la spéciation du Ni avec les carbonates a causé cette accumulation élevée à pH 7. Puisque plus de 80% du Ni total dissous est lié aux carbonates, une différence de 4% dans la liaison, peut faire doubler la concentration de l'ion libre à ce pH.

#### 2.5. Modèle pour les quatre espèces

Le modèle (équation 2.1) a été vérifié avec les 4 espèces (Tableau 2.2.) retrouvées (Figure 2.7.). Nous avons effectué la moyenne des [Ni] de tous les échantillons de *Chaoborus* d'un même lac. Donc, les espèces plus abondantes ont plus d'importance sur cette moyenne (car plus d'échantillons) et cela en soi est logique et valable. Ces résultats indiquent qu'il n'est pas nécessaire de distinguer les espèces afin d'évaluer la contamination avec le modèle. Cela enlève de la précision aux estimés mais rend la tâche plus simple encore.



**Figure 2.7.** : Concentrations moyennes de nickel (nmol g<sup>-1</sup>;  $\pm$  ET; n = 5-8) chez *Chaoborus albatus, Chaoborus americanus, Chaoborus flavicans* et *Chaoborus punctipennis* des différents lacs de Sudbury en fonction de l'ion libre du Ni corrigé pour l'effet compétiteur des ions H<sup>+</sup> aux sites de prise en charge biologiques (décrites par l'équation 2.1). Les valeurs ( $\pm$  ES) de la pente (F<sub>H</sub> dans l'équation 2.1) et de l'intersection avec l'axe *y* de la régression sont 125  $\pm$  39 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0,006) et 2,2  $\pm$  2,0 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0,3), respectivement. La valeur de K<sub>a</sub> est 3,4  $\pm$  1,2 µmol L<sup>-1</sup> (estimé par analyse des moindres carrés; p = 0,013).

#### 2.6. Conclusion

En conclusion, le modèle permet à un gestionnaire du risque environnemental d'utiliser des mesures du Ni chez les larves de *Chaoborus* afin d'estimer le niveau de contamination en Ni et de connaître la concentration de l'ion libre d'un lac (si le pH est mesuré) et ainsi connaître l'exposition des autres organismes de ce même lac. Ces estimations de la contamination des eaux lacustres en Ni, évaluées grâce à *Chaoborus*, s'ajoutent à celles pour le Cd. Il est certainement possible que ce biomoniteur soit utile pour d'autres métaux traces ayant un intérêt environnemental. Un point intéressant, mais non mentionné jusqu'à maintenant, est le fait que même si les concentrations molaires de Ni<sup>2+</sup> sont de trois ordres de grandeur (1000 fois) plus élevés que celles de Cd<sup>2+</sup> dans l'eau, *Chaoborus* accumule seulement 1,5 fois plus de Cd que de Ni. Ce genre de question et le fait que *Chaoborus* prend leur Cd seulement de la nourriture nous incite à nous demander par quelle voie *Chaoborus* accumule le Ni, par l'eau ou la nourriture. À partir de cette question est venue la deuxième investigation de cette étude qui s'est entièrement faite au laboratoire afin de connaître la biodynamique du Ni chez *Chaoborus*.

# TROISIÈME CHAPITRE - DYNAMIQUE DU NICKEL CHEZ LE BIOMONITEUR CHAOBORUS FLAVICANS

Les concentrations en métaux d'un organisme récolté dans un lac ne reflètent pas quelle proportion du métal provient de l'eau ou de sa nourriture. Il est important de connaître les sources de contamination afin de pouvoir développer des critères de qualité des écosystèmes aquatiques basés sur les métaux présents dans l'eau ou présents dans la nourriture des organismes. Des expériences précises en laboratoire ou en nature peuvent nous démontrer l'importance de chacune de ces voies d'entrée. Cette section portera sur la méthodologie, les résultats et la discussion de la mesure des entrées (par l'eau et la nourriture) et de la sortie de Ni chez *Chaoborus flavicans*. Les détails sont donnés dans le deuxième article de ce mémoire.

## 3.1. Chaîne trophique expérimentale et le milieu artificiel

La chaîne trophique expérimentale était constituée de l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*, du cladocère *Daphnia magna* (organismes offerts par le MDDEP afin de débuter les cultures) et de la larve du diptère *Chaoborus flavicans* récolté au lac Bédard (47°16'N, 71°07'W; lac présentant des [M] traces faibles). La croissance des algues a été effectuée à l'aide du milieu de culture Bristol et l'élevage des daphnies était effectué dans une eau reconstituée simple avec l'ajout de micronutriments essentiels (Elendt et Bias 1990). La spéciation chimique du milieu Bristol a été calculée à l'aide du logiciel MINEQL+ (version 4.5, 1998, Environmental Research Software, ME) afin de connaître les concentrations de l'ion libre de Ni ([Ni<sup>2+</sup>]) lors de l'exposition des trois niveaux

trophiques. Le Tableau 3 présente les concentrations des micronutriments libres et les

concentrations totales de macronutriments.

**TABLEAU 3. :** Concentrations totales de macronutriments et concentrations libres des micronutriments (calculées avec MINEQL+) dans le milieu de culture Bristol modifié utilisé pour toutes les expositions au nickel. Le tampon métallique EDTA (concentrations variables) et le tampon à pH MOPS (10 mM) étaient aussi présents dans le milieu.

Macronutriment	Concentration (total dissous; mol L <sup>-1</sup> )	Micronutriment	Concentration (ion libre; mol L <sup>-1</sup> )
В	9,2×10 <sup>-5</sup>	Co <sup>2+</sup>	1×10 <sup>-12</sup>
Ca	4,7×10 <sup>-4</sup>	$Cu^{2+}$	$1 \times 10^{-13}$
Cl	2,5×10 <sup>-3</sup>	Fe <sup>3+</sup>	$1 \times 10^{-19}$
$CO_3$	2,0×10 <sup>-4</sup>	$Mn^{2+}$	$1 \times 10^{-09}$
K	1,3×10 <sup>-3</sup>	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	$1 \times 10^{-07}$
Mg	2,1×10 <sup>-4</sup>	$Zn^{2+}$	$1 \times 10^{-10}$
Na	1,6×10 <sup>-3</sup>		
NO <sub>3</sub>	1,5×10 <sup>-3</sup>		
$PO_4$	7,0×10 <sup>-9</sup>		
$SO_4$	3,7×10 <sup>-4</sup>		

#### 3.2. Croissance de l'algue Pseudokirchneriella subcapitata en présence de nickel

Les algues étaient mises en croissance à 50 nmol L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup> libre pendant une semaine et celles-ci servaient de nourriture pour les cladocères. Un pH de 7 était maintenu constant avec le tampon MOPS (10 mM) et le tampon à métaux EDTA (concentrations variables selon les besoins) a permis d'éviter la prise en charge de tout le métal par les algues. Cette concentration de Ni<sup>2+</sup> libre a été choisie relativement à la sensibilité de *P. subcapitata* au Ni. La Figure 3.1. présente les courbes de croissance de l'algue à différentes [Ni<sup>2+</sup>]. Nous avons aussi observé la croissance de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* et elle s'est avérée 100 fois plus résistante au Ni que *P. subcapitata* (données

non présentées). Bien que le Ni a été démontré comme un métal essentiel pour plusieurs types d'algue, il semble toxique pour *P. subcapitata* à de très faibles concentrations.



**Figure 3.1.:** Densité (Ln (cellules mL<sup>-1</sup>); n = 3) de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* en croissance à différentes concentrations de nickel libres ([Ni<sup>2+</sup>]) pendant 5 jours.

Les densités plus élevées lors du dénombrement à 24 heures représentent, ce que je crois être, une quantité importante d'algues mortes non détectées lors du dénombrement de 40 heures (car décomposées en plus petites particules). Les résultats démontrent une diminution ( $[Ni^{2+}] > 30$  nmol L<sup>-1</sup>) et même l'absence ( $[Ni^{2+}]$  de 120 et 150 nmol L<sup>-1</sup>) de phases de croissance exponentielles. De plus, la toxicité du Ni a engendré une densité maximale plus faible ( $[Ni^{2+}] > 30$  nmol L<sup>-1</sup>) après cinq jours.

D'après nos résultats, le Ni semble interférer avec la synthèse de chlorophylle, car les algues étaient de couleur beaucoup plus pâle que lorsqu'en présence de Ni ( $[Ni^{2+}] =$  50 nmol L<sup>-1</sup>; Figure 3.2.). Il a d'ailleurs été observé que le Ni<sup>2+</sup> peut substituer le Mg<sup>2+</sup> dans l'anneau porphyrine des molécules de la chlorophylle (Küpper *et al.*, 2006). Un autre effet toxique observé a été le grossissement anormal des cellules (données non présentées) qui reflète un effet toxique lié à la division cellulaire. La concentration de 50 nmol de Ni L<sup>-1</sup> utilisée lors de l'exposition des trois niveaux trophiques est beaucoup plus faible que celles observées à Sudbury (Tableau 6.). Les [Ni] moyennes ( $\pm$  ET ; n = 6) chez *P. subcapitata* en croissance pendant 7 jours à 50 nmol L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup> était de 2137  $\pm$  59 nmol g<sup>-1</sup> poids sec.



**Figure 3.2.:** Photos d'algues exposées à 50 nmol  $L^{-1}$  de nickel libre (à gauche) et sans nickel ajouté (à droite).

## 3.3. Voies d'entrée du nickel chez Daphnia magna

Nous avons exposé *Daphnia magna* (n = 6 par traitement; 15 daphnies par échantillon) au Ni pendant quatre jours selon différentes voies d'accumulation, c'est-à-dire par la nourriture seulement (algue *P. subcapitata* contaminée à 50 nmol de Ni L<sup>-1</sup> donnée en excès) en ajoutant une quantité suffisante d'EDTA dans l'eau afin d'éviter la contamination de l'eau par les algues; deuxièmement par l'eau seulement, donc à 50 nmol de Ni L<sup>-1</sup> sans nourriture; par les deux voies simultanément (algue et eau contaminées) et le quatrième traitement était le témoin (algue et eau sans Ni). Chaque jour, l'eau était renouvelée à 90%. À la fin de l'expérience, les daphnies des trois traitements avec Ni ont été transférées dans l'eau sans Ni avec de la nourriture sans Ni afin de permettre la désorption du métal à la surface de leur corps et de vider leur contenu contaminé du tractus digestif. La Figure 3.3. présente les résultats de cette expérience.



**Figure 3.3.** : Concentrations moyennes de Ni (nmol g<sup>-1</sup>;  $\pm$  ET) chez *Daphnia magna* exposé à quatre traitements pendant 4 jours: témoin (T), nourriture seulement (N; *Pseudokirchneriella subcapitata* contaminée sans Ni dans l'eau), eau seulement (E; pas nourri et Ni dans l'eau) et par l'eau et la nourriture (N et E; Ni dans l'eau et dans les algues). Les lettres différentes représentent des différences significatives (p < 0.05; ANOVA suivit d'un test en paire de Tukey)

Les résultats démontrent que pour *D. magna*, l'entrée de Ni par la nourriture est négligeable et donc, tout le nickel absorbé provient de la voie aqueuse. Cette même conclusion a été établie par Watras *et al.* (1985) et Komjarova et Blust (2009) pour le même cladocère nourri de *Scenedesmus obliquus* et *P. subcapitata*, respectivement. Effectivement, il n'y pas de différence significative (p < 0,05) entre les [Ni] de *D. magna* pour le traitement témoin (T) et le traitement Nourriture (N), malgré la [Ni] élevée dans les algues (2137 ± 59 nmol g<sup>-1</sup>; poids sec). Le fait de mettre des algues dans le traitement Nourriture et Eau (N et E; Figure 3.3.) a fait diminuer l'accumulation de Ni par la daphnie. Cela est probablement dû à la prise en charge ou l'adsorption du Ni par les algues dans le milieu d'exposition des daphnies, entraînant une exposition plus faible par l'eau. Ceci est un artéfact expérimental; les algues auraient dû être rincées plus d'une fois dans un nouveau milieu d'exposition et centrifugées avant d'être données aux daphnies, ainsi elles auraient atteint leur concentration stationnaire de Ni interne.

Une expérience préliminaire (données non présentées) a permis de constater que l'état stationnaire chez *D. magna* est atteint en moins de six heures lorsqu'exposé à 50 nmol L<sup>-1</sup>; donc, pour les besoins de l'expérience de la section suivante, nous avons établi la durée d'exposition à 24 h. Les daphnies juvéniles, exposées 24h à 50 nmol L<sup>-1</sup> de Ni libre (par l'eau et la nourriture) et servant de nourriture à *Chaoborus flavicans* avaient une concentration de Ni de 226  $\pm$  43 nmol g<sup>-1</sup> ( $\pm$  E.T.; *n* = 9), soit 10 fois moins de Ni que celle de l'algue *P. subcapitata*.

## 3.4. Voies d'entrée du nickel chez Chaoborus flavicans

Afin de connaître la proportion de Ni venant des proies de *Chaoborus* (ici *D. magna*) et de l'eau, nous avons exposé *C. flavicans* individuellement à quatre traitements (n = 12 par traitement) pendant 4 jours. Le premier comprenait de la nourriture contaminée, c'està-dire 5 à 10 (selon la disponibilité de la culture) *D. magna* juvéniles contaminés par jour et de l'eau sans Ni (Traitement Nourriture; N), le deuxième était une exposition par l'eau contaminée ( $[Ni^{2+}]$ : 50 nmol L<sup>-1</sup>) sans nourriture (traitement Eau; E), le troisième était une exposition par l'eau et la nourriture contaminées (traitement Eau et Nourriture; NE) et le quatrième était le témoin (T; daphnies et eau sans Ni). Chaque jour, le nombre de daphnies ingérées était dénombré et 90% de l'eau était renouvlée. Pour le cinquième jour,
les *Chaoborus* ont été transférés dans l'eau sans Ni et nourris de daphnies sans Ni afin de leur permettre d'évacuer leur contenu du tractus riche en métal et celui adsorbé sur la surface de leur corps. La Figure 3.4. présente les résultats de cette expérience.



**Figure 3.4.** : Concentrations moyennes de Ni (nmol g<sup>-1</sup>;  $\pm$  E.T.) chez *Chaoborus flavicans* exposé à quatre traitements : témoin (T ; eau et daphnies sans Ni), nourriture seulement (N; *D. magna* contaminé sans Ni dans l'eau), eau seulement (E; pas nourri et Ni dans l'eau) et par l'eau et la nourriture (NE; Ni dans l'eau et dans la nourriture). La dernière colonne représente l'addition mathématique du traitement N et E (N + E). Les lettres différentes représentent des différences significatives (p < 0.05; ANOVA suivit d'un test en paire de Tukey)

Cette expérience démontre qu'environ 1/3 du Ni de *C. flavicans* provient de la nourriture et qu'environ 2/3 est obtenu de l'eau. Qu'une si grande part de Ni provienne de l'eau peut expliquer en partie la forte corrélation entre les [Ni] de l'eau et de *Chaoborus* en nature (Figure 2.5.). Ces résultats sont très différents de l'accumulation de Cd chez *Chaoborus* qui provient exclusivement de la nourriture (Munger et Hare 1997, Munger *et al.* 1999). Dans le cas du poisson Tête de Boule (*Pimephales promelas*), la proportion de Ni venant de la nourriture et de l'eau est similaire (Lapointe et Couture 2009). Comme il

a souvent été démontré, l'accumulation par la nourriture et l'eau est additive (Hare 1992); ceci est confirmé par la dernière colonne (N + E) de la Figure 3.4. qui est l'addition mathématique du traitement Nourriture (N) et du traitement Eau (E). La valeur de la bar d'erreur de cette dernière a été calculée selon le principe de propagation d'erreur.

# 3.5. Détermination des constantes de taux de perte et d'entrée de nickel chez *C.flavicans*

Puisque le Ni de *Chaoborus* provient de la nourriture et de l'eau et que ces deux vecteurs sont additifs, nous pouvons utiliser l'équation suivante (Thomann, 1981; Munger *et al.*, 1999) afin de décrire le taux auquel les concentrations de Ni chez *Chaoborus*  $(d[Ni]_{Chaoborus}/dt)$  changent dans le temps. Celui-ci peut être décrit selon l'équation,

$$\frac{d[\text{Ni}]_{Chaoborus}}{dt} = k_{uw}[\text{Ni}^{2+}] + \text{EA} \cdot \text{IR} \cdot [\text{Ni}]_{\text{proie}} - k_e[\text{Ni}]_{Chaoborus} - k_g[\text{Ni}]_{Chaoborus}$$
(3.1)  
(entrée-eau) (entrée-nourriture) (perte-physio.) (dilution par croissance)

où  $k_{uw}$  (L g<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) est la constante du taux d'entrée par l'eau, [Ni<sup>2+</sup>] est la concentration de l'ion libre dans l'eau, EA (g Ni retenu g<sup>-1</sup> Ni ingéré) est l'efficacité d'assimilation, IR (g proie ingérée poids sec g<sup>-1</sup> *Chaoborus* poids sec j<sup>-1</sup>) est le taux d'ingestion, [Ni]<sub>proie</sub> (nmol g<sup>-1</sup> poids sec) est la concentration de Ni dans la proie,  $k_e$  (j<sup>-1</sup>) et  $k_g$  (j<sup>-1</sup>) sont, la constante du taux de perte et la constante du taux de croissance, respectivement.

Puisque la majorité de l'accumulation de Ni chez *Chaoborus* provient de l'eau, nous avons exposé *C. flavicans* à 300 nmol L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup> pendant 8 jours et récolté quatre échantillons (quatre individus par échantillon) aux jours 1, 2, 4, 6, 8 afin de mesurer l'accumulation temporelle. Après les 8 jours d'exposition, les larves ont été transférées dans l'eau sans Ni afin de mesurer la perte de Ni pendant 8 autres jours (des échantillons ont été prélevés aux jours 9, 10, 12, 14 et 16; Figure 3.5.). Lors du prélèvement d'échantillon, les *Chaoborus* étaient laissés 45 minutes dans un milieu Bristol avec de l'EDTA (0,1 mmol  $L^{-1}$ ) pour enlever le Ni adsorbé à la surface de son corps, et subséquemment 3 secondes dans un milieu Bristol propre avant de les congeler.

Puisque les larves n'étaient pas nourries pendant ces 16 jours, elles ont perdu du poids passant d'une moyenne ( $\pm$  ET; n = 4) de 0,99 ( $\pm$  0,05) à 0,73 ( $\pm$  0,07) mg par individu. Ce phénomène de changement de poids (W) dans le temps (t) peut être décrit par l'équation,

$$W = W^0 e^{k_g t} \tag{3.2}$$

Où W<sup>0</sup> est le poids initial (mg) au début de l'expérience et  $k_g$  est la constante décrivant le taux de perte ( $k_g$  négatif) ou de gain ( $k_g$  positif) de poids. La constante  $k_g$  estimée lors des 16 jours d'expérience a été de -0,023  $\pm$  0,004 j<sup>-1</sup>. Cette valeur n'a pas été utilisée afin d'estimer les [Ni] chez les *Chaoborus* des lacs de Sudbury (section 3.7), car en nature, les animaux mangent et grossissent; une telle croissance peut engendrer une diminution des concentrations de métaux par dilution de masse.

Après les 8 jours d'accumulation, les larves ont été transférées dans l'eau sans Ni afin de mesurer leur perte (Figure 3.5.). Ce phénomène de perte physiologique peut être décrit par l'équation 3.3 suivante,

$$[Ni]_{Chaoborus} = [Ni]_{Chaoborus}^{0e} e^{-(k_g + k_e)t}$$
(3.3)

Où  $[Ni]_{Chaoborus}^{0e}$  est la concentration de Ni de *C. flavicans* initiale au début de l'expérience de perte (jour 8). Le facteur  $(k_g + k_e)$  a été obtenu par une estimation des moindres carrés à partir des points expérimentaux illustrés à la Figure 3.5. et  $k_e$  par une soustraction de la constante  $k_g$  estimée précédemment (équation 3.2). La courbe modélisée est présentée sur la Figure 3.5. (jour 8 à 16; traits courts). La valeur de la

constante de taux de perte  $k_e$  a été de 0,19 ± 0,03 j<sup>-1</sup>, ce qui est similaire à la valeur estimée pour le gastropode *Lymnaea stagnalis* (0.173 ± 0.017 j<sup>-1</sup>; Croteau and Luoma 2009). La valeur obtenue pour le Ni chez *C. flavicans* est élevée comparativement à la valeur de  $k_e$  pour le Cd chez cette espèce (0.004 ± 0.009 j<sup>-1</sup>; Croteau *et al.*, 2001).



**Figure 3.5.** : Changement dans le temps (j) de la moyenne ( $\pm$  ET; n = 4) des concentrations de Ni de *Chaoborus flavicans* exposé à 300 nM de Ni<sup>2+</sup> libre dans le milieu de culture Bristol, sans nourriture, pendant 8 jours (symboles noirs) et ensuite à de l'eau sans Ni pendant 8 autres jours (symboles blancs). Les courbes modélisées pour la prise en charge (longs traits) et la sortie (courts traits) ont été estimées en utilisant l'équation 3.4 et 3.3, respectivement.

Il était nécessaire d'estimer  $k_g$  et  $k_e$  avant de pouvoir modéliser l'entrée de Ni du jour 1 à 8 de l'expérience (Figure 3.5.). L'entrée de Ni sans la portion venant de la nourriture peut se décrire selon l'équation,

$$[\text{Ni}]_{Chaoborus} = \frac{k_{uw}[\text{Ni}^{2+}]}{k_g + k_e} (1 - e^{-(k_g + k_e)t}) + [\text{Ni}]_{Chaoborus}^{0u} e^{-(k_g + k_e)t}$$
(3.4)

Où  $[Ni]_{Chaoborus}^{0u}$  est la concentration de Ni chez *C. flavicans* au début de l'expérience de prise en charge. La constante de prise en charge  $k_{uw}$  a été estimée par l'analyse des moindres carrés à l'aide des points expérimentaux de la Figure 3.5. La courbe pointillée (longs traits) du jour 1 à 8 illustre l'équation précédente. La constante  $k_{uw}$  obtenue est  $0.019 \pm 0.002$  L g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Aucune autre constante de prise en charge par l'eau n'a été trouvée dans la littérature.

#### 3.6. Détermination de l'efficacité d'assimilation de Ni par Chaoborus flavicans

Grâce à l'équation de perte, nous avons pu estimer la perte de Ni à chaque jour pendant les quatre jours d'exposition et la 5<sup>e</sup> journée de dépuration de l'expérience eau versus nourriture (Section 3.1), et ce, en excluant la prise en charge par l'eau du traitement Nourriture et Eau (NE; possible grâce au principe d'additivité de l'accumulation).

Lors de cette première expérience (section 3.1), le taux d'ingestion (TI) a été mesuré pour chaque individu en comptant le nombre de *D. magna* juvénile ingéré et en utilisant un poids moyen individuel de  $0,023 \pm 0,007$  mg ( $\pm$  ET; n = 15; poids sec). La concentration moyenne de Ni de *D. magna* ([Ni]<sub>proie</sub> dans l'équation 3.1) était de 226  $\pm$  43 nmol g<sup>-1</sup> ( $\pm$  ET; n = 9). En présumant 100 % d'efficacité d'assimilation pendant les quatre jours de l'expérience et en appliquant l'équation de perte (3.3) pendant les cinq jours, nous sommes parvenus à un estimé de [Ni] chez *Chaoborus*. Selon ces valeurs estimées et les valeurs mesurées, il a été possible de constater que *C. flavicans* avait assimilé en moyenne ( $\pm$  ET) 14 %  $\pm$  12,5 % du Ni de ses proies *D. magna*. Cette grande variation de 4 à 56% d'EA est principalement due à une variation du taux d'ingestion démontrée par la Figure 3.6. Plus *C. flavicans* mange, moins il assimile de Ni de sa proie, car le temps de passage dans le tractus est plus rapide et ne favorise pas l'assimilation.



**Figure 3.6.:** Efficacité d'assimilation individuelle (EA; %) de *Chaoborus flavicans* pour le nickel de ses proies *Daphnia magna* juvéniles ingérées à des taux variés (TI; g poids sec de proie g<sup>-1</sup> poids sec de *Chaoborus* d<sup>-1</sup>). La courbe décrit la fonction  $y = a \cdot e^{-bx}$  où les valeurs (± ES) de « a » est 60 ± 11 % et « b » est 18,5 ± 3,0.

Ce phénomène de dépendance entre l'EA et le TI est connu (Munger et Hare 2000), mais à ma connaissance, aucune équation n'avait permis de décrire précisément cette relation. Suite à cette découverte, nous nous sommes demandés pourquoi *C. flavicans* assimile si peu de Ni, en moyenne. Notre première hypothèse a été que le Ni se trouvait probablement sous une forme non assimilable (ex : granules) dans les cellules de sa proie. Nous avons donc vérifié, à l'aide d'un fractionnement subcellulaire de *D. magna*, les proportions de Ni dans les fractions suivantes : les granules, les mitochondries, les organelles, les protéines dénaturées à la chaleur (PDC; comprenant les enzymes), les protéines stables à la chaleur (PSC; comprenant les protéines de type MT)

et les débris. Pour obtenir ces fractions, nous avons exposé *D. magna* pendant 2 jours à 50 nmol L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup> avec de la nourriture contaminée (*P. subcapitata* contaminé à 50 nmol L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup>) et les avons laissé dépurer pendant 3 heures. Ensuite, environ 50 daphnies ont été homogénéisées à l'aide d'un Pellet Pestle (Kontes) et l'homogénat (ratio poids de tissus : volume de tampon de 1 pour 7) a été soumis à un protocole de centrifugation différentielle (Figure 3.7.). La première étape (800 x g, 15 min., 4°C) a été effectuée trois fois afin de bien rincer l'exosquelette des cellules.



**Figure 3.7.:** Protocole de fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle afin d'obtenir les fractions présentées en caractère gras. Adapté de Dumas et Hare (2008).

La proportion de Ni présente dans chaque fraction est présentée à la Figure 3.8. Les barres verticales blanches représentent le métal trophiquement biodisponible. Les granules ne sont pas considérées comme biodisponibles pour le niveau trophique supérieur et les débris sont un amalgame de constituants cellulaires non clairement défini. Ce dernier comprend entre autre, l'exosquelette, les noyaux et les membranes cellulaires et des cellules entières non fractionnées.



**Figure 3.8. :** Proportion de Ni (%;  $\pm$  ET) dans les différentes fractions subcellulaires de *Daphnia magna*. De gauche à droite les mitochondries (Mito.), les organelles (Org.), les protéines dénaturées à la chaleur (PDC), les protéines stables à la chaleur (PSC), les granules (Gran.) et les débris (Deb.). Les barres blanches représentent les fractions biodisponibles.

Plusieurs études ont démontré que le métal présent dans les fractions TAM est assimilé par le maillon supérieur de la chaîne alimentaire. Cela a été démontré avec succès pour une variété d'invertébrés (Wallace and Luoma 2003; Dubois and Hare 2009a, b; Dumas and Hare 2008; Seebaugh *et al.* 2004; Ng *et al.* 2007), Ici, le métal dans ces fractions constitue 58 % du Ni total de la proie et seulement 14 % du Ni, en moyenne, est assimilé par *C. flavicans*. Par contre, le *Chaoborus* ayant ingéré le moins de proie a assimilé 56% du Ni. À ma connaissance, seulement deux autres études de transfert trophique de Ni combiné au fractionnement subcellulaire ont été effectuées. Le Ni transféré de deux proies benthiques (Chironomus riparius et Tubifex tubifex) à un prédateur benthique, Sialis velata, dépendait de la localisation du Ni dans les cellules de la proie. Ainsi, la proportion de Ni située dans les fractions protéiniques (40 à 85 %) était directement proportionnelle (1:1) avec l'efficacité d'assimilation (60 à 80%) du prédateur (Dumas et Hare 2008). Le cas du poisson Tête de Boule (Pimephales promelas) ressemble beaucoup à celui de Chaoborus qui sont très loin phylogénétiquement, mais tout de même deux prédateurs pélagiques. Le poisson a assimilé seulement 10 % du Ni qui se trouvait chez deux types de proies, D. magna et Tubifex tubifex, qui avaient respectivement 85 et 50% de leur Ni dans les fractions subcellulaires protéiniques biodisponibles. L'absence de corrélation entre l'EA et les fractions TAM s'est manifesté plus d'une fois dans le cas des poissons (Goto and Wallace 2009a, b; Steen Redecker et al. 2007; Seebaugh et al. 2005; Ng and Wood 2008; Zhang and Wang 2006; Lapointe et al. 2009; Lapointe et Couture 2009). Ces dernières études ont démontré que malgré la grande proportion de Cd (40 à 90 %) dans les fractions protéiniques des proies, seulement 0,9 à 19 % du Cd était assimilé par les différentes espèces de poisson. L'étude récente de Goto and Wallace (2009) indique que le Cd dans les proies est bien disponible lors de la digestion (vérifié en soumettant les proies aux fluides intestinaux de poisson), mais que c'est au niveau des cellules de transport de la paroi intestinal que l'entrée est régulée. Donc selon ces études, les poissons semblent, contrairement aux invertébrés, avoir un système digestif beaucoup plus complexe qui n'assimile pas tout le métal, qui pourtant est disponible. Notre étude est donc la première qui mentionne une absence de corrélation pour un invertébré. Nous savons que le Ni est essentiel pour plusieurs organismes (Denkaus et Salnikow 2002; Phipps et al. 2002; Muyssen et al. 2004), donc il est possible que ces deux prédateurs pélagiques (*Pimephales promelas* et *C. flavicans*) régulent leur [Ni] au niveau du tube digestif, comme l'a démontré l'étude de Chowdhury *et al.* 2008 chez la truite arc-en-ciel. Dans le cas de *Sialis velata*, la proportion de Ni dans les fractions biodisponibles de la proie correspondait bien à son EA. Étant donné que *Sialis* est un prédateur opportuniste, le taux de passage de sa nourriture dans son tractus est faible et lui procure probablement une meilleur EA (Dumas et Hare 2008).

Nos résultats correspondent bien avec ceux d'autres chercheurs qui ont observé une régulation homéostatique du Ni (Chowdhury *et al.* 2008; Croteau et Luoma 2009; Lapointe et al. 2009), mais plusieurs autres études doivent être effectuées afin de bien comprendre le destin de cet élément au sein des organismes.

#### 3.7. Estimation des [Ni] chez Chaoborus et comparaison avec les valeurs en nature

La dynamique du Ni chez *C. flavicans* est maintenant en grande partie comprise et il ne reste plus qu'à vérifier si les valeurs déterminées pour les constantes dans le modèle sont fiables. À l'aide des paramètres estimés et des variables mesurées sur le terrain, il faut estimer les [Ni] de *Chaoborus* et les comparer avec les [Ni] des *Chaoborus* mesurées pour une série de lacs échantillonnés à Sudbury. Pour y parvenir, nous avons utilisé l'équation suivante (adapté de Munger *et al.* 1999) qui décrit les [Ni] de *Chaoborus* où d[Ni]<sub>Chaoborus</sub>/dt dans l'équation 3.1 est égale à zéro, donc où l'entrée de Ni est égale à la sortie du Ni. Les [Ni] chez *Chaoborus* sont donc à l'état stationnaire et l'équation s'écrit :

$$[\text{Ni}]_{Chaoborus}^{ES} = \frac{k_{uw} \cdot [\text{Ni}^{2+}] + \text{EA} \cdot \text{TI} \cdot [\text{Ni}]_{\text{proie}}}{k_g + k_e}$$
(3.5)

où  $[Ni]_{Chaoborus}^{ES}$  est la concentration de Ni de *Chaoborus* à l'état stationnaire. Les valeurs de  $[Ni]_{Chaoborus}^{ES}$  et de  $[Ni^{2+}]$  sont celles des Tableau 2.2. et 4.1., respectivement. Pour

obtenir des valeurs de  $[Ni]_{Chaoborus}^{ES}$  estimées du modèle nous avons utilisé nos valeurs de constante de taux de prise en charge par l'eau  $k_{uw}$  (0.019 ± 0.002 L g<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>), de taux de perte  $k_e$  (0,19 ± 0.03 d<sup>-1</sup>) estimées au laboratoire (Équation 3.4 et 3.3, respectivement) et la valeur moyenne d'efficacité d'assimilation (EA, 14 % ou 0.14) pour *C. flavicans*. Cette valeur d'EA a ensuite servi pour établir un taux d'ingestion (TI) de 0,09 g de proie ingérée g<sup>-1</sup> de *Chaoborus* j<sup>-1</sup> (poids sec) selon la courbe de la Figure 3.6. Par contre, puisque *Chaoborus* se nourrit seulement la nuit et qu'au laboratoire, il mange toute la journée, nous avons divisé cette valeur par trois afin qu'elle corresponde aux 8 heures de noirceur de la fin mai à la latitude de Sudbury. Cette nouvelle valeur d'environ 0,03 g proie ingérée poids sec g<sup>-1</sup> *Chaoborus* poids secs j<sup>-1</sup> est la même que la valeur moyenne mesurée pour le TI de deux espèces de *Chaoborus* (*C. punctipennis* and *C. americanus*) en nature (Croteau *et al.*, 2003a). La valeur de constante de taux de croissance utilisée ( $k_g$ = 0,023 d<sup>-1</sup>) correspond à celle de *C. flavicans* et a été prise de Croteau *et al.* (2001).

Pour estimer la [Ni]<sub>proie</sub>, nous avons premièrement fait référence aux échantillons de zooplancton grossier provenant des différents lacs de Sudbury. Par contre, les [Ni] dans le zooplancton n'était ni corrélées avec les [Ni]<sub>Chaoborus</sub> (Figure 3.9.) ni avec celles des [Ni<sup>2+</sup>]. Cela suggère que ces valeurs de [Ni] du zooplancton ne correspondent pas à celles de la nourriture spécifique à *Chaoborus* en nature.



**Figure 3.9. :** Absence de corrélation (p = 0.62) entre les concentrations de Ni chez *Chaoborus* (nmol g<sup>-1</sup>; n = 5-8) et le Ni dans le zooplancton brut (nmol g<sup>-1</sup>;  $\pm$  ET; n = 3) de deux fractions (50 à 125 µm : cercles noir et 125 à 500 µm : cercles blancs).

Ce manque de corrélation a déjà été observé par Croteau *et al.* (2003b). Manquant de valeurs pour les  $[Ni]_{proie}$ , nous avons utilisé un estimé grossier de cette variable avec une corrélation faite à partir de deux valeurs de [Ni] chez *D. magna* exposé à 50 et 900 nmol L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup> libre en laboratoire. De cette courbe, nous avons pu estimer les  $[Ni]_{proie}$  à partir des valeurs de l'ion libre des lacs (Tableau 6.; Annexe). La Figure 3.10. présente les valeurs estimées selon le modèle biodynamique en fonction des valeurs mesurées en nature.



**Figure 3.10. :** Concentrations de nickel (nmol g<sup>-1</sup>) de *Chaoborus* estimées selon l'équation 3.5 en fonction des [Ni] chez *Chaoborus* des différents lacs échantillonnés en 2007. La ligne pointillée représente le rapport 1:1.

Les estimés du modèle sont du même ordre de grandeur, mais plus élevés que les valeurs sur le terrain par un facteur de  $3,5 \pm 1,2$  ( $\pm$  ET). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence. Premièrement, en relation avec le Ni venant de la nourriture, il est difficile d'avoir un estimé juste des [Ni]<sub>proie</sub> car les communautés planctoniques sont diversifiées et que chaque taxon aura sa propre [Ni], sa propre densité et il faudrait séparer les taxons afin d'avoir ceux qui correspondent aux proies des larves de *Chaoborus* de stade 4. En faisant varier des [Ni]<sub>proie</sub> de 90% à la baisse, on diminue de peu le rapport des valeurs estimées à celles qui ont été mesurées (jusqu'à 2.5), dû à la faible proportion de Ni venant de la nourriture.

Par rapport à la portion venant de l'eau, la physicochimie de l'eau au laboratoire n'a pas été analysée, mais seulement estimée à partir des concentrations nominales. Par contre, sur le terrain tous les paramètres importants susceptibles de faire varier la biodisponibilité ont été analysés. À pH 7, beaucoup de Ni est lié aux carbonates et une petite variation de la spéciation pourrait facilement faire doubler les concentrations de l'ion libre dans notre milieu d'exposition. Ainsi, une valeur de  $k_{uw}$  diminuée de moitié changerait le rapport estimé : mesuré à 2.

### **3.8.** Conclusion

En conclusion, nos estimés des paramètres physiologiques faits au laboratoire sont suffisamment robustes pour obtenir une approximation des concentrations de Ni chez *Chaoborus* en nature. Par contre, il est clair que des mesures de paramètres sur le terrain pourraient améliorer la relation et pourrait nous indiquer s'il y a une différence entre les populations d'un milieu contaminé et non contaminé. De plus, cette étude démontre la présence d'une régulation homéostatique du Ni chez l'insecte *Chaoborus*, qui, par contre, ne lui permet pas de réguler ces concentrations totales de Ni. D'autres études sont nécessaires afin de bien comprendre l'interaction du Ni avec les différents organismes.

# QUATRIÈME CHAPITRE - CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES DE

### RECHERCHE

#### 4.1. Synthèse des résultats

La larve de l'insecte *Chaoborus* s'est avérée un excellent biomoniteur des concentrations de Ni biodisponibles dans les lacs de la région minière de Sudbury lorsque l'interaction compétitive entre les ions H<sup>+</sup> et Ni<sup>2+</sup> est prise en compte dans un modèle déterministe simple. Cette relation compétitive a été confirmée à l'aide d'une expérience au laboratoire. Malgré des variations interspécifiques de [Ni], il est possible de regrouper toutes les espèces d'un même lac afin d'utiliser le modèle. La contamination de ce métal est la deuxième, après celle du cadmium, qui peut être évaluée dans les lacs grâce à *Chaoborus*. Malgré les concentrations molaires beaucoup plus élevées pour le Ni dans l'eau, comparativement au Cd, *Chaoborus* accumule des concentrations internes de Ni similaires à celles du Cd, indiquant une meilleur homéostasie de ce premier.

Les études effectuées au laboratoire nous ont appris que l'eau, comparativement au Cd, est un vecteur important (2/3) de prise en charge de Ni chez *C. flavicans*. La nourriture est responsable, en moindre mesure, de 1/3 de l'accumulation étant donné l'efficacité d'assimilation faible (EA;  $14 \pm 12\%$ ;  $\pm$  ET) de *C. flavicans* pour le Ni présent chez sa proie *Daphnia magna*. La grande variation de l'EA du prédateur semblait être principalement due à une variation du taux d'ingestion, donc plus *C. flavicans* se nourrit, moins il assimile le Ni de ses proies. Afin d'expliquer pourquoi l'EA de *C. flavicans* est faible, nous avons fait appel au protocole de fractionnement subcellulaire des cellules de *D. magna* afin d'évaluer la proportion de Ni dans les fractions trophiquement biodisponibles. Contrairement à plusieurs études démontrant une relation directe (1:1) entre l'EA et la proportion de métal dans les fractions protéiniques, notre étude est la première qui démontre, chez un invertébré, une absence de corrélation entre ces deux variables. Ce phénomène a été déjà été observé chez les poissons et s'est expliqué par une régulation plus efficace que chez les invertébrés, au niveau du tractus. Il semble donc, que Chaoborus, régule son entrée de Ni au niveau du tractus. Puisque l'entrée de Ni chez Chaoborus se fait majoritairement de l'eau, nous l'avons exposé au Ni dans l'eau sans lui donner de nourriture pendant huit jours, et ensuite pendant huit autres jours sans Ni afin d'estimer sa constante de taux d'entrée de Ni par l'eau  $(k_{uw})$  ainsi que sa constante de taux de perte de Ni  $(k_e)$ . La prise en charge de Ni par l'eau a été relativement rapide  $(k_{uw})$ de 0,019  $\pm$  0,002 L g<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>), mais aucune autre constante  $k_{uw}$  n'a été trouvée dans la littérature afin de comparer. Par contre, une constante de taux de sortie de Ni a été estimée pour un gastropode ( $0.173 \pm 0.017 \text{ j}^{-1}$ ; Croteau et Luoma 2009) et elle est très similaire à celle mesurée pour *Chaoborus*  $(0,19 \pm 0,03 \text{ j}^{-1})$ . De nouveau, cette valeur de constante de taux de perte élevée comparativement à celle du Cd pour le même animal (C. flavicans) indique une régulation efficace de ce métal. Les paramètres d'entrée et de sortie de Ni nous ont permis d'estimer les concentrations de Ni de Chaoborus provenant d'une série de lacs à Sudbury et celles-ci ont été comparées avec les valeurs mesurées. Le rapport des valeurs estimées : mesurées de 3,5 est acceptable étant donné le manque de données précises sur l'exposition des larves en nature.

### 4.2. Perspectives de recherche

Pour faire suite à cette étude, je suggère que l'utilisation de *Chaoborus*, comme biomoniteur, soit testée pour d'autres métaux. De plus, je propose que des recherches soient effectuées sur plusieurs aspects concernant le Ni.

Premièrement, concernant la biodisponibilité du Ni; mettre au clair si le Ni lié aux carbonates est biodisponible comme le suggère certains auteurs. Une avenue serait de vérifier si les constantes d'affinité de liaison du Ni aux carbonates sont trop élevées, entrainant une sous-estimation des concentrations de l'ion libre. Deuxièmement, déterminer pourquoi l'entrée de Ni chez *Chaoborus* provient majoritairement de l'eau comparativement au Cd. Est-ce que cela serait une conséquence de la prise en charge différente du calcium et du magnésium, ou une conséquence des concentrations très différentes de ces deux éléments dans l'eau?

Vérifier si la perte de Ni de *Chaoborus* est la même lorsqu'il obtient son Ni de l'eau et de la nourriture. De plus, obtenir d'autres constantes de taux d'entrée et de sortie de Ni chez d'autres organismes et clarifier pourquoi l'efficacité d'assimilation est si différente entre les organismes étudiés.

Investiguer sur l'essentialité du Ni chez les invertébrés et vérifier si la biodynamique du Ni est différente entre une population exposée (Sudbury) et une non exposée (ailleurs) et finalement, si la distribution subcellulaire du Ni chez *Chaoborus* est similaire à celle des autres métaux.

71



### **CINQUIÈME CHAPITRE – RÉFÉRENCES**

- Alikhan, M.A.; Zia, S. 1989. Nickel uptake and regulation in a copper-tolerant decapod, *Cambarus bartoni* (Fabricus) (Decapoda, Crustacea). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 94-102.
- Baudrimont, M.; Andres, S.; Metivaud, J.; Lapaquellerie, Y.; Ribeyre, F.; Maillet, N.; Latouche, C.; Boudou, A. 1999. Field transplantation of the freswater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): II. metallothionein response to metal exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2472-2477.
- Belzile, N.; Joly, H. A.; Li, H. **1997.** Characterization of humic substances extracted from Canadian lake sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 75, 14-27.
- Belzile, N.; Morris. J.R. **1995**. Lake Sediments : Sources or Sinks of Industrially Mobilized Elements? In *Restoration and Recovery of an Industrial Region*. Gunn, J.M. Eds.; Springer-Verlag, New York.
- Borgmann, U.; Norwood, W.P.; Reynoldson, T.B.; Rosa, F. 2001. Identifying cause in sediment assessments: bioavailability and the sediment quality triad. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 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. *Environ. Pollut.* 129, 39-48.
- Buchwalter, D.B.; Cain, D.J.; Clements, W.H.; Luoma, S.N. **2007**. Using biodynamic models to reconcile differences between laboratory toxicity tests and field biomonitoring with aquatic insects. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4821-4828.
- Buffle, J. **1988**. *Complexation Reactions in Aquatic Systems: an Analytical Approach*; Ellis Horwood Limited: Chichester, U.K., 1988.
- Buhler, R.H.O.; Kägi, J.H.R. 1974. Human hepatic metallothions. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 39*, 229–234. *Cited in* Oh S.H.; Deagen, J.T.; Whanger, P.D.; Weswig, P.H. 1978. Biological function of metallothionein-IV. Biosynthesis and degradation of liver and kidney metallothionein in rats fed diets containing zinc or cadmium. *Bioinorg Chem. 8*, 245–254.
- Campbell P.G.C.; Chapman P.M.; Hale B.A. **2006**. Risk assessment of metals in the environment. Chemicals in the environment: Assessing and managing risk. *Environ. Sci. and Technol.* 22, 102-131.

- Campbell, P.G.C. **1995**. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free ion activity model. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*; Tessier, A., Turner, D. R., Eds.; IUPAC/John Wiley and Sons: New York, pp 45-97.
- Campbell, P.G.C.; Hontela, A.; Rasmussen, J.B.; Giguère, A.; Gravel, A.; Kraemer, L.; Kovesces, J.; Lacroix, A.; Levesque, H.; Sherwood, G. 2003. Differentiating between direct (physiological) and food-chain mediated (bioenergetic) effects on fish in metalimpacted lakes. *Human Ecol. Risk Assess. 9*, 847-866.
- Campbell, P.G.C.; Stokes, P.M. **1985**. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 2034-2049.
- Carignan, R.; Nriagu, J.O. **1985**. Trace metal deposition and mobility in the sediments of two lakes near Sudbury, Ontario. *Geochim. Cosmochim. Acta* 49, 1753-1764.
- Carter, J.C.H.; Kwik, J.K. 1977. Instar succession, vertical distribution, and inter-specific competition among four species of *Chaoborus*. J. Fish. Res. Board Can. 34, 113-118.
- Chau, Y.K.; Kulikovsky-Cordeiro, O.T.R. 1995. Occurrence of nickel in the Canadian environment. *Environ. Rev. 3*, 95-120.
- Cherian, M.G.; Goyer, R.A. **1978**. Minireview. Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci.* 23, 1-10.
- Chowdhury, M.J.; Bucking, C.; Wood, C.M. 2008. Pre-exposure to waterborne nickel downregulates gastrointestinal nickel uptake in rainbow trout: indirect evidence for nickel essentiality. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1359–1364.
- Couillard, Y.; Campbell, P.G.C.; Pellerin-Massicotte J.; Auclair, J.-C. 1995. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence of citotoxicity and links to effects at higher levels of biological organisation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 703-715.
- Cowling, E.B. 1982. An historical perspective on acid precipitation. In Acidic Precipitation and Fisheries Impacts in Eastern North America. Edited by R.E. Johnson. American Fisheries Society, Bethesda, M.D. pp. 15-31.
- Croteau, M.N.; Hare, L.; Tessier, A. **1998**. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1348-1353.
- Croteau, M.N. Luoma, S.N. **2009**. Predicting dietborne metal toxicity from metal influxes. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4915-4921.

- Croteau, M.N.; Hare, L.; Marcoux, P. **2003a**. Feeding patterns of migratory and nonmigratory fourth instar larvae of two coexisting *Chaoborus* species in an acidic and metal contaminated lake: Importance of prey ingestion rate in predicting metal bioaccumulation. *Archiv für Hydrobiologie 158*, 57-74.
- Croteau, M.N.; Hare, L.; Tessier, A. **2001**. Differences in Cd accumulation among species of the lake dwelling biomonitor *Chaoborus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 1737-1746.
- Croteau, M.N.; Hare, L.; Tessier, A. **2002.** Increases in food web cadmium following reductions in atmospheric inputs to some lakes. *Environ. Sci. Technol.*, *36*, 3079-3082
- Croteau, M.N.; Hare, L.; Tessier, A. **2003b**. Difficulties in relating Cd concentrations in the predatory insect *Chaoborus* to those of its prey in nature. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 60, 800-808.
- Cusimano, R.F.; Brakkle, D.F.; Chapman, G.A. 1986. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 1497-1503.
- Deleebeeck, N.M.E.; De Schamphelaere, K.A.C.; Heijerick, D.G.; Bossuyt, B.T.A.; Janssen, C.R. 2008. The acute toxicity of nickel to *Daphnia magna*: predictive capacity of bioavailability models in artificial and natural waters. *Ecotox. Environ. Safety* 70, 67-78.
- Deleebeeck, N.M.E.; De Schamphelaere, K.A.C.; Janssen, C.R. **2007**. A bioavailability model predicting the toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*) in synthetic and natural waters. *Ecotox. Environ. Safety* 67, 1-13.
- Deleebeeck, N.M.E.; De Schamphelaere, K.A.C.; Janssen, C.R. **2009**. Effects of Mg<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> on the toxicity of Ni<sup>2+</sup> to the unicellular green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Model development and validation with surface waters. *Sci. Total Environ.* 407, 1901-1914.
- Denkaus, E.; Salnikow, K. 2002. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 42, 35-56.
- Doig, L.E.; Liber, K. 2007. Nickel speciation in the presence of different sources and fractions of organic matter. *Ecotox. Environ. Safe.* 66, 169-177.
- Dubois, M.; Hare, L. **2009a**. Subcellular distribution of cadmium in two aquatic invertebrates: change over time and relationship to Cd assimilation and loss by a predatory insect. *Environ. Sci. Technol.* 43, 356-361.

- Dubois, M.; Hare, L., **2009b**. Selenium assimilation and loss by an insect predator and its relationship to Se subcellular partitioning in two prey types. *Environ. Pollut.* 157, 772-777.
- Duffus, J.H. 2002. "Heavy metals" A meaningless term? (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. 74, 793-807.
- Dumas, J.; Hare, L. **2008**. The internal distribution of nickel and thallium in two freshwater invertebrates and its relevance to trophic transfer. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5144-5149.
- Elendt, B.P.; Bias, W.R. **1990**. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna. Water Res.* 24, 1157-1167.
- Gamble, D.S.; Schnitzer, M. 1973. The chemistry of fulvic acid and its reactions with metal ions. In: Singer, P.C. (Ed.), *Trace Metals and Metal-Organic Interactions in Natural Waters*. Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor, MI, USA, pp. 265–302.
- Gilman, J.P.W.; Ruckerbauer, G.M. **1962**. Metal carcinogenesis: I. Observations on the carcinogenicity of a refinery dust, cobalt oxide and colloidal thorium dioxide. *Cancer Res.* 22, 152-157.
- Goldberg, E.D.; Bowen, V.T.; Farrington, J.W. 1978. The mussel watch. *Environ. Conserv.* 5, 101-125.
- Goldberg, E.D.; Koide, M.; Hodge, V. **1983**. U.S. Mussel Watch: 1977-1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuar. Coast. Shelf S.16*, 69-93.
- Gosselin, A.; Hare, L. 2003. Burrowing behavior of *Chaoborus flavicans* larvae and its ecological significance. J. N. Am. Benthol. Soc.22, 575-581.
- Goto, D.; Wallace W.G. **2009a**. Influences of prey- and predator-dependent processes on cadmium and methylmercury trophic transfer to mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 66, 836-846.
- Goto, D.; Wallace, W.G. **2009b**. Relevance of intracellular partitioning of metals in prey to differential metal bioaccumulation among populations of mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). *Mar. Environ. Res.* 68, 257-267.
- Gunn, J.M. 1995. Restoration and Recovery of an Industrial region. Progress in Restoring the Smelter-damaged Landscape near Sudbury, Canada; Gunn, J. M., Ed.; Springer-Verlag: New York, 1995.

- Guthrie, J.W.; Hassana, N.M.; Salama, M.S.A.; Fasfousa, I.I.; Murimboha, C.A.; Murimboha, J.; Chakrabartia, C.L.; Grégoire, D.C. **2005**. Complexation of Ni, Cu, Zn, and Cd by DOC in some metal-impacted freshwater lakes: a comparison of approaches using electrochemical determination of free-metal-ion and labile complexes and a computer speciation model, WHAM V and VI. *Anal. Chim. Acta* 528, 205–218.
- Guthrie, J.W.; Mandal, R.; Salam, M.S.A.; Hassan, N.M.; Murimboh, J.; Chakrabarti, C.L.; Back, M.H.; Grégoire, D.C. 2003. Kinetic studies of nickel speciation in model solutions of a well-characterized humic acid using the competing ligand exchange method. *Anal. Chim. Acta 480*, 157-169.
- Hare, L. 1992. Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. Crit. Rev. Toxicol. 22, 327-369.
- Hare, L.; Carter, J.C.H. **1987**. Zooplankton populations and the diets of three *Chaoborus* species (Diptera, Chaoboridae) in a tropical lake. *Freshwater Biol.* 17, 275-290.
- Hare, L.; Tessier, A. **1996**. Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature 380*, 430-432.
- Hare, L.; Tessier, A. **1998**. The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1850-1859.
- Hare, L.; Tessier, A.; Croteau, M.N. **2008**. A biomonitor for tracking changes in the availability of lakewater cadmium over space and time. *Human Ecol. Risk Assess.* 14, 229-242.
- Hédouin, L.; Pringault, O.; Metian, M.; Bustamante, P.; Warnau, M. 2007. Nickel bioaccumulation in bivalves from the New Caledonia lagoon: Seawater and food exposure. *Chemosphere* 66, 1449-1457.
- Henry, W.M.; Knapp, K.T. **1980**. Compound forms of fossil fuel fly ash emissions. *Environ. Sci. Technol. 14*, 450–456.
- Hoang, T.C.; Tomasso, J.R.; Klaine, S.J. **2004**. Influence of water quality and age on nickel toxicity to fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 86-92.
- Jaques, A.P. **1987**. Summary of emissions of antimony, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, manganese, mercury and nickel in Canada. Direction des programmes industriels, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 44 pp.
- Keller, W. 2009. Limnology in northeastern Ontario: from acidification to multiple stressors. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 66, 1189-1198.

- Keller, W.; Heneberry, J.; Gunn, J. **1999**. Effects of emission reductions from the Sudbury smelters on the recovery of acid and metal-damaged lakes. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery 6*, 189-198.
- Kinraide, T.B. **2006**. Plasma membrane surface potential  $(\Psi_{PM})$  as a determinant of ion bioavailability: A critical analysis of new and published toxicological studies and a simplified method for the computation of plant  $(\Psi_{PM})$ . *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 3188-3198.

Kojima, Y.; Kägi, J.H.R. 1978. Metallothionein. Trends Biochem. Sci. April, 90-93.

- Komjarova, I.; Blust, R. **2008**. Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea *Daphnia magna*, a stable isotope experiment. *Aquat. Toxicol.* 90, 138-144.
- Komjarova, I.; Blust, R. **2009**. Application of a stable isotope technique to determine the simultaneous uptake of cadmium, copper, nickel, lead, and zinc by the water flea *Daphnia magna* from water and the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1739-1748.
- Küpper H.; Küpper, F.C.; Spiller, M. 2006. Heavy metal-chlorophylls formed in vivo during heavymetal stress and degradation products formed during digestion, extraction and storage of plantmaterial. In: Grimm B.; Porra R.; Rüdiger, W.; Scheer H. editors. Chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications. vol. 25 of series "Advances in photosynthesis and respiration", series editor: Govindjee Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 67-77.
- Lapointe, D.; Couture, P. 2009. Influence of the route of exposure on the accumulation and subcellular distribution of nickel and thallium in juvenile fathead minnows (*Pimephales* promelas). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 57, 571–580.
- Lapointe, D.; Gentès S.; Ponton, D.E.; Hare, L.; Couture, P. **2009**. The influence of prey type on nickel and thallium assimilation, subcellular distribution and toxicity in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.*, *43*, 8665–8670.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S. **2008**. Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.
- Mandal, R., Sekaly, A.L.R., Murimboh, J., Hassan, N.M., Chakrabarti, C.L., Back, M.H., Grégoire, D.C., Schroeder, W.H. 1999a. Effect of the competition of copper and cobalt on the lability of Ni(II) - organic ligand complexes. Part I. In model solutions containing Ni(II) and a well-characterized fulvic acid. *Anal. Chim. Acta* 395, 309-322.
- Mandal, R., Sekaly, A.L.R., Murimboh, J., Hassan, N.M., Chakrabarti, C.L., Back, M.H., Grégoire, D.C., Schroeder, W.H. **1999b.** Effect of the competition of copper and cobalt

on the lability of Ni(II) - organic ligand complexes, Part II: in freshwaters (Rideau River surface waters) *Anal. Chim. Acta 395*, 323-334.

- Mandal, R.; Hassan, N.M.; Murimboh, J.; Chakrabarti, C.L.; Back, M.H. 2002. Chemical speciation and toxicity of nickel species in natural waters from the Sudbury area (Canada). *Environ. Sci. Technol.* 36, 1477-1484.
- Marigomez, I.; Soto, M.; Cajaraville, M.P.; Angulo, E.; Giamberini, L. **2002**. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Techniq.* 56, 358-392.
- Martell, A.E.; Smith, R.M.; Motekaitis, R.J. **2004**. NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database. U.S. Department of Commerce: Gaithersburg, MD.
- Martin, S.; Proulx, I.; Hare, L. 2008. Explaining metal concentrations in sympatric *Chironomus* species. *Limnol. Oceanogr.* 53, 411-419.

Morel, F.M.M. 1983. Principles of Aquatic Chemistry; John Wiley and Sons: New York.

- Munger, C.; Hare, L. **1997**. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic Insect (*Chaoborus punctipennis*): implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environ. Sci. Technol.* 31, 891-895.
- Munger, C.; Hare, L., **2000**. Influence of ingestion rate and food types on cadmium accumulation by the aquatic insect *Chaoborus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 327-332.
- Munger, C.; Hare, L.; Tessier, A. **1999**. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in nature. *Limnol. Oceanogr.* 44, 1763-1771.
- Muyssen, B.T.A.; Brix, K.V.; DeForest, D.K.; Janssen, C.R. **2004**. Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. *Environ. Rev.* 12, 113–131.
- Ng, T.Y.T., Wood, C.M. **2008**. Trophic transfer and dietary toxicity of Cd from the oligochaete to the rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 87, 47-59.
- Ng, T.Y.T; Rainbow P.S.; Amiard-Triquet, C.; Amiard, J.C.; Wang, W.X. **2007.** Metallothionein turnover, cytosolic distribution and the uptake of Cd by the green mussel *Perna viridis. Aquat. Toxicol.* 84, 153-61.
- Nieboer, E.; Tom R.T.; Sanford, W.E. **1988**. «Nickel Metabolism in Man and Animals», *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel et A. Sigel (éd.), Marcel Dekker Inc., New York, NY, vol. 23, p. 91-121.
- Nriagu, J.O., editor. **1980**. Nickel in the Environment. John Wiley & Sons. New York, New York. 1980. pp. 94-101.

- O'Connor, T.P. **1996**. Trends in chemical concentrations in mussels and oysters collected along the US coast from 1986 to 1993. *Mar. Environ. Res.* 41, 183-200.
- Oden, S. **1968**. The acidification of air and precipitation and its consequences in the natural environment. Swedish National Science Research Council, Stockholm, Sweden. *Ecol. Committ. Bull. No. 1.* Translation Consultants Ltd., Arlington, Va.
- Orvoine, J.; Hare, L.; Tessier, A. **2006**. Competition between protons and cadmium ions in the planktonic food chain leading to the phantom midge *Chaoborus*. *Limnol*. *Oceanogr*. *51*, 1013-1020.
- Oxtoby, D.W.; Nachtrieb, N.H. **1996**. *Principles of Modern Chemistry*, 3<sup>rd</sup> ed. Saunders College Publishing: Fort Worth, TX.
- Pane, E.F.; Smith, C.; McGeer, J.C.; Wood., C.M. 2003. Mechanisms of acute and chronic waterborne nickel toxicity in the freshwater cladoceran, *Daphnia magna. Environ. Sci. Technol.* 37, 4382-4389.
- Pelletier, É.; Campbell, P.G.C.; Denizeau, F. 2004. Prise en charge et détoxication des métaux chez les organismes aquatiques. Dans : Écotoxicologie Moléculaire. Principes fondamentaux et perspectives de développement. Presse de l'Université du Québec, Québec, Canada, pp. 16-39.
- Perceval, O.; Couillard, Y.; Pinel-Alloul, B.; Giguère, A.; Campbell, P.G.C. 2004. Metalinduced stress in bivalves living along a gradient of Cd contamination: relating subcellular metal distribution to population-level responses. *Aquat. Toxicol.* 69, 327-345.
- Phillips, D.J.H.; Rainbow, P.S. **1993**. *Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants*; Elsevier Applied Science: London, U.K.
- Phipps, T.; Tank, S.L.; Wirtz, J.; Brewer, L.; Coyner, A.; Ortego, L. S.; Fairbrother, A. 2002. Essentiality of nickel and homeostatic mechanisms for its regulation in terrestrial organisms. *Environ. Rev.* 10, 209-261.
- Pyle, G.G.; Kamunde, C.N.; McDonald, D.G.; Wood, C.M. 2003. Dietary sodium inhibits aqueous copper uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Biol. 206, 609-618.
- Pyle, G.G.; Rajotte, J.W.; Couture, P. 2005. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotox. Environ. Safe.* 61, 287-312.
- Reinfelder, J.R.; Fisher, N.S., **1994**. The assimilation of elements ingested by marine planktonic bivalve larvae. *Limnol. Oceanogr.* 39, 12-20.

- Ritchie, J.D.; Perdue, M.E. **2003**. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 85-96.
- Saether, O. A. **1972**. Nearctic and palaearctic *Chaoborus* (Diptera: Chaoboridae). In *Das Zooplankton der Binnengewässer*; Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung: Stuttgart, Germany, pp 257-304.
- Schubauer-Berigan, M.K.; Dierkes, J.R.; Monson, P.D.; Ankley, G.T. 1993. pH-dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to Ceriodaphnia dubia, Pimephales promelas, Hyalella azteca and Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 12, 1261-1266.
- Seebaugh, D.R.; Goto, D.; Wallace, W.G. **2005**. Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Mar. Environ. Res.* 59, 473-491.
- Sigg, L.; Sturm, M.; Kistler, D. **1987**. Vertical transport of heavy metals by settling particles in Lake Zurich. *Limnol. Oceanogr.* 32, 112-130.
- Spears, J.W. 1999. Reevaluation of the metabolic essentiality of the minerals. Asian-Australasian. J. Anim. Sci. 12, 1002-1008.
- Steen-Redeker, E.; Van Campenhout, K.; Bervoets, L.; Reijnders, H.; Blust, R. 2007. Subcellular distribution of Cd in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*, implications for trophic availability and toxicity. *Environ. Pollut.* 148, 166–175.

Stumm, W.; Morgan, J.J. 1981. Aquatic Chemistry. 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley and Sons, New York.

- Tabata, M.; Sarkar, B. 1992. Specific nickel (II)-transfer process between the native sequence peptide representing the nickel (ii) transport site of human albumin and Lhistidine (abstr.). J. Inorg. Biochem. 45, 93-104.
- Tan, Q.G.; Wang, W.X. **2008**. The influences of ambient and body calcium on cadmium and zinc accumulation in Daphnia magna. *Environ. Toxicol. Chem* 27, 1605-1613,
- Thomann, R.V. **1981**. Equilibrium model of fate of microcontaminants in diverse aquatic food chains. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38, 280-296.
- Thurman, E.M. **1985**. Organic Geochemistry of Natural Waters; Kluwer Academic Publishers Group: Lancaster, U.K.
- Tipping, E. **1998**. Humic ion-binding model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. *Aquat. Geochem.* 4, 3–48.
- Töpperwien, S.; Behra, R.; Sigg, L. **2007**. Competition among zinc, manganese, and cadmium uptake in the freshwater alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Environ. Toxicol. Chem. 26*, 483-490.

- Unsworth, E.R.; Warnken, K.W.; Zhang, H.; Davison, W.; Black, F.; Buffle, J.; Cao, J.; Cleven, R.; Galceran, J.; Gunkel, P.; Kalis, E.; Kistler, D.; Van Leeuwen, H.P.; Martin, M.; Noël, S.; Nur, Y.; Odsak, N.; Puy, J.; Riemsdijk, W.V.; Sigg, L.; Temminghoff, E.; Tercie-Waeber, M.L.; Toepperwien, S.; Raewyn, M.T.; Weng, L.; Xue, H. 2006. Model predictions of metal speciation in freshwaters compared to measurements by *in situ* techniques. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1942-1949.
- Van Laer, L.; Smolders, E.; Degryse, F.; Janssen, C.; De Schamphelaere, K.A.C. 2006. Speciation of nickel in surface waters measured with the Donnan membrane technique. *Anal. Chim. Acta* 578, 195-202.
- Wallace, W.G.; Luoma, S.N. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Mar. Ecol-Prog. Ser.* 257, 125-137.
- Wang, M.H.; Wang, D.Z.; Wang, G.Z.; Huang, X.G.; Hong, H.S.; 2007. Influence of N, P additions on the transfer of nickel from phytoplankton to copepods. *Environ. Pollut.* 148, 679-687.
- Watras, C.J.; MacFarlane, J.; Morel, F.M.M. 1985. Nickel accumulation by *Scenedesmus* and *Daphnia*: food chain transport and geochemical implications. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 724-730.
- Xue, H.B.; Jansen, S.; Prasch, A.; Sigg, L. **2001**. Nickel speciation and complexation kinetics in freshwater by ligand exchange and DPCSV. *Environ. Sci. Technol. 35*, 539-546.
- Zhang, L.; Wang, W.X., 2006. Significance of internal metal speciation in prey in influencing the trophic transfer of metals in marine fish. *Limnol. Oceanogr.* 51, 2008-2017.

## SIXIÈME CHAPITRE - ANNEXE

**TABLEAU 6.** : Valeurs moyennes (n = 3) des constituants chimiques de l'eau pour 15 lacs canadiens situés près des fonderies de Rouyn-Noranda, QC (Lacs Marlon and Opasatica) et de Sudbury, ON (autres lacs). n.d. : non déterminé.

Lake	pН	[DOC] (mg/L)	[Cl] (µM)	[CO <sub>3</sub> ] (µM)	[NO <sub>3</sub> ] (µM)	[SO <sub>4</sub> ] (µM)	[Ca] (µM)	[K] (µM)	[Mg] (µM)	[Na] (µM)	[Al] (nM)
Bibby	6.8	4.4	10	27	5	95	69	11	45	46	1104
Chief	5.6	2.1	11	<10	5	77	40	7	22	29	2694
Clearwater	6.2	2.4	274	23	3	106	109	16	43	190	441
Crooked	6.4	3.7	69	45	6	116	71	18	48	80	1142
Crowley	6.3	3.2	17	50	3	81	58	15	31	41	554
Hannah	7.4	3.7	2381	217	13	180	265	54	151	2102	320
Laurentian	6.7	4.5	862	100	11	61	105	20	63	703	455
Marlon	7.1	8.4	5	217	11	47	160	14	58	52	1644
McFarlane	7.8	4.2	2167	463	12	171	401	53	209	1873	335
Opasatica	7.5	5.7	35	464	n.d.	71	213	21	115	118	366
Pine	4.7	0.9	8	10	5	77	33	7	17	29	3349
Raft	6.8	2.4	23	73	3	96	81	12	45	51	169
Silver	5.9	2.7	2481	30	10	162	194	51	117	2056	350
Swan	5.9	2.1	138	28	8	61	71	7	22	76	332
Tilton	6.6	2.3	121	23	4	90	89	12	40	89	381

## TABLEAU 6. : Suite.

	[Cd]	[Co]	[Cu]	[Fe]	[Mn]	[Ni]	[Ni <sup>2+</sup> ]		[Pb]	[Se]	[Zn]
Lake	(nM)	% free Ni	(nM)	(nM)	(nM)						
Bibby	0.49	3.7	138	1050	414	985	589	60	1.12	2	115
Chief	1.58	30.7	142	681	1060	1158	957	83	1.33	n.d.	122
Clearwater	1.99	9.0	131	54	282	1124	843	75	0.64	4	251
Crooked	2.06	32.7	323	284	640	2106	1480	70	1.56	5	250
Crowley	0.91	6.0	128	163	387	869	566	65	0.92	2	116
Hannah	1.43	2.8	290	276	109	2113	1344	64	0.76	13	60
Laurentian	0.52	4.7	166	1339	342	717	459	64	2.00	4	64
Marlon	1.26	0.5	204	2896	50	10	5	50	35.91	5	92
McFarlane	0.32	1.9	108	139	244	890	505	57	0.43	7	96
Opasatica	0.26	1.8	38	79	16	15	5	36	0.01	n.d.	2
Pine	2.83	65.5	310	387	1141	1684	1519	90	10.36	2	236
Raft	0.95	1.2	125	147	133	1046	741	71	1.33	3	93
Silver	2.17	13.0	161	245	600	1591	1138	72	1.61	10	244
Swan	1.57	28.5	91	438	644	1099	860	78	0.88	n.d.	108
Tilton	0.79	1.4	100	114	189	676	486	72	0.31	4	95

## DEUXIÈME PARTIE – ARTICLES



## ASSESSMENT OF NICKEL CONTAMINATION IN LAKES USING THE PHANTOM MIDGE CHAOBORUS AS A BIOMONITOR

### DOMINIC E. PONTON AND LANDIS HARE\*

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

Please cite this article as

Ponton, D.E; Hare, L. **2009** Assessment of nickel contamination in lakes using the phantom midge *Chaoborus* as a biomonitor. *Environmental Science and Technology* 43, 6529–6534.

Keywords: Nickel; Biomonitor; Competition; pH; Insect; lake; Chaoborus

**Brief:** The insect *Chaoborus* is an effective biomonitor for nickel in lakewater, which would make it useful for estimating nickel exposure in ecological risk assessments.

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

### Résumé

Le nickel peut être présent en concentrations préoccupantes dans les plans d'eau près des mines et des sites industriels. Nous avons évalué le potentiel de la mouche fantôme *Chaoborus* comme biomoniteur de ce métal trace en récoltant de l'eau et des larves de *Chaoborus* dans 15 lacs présentant un gradient de contamination aux alentours de la fonderie de Sudbury, ON, Canada. Nous avons mesuré le pH, les métaux traces, les ions majeurs, ainsi que le carbone organique et inorganique dans l'eau des lacs afin de calculer la spéciation chimique à l'aide du logiciel *Windermere Humic Aqueous Model* (WHAM). Les concentrations de Ni dans *Chaoborus* varient entre les lacs et sont corrélées avec les concentrations de l'ion libre de Ni (Ni<sup>2+</sup>) si l'interaction compétitive avec les ions hydrogène (H<sup>+</sup>) est prise en compte. Nous avons vérifié cet effet compétiteur en laboratoire en exposant *Chaoborus punctipennis* à une concentration constante de Ni<sup>2+</sup> libre, mais en faisant varier le pH. Comme attendu, les larves de *Chaoborus punctipennis* exposées à une plus grande concentration d'ions H<sup>+</sup> ont accumulé moins de Ni. La larve de *Chaoborus* s'avère être un biomoniteur efficace de la contamination en Ni dans les lacs et utile pour l'évaluation du risque des métaux traces pour les organismes aquatiques.

### Abstract

Nickel (Ni) can be present in concentrations of concern in waters near mining and industrial sites. We tested species of the phantom midge *Chaoborus* as a biomonitor for this trace metal by collecting water and *Chaoborus* larvae from 15 lakes located along a Ni gradient mainly in the vicinity of smelters located in Sudbury, ON, Canada. We measured pH, trace metals, major ions, as well as inorganic and organic carbon concentrations in lakewater for use in calculating ambient metal speciation using the

88

Windermere Humic Aqueous Model (WHAM). Nickel concentrations in *Chaoborus* species varied widely among our study lakes and could be related to concentrations of the free Ni<sup>2+</sup> ion in lakewater if competitive interactions with hydrogen ions (H<sup>+</sup>) were taken into account. We verified this inhibitory effect in the laboratory by exposing *Chaoborus punctipennis* to constant free Ni<sup>2+</sup> ion concentrations at various H<sup>+</sup> ion concentrations. As expected, larvae exposed to high concentrations of H<sup>+</sup> ions accumulated less Ni. Overall, our results suggest that *Chaoborus* larvae would be an excellent biomonitor for Ni in lakewater and as such would be a useful component of risk assessment strategies designed to evaluate Ni exposure to aquatic organisms in lakes.

#### Introduction

Given nickel's many industrial uses, it is avidly mined in countries around the world. Canada is the world's second largest Ni producer (1), and mining and refining of this metal are historically centered on the city of Sudbury in northern Ontario. For decades, lakes located near the Sudbury smelters received acidic and metal-rich fallout (2, 3). Although improvements made since the 1970's drastically reduced atmospheric emissions from these smelters, lakes in the Sudbury area remain contaminated and, in some cases, acidic (2, 3). Of the many metals present in high concentrations in lakewater and sediments (Cd, Co, Cu, Ni), Ni has been implicated as the most likely cause of toxicity in Sudbury lakes (4). Thus a reliable means of classifying lakes according to their bioavailable Ni concentrations would be of great use for estimating the exposure of aquatic organisms to Ni, and measurements of contaminant exposure are a key component of ecological risk assessments. Although measurements of metals in lakewater and sediments can be fairly simple to make, they tend to be of limited use for assessing exposure because they do not necessarily represent the proportion of metal that is available for uptake by animals (5). In contrast, metal measurements in aquatic animals can be used to rank lakes according to their contamination level in a manner that is more biologically meaningful (5, 6). However, few aquatic animals have been tested as Ni biomonitors, and studies of Ni in general have lagged behind those of more "popular" metals such as cadmium and copper (7).

We set out to test the potential of species of the phantom midge *Chaoborus* (Diptera, Chaoboridae) as a biomonitor for Ni in lakewater. We chose this insect because it is an effective biomonitor for lakewater Cd (6, 8, 9), due in part to the fact that its

90
larvae are metal tolerant, widespread, easily collected, readily identified to species, and of adequate size for metal analyses (6). A potential drawback of using this insect is that it regulates its concentrations of some essential metals (Cu and Zn; 9), and Ni is essential for many animals (10). Thus, we first needed to determine if Ni concentrations varied among *Chaoborus* larvae collected from lakes located along a known Ni gradient. For this purpose, we chose lakes located in the vicinity of Canadian metal refineries located in Sudbury, ON, where Ni can be present in high concentrations (4, 11, 12), as well as in Rouyn-Noranda, QC, where cadmium (Cd) is the contaminant of greatest concern and Ni concentrations tend to be quite low (12, 13). We then determined if lake to lake variations in *Chaoborus* Ni concentrations could be explained by corresponding differences in concentrations of the free Ni<sup>2+</sup> ion in lakewater. Lastly, since previous results for Cd indicate that accumulation of this metal is influenced by lakewater acidity, we also considered differences in lakewater pH among the study lakes. Being able to predict free Ni ion concentrations from Ni concentrations in a biomonitor would provide a useful tool for estimating Ni-exposure to organisms in lakes.

#### **Materials and Methods**

**Field Study Sites and Insect Collection.** We collected water samples and insect larvae in late May and early June 2007 from 13 lakes (Table 1) located on the Precambrian Canadian Shield in the mining areas of Sudbury, ON and Rouyn-Noranda, QC. Additional samples were collected from two Sudbury lakes (Chief and Swan) in May 2009 (Table 1). The selected lakes encompass a range in lakewater Ni concentrations and pH (Table 1) and harbor populations of the phantom-midge *Chaoborus*. This insect has a lengthy life cycle in northern temperate lakes (1-2 years; *14*) and exchanges metals such

as Cd rapidly (15, 16) such that its metal concentrations are likely to be in steady state with those in its surroundings.

We collected *Chaoborus* larvae either during the day in sediment, using an Ekman grab (the contents of which were sieved with a 500  $\mu$ m mesh-aperture net), or at night in lakewater, by hauling a 164  $\mu$ m mesh-aperture plankton net horizontally in the water column. Larvae were held in lakewater at field temperatures for transport to the laboratory where they were sorted according to species (*17*). Where numbers permitted, 5-8 samples of each *Chaoborus* species were prepared by pooling 8-15 similar sized fourth-instar (*14*) larvae in each sample. These samples were placed on acid-washed, preweighed pieces of Teflon sheeting in acid-washed microcentrifuge tubes and frozen at -20 °C.

Water Sampling. To prevent inadvertent trace metal contamination, all labware was soaked in 15% (v/v) nitric acid (HNO<sub>3</sub>; Omni-trace grade) and rinsed seven times with ultrapure water (Milli-Q system water; > 18 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>) prior to use. In each lake, filtered water samples were collected in the epilimnion using three *in situ* Plexiglas diffusion samplers (216 × 72 × 12 mm; comprising 8 4-mL compartments separated from lakewater by a Gelman HT-200, 0.2-µm pore size, polysulfone membrane; *11*). Samplers were anchored 1 meter below the surface in the epilimnion because this is the zone in which *Chaoborus* larvae feed at night. Prior to use, the diffusion samplers were filled with ultrapure water then sealed individually in clean plastic bags. After deployment for a minimum of 3 days, samplers were retrieved and water samples were removed from them immediately upon collection.

Samples (1 mL) for dissolved inorganic carbon (DIC) determination were removed by syringe from one compartment in each sampler and injected through a septum into prewashed glass tubes that had been purged using helium. From the same compartment, the remaining 3 mL was removed to measure lakewater pH (pH was also measured at the lake surface). Another sample (4 mL) was collected for dissolved organic carbon (DOC) determination by piercing the peeper membrane with a NaOH washed (0.005 M) plastictipped pipette then injecting the contents into a dark glass bottle that had been washed in NaOH, rinsed, heated to 400 °C and rinsed again with ultrapure water (ELGA; [DOC] <  $0.005 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Samples (4 mL) for anions (Cl, NO<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub>) were removed using a pipette with an unused plastic tip that had been rinsed in ultrapure water. These samples were injected into new High Density Polyethylene (HDPE) bottles (4 mL capacity) that had been rinsed with ultrapure water. The remaining cells were used for the determination of trace metals (Cd, Cu, Mo, Ni, Pb, Zn) and other cations (Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na); samples for these elements were removed by piercing the membrane with a pipette having an acidwashed plastic tip, and placing the contents into prewashed and preacidified (0.2% v/v ultrapure concentrated HNO<sub>3</sub>) HDPE bottles (15 mL capacity).

Analyses. Frozen *Chaoborus* larvae were freeze-dried (FTS Systems) and weighed using a microbalance (Sartorius M2P PRO 11). Dried larvae were placed in acid washed HDPE bottles where they were digested for 2 days in concentrated HNO<sub>3</sub> (Omnitrace grade; 100  $\mu$ L per mg dry weight) followed by 1 day in concentrated hydrogen peroxide (40  $\mu$ L per mg dry weight); digestate volume was completed to 1 mL per mg dry weight using ultrapure water. Certified reference material (lobster hepatopancreas, TORT-2, National

Research Council of Canada, NRCC) was submitted to the same digestion procedure. Trace metals in insects were measured using Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS; Thermo Elemental X Series). Trace metal concentrations in the reference material were within the certified range and the detection limit for Ni in insects was 1.7 nmol g<sup>-1</sup>.

Total dissolved metal concentrations in lakewater were measured by ICP-MS. Certified reference water samples (Riverine Water Reference Material for Trace Metals SLRS-1, NRCC; PlasmaCal Multielement Standard 900-Q30-100, SCP Science) were analyzed during each analytical run and measured concentrations were within the certified range for each element. Major cation concentrations were measured by ICP-Atomic Emission Spectrometry (Varian Vista AX CCD). Concentrations of anions (Cl, NO<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub>) were measured by ion chromatography (Dionex, system ICS-2000; AS-18 column). Dissolved inorganic carbon concentrations were obtained by gas chromatography (Varian 3800 with CombiPal injection and CP-PoraPLOT column) and dissolved organic carbon was measured by transformation to CO<sub>2</sub> (Shimadzu TOC-5000A).

**Metal Speciation Calculations using WHAM.** We used the Windermere Humic Aqueous Model (WHAM 6.0.1) to estimate free metal ion concentrations. This model is based on Humic Ion-Binding Model VI (*18*), a discrete site/electrostatic model of the interactions of protons and metals with fulvic and humic acids. Model parameters are semi-empirical in nature because they were determined from fitting laboratory metal titration data performed under conditions (ionic strength, metal-ligand ratios, etc.) that generally differ from those observed in natural systems. All pertinent inorganic formation

constants were updated using a reliable source of thermodynamic data (19); in our case, Ni complexes with bicarbonates and carbonates were most affected by these changes. Concentrations of fulvic acid (FA) and humic acid (HA) required as input data to the WHAM computer code were estimated from our measurements of DOC by assuming that (i) humic substances (HS) contain 50% carbon (20-22), (ii) all dissolved carbon is present as HS, and (iii) the ratio of humic to fulvic acids in HS is 1:9 (23). However, we also tested other scenarios because recent research suggests that Ni binding to humic acids is negligible (24, 25) and that only 40% of fulvic acids are active in binding Ni (26).

**Competition between H<sup>+</sup> and Ni<sup>2+</sup> ions in the Laboratory.** To measure the inhibitory effect of hydrogen ions (H<sup>+</sup>) on Ni accumulation by *Chaoborus*, we exposed fourth instar *Chaoborus punctipennis* larvae to a constant free Ni<sup>2+</sup> ion concentration, [Ni<sup>2+</sup>], of 1.6  $\mu$ M (similar to those measured in Ni contaminated lakes; Table 1) while varying ambient pH from 5.2 to 7.2. To maintain [Ni<sup>2+</sup>] (and those of Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Zn<sup>2+</sup>) constant in the face of changing pH, we used output from the speciation program MINEQL+ (version 4.5, 1998, Environmental Research Software, ME, USA) to determine appropriate total metal concentrations to be used at each pH.

Larvae for this experiment were collected in October 2008, using an Ekman grab, in Lake Bédard, Quebec ( $47^{\circ}16'$  N,  $71^{\circ}07'$  W). They were then transported to the laboratory in lakewater, where fourth instar *C. punctipennis* were removed and held in Bristol culture medium (without Ni) on an 18:6 day:night cycle, at 15 °C, for a 1-day acclimation period. Under these conditions, larvae (12 individuals; n = 5 per pH) were exposed to Ni in acid-washed 500 mL HDPE containers filled with 400 mL of modified Bristol medium (*27*) to which sufficient Ni had been added to attain a [Ni<sup>2+</sup>] of 1.6  $\mu$ M.

The exposure medium was prepared 24 h in advance to allow time for chemical equilibration and pH was adjusted using NaOH (1 M) and maintained constant by adding a pH buffer to the medium (10 mM 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS), pKa 7.2). The pH buffer used is reported to have a negligible influence on Ni speciation (*26*). Daily pH measurements confirmed that pH remained constant. Knowing that water is the major source of Ni for *Chaoborus* larvae (*27*) and that larvae can survive for months without food (Hare, unpublished data), we did not feed larvae during the 4-day exposure period. After exposure, larvae were removed and held for 45 min (as determined in a preliminary experiment, data not shown) in Ni-free Bristol medium containing 0.1 mM EDTA to remove surface-sorbed Ni. Larvae were then rinsed for 1 minute in fresh Ni-free Bristol medium and placed on acid-washed, preweighed Teflon sheeting in acid-washed microcentrifuge tubes and frozen at -80 °C until drying, digestion and Ni-analysis (see above).

#### **Results and Discussion**

Nickel concentrations in *Chaoborus* species varied widely among lakes (Table 1), suggesting that this insect is unable to regulate its concentrations of this metal. This trend contrasts with those reported for the essential metals copper (Cu) and zinc (Zn), whose concentrations vary little in *Chaoborus* inhabiting lakes in which  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  concentrations vary by several orders of magnitude (9, 11). Our data suggest either that Ni is not essential for this insect, although it is reported to be for some animals (10), or that it is essential for *Chaoborus* larvae and they control their concentrations of internally bioavailable Ni by means such as storage in granules or binding to proteins (8, 27, 28).

Wide variations in *Chaoborus* Ni concentrations represent the first prerequisite for using this insect as a biomonitor for bioavailable Ni concentrations in lakes.

Total dissolved Ni concentrations in lakewater also varied widely among our study lakes (Table 1), with those of lakes located near the Sudbury Ni-smelters being up to 200 times higher than those of lakes located near the copper smelter in Rouyn-Noranda (Lakes Marlon and Opasatica). Overall, these data suggest that, in spite of efforts to reduce atmospheric metal inputs to the Sudbury-area lakes (2), many of them remain highly contaminated and thus there is a potential for toxic effects on aquatic organisms.

Lake	Location	2.	Wate	er chem	istry			[Ni] in Cha	oborus larvae	
		pН	[DOC] (mg L <sup>-1</sup> )	[Mg] (µM)	[Ca] (µM)	[Ni] (µM)	<i>C. punctipennis</i> (nmol g <sup>-1</sup> )	<i>C. albatus</i> (nmol g <sup>-1</sup> )	<i>C. flavicans</i> (nmol g <sup>-1</sup> )	C. americanus (nmol g <sup>-1</sup> )
Bibby	46°22'N, 80°58'W	6.8	4.4	45	69	0.99	$20.8\pm1.9$		$19.6\pm3.2$	
Chief	46°21'N, 81°01'W	5.6	2.1	22	40	1.16	$17.7\pm7.0$			
Clearwater	46°22'N, 81°03'W	6.2	2.4	43	109	1.12	$29.4\pm2.2$			
Crooked	46°22'N, 81°02'W	6.4	3.7	48	71	2.11	$50.0\pm7.5$		$31.9\pm 8.4$	
Crowley	46°23'N, 80°59'W	6.3	3.2	31	58	0.87	$25.3 \pm 5.3$			
Hannah	46°26'N, 81°02'W	7.4	3.7	151	265	2.11	$49.4\pm5.0$			
Laurentian	46°27'N, 80°56'W	6.7	4.5	63	105	0.72		$9.0\pm1.8$		
Marlon	48°16'N, 79°04'W	7.1	8.4	58	160	0.01	$0.03\pm0.7\text{*}$	$1.5\pm1.0{*}$		
McFarlane	46°25'N, 80°57'W	7.8	4.2	209	401	0.89	$25.1\pm2.5$		$28.9\pm 3.5$	
Opasatica	48°08'N, 79°20'W	7.5	5.7	115	213	0.01	$0.6\pm0.5{}^{\boldsymbol{*}}$		$0.3\pm0.4\text{*}$	
Pine	46°22'N, 81°02'W	4.7	0.9	17	33	1.68		$15.3\pm1.8$		$9.5 \pm 4.4$
Raft	46°24'N, 80°57'W	6.8	2.4	45	81	1.05	$27.7\pm3.3$		$32.9\pm9.3$	
Silver	46°22'N, 81°03'W	5.9	2.7	117	194	1.59	$38.1 \pm 4.7$		$21.2\pm2.8$	
Swan	46°21'N, 81°03'W	5.9	2.1	22	71	1.10	$32.8\pm4.7$			$11.9\pm4.7$
Tilton	46°22'N, 81°04'W	6.6	2.3	40	89	0.68	$16.1\pm5.6$		$15.3\pm3.7$	
Max./min.		433 <sup>#</sup>	9.3	12.3	12.2	211	58.8 <sup>&amp;</sup>	18.0 <sup>&amp;</sup>	38.7 <sup>&amp;</sup>	1.3 <sup>&amp;</sup>

**TABLE 1.** Locations, water chemistry and mean ( $\pm$  SD, n = 3-8) nickel concentrations in larvae of four *Chaoborus* species (nmol g<sup>-1</sup> dry weight) collected from 15 lakes located in the vicinity of two Canadian metal smelters.

\* below the calculated detection limit of 1.7 nmol g<sup>-1</sup>. # calculated on the basis of [H<sup>+</sup>]. \* for values below the detection limit, we assumed a [Ni] of 0.85 nmol g<sup>-1</sup>

We compared Ni concentrations in *Chaoborus* to those in lakewater to determine if the two were correlated, which would provide strong evidence that this insect has potential as a Ni biomonitor. We combined our data for *C. punctipennis* and *C. albatus* because they are sister species in the same subgenus (*Sayomyia*; *17*) that are so similar in size and morphology as to be confounded in some studies (Norman Yan, York University, Toronto, personal communication). Likewise, these two species take up and lose cadmium (Cd) at a similar rate (*15*), and thus Ni accumulation in these species might also be similar. The other *Chaoborus* species that we collected, *C. (Chaoborus) flavicans* and *C. (Chaoborus) americanus*, belong to a different sub-genus, are larger in size and are reported to differ somewhat from the two smaller species in their accumulation of Cd (*15*).



**Figure 1.** Relationships between mean ( $\pm$  SD; n = 4-8) Ni concentrations (nmol g<sup>-1</sup> dry weight) in *Chaoborus* larvae (combined data for the sister species *C. (Sayomyia) punctipennis* and *C. (Sayomyia) albatus*) and (A) mean ( $\pm$  SD; n = 3) total dissolved Ni concentrations in lakewater, (B) mean ( $\pm$  SD; n = 3) estimated free Ni<sup>2+</sup> ion concentrations ([Ni<sup>2+</sup>]) in lakewater, and (C) [Ni<sup>2+</sup>] in lakewater considering the influence of hydrogen ions ([H<sup>+</sup>]) at biological uptake sites for Ni (as described by equation 2). The values ( $\pm$  SE) of the slope (F<sub>H</sub> in equation 2) and the *y*-intercept of the regression in panel C are 229  $\pm$  69 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0.005) and 0.8  $\pm$  2.0 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0.009).

Concentrations of total dissolved Ni in lakewater were significantly correlated with Ni concentrations in the *Chaoborus (Sayomyia)* species (Figure 1A;  $r^2 = 0.78$ ; p < 0.001). In theory, this correlation should be even stronger if we consider concentrations of the free Ni<sup>2+</sup> ion because, according to the precepts of the free ion activity model (FIAM; *29*, *30*) and its "offspring" the Biotic Ligand Model (BLM; *31*), metal accumulation by animals should be better predicted by the concentration of the free metal ion than by total dissolved metal concentrations. In the case of our data set, the strength of the correlation between Ni concentrations in *Chaoborus* and [Ni<sup>2+</sup>], albeit highly significant (Figure 1B;  $r^2 = 0.62$ ; p < 0.001), is somewhat lower than that for total dissolved Ni (Figure 1A). We wondered if this reduction could be explained by the assumptions used in estimating [Ni<sup>2+</sup>] (see Materials and Methods). For example, Van Laer *et al. (26)* have suggested that only 40% of fulvic acids are active in binding Ni and that Ni binding to humic acids is negligible. Making such changes did not increase the strength of the relationship between Ni concentrations in *Chaoborus* species and [Ni<sup>2+</sup>] ( $r^2$  values declined from 0.62 to 0.53).

That total dissolved Ni concentrations predict *Chaoborus* Ni concentrations so well is explained by the fact that the majority (57 to 90%, mean ( $\pm$ SD) 67  $\pm$  13 %; Supplementary Table 1) of the dissolved Ni in the Sudbury area lakes is present as Ni<sup>2+</sup>. Thus total dissolved [Ni] and [Ni<sup>2+</sup>] are highly correlated ( $r^2 = 0.94$ , p < 0.001; linear regression not shown). The somewhat weaker correlation obtained using [Ni<sup>2+</sup>] is likely due to an apparent outlier, Pine Lake, which is the most acidic lake (pH 4.7) that we sampled (Table 1); fully 90% of the dissolved Ni in this lake is present as Ni<sup>2+</sup>.

Pine Lake is also clearly an outlier because the two *Chaoborus* species collected from this lake accumulate less Ni than might be expected from the high  $[Ni^{2+}]$  in lakewater (Figure 1A,B; Table 1). This fact could be explained by assuming that another ion inhibits Ni entry at Ni-uptake sites on organisms in this lake. Several investigators have reported that acidity can protect organisms from metal contamination (*31-36*). Indeed, *Chaoborus* larvae are reported to accumulate little Cd in highly acidic, Cdcontaminated lakes in spite of the high  $[Cd^{2+}]$  in such lakes (*6*, *8*, *9*, *11*). Hare and Tessier (*8*, *9*) showed that the competitive influence of H<sup>+</sup> at Cd uptake sites on organisms can be accounted for using the mechanistic model

$$[Cd]_{organism} = F_{H} \frac{[Cd^{2+}]}{[H^{+}] + K_{a}}$$
(1)

where  $[Cd]_{organism}$  represents the concentration of Cd in an organism,  $F_H$  is a proportionality constant and  $K_a$  is a pseudoequilibrium affinity constant for the reaction between H<sup>+</sup> and Cd-uptake sites on biological membranes. Using the approach described by Hare and Tessier (8, 9), equation 1 can be rewritten to describe [Ni] in *Chaoborus* as follows:

$$[Ni]_{Chaoborus} = F_{H} \frac{[Ni^{2+}]}{[H^{+}] + K_{a}}$$
(2)

where the values of  $F_H$  and  $K_a$  are specific to Ni. Using this approach, highly acidic Pine Lake moves close to the regression line and the correlation between  $[Ni]_{Chaoborus}$  and  $[Ni^{2+}]$  is strengthened ( $r^2 = 0.93$ , p < 0.001; Figure 1C). Other lakes of low pH also move somewhat towards the regression line. We tested several other ions ( $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) as possible inhibitors of Ni entry at biological uptake sites (using the approach described in *11*), however, only  $Cu^{2+}$  substantially improved the correlation ( $r^2$  = 0.88; p < 0.001), albeit less than H<sup>+</sup> ( $r^2 = 0.93$ ). Although results of a recent study (37) suggest that Ni concentrations in an aquatic invertebrate (*Daphnia magna*) do decline slightly (by 7%) when dissolved Cu concentrations are increased by a factor of 10, these results are difficult to interpret because chemical speciation was not considered and because dissolved [Ni] were extremely high (100  $\mu$ M or ~50 times that of the most contaminated lake in our study).

To demonstrate unambiguously the inhibitory influence of H<sup>+</sup> ions on Ni accumulation by *Chaoborus*, we measured Ni uptake by final instar *C. punctipennis* larvae in the laboratory over a pH range of 5.2 to 7.2 but at a constant [Ni<sup>2+</sup>] of 1.6  $\mu$ M, which is close to that measured in Pine Lake (1.52 ± 0.02 (SD)  $\mu$ M). Our results (Figure 2) indicate that there is indeed a competitive interaction between Ni<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> such that Ni bioaccumulation is reduced at low pH. The realism of our laboratory results is supported by the fact that there is no significant difference (ANOVA; *p* > 0.05) between mean Ni concentrations in *C. punctipennis* exposed to Ni at pH 5 to 6 in the laboratory and those in *C. albatus* collected at pH 4.7 in Pine Lake (Figure 2).



**Figure 2.** Mean ( $\pm$  SD; n = 5) Ni concentrations (nmol g<sup>-1</sup> dry weight) in *Chaoborus punctipennis* larvae exposed to a constant [Ni<sup>2+</sup>] of 1.6  $\mu$ M at five different pHs (open symbols). Also shown, for comparative purposes, are the corresponding values for *Chaoborus albatus* from Pine Lake (closed symbol). Different letters represent statistically significant differences among treatment levels (ANOVA followed by a pairwise Tukey test; p < 0.05).

The fact that larvae of *C. punctipennis* larvae readily accumulated Ni when exposed to this metal in water alone is consistent with the results of experiments showing that *Chaoborus flavicans* larvae take up the majority of their Ni from water (*27*). However, because some of their Ni comes from the zooplankton that they consume as food (~30%; *27*),  $H^+$ -Ni<sup>2+</sup> competition on organisms in the food chain leading to *Chaoborus* likely also explains in part the reduced Ni accumulation by this predator in highly acidic lakes. Indeed, reduced Cd accumulation by *Chaoborus* in highly acidic lakes can be wholly explained by  $H^+$ -Cd<sup>2+</sup> competition for Cd-uptake sites on organisms at lower trophic

levels (*38*) since *Chaoborus* larvae take up all of their Cd from prey (*39*). It can be hypothesized that as Ni-rich, acidic lakes recover, Ni concentrations in animals could actually increase as pH levels rise and [Ni<sup>2+</sup>] decline; this phenomenon has been reported for [Cd] in lakewater and *Chaoborus* larvae living in Sudbury area lakes (*3*).

To determine if we can use *Chaoborus* larvae as Ni biomonitors without identifying them to the species level, we combined our Ni data for four *Chaoborus* species (Table 1). Nickel concentrations in these species correlated well (Figure 3; p < 0.001) with those of Ni<sup>2+</sup> (corrected for Ni<sup>2+</sup>-H<sup>+</sup> competition), whether the species were considered separately ( $r^2 = 0.75$ ; linear regression not shown) or if mean values for the genus were calculated for each lake ( $r^2 = 0.90$ ; Figure 3). These results suggest that *Chaoborus* larvae can be used as a Ni biomonitor without identifying them to species.



**Figure 3.** Relationship between Ni concentrations (nmol g<sup>-1</sup> dry weight) in larvae of four *Chaoborus* species (*C. albatus, C. americanus, C. flavicans* and *C. punctipennis*) and  $[Ni^{2+}]$  in lakewater taking into account the influence of hydrogen ions (H<sup>+</sup>) at biological uptake sites for Ni (as described by equation 2). For lakes containing more than one species, values are means ( $\pm$  SD; n = 5-13) of all *Chaoborus* samples. The values ( $\pm$  SE) of the slope (F<sub>H</sub> in eq. 2) and the *y*-intercept of the regression are 125  $\pm$  39 nmol g<sup>-1</sup> (p = 0.006) and 2.2  $\pm$  2.0 (p = 0.3) nmol g<sup>-1</sup>, respectively, whereas K<sub>a</sub> is 3.37  $\pm$  1.17 µmol L<sup>-1</sup> (estimated by least squares analysis; p = 0.013).

Overall, our results suggest that the model we tested provides a means of using measurements of Ni in *Chaoborus* larvae to estimate free Ni<sup>2+</sup> ion concentrations in lakewater without having recourse to more onerous chemical analyses of lakewater (other than measurements of pH) and chemical speciation models. Furthermore, we show that measurements of Ni in lakewater alone can be misleading since they would classify communities in highly acidic lakes as being at risk from Ni contamination whereas organisms in such lakes are in fact protected from Ni by  $H^+$  ions. We suggest that

measurements of Ni in *Chaoborus* larvae would provide a simple means of ranking lakes according to their <u>bioavailable</u> Ni concentrations, something that measurements in lakewater alone cannot necessarily provide. Since it is known that *Chaoborus* larvae are also an effective biomonitor for lakewater [Cd<sup>2+</sup>], our study adds to its range of use in areas contaminated by either or both of these trace metals.

#### Acknowledgements

Funding was provided by the Metals In The Human Environment–Strategic Network and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We thank C. Fortin and N. Belzile for their comments on the manuscript, the Cooperative Freshwater Ecology Unit at Laurentian University for their encouragement and assistance in the field, and M. Bordeleau, S. Duval, P. Fournier, J. Lacharité, L. Rancourt, R. Rodrigue, M. Rosabal-Rodríguez and V. Thomasson for their help in the laboratory and the field.

## **Literature Cited**

 USGS. *Mineral Resources, Mineral Commodity Summaries, Nickel*; U.S. Geological Survey: 2009;

http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/nickel/mcs-2009-nicke.pdf

(2) Gunn, J. M. Ed. Restoration and Recovery of an Industrial region. Progress in Restoring the Smelter-damaged Landscape near Sudbury, Canada, Springer-Verlag: New York, 1995.

- (3) 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.
- 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.
- Phillips, D. J. H.; Rainbow, P. S. *Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants*;
  Elsevier Applied Science: London, U.K., 1993.
- (6) Hare, L.; Tessier, A.; Croteau, M. N. A biomonitor for tracking changes in the availability of lakewater cadmium over space and time. *Human Ecol. Risk Assess.* 2008, *14*, 229-242.
- (7) Dumas, J.; Hare, L. The internal distribution of nickel and thallium in two freshwater invertebrates and its relevance to trophic transfer. Environ. Sci. Technol. 2008, 42, 5144-5149.
- (8) Hare, L.; Tessier, A. Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature* 1996, *380*, 430-432.
- (9) Hare, L.; Tessier, A. The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes. *Limnol. Oceanogr.* 1998, 43, 1850-1859.
- (10) Phipps, T.; Tank, S. L.; Wirtz, J.; Brewer, L.; Coyner, A.; Ortego, L. S.;
  Fairbrother, A. Essentiality of nickel and homeostatic mechanisms for its
  regulation in terrestrial organisms. *Environ. Rev.* 2002, *10*, 209–261.

- (11) 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.
- (12) Giguère, A.; Campbell, P. G. C.; Hare, L.; Cossu-Leguille, C. Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2005. *62*, 563-577.
- (13) 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.
- (14) Carter, J. C. H.; Kwik, J. K. Instar succession, vertical distribution, and interspecific competition among four species of *Chaoborus*. J. Fish. Res. Board Can. 1977, 34, 113-118.
- (15) Croteau, M. N.; Hare, L.; Tessier, A. Differences in Cd accumulation among species of the lake dwelling biomonitor *Chaoborus. Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2001, *58*, 1737-1746.
- (16) 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.
- (17) Saether, O. A. Nearctic and Palaearctic *Chaoborus* (Diptera: Chaoboridae). In *Das Zooplankton der Binnengewässer*; Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung: Stuttgart, Germany, 1972; pp 257-304.

- (18) Tipping, E. Humic ion-binding model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. *Aquat. Geochem.* 1998, 4, 3–48.
- (19) Martell, A. E.; Smith, R. M.; Motekaitis, R. J. NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database. U.S. Department of Commerce: Gaithersburg, MD, 2004.
- (20) Buffle, J. Complexation Reactions in Aquatic Systems: an Analytical Approach;Ellis Horwood Limited: Chichester, U.K., 1988.
- (21) Ritchie, J. D.; Perdue, M. E. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2003, 67, 85-96.
- (22) Belzile, N.; Joly, H. A.; Li, H. Characterization of humic substances extracted from Canadian lake sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1997**, *75*, 14-27.
- (23) Thurman, E. M. Organic Geochemistry of Natural Waters; Kluwer Academic Publishers Group: Lancaster, U.K., 1985.
- (24) Bryan, S. E.; Tipping, E.; Hamilton-Taylor, J. Comparison of measured and modelled copper binding by natural organic matter in freshwaters. *Comp. Biochem. Physiol.* 2002, *133*, 37-49.
- (25) Cheng, T.; De Schamphelaere, K.; Lofts, S.; Janssen C.; Allen, H. E. Measurement and computation of zinc binding to natural dissolved organic matter in European surface waters. *Anal. Chim. Acta* 2005, *542*, 230-239.

- (26) Van Laer, L.; Smolders, E.; Degryse, F.; Janssen, C.; De Schamphelaere, K. A. C. Speciation of nickel in surface waters measured with the Donnan membrane technique. *Anal. Chim. Acta* 2006, *578*, 195–202.
- (27) Ponton, D. E.; Hare, L. Nickel dynamics in the aquatic insect *Chaoborus. Aquat. Toxicol.* 2009, under review.
- (28) Lapointe, D.; Couture, P. Influence of the route of exposure on the accumulation and subcellular distribution of nickel and thallium in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2009, in press.
- (29) Morel, F. M. M. Principles of Aquatic Chemistry; John Wiley and Sons: New York, 1983.
- (30) Campbell, P. G. C. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free ion activity model. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*; Tessier, A., Turner, D. R., Eds.; IUPAC/John Wiley and Sons: New York, 1995; pp 45-97.
- (31) Paquin, P. R.; Gorsuch, J. W.; Apte, S.; Batley, G. E.; Bowles, K. C.; Campbell, P. G. C.; Delos, C. G.; Di Toro, D. M.; Dwyer, R. L.; Galvez, F.; Gensemer, R. W.; Goss, G. G.; Hogstrand, C.; Janssen, C. R.; McGeer, J. C.; Naddy, R. B.; Playle, R. C.; Santore, R. C.; Schneider, U.; Stubblefield, W. A.; Wood, C. M.; Wu, K. B. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 2002, *133*, 3-35.
- (32) Campbell, P. G. C.; Stokes, P. M. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1985**, *42*, 2034-2049.

- (33) Cusimano, R. F.; Brakkle, D. F.; Chapman, G. A. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1986**, *43*, 1497-1503.
- (34) Deleebeeck, N. M. E.; De Schamphelaere, K. A. C.; Heijerick, D. G.; Bossuyt, B. T. A.; Janssen, C. R. The acute toxicity of nickel to *Daphnia magna*: predictive capacity of bioavailability models in artificial and natural waters. *Ecotox. Environ. Safety* 2008, *70*, 67-78.
- (35) Deleebeeck, N. M. E.; De Schamphelaere, K. A. C.; Janssen, C. R. A bioavailability model predicting the toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*) in synthetic and natural waters. *Ecotox. Environ. Safety* 2007, 67, 1-13.
- (36) Deleebeeck, N. M. E.; De Schamphelaere, K. A. C.; Janssen, C. R. Effects of Mg<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> on the toxicity of Ni<sup>2+</sup> to the unicellular green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Model development and validation with surface waters. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 1901-1914.
- (37) Komjarova, I.; Blust, R. Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea *Daphnia magna*, a stable isotope experiment. *Aquat. Toxicol.* 2008. 90, 138-144
- (38) Orvoine, J.; Hare, L.; Tessier, A. Competition between protons and cadmium ions in the planktonic food chain leading to the phantom midge *Chaoborus*. *Limnol*. *Oceanogr.* 2006, *51*, 1013-1020.
- (39) Munger, C.; Hare, L.; Tessier, A. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in nature. *Limnol. Oceanogr.* 1999, 44, 1763-1771.

# NICKEL DYNAMICS IN THE LAKEWATER BIOMONITOR CHAOBORUS

Dominic E. Ponton and Landis Hare\*

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

Please cite this article in press as

Ponton, D.E., Hare, L. **2009** Nickel dynamics in the lakewater metal biomonitor *Chaoborus. Aquatic Toxicology*, doi:10.1016/j.aquatox.2009.09.011

**Keywords:** Nickel; Assimilation Efficiency; Subcellular Partitioning; Metal; Biodynamic model; Food chain.

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

#### Résumé

Le nickel (Ni) est un contaminant répandu qui peut être présent en concentrations toxiques dans les plans d'eau près d'opérations minières et des fonderies. Pourtant, son accumulation par les animaux aquatiques a été peu étudiée et peu de biomoniteurs sont connus pour évaluer la contamination par ce métal. Récemment, la larve de l'insecte Chaoborus a été démontré comme un biomoniteur efficace de la contamination en Ni dans les lacs. Puisque les animaux sont plus efficaces comme biomoniteur lorsque les sources de contamination (eau ou nourriture) et les taux d'entré et de sortie de métal sont connus, nous avons évalué ces paramètres pour Chaoborus. Pour y arriver, nous avons exposé les membres d'une chaîne alimentaire planctonique (algue verte, cladocère et Chaoborus) à des concentrations réalistes de Ni. Nous avons découvert qu'environ 65% du Ni entrant chez Chaoborus flavicans provenait de l'eau et le reste de sa proie, Daphnia magna. Ce résultat est concordant avec la faible moyenne d'efficacité assimilation de Ni (14%) de Chaoborus flavicans pour le Ni de sa proie. Afin d'expliquer cette faible efficacité d'assimilation, nous avons mesuré, par fractionnement subcellulaire, où le Ni était situé dans les cellules de Daphnia magna. Les résultats démontrent qu'environ 55% du Ni chez la proie étaient disponibles pour l'assimilation et que cette dernière était atteinte seulement si Chaoborus flavicans mangeait peu, principalement parce que le taux de passage des proies dans le tractus digestif était plus lent et permettait une assimilation plus efficace. Nous avons, de plus, mesuré le taux d'entré de Ni par l'eau et le taux de sortie physiologique de Ni. Ces paramètres nous ont permis de décrire, à l'aide d'un modèle de bioaccumulation déterministe, les échanges de Ni entre la larve et son environnement. Par l'utilisation des constantes estimées et des

mesures provenant d'une dizaine de lac canadiens, nous avons pu estimer les concentrations de Ni chez les populations de larves de *Chaoborus* en milieu naturel. Les estimés ont été surévalués par un facteur quatre et cette différence peu principalement être expliquée par une incertitude de l'estimation de la constante de taux d'entré par l'eau et par le manque de mesures fiables de concentrations de Ni dans les proies spécifiques de *Chaoborus* en nature.

## Abstract

Nickel (Ni) is a widespread contaminant present at toxic concentrations in aquatic systems in the vicinity of some mining and smelting operations. However, its accumulation by aquatic animals has been little studied and there are few biomonitors for this metal. Recently, larvae of the aquatic insect *Chaoborus* were shown to be effective as biomonitors for Ni concentrations in lakewater. Since animals are more effective as biomonitors when we understand how they take up their contaminants (from water or from food) and the rate at which they exchange contaminants with their surroundings, we set out to measure these parameters for *Chaoborus*. To achieve these goals, we exposed the components of a laboratory food chain (green alga, cladoceran, *Chaoborus*) to realistic Ni concentrations. We found that the majority ( $\approx 65\%$ ) of the Ni taken up by Chaoborus flavicans comes from lakewater, with the remainder coming from its planktonic prey (*Daphnia magna*). This result is consistent with the low mean efficiency (14%) with which C. flavicans assimilated Ni from its prey. To explain the low efficiency of Ni uptake from food we measured the subcellular distribution of Ni in prey, which predicted that the majority of the Ni in prey ( $\approx$ 55%) was available for assimilation by the predator. This potential Ni-uptake efficiency was only reached in animals that ingested

few prey, likely because their gut passage time was longer than those ingesting many prey. We also measured Ni uptake and loss by *C. flavicans* exposed to Ni in water then used these data to parameterize a mechanistic bioaccumulation model that allowed us to describe Ni exchange between this insect and water. Lastly, we used these model constants, along with field measurements of Ni in 10 Canadian lakes, to predict Ni concentrations in field populations of *Chaoborus*. Model predictions overestimated Ni concentrations in field populations by a factor of 4. We suggest that uncertainties in the rate constant for Ni uptake from water and a lack of measured Ni concentrations in the prey eaten by *Chaoborus* larvae in the field could explain this difference.

#### 1. Introduction

Nickel (Ni) has many industrial and domestic applications, but it's mining, processing and use can lead to the contamination of aquatic and terrestrial environments (Chau and Kulikovsky-Cordeiro, 1995; Mukherjee, 1998). Indeed, toxic effects on aquatic organisms living near one of the world's major metal smelting sites (Sudbury, Ontario; Gunn, 1995) are reported to be a consequence of elevated Ni concentrations in their environment (Borgmann et al., 2001). Thus evaluating Ni availability to such organisms is a priority. However, using metal measurements in sediments or water alone can be problematic because they do not consider the availability of these contaminants to organisms. In this regard, metal measurements in animals are often more useful because they integrate the chemical, biological and trophic aspects of a given system (Phillips and Rainbow, 1993; Hare et al., 2008).

A small number of invertebrates have been tested as biomonitors of Ni contamination in marine (Widdows, 1985; Gibb et al., 1996) and freshwater (Tochimoto et al., 2003) systems. Recently, the phantom midge *Chaoborus* was added to this list (Ponton and Hare, 2009). Larvae of this insect are found in lakes worldwide, where they often bury themselves in sediment during the day, to avoid fish predation, and then migrate into the water column at night where they are predators of small planktonic invertebrates such as cladocerans, copepods and rotifers (Hare and Carter, 1987; Croteau et al. 2003a,b). Because *Chaoborus* incarnates many of the characteristics of a good biomonitor (widespread, abundant, easily collected and tolerant to the contaminants that it accumulates), it has been proposed as a biomonitor for estimating free Cd<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> ion concentrations in lakewater (Hare et al., 2008; Ponton and Hare, 2009).

Biomonitors are used most effectively when the means and the rate at which they exchange contaminants are known. For example, if an animal accumulates a metal mainly from food then its metal concentrations will likely be influenced by the abundance and type of food available to it. Likewise, an animal that exchanges metals slowly with its surroundings would not likely be a good biomonitor of short-term changes in ambient metal concentrations.

With these factors in mind, we set out to measure Ni uptake and loss by *Chaoborus* larvae since nothing is known about how Ni enters this predator (via water or its prey) or the rate at which this insect exchanges Ni with its surroundings. We measured Ni uptake from both water and food, the efficiency with which this predator assimilates Ni from its prey, and Ni efflux from this insect. We then used this information in a biodynamic model to predict Ni concentrations in larvae exposed to this metal in both the laboratory and the field. Since there is little information on Ni bioaccumulation in general, our results for this aquatic insect should aid in understanding how aquatic invertebrates interact with this environmentally important trace metal.

#### 2. Methods

To describe and explain Ni accumulation by the biomonitor *Chaoborus*, we created a planktonic food chain consisting of the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, the herbivore *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) and the predator *Chaoborus flavicans* (Insecta, Chaoboridae). We used realistic exposure concentrations of 50 or 300 nmol L<sup>-1</sup> free Ni ion ( $[Ni^{2+}]$ ); these values are lower than those measured in many Ni-contaminated lakes (up to 2,000 nmol L<sup>-1</sup> total dissolved Ni; Ponton and Hare, 2009). Free Ni ion concentrations were estimated using the speciation program MINEQL+ (version 4.5,

1998, Environmental Research Software, ME, USA). All Ni-exposure media were prepared 1 day in advance to allow them time to reach equilibrium and pH was adjusted using NaOH (1 M) and maintained constant by adding a pH buffer to the medium (10 mM MOPS, 3-morpholinopropanesulfonic acid; p*K*a 7.2). Daily pH measurements confirmed that pH remained constant, and MOPS buffer is reported to have a negligible influence on Ni speciation (Van Laer et al., 2006).

## 2.1. Nickel exposure: algae

Stock cultures of the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* were maintained in Bristol culture medium (Table 1) at 20 °C under "cool white" fluorescent lights (100  $\mu$ E m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) on a 16/8 day/night cycle. Air was bubbled continuously into the algal cultures to maintain cells in suspension and to ensure an adequate supply of CO<sub>2</sub>. Contaminated algae to be used as food for *D. magna* were cultured in Bristol medium (Table 1) having a [Ni<sup>2+</sup>] of 50 nmol L<sup>-1</sup> that was held in polycarbonate Erlenmeyer flasks under the same light and temperature regimes used for the stock cultures. Six samples of algae were taken for Ni-analysis. Each 40-mL algal sample was centrifuged at 10,000 x g for 10 min, then the supernatant was removed and the pellet was centrifuged a second time with Ni-free 0.1 mM EDTA (to remove both the Ni-contaminated culture medium and Ni adsorbed on the algae), followed by a final centrifugation in Ni-free Bristol medium. Pellets were placed in acid-washed preweighed high-density polyethylene (HDPE) bottles and frozen at -80 °C until drying, digestion and Ni-analysis.

Macronutrient	Concentration (total dissolved; mol L <sup>-1</sup> )	Trace metal	Concentration (free ion; mol $L^{-1}$ )
В	9.2×10 <sup>-5</sup>	Co <sup>2+</sup>	1×10 <sup>-12</sup>
Ca	4.7×10 <sup>-4</sup>	Cu <sup>2+</sup>	1×10 <sup>-13</sup>
Cl	2.5×10 <sup>-3</sup>	Fe <sup>3+</sup>	1×10 <sup>-19</sup>
$CO_3$	2.0×10 <sup>-4</sup>	$Mn^{2+}$	1×10 <sup>-09</sup>
K	1.3×10 <sup>-3</sup>	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	$1 \times 10^{-07}$
Mg	2.1×10 <sup>-4</sup>	$Zn^{2+}$	1×10 <sup>-10</sup>
Na	1.6×10 <sup>-3</sup>		
$NO_3$	1.5×10 <sup>-3</sup>		
$PO_4$	7.0×10 <sup>-9</sup>		
SO <sub>4</sub>	$3.7 \times 10^{-4}$		

**Table 1.** Total macronutrient concentrations and trace metal (free ion) concentrations (calculated using MINEQL+) in the modified Bristol medium used in our experiments. The metal buffer EDTA and the pH buffer MOPS were also present in the medium.

## 2.2. Nickel exposure: the herbivore Daphnia magna

*Daphnia magna* was cultured at 20 °C in artificial lakewater containing M4 medium as a supplement (Elendt and Bias 1990), at a hardness of 150 mg/L (CaCO<sub>3</sub> equivalence), and fed the green alga *P. subcapitata* (see 2.1.). Juvenile *D. magna* to be used as Ni-contaminated prey for *Chaoborus* were removed from the rearing aquaria and held for 1 day in HDPE containers filled with Ni-contaminated ( $[Ni^{2+}] = 50 \text{ nmol L}^{-1}$ ) water (Table 1) where they were fed Ni-rich algae in excess (see 2.1.; the mean (± SD; *n* = 6) [Ni] in algae was 2140 ± 60 nmol g<sup>-1</sup>). This exposure time allowed juvenile *D. magna* ample time to reach a steady state in their Ni concentrations (steady state is reached in ~6 hours; D.E. Ponton, unpublished data). Nickel contaminated *D. magna* (2-5 days old) to be offered daily as prey to *Chaoborus* were first held in Ni-free Bristol medium (Table 1) and offered Ni-free *P. subcapitata* for 30 min to remove Nicontaminated gut contents and Ni adsorbed on the body surface. To measure the Ni content of *D. magna*, 2-3 samples (each comprising 15-30 individuals) were placed on acid-washed, pre-weighed, Teflon sheeting in acid-washed microcentrifuge tubes and frozen at -80 °C for later Ni-analysis.

#### 2.3. Ni distribution in the cells of Daphnia magna

To estimate the proportion of Ni in *D. magna* that is potentially available for transfer to *Chaoborus*, we held Ni-contaminated *D. magna* (see 2.2.) for 3 hours in Ni-free water (Table 1) and with Ni-free food (*P. subcapitata*) to remove both Ni-rich gut contents and Ni adsorbed on the body surface. These depurated prey ( $\approx$ 50 pooled individuals per sample; *n* = 10) were placed in acid-washed, pre-weighed 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes, weighed, placed on ice and homogenized in physiological buffer (25 mM TRIS; pH 7.4) (1:3 tissue to buffer, w/v ratio) using a Pellet Pestle (Kontes) for 2 seconds, at 30 second intervals, over a period of 5 min.

To measure metal concentrations in whole animals, aliquots of the homogenate were placed in pre-weighed 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes and frozen at -80 °C. Remaining homogenates were centrifuged three times at 800 x g. Following each centrifugation, the supernatant was removed and the pellet was diluted again with physiological buffer at a tissue to buffer ratio of 1 to 2. The 3 supernatants were combined into pre-weighed 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes (final tissue to buffer ratio of 1 to 7). These samples were then subjected to a centrifugation, digestion and heat-treatment protocol (Wallace et al., 2003 modified slightly according to Dumas and Hare, 2008) that gave the following operationally defined subcellular fractions: cellular debris (includes membranes and unbroken cells), granules (and other NaOH

resistant particles), organelles (microsomes, lysosomes and mitochondria), heatdenatured proteins (HDP; includes enzymes) and heat-stable proteins (HSP; includes metallothionein, MT). The organelles fraction was further separated, by centrifugation, into a mitochondrial fraction and one containing other organelles (Giguère et al., 2006). By comparing metal burdens in aliquots of the homogenate to the sum of those measured in the various fractions, we determined that metal losses during the fractionation procedure were negligible (mean ( $\pm$  SD) recovery was 120  $\pm$  28%). The 50,000 and 100,000 x g centrifugations were carried out using a Beckman TL-100 centrifuge with a TLA-100.3 rotor, whereas all other centrifugations involved the use of a Thermo IEC Micromax. Supernatants were weighed, acidified and held at 4 °C until analysis. Pellets were frozen at -80 °C for later analysis.

## 2.4. Chaoborus collection

*Chaoborus* larvae were collected, at night, in July and October 2008, from uncontaminated Lake Bédard, Quebec (47°16' N, 71°07' W) by hauling a 164 µm meshaperture plankton net horizontally in the water column. Samples were held in clean plastic bags filled with lakewater and maintained at field temperature for transportation to the laboratory where final (fourth) instars (Carter and Kwik, 1977) of the common Holarctic species *Chaoborus flavicans* (Saether, 1972) were removed and placed in Nifree Bristol medium (Table 1) under a 18/6 day/night cycle, at 15 °C, for a 1 day acclimation period.

## 2.5. Water and food as Ni sources for Chaoborus

*Chaoborus flavicans* larvae were exposed to one of 4 treatment levels over 4 days, that is, either Ni in food only (F; Ni-contaminated *D. magna* and Ni-free water), Ni in

water only (W: Ni-contaminated water without D. magna; Chaoborus larvae can survive for months without food (Hare, unpublished data)), both Ni-contaminated D. magna and water (FW), or a control (C; Ni-free D. magna and water). Mean (± SD) Ni concentrations in Ni-exposed D. magna were  $226 \pm 43$  nmol Ni g<sup>-1</sup> (n = 9). Larvae were held individually (n = 12 per treatment level) in acid-washed HDPE containers filled with  $\approx$ 100 mL of Bristol medium (Table 1) and offered 5 to 10 juvenile *D. magna* per day, which is close to the mean ( $\pm$  SD) ingestion rate for C. *flavicans* larvae as measured in a preliminary experiment ( $11 \pm 2$  D. magna per C. flavicans per day). Each day, uneaten prey and the exoskeletons of prey that had been egested by the predator were removed and counted to determine the ingestion rate of each C. flavicans larva. To prevent Ni contamination of water in the food-only treatment level and to keep [Ni<sup>2+</sup>] constant in the two treatments levels that included Ni-contaminated water, we changed 9/10 of the water in each container daily. After the 4-day exposure period, Chaoborus larvae were held for 1 day in Ni-free Bristol medium (to remove Ni adsorbed on the body surface) and fed uncontaminated prey (to eliminate Ni-contaminated gut contents). The length of the depuration period was chosen on the basis of visual observations of the gut passage time of colored prey (C. dubia) in Chaoborus punctipennis larvae (Munger and Hare, 1997). Depurated larvae were placed individually on acid-washed, preweighed Teflon pieces in acid-washed 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes and frozen at -80 °C until analysis. Larval mortality during the experiment (F = 2; W = 1; FW = 1; C = 3) cannot be ascribed to Ni exposure.

# 2.6. Determination of rate constants for Ni uptake and loss

To estimate the rate constant for Ni uptake, we exposed *C. flavicans* larvae in groups of 4 to Ni-contaminated ( $[Ni^{2+}] = 300 \text{ nmol L}^{-1}$ ) Bristol medium (Table 1) in acidwashed, 100 mL, HDPE containers held at 15 °C for 8 days. To measure Ni-efflux, larvae contaminated for the 8-day period were transferred to Ni-free water for a further 8 days. To keep [Ni] in water constant, we changed 9/10 of the water every second day. On days 1, 2, 4, 6 and 8 of the influx experiment and days 9, 10, 12, 14 and 16 of the efflux experiment we removed the larvae from 4 containers and held them for 45 min in Ni-free Bristol medium containing 0.1 mM EDTA to remove Ni adsorbed on the body surface (a preliminary experiment revealed that 45 min was sufficient). Larvae were then rinsed for 1 min in Ni-free water, placed in groups of 4 on acid-washed, preweighed Teflon sheeting, held in acid-washed microcentrifuge tubes, and frozen at -80 °C. Larvae were not fed during this experiment.

#### 2.7. Nickel analyses

Organisms and pellets were freeze-dried (FTS Systems), weighed and then placed in acid washed HDPE bottles where they were digested for 2 days in nitric acid (Optima grade; 100  $\mu$ L mg<sup>-1</sup> dry weight) followed by 1 day in hydrogen peroxide (Trace Select Ultra grade; 40  $\mu$ L mg<sup>-1</sup> organisms); digestate volume was completed to 1 mL mg<sup>-1</sup> organism using ultra pure water (Milli-Q system water; > 18 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>). Certified reference material (lobster hepatopancreas; National Research Council of Canada, TORT-2) was submitted to the same digestion procedures and Ni concentrations in this reference material were within the certified range. Nickel concentrations in organisms were measured using Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (Thermo

Elemental X Series). The mean ( $\pm$  SD) Ni concentration in procedural blanks ( $1.3 \pm 0.5$  nmol g<sup>-1</sup>) was the same as that in control *C. flavicans* larvae ( $1.3 \pm 0.9$  nmol g<sup>-1</sup>). We corrected for Ca interference on Ni measurements in samples of the crustacean *D. magna* by using a Ca-Ni curve.

### 2.8. Data analyses

Experimental means were compared by ANOVA and post-hoc Tukey tests (subsequent to verification of assumptions of normality). Variations around mean experimental measurements are reported as standard deviations (SD) unless specified. Model rate constants were obtained by least squares optimization.

# 2.9. Modeling Ni dynamics in Chaoborus

Knowing that water and prey are potential sources of Ni for *Chaoborus* larvae, and that their contribution to larval Ni concentrations is likely to be additive, we can use the following equation (Thomann, 1981; Munger et al., 1999) to describe the rate at which Ni concentrations in this insect change over time:

$$\frac{d[\text{Ni}]_{Chaoborus}}{dt} = k_{uw}[\text{Ni}^{2+}] + \text{AE} \cdot \text{IR} \cdot [\text{Ni}]_{\text{prey}} - k_e[\text{Ni}]_{Chaoborus} - k_g[\text{Ni}]_{Chaoborus}$$
(1)  
(uptake-water) (uptake-food) (Ni-efflux) (growth dilution)

where  $[Ni]_{Chaoborus}$  (nmol g<sup>-1</sup> dry weight) is the Ni concentration in *Chaoborus*;  $k_{uw}$  (L g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) is a rate constant for Ni uptake from water and  $[Ni^{2+}]$  (nmol L<sup>-1</sup>) is the concentration of the free Ni<sup>2+</sup> ion in water; AE (g Ni retained g<sup>-1</sup> Ni ingested) is the efficiency with which *Chaoborus* assimilate Ni from their prey, IR (g prey ingested dry weight g<sup>-1</sup> *Chaoborus* dry weight d<sup>-1</sup>) is the rate at which *Chaoborus* ingest their prey, and  $[Ni]_{prey}$  is

the Ni concentration in prey;  $k_e$  (d<sup>-1</sup>) and  $k_g$  (d<sup>-1</sup>) are rate constants for physiological Ni efflux from *Chaoborus* and larval growth, respectively.

Assuming that Ni concentrations in lake-dwelling *Chaoborus* larvae are at steady state, equation 1 can be rewritten as follows

$$[\text{Ni}]_{Chaoborus}^{ss} = \frac{k_{uw} \cdot [\text{Ni}^{2+}] + \text{AE} \cdot \text{IR} \cdot [\text{Ni}]_{\text{prey}}}{k_a + k_e}$$
(2)

where [Ni]<sup>ss</sup><sub>Chaoborus</sub> is the steady state Ni concentration in *Chaoborus*.

## 3. Results and discussion

#### 3.1. Food and water as Ni uptake routes

*Chaoborus flavicans* larvae took up significantly more Ni from water (W) than from their food (F) (Figure 1). The water and food vectors were approximately additive (Figure 1), because the sum of the food-only and water-only treatment levels (F+W) was very close to the mean value for the combined food and water treatment level (FW). Additivity of metal exposure routes has been frequently observed in the laboratory (Hare, 1992) and is the basis of the dynamic bioaccumulation model described by equation 1. Our data suggest that in a natural system, where *C. flavicans* larvae would be exposed to Ni simultaneously through water and prey, Ni taken up from water and food would account for approximately two-thirds and one-third, respectively, of their total Ni content. This result contrasts with those reported for Cd in the congener *C. punctipennis*, for which food was the sole Cd source (Munger and Hare, 1997; Munger et al., 1999), and
suggests that caution is needed when generalizing about the sources of various metals for a given type of animal.



**Fig. 1.** Mean Ni concentrations (+ SD) in *Chaoborus flavicans* larvae exposed for 4 days to either: a control (C; Ni-free water and Ni-free *D. magna*); Ni in food only (F; Ni-free water and Ni-contaminated *D. magna*); Ni in water only (W; Ni-contaminated water without food; Ni in both food and water (FW; Ni-contaminated water and Ni-contaminated *D. magna*. The mathematical addition of the food-only and water-only treatments (F+W) is also shown. Different letters represent statistically significant differences among treatment levels (ANOVA followed by a pairwise Tukey test; p < 0.05).

The relative importance of water and food as Ni sources has been measured for few other species. On the one hand, the crustacean *D. magna* is reported to take up all of its Ni from water as opposed to algae (Watras et al., 1985; Komjarova and Blust, 2009). On the other hand, the insect *Sialis* readily accumulates Ni from prey (chironomids and oligochaetes; Dumas and Hare, 2008) as do juvenile *Pimephales promelas*, which take up approximately half of their Ni from food (oligochaetes; Lapointe and Couture, 2009); Ni assimilation efficiencies are discussed in the following section. Clearly, further studies are needed if patterns are to be discerned among animal groups.

# 3.2. Modeling Ni uptake via water and Ni efflux from Chaoborus

We used equation 1 to model temporal changes in Ni concentrations by *C*. *flavicans* using our data on Ni uptake from water and subsequent Ni loss from larvae. For this purpose, we ignored the food-related term in equation 1 ( $AE \cdot IR \cdot [Ni]_{prey}$ ). To estimate the value of the growth rate constant  $k_g$ , we considered that temporal variations in the weight of an individual (*W*; mg) can be described as follows (Winberg, 1971),

$$W = W^0 e^{k_g t} \tag{3}$$

where  $W^0$  is initial weight (mg) and *t* is time (d). Because *C. flavicans* larvae were not fed during our 16-day experiment, they lost weight, that is, mean (± SD) individual weight declined from 0.99 (± 0.05) to 0.73 (± 0.07) mg. Thus the estimated value of  $k_g$  (± SE) was negative at -0.023 ± 0.004 d<sup>-1</sup> and the model curve representing changes in larval weight over time represents well our experimental data (r<sup>2</sup> = 0.46; *p* < 0.001). By comparison, the reported value of  $k_g$  for *C. flavicans* feeding on copepods in the laboratory is 0.023 d<sup>-1</sup> (Croteau et al., 2001).

To estimate the rate constant for Ni efflux  $(k_e)$ , we used our measurements of changes in larval Ni concentrations over the 8 day period when Ni-contaminated larvae were held in Ni-free water (Figure 2). For this purpose we ignored the Ni uptake terms in equation 1, which in integrated form gives

$$[Ni]_{Chaoborus} = [Ni]_{Chaoborus}^{0e} e^{-(k_g + k_e)t}$$
(4)

where  $[Ni]_{Chaoborus}^{0e}$  is the initial Ni concentration in *C. flavicans* at the beginning of the efflux period. The value of  $k_g + k_e$  (± SE), obtained by least-squares optimization, was  $0.17 \pm 0.03$  (p < 0.001). The value of  $k_e$  ( $0.19 \text{ d}^{-1} \pm 0.03$ ) was extracted by subtracting  $k_g$  (as determined above) and the value of SE for  $k_e$  was generated by assuming that the summation of the squares of SE from both variables equals the square SE of the sum of the independent variables. The Ni-efflux model curve represents well the experimental data points during the efflux period ( $r^2 = 0.68$ ; p < 0.001). Our estimate for  $k_e$  is very close to that reported for Ni loss from the gastropod *Lymnaea stagnalis* (~0.17 d<sup>-1</sup>; Croteau and Luoma, 2009), approximately 3 times that reported for larvae of the caddisfly *Stenopsyche marmorata* (~0.06 d<sup>-1</sup>; Tochimoto et al., 2003), and an order of magnitude higher than those reported for some tropical bivalves (Hédouin *et al.*, 2007). In contrast, Cd is lost very slowly from *C. flavicans* (Munger et al., 1999), which is consistent with the much lower  $k_e$  value reported for Cd in this species (~0.004 d<sup>-1</sup>; Croteau et al., 2001).



**Fig. 2.** Changes over time in mean  $(\pm$  SD) Ni concentrations measured in *Chaoborus flavicans* exposed to Ni in artificial lakewater for 8 days (closed symbols) and then held in uncontaminated water for a further 8 days (open symbols). Model curves for Ni uptake (long dashes) and efflux (dotted line) were estimated using equations 4 and 3, respectively.

The uptake rate constant  $k_{uw}$  was obtained by least squares optimization using our experimental data for Ni uptake from water (Figure 2) and the integrated form of equation 1 (without the terms related to Ni uptake from prey), that is,

$$[Ni]_{Chaoborus} = \frac{k_{uw}[Ni^{2+}]}{k_g + k_e} (1 - e^{-(k_g + k_e)t}) + [Ni]_{Chaoborus}^{0u} e^{-(k_g + k_e)t}$$
(5)

where  $[Ni]_{Chaoborus}^{0u}$  is the Ni concentration (nmol g<sup>-1</sup>) in *C. flavicans* at the beginning of the uptake experiment. Into equation 5 we substituted our estimates for  $k_g$  and  $k_e$  (Table 2) along with the measured concentrations of Ni in water and *C. flavicans*, which allowed us to obtain an estimate for  $k_{uw}$  of  $0.019 \pm 0.002$  L g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> ( $\pm$  SE; p < 0.001). This estimate is about double the value of  $k_{uw}$  (0.009 L g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) reported for Ni in two marine bivalves (Hédouin *et al.*, 2007). Lastly, we generated a model curve using all of the above values in equation 5 and found that it fit our experimental data well (r<sup>2</sup> = 0.74; *p* < 0.001; Figure 2).

**Table 2.** Nickel concentrations in artificial lakewater ( $[Ni^{2+}]$ ), and in members of the laboratory food chain composed of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* ( $[Ni]_{algae}$ ), the herbivore *Daphnia magna* ( $[Ni]_{prey}$ ) and the predator *Chaoborus flavicans* ( $[Ni]_{Chaoborus}$ ; Figures 1 and 2). Also given are measurements of herbivore weight ( $W_{prey}$ ) and estimated values of model variables and parameters (see 2.9.) including the uptake rate constant of Ni from water ( $k_{uw}$ ), the assimilation efficiency (AE) of Ni in prey ingested by the predator, the predator's ingestion rate (IR; as used in field extrapolations; see 3.3), the Ni efflux rate constant ( $k_e$ ), and the predator's growth rate constant ( $k_g$ ; the value for fed larvae (from Croteau et al., 2001) was used in field extrapolations).

[Ni <sup>2+</sup> ]	[Ni] <sub>algae</sub>	[Ni] <sub>prey</sub>	W <sub>prey</sub>	k <sub>uw</sub>	AE	IR	$k_e$	$k_g$
nmol L <sup>-1</sup>	nmol g <sup>-1</sup>	nmol g <sup>-1</sup>	mg	$L g^{-1} d^{-1}$	%	ng $g^{-1} d^{-1}$	d <sup>-1</sup>	d <sup>-1</sup>
50 or 300	$2140\pm60$	$226\pm43$	$0.023\pm0.007$	$0.019\pm0.002$	$14 \pm 13$	0.03	$0.19\pm0.03$	$-0.023 \pm 0.004$ (unfed)
							5- 146	0.023 (fed)

## 3.3. Modeling Ni uptake via food

To estimate variables related to Ni uptake via the consumption of prey (equation 1), we exposed *C. flavicans* to Ni in prey (Table 2) and measured prey ingestion daily over four days (see 2.5). To estimate Ni assimilation efficiency, we assumed that all of the Ni eaten as prey on a given day was assimilated and then compared the estimated Ni concentrations in *C. flavicans* (assuming 100% assimilation efficiency) to our measured values at the end of the 4 day feeding and 1 day depuration period. To compensate for physiological Ni losses from *C. flavicans* during the experiment, we applied equation 3 and our estimates of  $k_e$  and  $k_g$  (Table 2).

Calculated mean ( $\pm$  SD) Ni assimilation efficiencies were 14.0  $\pm$  12.5 %. The large variation measured among individual larvae (range 4-56%) can be explained by the rate at which they ingested prey (Figure 3). Thus *C. flavicans* ingesting large numbers of prey assimilated a lower proportion of Ni than those ingesting fewer prey (Figure 3). Similar results have been reported for Cd uptake by *C. punctipennis*, for which assimilation efficiencies varied between 30% and 100% depending on whether prey were ingested at high or low rates, respectively (Munger and Hare, 2000). These results for Cd and Ni can be explained if *Chaoborus* larvae ingesting fewer prey have a slower gut passage time, which is likely result in more efficient assimilation of the Cd and Ni in their food. Similar trends have been reported for several trace metals in the bivalve *Mytilus edulis* (Wang et al., 1995).

133



**Fig. 3.** Nickel assimilation efficiencies (%) of individual *Chaoborus flavicans* consuming juvenile *Daphnia magna* at various rates (g prey g<sup>-1</sup> body dry weight *Chaoborus* d<sup>-1</sup>). The curve describes the function  $y = a \cdot e^{-bx}$  where the value ( $\pm$  SE) of "a" is  $72 \pm 14\%$  and "b" is  $19.0 \pm 3.3$ .

The few previous estimates of Ni assimilation efficiencies by aquatic invertebrates range from low values of 10 to 17% for a marine copepod ingesting phytoplankton (Wang et al., 2007) to high values of 60 and 80% for a benthic alderfly feeding on insects or oligochetes, respectively (Dumas and Hare, 2008). In the latter case, high values were explained by the slow gut passage time of the alderfly (Dumas and Hare, 2008), which would be consistent with our observation that a slow gut passage time leads to efficient Ni assimilation. Marked differences in Ni assimilation efficiencies have been reported for clams and oysters feeding on the same phytoplankton source (61 and 17%, respectively; Hédouin et al., 2007). Since Ni is reported to be an essential metal for some animals (Phipps et al., 2002; Chowdhury et al., 2008), the efficiency with which it is assimilated could vary among species or individuals depending on their Ni requirements.

To explain the low mean assimilation efficiency of Ni by C. flavicans, we measured the subcellular distribution of Ni in its prey since the distribution of metals in prey cells is reported to be important in controlling metal transfer to predatory aquatic invertebrates (Figure 4; Wallace and Luoma, 2003; Dumas and Hare, 2008; Dubois and Hare, 2009) and fish (Reinfelder and Fisher, 1994; Zhang and Wang, 2006). Our results suggest that 58% of the Ni in D. magna (the sum of the HDP, HSP and organelle fractions) was available for assimilation by a predator (Wallace and Luoma, 2003). Although Ni assimilation efficiencies in C. flavicans reached this value in one individual, most larvae did not assimilate Ni with such great efficiency (Figure 3). However, this variation among individuals is explained in part by differences in their ingestion rate (Figure 3), which is likely to influence their gut passage time (as discussed above). Thus our estimate of prey Ni that is available for transfer to a predator represents a potential limit that is realized only when prey consumption rates are low. This hypothesis is supported by data for a predatory alderfly having a slow gut passage time (> 12 hours); this insect assimilates  $\sim$ 75% of prev Ni of which  $\sim$ 65% should be available for uptake (Dumas and Hare, 2008). In contrast, our results differ from those reported for a fish, which assimilates only  $\sim 10\%$  of the Ni in its diet even though subcellular partitioning of Ni in prey suggest that the majority of the Ni in its benthic prey should be available to it (Lapointe et al., 2009). Results for this fish are suggestive of regulation, which is supported by evidence that rainbow trout control their dietary uptake of Ni (Chowdhury et al., 2008).

135



**Fig. 4.** Proportional distribution (%;  $\pm$  SD; n = 10) of Ni in various subcellular fractions of *Daphnia magna*: mitochondria (Mito.), other organelles (Org.), cytosolic heat denatured proteins (HDP), cytosolic heat stable proteins (HSP), granules (Gran.), and cellular debris (Debr.); open bars represent Ni that is purported to be available for transfer to a predator, the grey bar represents Ni that is not available for trophic transfer, whereas the black bar represents an ambiguous fraction whose propensity for trophic transfer is uncertain.

Considering the prey themselves, the small proportion of Ni ( $\approx$ 15%) in potentially metal-sensitive fractions in *D. magna* (HDP + organelles + mitochondria; Wallace and Luoma, 2003) suggests that this crustacean has the potential to survive in lakes that are moderately contaminated with Ni. Even at higher Ni<sup>2+</sup> concentrations (900 nmol L<sup>-1</sup>) than those used in our study, *D. magna* is able to maintain the same low proportion of its Ni in these metal-sensitive fractions (Lapointe et al., 2009).

## 3.4. Testing the biodynamic model with field Chaoborus

We tested our laboratory estimates of model parameters for Ni by using them to predict Ni concentrations in *Chaoborus* larvae collected from a series of lakes located along a Ni gradient in the vicinity of smelters near the city of Sudbury, Ontario. Field values of steady state Ni concentrations in Chaoborus larvae,  $[Ni]_{Chaoborus}^{ss}$  (equation 2), and  $[Ni^{2+}]$  were taken from Ponton and Hare (2009) for both *C. flavicans* (from 6 lakes) and *C. punctipennis* (from 10 lakes).

To generate model values for  $[Ni]_{Chaoborus}^{ss}$ , we used our laboratory estimates of the rate constants  $k_{uw}$  (0.019 L g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) and  $k_e$  (0.19 d<sup>-1</sup>), as well as the mean Ni assimilation efficiency (AE, 14 % or 0.14) for *C. flavicans* (Table 2). This value of AE was then used to set the value of the ingestion rate (IR), according to the curve relating these two variables (Figure 3). However, because *Chaoborus flavicans* larvae in the field feed only at night we divided this value of IR by 3 (there are ≈8 hours of darkness in late spring at the latitude of the lakes considered in Ponton and Hare, 2009) to give an IR of ≈0.03 g prey ingested g<sup>-1</sup> *Chaoborus* dry weight d<sup>-1</sup> (Table 2). This value is identical to the mean IR measured for two *Chaoborus* species (*C. punctipennis* and *C. americanus*) in the field (Croteau et al., 2003a). The value of the growth rate constant  $k_g$  for non-starved *C. flavicans* (0.023 d<sup>-1</sup>) was taken from Croteau et al. (2001).

To estimate  $[Ni]_{prey}$ , we first considered using Ni measurements in bulk zooplankton from the Sudbury area lakes (Ponton and Hare, unpublished data). Mean Ni concentrations in zooplankton (125-500 µm fraction) from 6 lakes ranged from 600 to 3,000 nmol g<sup>-1</sup> (mean 1,400 ± 1,100 (SD) nmol g<sup>-1</sup>). However, Ni concentrations in zooplankton were neither correlated with those of  $[Ni]_{Chaoborus}$  nor those of  $[Ni^{2+}]$  (given in Ponton and Hare, 2009), which suggests that they do not reflect the values in the specific prey types that are consumed by *Chaoborus* larvae in the field. A similar lack of correlation has been reported between lakewater  $[Cd^{2+}]$  and Cd concentrations in bulk zooplankton (Croteau et al., 2003b). Lacking field measurements, we used our laboratory measurements of [Ni] in *D. magna* as a rough estimate of  $[Ni]_{prey}$  in the field; that is, knowing  $[Ni^{2+}]$  in the field we estimated  $[Ni]_{prey}$  from a regression of laboratory  $[Ni^{2+}]$  of 50 and 900 nmol L<sup>-1</sup> that produced mean (± SD) [Ni] in *D. magna* of 226 ± 43 and 1490 ± 140, respectively.

Model estimates for Ni concentrations in *Chaoborus* from the Sudbury area lakes are of the same order of magnitude, but higher by a factor of  $4.0 \pm 1.4$  (SD) than Ni concentrations measured in field *Chaoborus* (Figure 5). There are several possible explanations for the gap between predicted and measured values.



**Fig. 5.** Measured mean  $(\pm$  SD) values of [Ni] in *Chaoborus* larvae from lakes situated along a Ni gradient in the vicinity of metal smelters in the city of Sudbury, Ontario, Canada compared to predicted values obtained using equation 6 (see text for details). The broken line represents a 1:1 relationship.

First, in relation to the prey portion of equation 1, we assumed that Ni concentrations in a single prey type (the cladoceran D. magna) are representative of prey [Ni] in all lakes. This is clearly an oversimplification because this insect consumes a variety of invertebrates (cladocerans, copepods, rotifers, etc) in nature and these different prev types are likely to differ in their metal concentrations (Croteau et al., 2003b). Furthermore, the types and numbers of prey actually consumed by Chaoborus larvae usually differ from the relative abundances of prey in their surroundings (Hare and Carter, 1987; Croteau et al., 2003a). Thus differences among lakes in the species composition and density of their zooplankton communities (Shaw and Kelso, 1992), compounded by differences in larval selectivity among prey types, likely influence all of the food-related terms (IR, AE and [Ni]<sub>prev</sub>) in equation 1 (Croteau et al., 2003a, b). Predictions would be refined by measuring Ni concentrations in the specific prey types and sizes known to be consumed by fourth instar C. flavicans larvae in the field. We note, however, that food is a less important Ni source for *Chaoborus* than is water. Thus reducing, for example, IR by 90% (to simulate low prey capture efficiencies in lakes that are poor in zooplankton) would still leave the ratio of predicted to measured values at  $\approx 3$ .

Second, with regards to the water uptake portion of equation 1, it should be noted that in the laboratory we did not measure the water chemistry of the exposure solutions, whereas major ions as well as dissolved organic and inorganic carbon were measured in the field and used in the estimation of  $[Ni^{2+}]$ . If, for example, actual Ni complexation by bicarbonate (80% of total Ni) was ~4% lower than expected,  $[Ni^{2+}]$  would be twice those expected such that the value of  $k_{uw}$  would be reduced by half and the ratio of estimated to observed values would be ≈2.5. Lastly, our value of  $k_{uw}$  is likely more uncertain than those of the other two rate constants ( $k_e$  and  $k_g$ ) because it includes the uncertainties surrounding these constants (see equation 5).

Overall, if we reduced prey ingestion by 90% and the uptake rate constant by the half, the ratio of estimated to measured values becomes  $1.4 \pm 0.5$  (SD). We conclude that our laboratory-based estimates of several model parameters are sufficiently robust to allow rough approximations of Ni concentrations in field *Chaoborus*. However, field measurements of some model terms would likely improve the efficacy of model predictions. Field measurements would also be useful for determining if genetic differences between metal exposed and unexposed populations are likely to influence the values of model parameters. Such is the case for sedentary species such as bivalves (Wang and Rainbow, 2005), but is probably less likely for aquatic insects like *Chaoborus* that have an aerial dispersal stage.

### 4. Conclusion

Larvae of the lake dwelling insect *Chaoborus* take Ni up from both water and food, with the two sources having a relative importance of approximately two thirds to one third, respectively. The fact that food is of lesser importance than water as a Ni source is explained in part by the low mean efficiency ( $\approx$ 14%) with which this predator assimilates Ni from its prey. Assimilation efficiencies were inversely related to the rate at which individual *Chaoborus* larvae ingested their prey, and were explained in part by Ni subcellular distributions in prey. A one-compartment kinetic bioaccumulation model successfully described Ni accumulation by larvae from water in the laboratory. Predicted values for Ni in field populations of *Chaoborus* were higher by a factor of  $\approx$ 4 than those measured in the field; explanations for this discrepancy include the lack of Ni

140

measurements in prey consumed by this predator in the field, as well as uncertainties related to Ni speciation in our artificial lakewater and the rate constant for Ni uptake from water by this predator.

### Acknowledgements

Funding was provided by the Metals In The Human Environment – Strategic Network and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We thank C. Fortin and N. Belzile for their comments on the manuscript, B. Leclercq and P. Fournier, for their help in the laboratory.

#### References

- 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.
- Carter, J.C.H., Kwik, J.K., 1977. Instar succession, vertical distribution, and inter-specific competition among four species of *Chaoborus*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 34, 113-118.
- Chau, Y.K., Kulikovsky-Cordeiro, O.T.R., 1995. Occurrence of nickel in the Canadian environment. Environmental Reviews 3, 95-120.
- Chowdhury, M.J., Bucking, C., Wood, C.M., 2008. Pre-exposure to waterborne nickel downregulates gastrointestinal nickel uptake in rainbow trout: indirect evidence for nickel essentiality. Environmental Science and Technology 42, 1359-1364.
- Croteau, M.N., Hare, L., Marcoux, P., 2003a. Feeding patterns of migratory and nonmigratory fourth instar larvae of two coexisting *Chaoborus* species in an acidic and

metal contaminated lake: Importance of prey ingestion rate in predicting metal bioaccumulation. Archiv für Hydrobiologie 158, 57-74.

- Croteau, M.N., Hare, L., Tessier, A., 2001. Differences in cadmium accumulation among species of the lake-dwelling biomonitor *Chaoborus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 58, 1737-1746.
- Croteau, M.N., Hare, L., Tessier, A., 2003b. Difficulties in relating Cd concentrations in the predatory insect *Chaoborus* to those of its prey in nature. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 60, 800-808.
- Croteau, M.N., Luoma, S.N., 2009. Predicting dietborne metal toxicity from metal influxes. Environmental Science and Technology 43, 4915-4921.
- Dubois, M., Hare, L., 2009. Selenium assimilation and loss by an insect predator and its relationship to Se subcellular partitioning in two prey types. Environmental Pollution 157, 772-777.
- Dumas, J., Hare, L. 2008. The internal distribution of nickel and thallium in two freshwater invertebrates and its relevance to trophic transfer. Environmental Science and Technology 42, 5144-5149.
- Elendt, B.P., Bias, W.R., 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. Water Research 24, 1157-1167.
- Gibb, J.O.T., Allen, J.R., Hawkins, S.J., 1996. The application of biomonitors for the assessment of mine-derived pollution on the west coast of the Isle of Man. Marine Pollution Bulletin 32, 513-519.

- Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. Aquatic Toxicology 77, 178-189.
- Gunn, J.M., 1995. Restoration and recovery of an industrial region. Progress in restoring the smelter-damaged landscape near Sudbury, Canada. Springer-Verlag, New York, NY, USA.
- Hare, L., 1992. Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. Critical Reviews in Toxicology 22, 327-369.
- Hare, L., Carter, J.C.H., 1987. Zooplankton populations and the diets of three *Chaoborus* species (Diptera, Chaoboridae) in a tropical lake. Freshwater Biology 17, 275-290.
- Hare, L., Tessier, A., Croteau, M.N., 2008. A biomonitor for tracking changes in the availability of lakewater cadmium over space and time. Human and Ecological Risk Assessment 14, 229-242.
- Hédouin, L., Pringault, O., Metian, M., Bustamante, P., Warnau, M., 2007. Nickel bioaccumulation in bivalves from the New Caledonia lagoon: Seawater and food exposure. Chemosphere 66, 1449-1457.
- Komjarova, I., Blust, R., 2009. Application of a stable isotope technique to determine the simultaneous uptake of cadmium, copper, nickel, lead, and zinc by the water flea
   *Daphnia magna* from water and the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*.
   Environmental Toxicology and Chemistry 28, 1739-1748.
- Lapointe, D., Couture, P., 2009. Influence of the route of exposure on the accumulation and subcellular distribution of nickel and thallium in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, in press.

- Lapointe, D., Gentès S., Ponton, D.E., Hare, L., Couture, P., 2009. The influence of prey type on nickel and thallium assimilation, subcellular distribution and toxicity in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environmental Science and Technology, under review.
- Mukherjee, A.B., 1998. Nickel: a review of occurrence, uses, emissions, and concentration in the environment in Finland. Environmental Reviews 6, 173-187.
- Munger, C., Hare, L., 1997. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic Insect (*Chaoborus punctipennis*): implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. Environmental Science and Technology 31, 891-895.
- Munger, C., Hare, L., 2000. Influence of ingestion rate and food types on cadmium accumulation by the aquatic insect *Chaoborus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 57, 327-332.
- Munger, C., Hare, L., Tessier, A., 1999. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in nature. Limnology and Oceanography 44, 1763-1771.
- Phillips, D.J.H., Rainbow, P.S., 1993. Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants. Elsevier Applied Science, London, U.K.
- Phipps, T., Tank, S.L., Wirtz, J., Brewer, L., Coyner, A., Ortego, L.S., Fairbrother, A., 2002. Essentiality of nickel and homeostatic mechanisms for its regulation in terrestrial organisms. Environmental Reviews 10, 209–261.
- Ponton, D.E., Hare, L., 2009. Assessment of nickel contamination in lakes using the phantom midge *Chaoborus* as a biomonitor. Environmental Science and Technology 43, 6529-6534.

Reinfelder, J.R., Fisher, N.S., 1994. The assimilation of elements ingested by marine planktonic bivalve larvae. Limnology and Oceanography 39, 12-20.

- Saether, O. A., 1972. Neartic and Palaearctic *Chaoborus* (Diptera: Chaoboridae). pp 257-304 in: Das Zooplankton der Binnengewässer. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, Germany.
- Shaw, M.A., Kelso, J.R.M., 1992. Environmental factors influencing zooplankton species composition of lakes in north-central Ontario, Canada. Hydrobiologia 241, 141-154.
- Thomann, R.V., 1981. Equilibrium model of fate of microcontaminants in diverse aquatic food chains. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 38, 280-296.
- Tochimoto, H., Maki, T., Afzal, M., Tanabe, S., 2003. Accumulation of trace metals in aquatic insect *Stenopsyche marmorata* Navas transferred in streams. Ecotoxicology and Environmental Safety 56, 256-264.
- Van Laer, L., Smolders, E., Degryse, F., Janssen, C., De Schamphelaere, K.A.C., 2006. Speciation of nickel in surface waters measured with the Donnan membrane technique. Analytica Chimica Acta 578, 195-202.
- Wallace, W.G., Lee, B.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). Marine Ecology Progress Series 249, 183-197.
- Wallace, W.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). Marine Ecology Progress Series 257, 125-137.

- Wang, M.H., Wang, D.Z., Wang, G.Z., Huang, X.G., Hong, H.S., 2007. Influence of N, P additions on the transfer of nickel from phytoplankton to copepods. Environmental Pollution 148, 679–687.
- Wang, W.X., Fisher, N.S., Luoma, S.N., 1995. Assimilation of trace elements ingested by the mussel *Mytilus edulis*: effects of algal food abundance. Marine Ecology Progress Series 129, 165-176.
- Wang, W.-X., Rainbow, P.S., 2005. Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates. Ecotoxicology and Environmental Safety 61, 145-159.
- Watras, C.J., MacFarlane, J., Morel, F.M.M., 1985. Nickel accumulation by *Scenedesmus* and *Daphnia*: Food-Chain transport and geochemical implications. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 42, 724-730.
- Widdows, J., 1985. Physiological responses to pollution. Marine Pollution Bulletin 16, 129-134.
- Winberg, G.G., 1971. Methods for the estimation of the production of aquatic animals. Academic Press, New York, NY.
- Yeh, H.C., Chen, I.M., Chen, P., Wang, W.H., 2009. Heavy metal concentrations of the soldier crab (*Mictyris brevidactylus*) along the inshore area of Changhua, Taiwan.
  Environmental Monitoring and Assessment 153, 103-109.
- Zhang, L., Wang, W.X., 2006. Significance of internal metal speciation in prey in influencing the trophic transfer of metals in marine fish. Limnology and Oceanography 51, 2008–2017.