

Université du Québec
INRS-Eau, Terre et Environnement

**COMPETITION ENTRE LES PROTONS ET LES IONS DE CADMIUM LE
LONG D'UNE CHAÎNE ALIMENTAIRE MENANT AU BIOMONITEUR
*CHAOBORUS***

Par
Jord Orvoine

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

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dr. James McGeer <i>Ressources naturelles Canada</i>
Examineur interne	Prof. Claude Fortin <i>INRS-Eau, Terre et Environnement</i>
Codirecteur de recherche	Prof. André Tessier <i>INRS-Eau, Terre et Environnement</i>
Directeur de recherche	Prof. Landis Hare <i>INRS-Eau, Terre et Environnement</i>

*À Cawo,
Au Québec,
À mes parents,*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement Landis Hare, qui en tant que professeur, directeur de maîtrise et surtout ami a toujours été là pour me conseiller, me guider, me donner confiance. Je tiens à remercier Landis pour toute son amitié, pour ses qualités de patience et d'écoute, pour tous les supers bons moments que nous avons eu. Enfin, Je tiens également à remercier très sincèrement André Tessier qui par son enthousiasme, sa joie, son esprit critique et perspicace digne de Sherlock Holmes, a fait que ma recherche a été réalisée à la fois avec beaucoup de sérieux mais aussi beaucoup de plaisir. Je remercie aussi Peter Campbell, Jean Christian Auclair et Claude Fortin pour leurs conseils et leurs supports.

Je tiens aussi à dire merci aux bons potes de l'INRS avec lesquels j'ai passé beaucoup de temps à rigoler, c'est sûr que sans eux j'aurai fini un an plutôt (Ha! Ha! Ha!) mais que de bons moments j'aurai manqué. Donc un grand grand merci à Louis Croisetière et Amiel Boulemant, merci pour tout les gars, pour tout...(un peu d'intimité quand même). Merci à Annick Michaud et Lisa Kraemer, les blondes les plus incroyables de l'Abitibi et du Utah, un Chick Magnet ne peut vous résister. Merci aux autres incroyables loulou, Luc Bérubé, Antony Chappaz avec qui la bière est toujours bonne à boire. Merci aussi à Suzanne Dussault, Anik Giguère, Catalina Alfarro de la Torre, Islem Yazza, Yves Couillard, Olivier Perceval, Marie-Emmanuelle Rail, Jean-Christophe Aznar.

Enfin, je voudrais aussi remercier tout une équipe de gens que j'estime beaucoup et avec qui se fut un réel plaisir de travailler, qui m'ont aidé et beaucoup appris au laboratoire et sur le terrain, merci à Michelle Bordeleau, Sébastien Duval, Pauline Fournier, Stéphane Prémont, Lise Rancourt, René Rodrigue. Je voudrais aussi remercier les stagiaires qui ont travaillé avec moi pour leur sympathie, la qualité de travail qu'ils ont effectué, merci à Philippe Boucher, Catherine Dion.

Enfin, je voudrais remercier les gens qui ne m'ont pas directement aidé dans ma recherche mais qui ont beaucoup compté pour moi au cours de ces années, des gens que j'aime beaucoup, beaucoup, merci à Miroslav Chum, Janick Lalonde, Valentina Poch, Soheil Nakostine, Philippe Terrier, Imad Baaklini, Pierre-Yves Horel.

Enfin, les derniers remerciements sont pour mes parents, Jean-Pierre et Dominique, pour mes frères Sulian et Jovan, ma sœur Aziliz et toute ma famille qui me laisse aller dans le monde avec leur grand rire dans mon cœur.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire de type «par article» se divise en deux parties. La première partie, appelée synthèse, fait état de l'avancement des connaissances dans notre domaine de recherche. On y décrit la problématique, nos objectifs, la méthodologie, nos résultats, nos conclusions et les perspectives de recherche. La deuxième partie du mémoire est constituée d'un article scientifique à soumettre à *Limnology and Oceanography*.

La contribution des auteurs de l'article s'établit comme suit :

Orvoine, J., L. Hare et A. Tessier. 2004. Competition between protons and cadmium ions along the food chain leading to the biomonitor *Chaoborus americanus*.

Jord Orvoine: - Conception du projet
 - Réalisation des expériences
 - Analyses des données
 - Rédaction initiale de l'article

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

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

RÉSUMÉ

L'industrie minière a causé une augmentation du flux de cadmium (Cd) vers les écosystèmes aquatiques. Ce métal, non essentiel, peut être toxique pour les organismes. Afin d'évaluer le risque encouru par les organismes aquatiques sensibles à ce contaminant, il est nécessaire de connaître les concentrations de Cd auxquelles ils sont exposés. Hare et Tessier (1998, 1996) ont proposé d'utiliser une larve de mouche aquatique, *Chaoborus*, comme biomoniteur du Cd dans la colonne d'eau. Ils ont mis à l'essai un approche basé sur le modèle de l'ion libre qui prédit les concentrations de l'ion libre du Cd (Cd^{2+}) à partir des concentrations de Cd dans *Chaoborus*, en tenant compte de la compétition des protons au niveau des sites de prise en charge du Cd. Les travaux de Munger et Hare (1997) montrent que chez *Chaoborus*, prédateur de zooplancton, la nourriture est la principale voie d'entrée du Cd. La compétition entre H^+ et Cd^{2+} peut donc avoir lieu à plusieurs niveaux de la chaîne trophique, c'est à dire, au niveau du tractus digestif de *Chaoborus*, des proies de *Chaoborus* ou des algues consommées par ces proies. Pour déterminer si elle a lieu chez *Chaoborus*, nous plaçons des larves dans 3 milieux de pH différents (4,5, 5,5 ou 6,5), de $[\text{Cd}^{2+}]$ identiques et nourries avec les mêmes copépodes contaminés en Cd, *Diatomus minutus*. L'absence de différence significative entre les efficacités d'assimilation de Cd pour les 3 pH indique qu'il n'y a pas de compétition entre les ions H^+ et Cd^{2+} dans le tractus de *C. americanus*. L'utilisation d'indicateur de pH coloré dans le tractus indique que les larves sont capables de réguler le pH de leur tractus entre 6 et 8,5 même si le pH du milieu varie de 4,5 à 9 ce qui explique l'absence de compétition H^+ - Cd^{2+} chez *Chaoborus*. Pour déterminer si la compétition a lieu chez les proies de *Chaoborus*, nous comparons l'accumulation de Cd chez des copépodes exposés à 2 concentrations de Cd^{2+} différentes et nourris avec les mêmes algues contaminées. Nos résultats indiquent que plus que la moitié du Cd (63%) peut venir de l'eau et donc que la compétition H^+ - Cd^{2+} peut avoir lieu chez ces proies. Nous mesurons ensuite l'accumulation du Cd chez des copépodes exposés à 3 pH différents (4.8, 5.5, 6.4), nourris avec les mêmes algues contaminées et exposés au même concentration de Cd^{2+} dans l'eau ce qui nous permet

de développer et de valider un modèle de bioaccumulation du Cd chez *Diaptomus minutus* qui tient compte de la compétition H^+ - Cd^{2+} chez ces copépodes.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	v
AVANT-PROPOS	ix
RÉSUMÉ.....	x
TABLE DES MATIÈRES.....	xii
LISTE DES FIGURES.....	xv
LISTE DES TABLEAUX.....	xvi

1^{ère} partie : Synthèse

1. INTRODUCTION.....	1
1.1 LE CADMIUM DANS L'ENVIRONNEMENT.....	1
1.2 L'ACCUMULATION DES METAUX DANS LES ORGANISMES.....	2
1.2.1. <i>Prise en charge des métaux dissous</i>	2
1.2.2. <i>Le modèle de l'ion libre</i>	3
1.2.3. <i>Prise en charge des métaux particuliers et dissous</i>	4
1.2.4. <i>Elimination des métaux</i>	4
1.2.5. <i>Autres facteurs influençant l'accumulation du métal</i>	4
1.2.6. <i>Les modèles de bioaccumulation</i>	5
1.3 LES BIOMONITEURS.....	6
1.4 <i>CHAOBORUS</i> : BIOMONITEUR DU Cd DANS L'EAU.....	6
1.5 BIOLOGIE DE <i>CHAOBORUS</i>	7
1.6 BIOLOGIE DE <i>DIPTOMUS MINUTUS</i> : UNE PROIE DE <i>CHAOBORUS</i>	8
1.7 PROBLEMATIQUE.....	10
1.8 OBJECTIFS.....	11
2. MÉTHODES.....	12
2.1 COLLECTE DES ORGANISMES.....	12
2.1.1 <i>Choix et échantillonnage de <u>Chaoborus americanus</u></i>	12
2.1.2 <i>Choix et échantillonnage de <u>Diaptomus minutus</u></i>	13
2.2 LES TRACEURS RADIOACTIFS.....	16

2.3 REPRESENTATIVITE DES RESULTATS	16
2.4 MONTAGES EXPÉRIMENTAUX	17
2.4.1 Détermination de la compétition H^+ - Cd^{2+} chez <u>Chaoborus americanus</u>	21
2.4.2 Mesures de pH dans le tractus de <u>Chaoborus americanus</u>	21
2.4.3 Détermination des voies d'entrée du Cd chez le copéode <u>Diaptomus minutus</u>	21
2.4.4 Détermination de la compétition H^+ - Cd^{2+} chez <u>Diaptomus. minutus</u>	23
2.4.5 Expérience de perte du Cd chez <u>Diaptomus. minutus</u>	25
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	25
3.1 LA COMPÉTITION ENTRE H^+ ET Cd^{2+} , A-T-ELLE LIEU DANS LE TRACTUS	25
DIGESTIF DE <u>CHAOBORUS AMERICANUS</u> ?	25
3.1.1. Expérience de compétition H^+ - Cd^{2+} chez <u>Chaoborus americanus</u>	25
3.1.2 Mesure du pH du tractus digestif de <u>Chaoborus americanus</u>	25
3.2 LA COMPÉTITION ENTRE H^+ ET Cd^{2+} , A-T-ELLE LIEU CHEZ <u>DIAPTOMUS MINUTUS</u> ?	27
3.2.1 Voies d'entrées du Cd chez <u>Diaptomus minutus</u>	27
3.2.2 Expérience de Compétition Cd^{2+} - H^+ chez <u>Diaptomus minutus</u>	29
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	31
5. BIBLIOGRAPHIE.....	33
2^{ème} partie : article	
1. ARTICLE	42

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Photo de <i>Chaoborus</i>	7
Figure 2 a.b. Photos de <i>D. minutus</i>	8
Figure 3. Montage expérimentale de l'expérience de détermination de la compétition entre H^+ et Cd^{2+} chez <i>C. americanus</i>	20
Figure 4. Montage expérimental de l'expérience de détermination de la compétition H^+ - Cd^{2+} chez <i>D. minutus</i>	24
Figures 5a, 5b. Photos de l'indicateur de pH lacmoïde dans le tractus de <i>C. americanus</i>	26
Figure 6. Photo de l'indicateur de pH alizarin dans le tractus de <i>C. americanus</i>	27

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition chimique du milieu bristol et des solutions mères	
Concentrées.....	15

1^{ère} partie : Synthèse

1. INTRODUCTION

1.1 Le cadmium dans l'environnement

Le cadmium (Cd) est un élément naturel de la croûte terrestre qui est généralement associé aux minerais de zinc, de plomb et de cuivre. L'industrialisation a provoqué une augmentation des apports de Cd vers les écosystèmes aquatiques (Nriagu et Pacyna 1988). Les principaux apports anthropiques de Cd proviennent du raffinage de métaux, de la combustion de charbon (et d'autres sources d'énergie fossile), des piles cadmium-nickel et de l'application de fertilisant à base de phosphate. Le Cd issu du raffinage de métaux est émis dans l'atmosphère et peut se déposer ensuite à des centaines de kilomètres de la source d'émission (Keller et al. 1992). Dans les milieux aquatiques, près des fonderies, ce métal non essentiel à la vie peut se concentrer dans les organismes et dans les sédiments; ces derniers peuvent devenir alors des sources potentielles de Cd pour des décennies après la fin des émissions.

Depuis une vingtaine d'années, les responsables des fonderies du Québec et de l'Ontario ont pris conscience des problèmes environnementaux et ont diminué les émissions de plusieurs métaux y compris le Cd (Croteau et al. 2002). Cependant, les concentrations de ce contaminant dans les lacs situés près des fonderies sont encore élevées (Borgmann et al. 2004 ; Giguère et al. 2004). Des études sur le terrain (Borgmann et al. 2004) ont noté que dans les lacs les plus contaminés, il y avait une diminution de la diversité benthique qui était caractérisée par une absence des taxons les plus sensibles aux métaux, comme les amphipodes, les éphémères, les mollusques de la famille des sphaeriidae et les mouches chironomes du genre *Tanytarsus*. Ces études ont aussi rapportées que les sédiments des lacs les plus contaminés avaient des effets toxiques sur l'amphipode *Hyaella azteca* et que ces effets étaient causés principalement par le Cd.

D'autres travaux sur la perchaude (Lévesque et al. 2003), dans des lacs contaminés en métaux, dont le Cd, ont indiqué qu'une exposition à des concentrations sous létales altérerait ses fonctions physiologiques et causait un délai dans la reproduction de celles-ci. Donc, étant donné la forte toxicité du Cd et le danger qu'il représente pour l'environnement aquatique, il apparaît essentiel de contrôler les niveaux de concentration du Cd dans les milieux aquatiques.

1.2 Accumulation des métaux dans les organismes

1.2.1 Prise en charge des métaux dissous

Dépendant des organismes, la prise en charge de métal dissous peut avoir lieu à la surface du corps, au niveau des branchies ou/et au niveau du tractus digestif dans les cas où l'eau est bue ou avalée lors de l'ingestion de nourriture (Phillips et Rainbow 1993). L'entrée du métal dans l'organisme se fait au niveau des membranes cellulaires. Les membranes sont composées de 2 couches de phospholipides, de protéines périphériques, de protéines qui traversent la membrane, de transporteur de protéines et de canaux ioniques. Dans la colonne d'eau, même si les métaux dissous existent sous plusieurs formes chimiques (ion libre, complexé, lié à des ligands organiques et inorganiques) seulement certaines formes sont disponibles aux organismes. Lorsqu'ils sont sous forme d'ion libre, les métaux traces ont une grande affinité pour les groupes sulfures ou azotés qui composent les protéines et les macromolécules cellulaires (Phillips et Rainbow 1993). Donc, après avoir franchi la couche de diffusion qui sépare la solution, de la membrane cellulaire, les métaux sont en présence d'une multitude de site de liaison potentiel situé à la surface de la cellule, y compris des protéines périphériques et des protéines de transport (Tessier et Turner 1995). Certains ions métalliques ayant les mêmes caractéristiques que les ions essentiels, comme les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , peuvent se lier aux pompes ioniques et être transportés dans la cellule. Dans certains cas plus occasionnel, le métal dissous peut aussi former en présence de certains ligands, des complexes lipophiliques qui peuvent passer par simple diffusion à travers la membrane (Phillips et Rainbow 1993). Une fois lié à la cellule, le

métal peut alors entraîner un dysfonctionnement cellulaire s'il occupe un récepteur sensible ou bien s'il est transporté à l'intérieur de la cellule (Tessier et Turner 1995).

1.2.2 Le modèle de l'ion libre

Quoiqu'il en soit, malgré la multitude d'interaction qui existe entre le métal et la cellule, les observations en laboratoire montrent que la prise en charge et les effets biologiques chez les organismes exposés aux métaux sont principalement corrélés à l'activité de l'ion libre (Borgmann 1983, Allen et al. 1980). Basés sur ces observations, le modèle de l'ion libre, FIAM, (Campbell 1995, Morel 1983) permet de prédire l'accumulation d'un métal dans un organisme à partir de la concentration de l'ion libre du métal dans le milieu. L'application du modèle repose sur 6 prémisses :

- 1-La membrane est le site primaire des interactions du métal avec les organismes vivants.
- 2-Les interactions avec la membrane peuvent être décrites par des réactions de complexation aboutissant à un complexe M-X-cell.
- 3-La surface de la cellule est en équilibre avec la solution et cet équilibre précède l'expression de la réponse biologique ce qui implique que les cations Ca^{2+} et Mg^{2+} et l'ion hydrogène, H^+ , sont en compétition avec le métal au niveau des sites de liaisons à la surface de complexation et peuvent donc diminuer la réponse biologique. Certains travaux montrent l'effet des ions H^+ sur la diminution de la toxicité du cuivre, du cadmium, du zinc vis à vis des algues et des poissons (Xue et Sigg 1990, Peterson et al. 1984, Cusimano et al. 1986, Borgmann 1983).
- 4-La réponse biologique est strictement dépendante de la concentration du complexe M-X-cell.
- 5-Aux concentrations d'exposition habituellement observés en toxicologie, les sites libres de liaison du métal sont constants et la variation de l'activité de M-X-cell suit celle de l'ion libre dans la solution.
- 6-Durant l'exposition, la nature de la surface biologique ne change pas.

1.2.3 Prise en charge des métaux particulaires et de la nourriture

Les métaux associés aux particules sont en générale pris en charge dans le tractus digestif. La prise en charge des métaux associés à la nourriture varie en fonction du pH du tractus, des enzymes de digestion, du temps de digestion, de la température, et de la disponibilité des métaux dans les particules de nourriture (Phillips et Rainbow 1993).

1.2.4 Élimination des métaux

La concentration d'un métal dans un organisme est le résultat net de la différence entre les taux de prise en charge et de perte. Le métal peut être perdu par excrétion, par expulsion de granules riches en métaux (George et Pirei 1980) ou par désorption passive (comme dans le cas du zinc dans les branchies de crevette grise, White et Rainbow 1984).

1.2.5 Autres facteurs influençant l'accumulation des métaux

D'autres facteurs, outre la physico-chimie du métal et la diète des organismes, peuvent influencer la bioaccumulation. Des travaux rapportent l'effet de facteurs écologiques, physiologiques ou comportementaux sur l'accumulation des métaux chez certains organismes. Les travaux de Sloman et al. (2002, 2003) montrent que, chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, la prise en charge du cuivre et de l'argent est plus importante chez les poissons dominés que chez les individus dominants. Le rang social a un effet sur la régulation du sodium, ce qui a un effet sur la prise en charge des métaux. Warren et al. (1998) et Gosselin et Hare (2004) rapportent le cas d'animaux benthique dont le degré d'exposition à un métal varie en fonction de leur profondeur d'enfouissement, leur rythme de fouissage, et le taux d'irrigation de leur tunnel. Les travaux de Illes et al. (2001) montre que chez la larve de phrygane (Trichoptera : Hydropsychidae) le comportement alimentaire a une influence sur la prise en charge du Cd. Certains facteurs allométriques, tels l'âge, la masse corporelle et la taille, peuvent aussi influencer la concentration des métaux chez les organismes (Tessier et al. 1994).

1.2.6 Modèle de bioaccumulation

Les modèles de bioaccumulation permettent de prédire la concentration du métal dans les organismes à partir des concentrations du métal dans leur milieu. De tels modèles peuvent être décrits mathématiquement par des systèmes d'équation différentielle (Newman et McIntosh 1991). Si on considère un organisme comme un seul compartiment, les variations temporelles dans ses concentrations en métal ($[M]_{org}$) peuvent être décrites en utilisant l'équation de masse (Newman et McIntosh 1991) :

$$\frac{d[M]_{org}}{dt} = U(t) - E(t) \quad \text{Équation 1}$$

où $U(t)$ est le taux de prise en charge du métal et $E(t)$ est le taux de perte du métal. En considérant que le taux de prise en charge est indépendant du temps et que le taux d'élimination est une fraction constante de la concentration de métal dans l'organisme on a :

$$\frac{d[M]_{org}}{dt} = U - k_e [M(t)] \quad \text{Équation 2}$$

où k_e est une constante de taux d'élimination.

Si on tient compte de l'effet de dilution de la concentration du métal dans l'organisme due à la croissance et si on considère l'eau et la nourriture comme deux voies d'entrée l'équation 2 se réécrit :

$$\frac{d[M]_{org}}{dt} = \underbrace{k_w [M^{2+}] + k_f [M]_f}_{\text{prise en charge}} - \underbrace{(k_e + k_g) [M]_{org}}_{\text{perte}} \quad \text{Équation 3}$$

où $[M]_{\text{org}}$ est la concentration du métal dans l'animal (nmol g^{-1}), $[M^{2+}]$ est la concentration de l'ion libre du métal dans l'eau (nM), $[M]_f$ est la concentration du métal dans la nourriture (nmol g^{-1}), k_w est la constante de prise en charge du métal à partir de l'eau ($\text{L g}^{-1} \text{j}^{-1}$), k_f est la constante de prise en charge à partir de la nourriture (j^{-1}), k_e est la constante de taux de perte (j^{-1}), k_g est le taux de croissance (j^{-1}).

1.3 Les biomoniteurs

Étant donnée la multiplicité de facteurs qui peuvent influencer la disponibilité du Cd pour les organismes, il semble plus réaliste, et plus simple, d'estimer le niveau de contamination d'un milieu aquatique en mesurant les concentrations d'un métal chez les organismes plutôt que celles dans l'eau ou dans les sédiments (Phillips et Rainbow 1993 ; Tessier et al. 1994), d'où l'idée d'utiliser des organismes, qu'on appelle alors biomoniteurs, comme outils de prédiction de la contamination d'un écosystème par un contaminant. Cependant, tous les organismes ne peuvent pas être des biomoniteurs. Pour qu'un organisme puisse être utilisé comme biomoniteur, il faut qu'il réponde à plusieurs critères. Il doit être facile à récolter et à identifier. Ce doit être une espèce commune dans la zone géographique étudiée. Cette espèce doit bien sûr accumuler le métal et être capable de vivre le long d'un large gradient du métal en question. Enfin, il faut démontrer que la concentration du métal accumulée chez le biomoniteur a un lien avec la concentration du métal dans son milieu.

1.4 *Chaoborus* : Biomoniteur du Cd dans l'eau

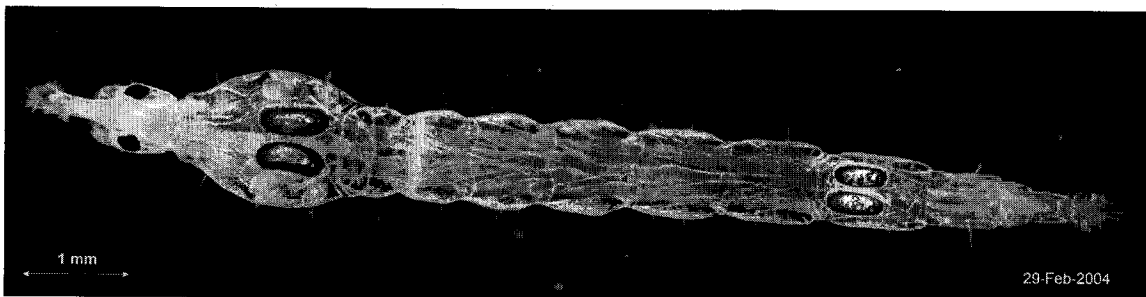
Comme biomoniteur du Cd dans l'eau des lacs, Hare et Tessier (1996, 1998) propose d'utiliser les larves de l'insecte *Chaoborus*. Cet organisme répond aux critères nécessaires pour être un bon biomoniteur du Cd. Les larves de *Chaoborus* sont faciles à récolter et à identifier, elles sont présentes dans la majorité des lacs d'Amérique du Nord (Borkent 1981), elles sont tolérantes à de fortes concentrations de Cd (jusqu'à 19 nM) ainsi qu'à des eaux acides (jusqu'à pH 4) (Croteau et al. 1998). L'acidité peut être élevée dans les lacs contaminés en métaux, ainsi l'utilisation de *Chaoborus* comme biomoniteur

du Cd est très intéressante par rapport à des espèces sensibles à l'acidification comme les bivalves et les crustacés. D'autre part, les larves de *Chaoborus* ne présentent aucun dimorphisme sexuel, ni structures associées au cycle reproducteur (Croteau et al. 1998), ce qui simplifie l'utilisation de ces insectes comme biomoniteur. En outre, il existe un modèle permettant de relier la concentration de Cd dans *Chaoborus* à la concentration de Cd dans la colonne d'eau (Hare et Tessier 1996, 1998). Cette approche se base sur la théorie du modèle de l'ion libre (Campbell 1995, Morel 1983) et tient compte de la compétition entre les protons et les ions Cd^{2+} , pour prédire $[\text{Cd}]_{\text{Chaoborus}}$ à partir de $[\text{Cd}^{2+}]$.

$$[\text{Cd}]_{\text{Chaoborus}} = \frac{F \cdot [\text{Cd}^{2+}]}{[\text{H}^+] + K_a} \quad \text{Équation 4}$$

1.5 Biologie de *Chaoborus*

FIGURE 1 : Photo de *Chaoborus* (vue dorsale)



<http://www.gpmatthews.nildram.co.uk/index1.html>

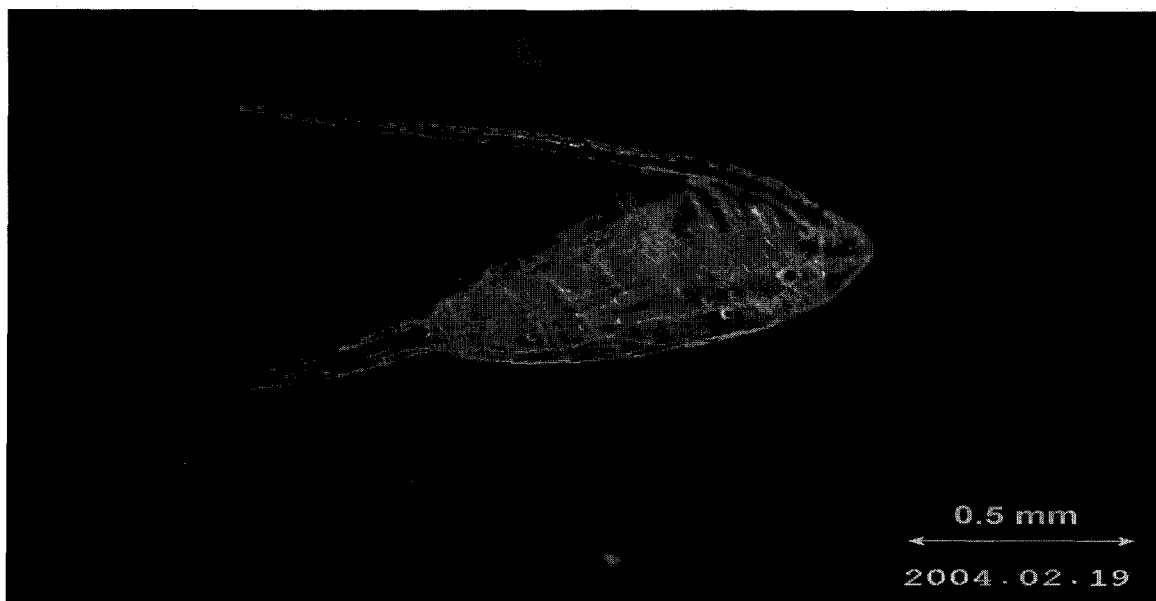
Chaoborus (Figure 1), notre biomoniteur de choix, est un insecte qui appartient à l'ordre des diptères et la famille des Chaoboridae. Il passe la majeure partie de sa vie (d'une durée d'un an sous nos latitudes) dans l'eau. L'œuf est déposé dans l'eau par la femelle, il se développe ensuite en larve. Puis, après 4 stades larvaires aquatiques, l'organisme se transforme en nymphe (ou « pupa ») et émerge ensuite sous sa forme adulte. L'insecte prend alors l'apparence d'un moustique blanc qui ne pique pas. Les larves de *Chaoborus* peuvent atteindre jusqu'à 2 cm de longueur et sont quasiment transparentes, mises à part deux paires de sacs de flottaison noirs qui les aident à se déplacer verticalement dans la colonne d'eau.

Dans les lacs du Bouclier canadien, on retrouve plusieurs espèces de *Chaoborus* y compris *C. albatus*, *C. punctipennis*, *C. flavicans* et *C. americanus*. Les trois premières espèces diffèrent de la quatrième par leur comportement migratoire dans la colonne d'eau au cours de leurs stades larvaires III et IV (Pope et al. 1973, Croteau et al. 2003). Durant la journée des mois d'été, les larves des espèces migratoires se trouvent enfouies dans les sédiments (ou dans l'hypolimnion, s'il est anoxique) et la nuit elles migrent dans l'épilimnion où elles peuvent se nourrir tout en étant à l'abri des prédateurs visuels comme les truites. *C. americanus*, qui est l'espèce non migratrice, a la particularité de rester constamment dans l'épilimnion. *C. americanus* ne se retrouve que dans les lacs dépourvus de poissons (Croteau et al. 2003).

Bien que considérés comme omnivores, puisqu'elles peuvent consommer du phytoplancton (Hare et Carter 1987, Moore 1988), les larves de *Chaoborus* sont avant tout des prédateurs de rotifères et de micro-crustacées comme les copépodes et les cladocères (Moore 1988). Comme ce prédateur avale ses proies en entier, le choix des proies, pour chaque stade larvaire, est déterminé par la taille de sa bouche (Hare et Carter 1987).

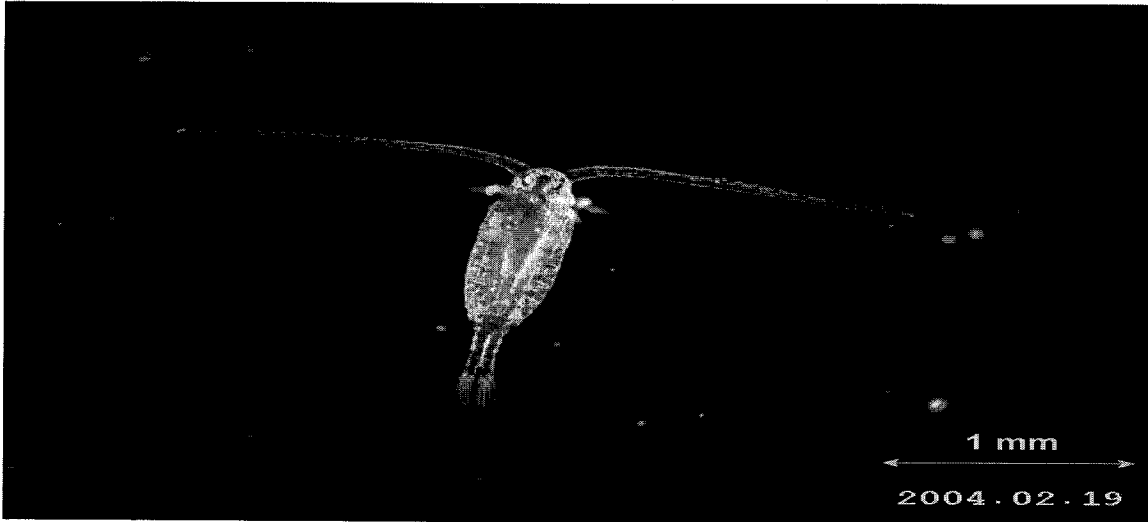
1.6 Biologie de *Diaptomus minutus* : proie de *Chaoborus*

FIGURE 2A : Photo de *D. minutus* (vue latérale)



<http://www.gpmatthews.nildram.co.uk/index1.html>

FIGURE 2B: Photo de *D. minutus* (vue dorsale)



<http://www.gpmatthews.nildram.co.uk/index1.html>

Diaptomus minutus (class Crustacea, ordre Copepoda, sous-ordre Calanoïda, famille Diaptomidae) (Photo 3a, 3b) est répandu dans les lacs du bouclier canadien (Shaw et Kelso 1992). La forme du corps, la position de la constriction du corps et la longueur de la première paire d'antennes sont des caractéristiques qui permettent de distinguer les calanoïdes des autres groupes de copépodes (Wilson 1959). Cette espèce est planctonique et occupe un rôle clef dans la chaîne alimentaire aquatique, en tant que consommateur primaire mais aussi en tant que proie pour les niveaux trophiques supérieures (Williamson 1991). La famille des Diaptomidae est la plus largement distribuée, et le groupe de copépode le plus abondant, dans les eaux douces d'Amérique du Nord (Williamson 1991).

Les œufs fertilisés représentent le premier stade de développement d'un calanoïde. Ils éclosent dans 1 à 5 jours après avoir été pondus par la femelle. Des seconds types d'œufs, des œufs de dormance, peuvent également être produit par la femelle. Ceux-ci n'éclosent que plusieurs mois avoir été relâché. Les deux types d'œufs peuvent être produit en même temps (Williamson 1991). Après émergence, les calanoïdes passent par six stades

de nauplies (N1-N6) et six stades de copépodites (C1-C6) avant d'atteindre le stade adulte. La durée de développement des différents stades varie en fonction de la température, de la disponibilité de la nourriture et du taux de prédation (Williamson 1991).

Les *Diaptomus minutus* sont des consommateurs d'algues et représentent une bonne source de nourriture pour certains autres types de copépodes (Peacock et Smyly 1983), pour les larves de chironomes, pour les larves de *Chaoborus* (Peacock 1982) ainsi que pour les poissons juvéniles (Wetzel 2001, Williamson 1991, Gurney 1931). Cette espèce est tolérante aux conditions acides ; on la retrouve dans les lacs acidifiés par des rejets anthropiques où le pH est inférieur à 5 (Sprules 1975a, 1975b).

1.7 Problématique

Les travaux de Hare et Tessier (1998, 1996) montrent que *Chaoborus* est un excellent candidat pour devenir un biomoniteur du Cd dans les milieux lacustres et qu'il existe un modèle, développé à partir des observations faites dans une série de lacs contaminés, qui permet de relier les concentrations de Cd dans les larves aux concentrations de Cd dans l'eau, à condition de tenir compte de la compétition entre les protons et les ions Cd^{2+} pour les sites de prise en charge biologique du Cd. Les travaux de Munger et Hare (1997) montrent que la nourriture est la principale voie d'entrée du Cd chez *Chaoborus*. Le modèle développé par Hare et Tessier (Équation 4) n'est donc pas une relation directe car les larves de *Chaoborus* ne prennent pas en charge le Cd directement de l'eau. Le Cd doit entrer dans la chaîne trophique à un niveau trophique inférieur, soit au niveau des proies des *Chaoborus*, soit à la base de la chaîne alimentaire c'est-à-dire au niveau des algues. La question est donc désormais de savoir à quels niveau(x) trophique(s) a lieu la compétition entre H^+ et Cd^{2+} . A-t-elle lieu au niveau des algues, au niveau des herbivores (comme les calanoïdes) qui sont les proies de *Chaoborus*, ou a-t-elle lieu dans le tractus de *Chaoborus* (comme le suggèrent Croteau et al. 2003)? Répondre à cette question permettrait de raffiner éventuellement le modèle de Hare et Tessier (1996) et peut-être d'expliquer pourquoi les concentrations en Cd dans les larves observées dans certains

lacs atypiques ne correspondent pas aux valeurs prédites par le modèle (Croteau et al. 2003).

1.8 Objectifs

Notre étude a pour objectif global de déterminer à quel(s) niveau(x) trophique(s) a lieu la compétition entre les protons et les ions Cd^{2+} dans la chaîne trophique menant à *Chaoborus*. Pour cela nous nous fixons plusieurs objectifs :

- Objectif 1.** Déterminer si la compétition entre H^+ et Cd^{2+} pour les sites de prise en charge biologique a lieu dans le tractus digestif de *Chaoborus americanus*.
- Objectif 2.** Déterminer si *Chaoborus americanus* peut contrôler le pH de son tractus dans des milieux acides et basiques.
- Objectif 3.** Déterminer l'importance relative de l'eau et de la nourriture comme sources de Cd chez le copépode *Diaptomus minutus*, une proie de *Chaoborus*.
- Objectif 4.** Déterminer si la compétition entre H^+ et Cd^{2+} a lieu chez *Diaptomus minutus*.

2. METHODES

Certains détails méthodologiques qui ne figure pas dans cette section sont donnés dans la partie 2 du mémoire.

2.1 Collecte des organismes

2.1.1 Choix et échantillonnage de *Chaoborus americanus*

Nous avons choisi *Chaoborus americanus* pour réaliser nos expériences. Cette espèce, non migratrice (voir la section 1.5 «Biologie de *Chaoborus*»), offre l'avantage de pouvoir être récoltée durant le jour, avec un simple filet plutôt qu'avec une benne à sédiment. Cette méthode de capture diminue de beaucoup le temps de capture et de triage. D'autre part, le fait que cette espèce soit entièrement pélagique, contrairement aux autres espèces de *Chaoborus* qui sont benthiques le jour, permet d'avoir des conditions expérimentales proches des conditions naturelles en évitant le stress que peut occasionner l'absence de sédiment dans nos expériences. D'autre part, étant donné que *C. americanus* est une des espèces dont la taille est l'une des plus grandes parmi les 4 espèces retrouvées communément au Québec (Croteau et al. 2001), elle peut être nourrie avec des proies de grande taille, ce qui facilite la manipulation et le triage des proies. Les travaux de Croteau et al. (2001) montrent, quant à eux, que les taux d'accumulation du Cd sont élevés (74 ng Cd.g⁻¹.d⁻¹) chez *C. americanus* comparativement à ceux de *C. albatus* (9 ng Cd.g⁻¹.d⁻¹) et *C. punctipennis* (16 ng Cd.g⁻¹.d⁻¹) ce qui permet d'avoir des valeurs d'accumulation facilement mesurables.

Les *Chaoborus americanus* proviennent du lac Pelouse, (pH 5,6; 47° 01' N, 72° 05' W). Ce lac est situé dans une région de lacs faiblement contaminés en Cd, où l'absence de poisson prédateur de *Chaoborus* comme la truite et le doré permet d'avoir de fortes densités de larves.

2.1.2 Choix et échantillonnage de *Diaptomus minutus*, une proie de *Chaoborus*

Les larves de *C. americanus* consomment une grande variété d'espèces de plancton. Pourquoi avons nous choisi le copépode *D. minutus* comme proie dans nos expériences? *Diaptomus minutus* est une espèce tolérante aux conditions acides (Sprules 1975a, 1975b). C'est une espèce commune aux lacs québécois et facile à trier, car la vitesse de nage est moins rapide que celle des autres zooplanctons du même taille. D'autre part, ce copépode est assez petit pour être ingéré par *C. americanus*, mais assez gros pour être facilement manipulé. Enfin, *D. minutus* est un herbivore, ce qui permet de recréer en laboratoire, une chaîne alimentaire composée d'algues, de *D. minutus* et de *C. americanus*. L'inconvénient de cette espèce est qu'il est difficile d'en faire l'élevage et de la conserver plus d'une semaine en laboratoire.

Les *D. minutus* proviennent du lac Bleu (pH 5,6 ; 46° 55' N, 71° 58' W) qui est situé dans une région de lacs faiblement contaminés en Cd et qui contient une forte densité de *D. minutus*. Une fois prélevés, les échantillons étaient transportés dans une glacière au laboratoire. Ils étaient ensuite placés dans une chambre environnementale à température régulée à 15°C. Cette température correspondait à la température moyenne des lacs au moment de l'échantillonnage.

2.1.3 Choix, culture et contamination de *Pseudokirchneriella subcapitata*

Pseudokirchneriella subcapitata, anciennement nommée *Selenastrum capricornutum*, est souvent utilisée en écotoxicologie. Les méthodes de culture, la vitesse de croissance et la biologie de l'espèce sont bien documentées, ce qui facilite la culture et la reproductibilité des résultats avec cette algue. Cette algue offre aussi les avantages d'être consommée par *D. minutus* et d'accumuler et de tolérer de fortes concentrations de Cd. Les algues sont cultivées sur un milieu Bristol dont la composition est donnée dans le tableau 1. Le milieu Bristol est fabriquée à partir de solutions mères concentrées de macroéléments et

de microéléments : métaux et (EDTA) acide éthylènediaminetétracétique. Pour préparer les milieux de culture, nous versons dans un flacon Erlenmeyer en verre, 2,5 ml de chaque solution mère de macroéléments et 250 μl de chaque solution mère de microéléments, nous complétons le volume à 500 ml avec de l'eau milliQ, nous fermons le flacon avec à un morceau de coton emballé dans du papier fromage que nous recouvrons de papier aluminium et nous plaçons le tout à l'étuve pour une durée de 40 minutes. Ensuite les solutions sont laissées pendant 24 heures à la température de la pièce, sous une hotte à flux laminaire, après quoi on inocule dans le milieu de croissance, 10 ml d'une solution d'algue d'une densité d'environ 5.10^6 cellules/ml. Les manipulations se font sous une hotte à flux laminaire pour éviter la contamination des milieux. La culture est ensuite placée à 23 °C, sous un éclairage de néon, le brassage des algues est assuré par bullage. L'air est préalablement filtré en passant par un flacon rempli d'eau et par un filtre d'une porosité de 4 microns. La phase exponentielle de croissance est atteinte au bout de 3-4 jours.

Pour contaminer les algues en Cd, nous suivons un autre protocole de culture. Le milieu de culture est préparé comme décrit précédemment, excepté que l'on n'ajoute pas de microéléments et que le milieu est préparé dans des flacons en polycarbonate pour empêcher l'adsorption du Cd sur les parois. Après l'étuve, nous inoculons, dans le milieu, 50 ml de l'acide 2-morpholinoéthanesulfonique, un tampon organique, chargé de maintenir le pH constant et d'éviter les fluctuations de la spéciation du Cd en solution au cours de la croissance des algues. Nous ajustons le pH avec un pH mètre en ajoutant à peu près 50 ml de NaOH à 0,1M. Nous ajoutons ensuite 0,5 ml d'un ligand organique, l'acide nitrilotriacétique (NTA) 10^{-2} M, ce qui donne une concentration finale de 10^{-5} M. Ce tampon permet de maintenir la concentration de Cd^{2+} constante durant la période de croissance. Sans ce ligand, étant donné les faibles concentrations en Cd libre et les fortes densités d'algue presque tout le Cd libre serait accumulé par les algues dès le début de la période d'exposition.

Enfin, nous ajoutons 13,3 ml d'une solution de ^{109}Cd d'une concentration de 14 μM ce qui donne une concentration de Cd totale de 0,32 μM et une concentration de Cd libre de

5,3 nM soit 1,6% du Cd total. La spéciation du Cd dans le milieu de croissance des algues est calculée par MINEQL+. Les valeurs d'expositions des algues pour chaque expérience sont données dans le tableau 1 de la partie 2 du mémoire.

TABLEAU 1 : Composition chimique du milieu Bristol et des solutions mères concentrées

Milieu Bristol sans métaux, sans EDTA							
macroéléments	masse molaire	concentrations dans les solutions mères	concentrations dans les solutions mères	concentrations dans le milieu Bristol sans NTA, sans métaux	dilution	éléments	concentrations dans le milieu Bristol sans NTA, sans métaux
	g/mol	g/l	mol/l	mol/l			mol/L
NaNO3	85	25	0,29	1,47E-03	F200	B	
CaCl2. 2H2O	146,9	2,5	0,02	8,51E-05		CO3	
MgSO4 . 7H2O	246,3	7,5	0,03	1,52E-04		Ca	8,51E-05
K2HPO4	174,17	7,5	0,04	2,15E-04		Cl	3,84E-04
KH2PO4	136,07	17,5	0,13	6,43E-04		Co	
NaCl	58,45	2,5	0,04	2,14E-04		Cu	
						Fe	
microéléments						H	
EDTA-Na2	336,32	50	0,13	0	F2000	K	1,07E-03
KOH	56,09	31	0,55	0		Mg	1,52E-04
FeCl3. 6H2O	270,2	4,84	0,02	0		Mn	
H3BO3	61,81	11,42	0,18	0		Mo	
MnCl2 . 4H2O	197,83	1,44	0,01	0	F2000	Na	1,68E-03
ZnSO4 . 7H2O	287,46	8,82	0,03	0		NO3	1,47E-03
MoO3	143,94	0,71	0,00	0		PO4	8,58E-04
CuSO4. 5H2O	249,61	1,57	0,01	0		SO4	1,52E-04
Co(NO3)2. 6H2O	290,93	0,49	0,00	0		Zn	
						EDTA	

2.2 Les traceurs radioactifs

Les traceurs radioactifs sont souvent utilisés pour faciliter les mesures de prise en charge ou de perte d'un métal par un organisme. Cette approche permet de mesurer de très faibles quantités de Cd. Elle diminue également le temps d'analyse, les erreurs de manipulation et le risque de contamination. Les traceurs permettent aussi de faire des mesures chez des organismes vivants. Au cours de nos expériences nous utilisons du ^{109}Cd . A partir d'une solution mère (1ml, 1 μCi), nous préparons une solution intermédiaire moins radioactive. Pour préparer la solution intermédiaire nous mettons dans une bouteille en téflon, 200 μl de la solution mère, 2 ml de HNO_3 concentré et 314 ml d'un étalon de ^{112}Cd de 1000 mg.l^{-1} nous complétons le volume à 200 ml avec de l'eau milliQ ce qui donne une activité spécifique de $71,43 \mu\text{Ci.mmol}^{-1}$. La mesure de ^{109}Cd se fait avec un compteur gamma dont le principe est de compter le nombre de particule par minute (CPM, compte par minute) que le radioélément émet en se désintégrant. Les CPM mesurés dans les organismes sont convertis en quantité de Cd total, en utilisant le rapport $54 \times 10^6 \text{ CPM}/\mu\text{mol}$ de Cd total. Ce rapport de conversion est établi en mesurant au compteur le nombre de CPM que donne un échantillon de la source intermédiaire de quantité de Cd totale connue. Avec le temps, l'activité spécifique diminue et donc le rapport de conversion diminue car le radioélément se désintègre. Cependant, nous considérons que la demi vie du cadmium est assez longue (462,6 jours) pour que le rapport de conversion établi reste constant durant le temps d'utilisation de la source intermédiaire (30 jours). Les temps de comptage sont déterminés de manière à obtenir une erreur maximum de 5%.

2.3 Représentativité des résultats

Les conditions expérimentales sont proches des conditions naturelles. L'eau de lac reconstituée utilisée dans nos milieux d'exposition est préparée en utilisant les concentrations d'ions majeurs mesurées dans un lac représentatif des lacs échantillonnés : concentration des ions majeurs en μM Ca^{2+} (21), Mg^{2+} (9,2), Na^+ (23,6), K^+ (2,3), SO_4^{2-} (21), Cl^- (7,5), NO_3^- (6,3) ($[\text{Cd}]_{\text{total}} = [\text{Cd}^{2+}]$),

MINEQL). Les concentrations de Cd libre et les pH dans les milieux d'exposition (tableau 2 partie 2) sont proches des concentrations retrouvées dans les lacs contaminés (Croteau et al. 1998). Les expériences ont lieu dans une chambre environnementale à température régulée à 15°C. Cette température correspond à la température moyenne des lacs au moment de l'échantillonnage. Dans toutes les expériences, les algues sont offertes en excès aux copépodes pour être sûr que les copépodes ne manquent pas de nourriture. La densité de copépodes est plus élevée dans nos expériences (4 copépodes mL⁻¹) qu'en milieu naturel (jusqu'à 0,5 copépodes mL⁻¹) pour minimiser le volume des milieux d'exposition et donc minimiser la quantité de ¹⁰⁹Cd à utiliser. Lors des expériences, les copépodes sont brassés et maintenus à l'obscurité pour éviter la déposition et la croissance des algues. Ces conditions expérimentales sont proches des conditions naturelles auxquelles sont soumis les copépodes et sont appliquées à tous les traitements, nous assumons donc qu'elles ne biaisent pas nos résultats.

2.4 Montages expérimentaux

2.4.1 Détermination de la compétition H⁺-Cd²⁺ chez *Chaoborus americanus*

Pour déterminer la compétition H⁺-Cd²⁺ chez *Chaoborus americanus*, nous mesurons l'accumulation de Cd chez des larves exposées à 3 pH différents (4,5, 5,5 et 6,5) à de l'eau de lac synthétique et des proies contaminées en Cd. Les concentrations en Cd dans les proies *Diaptomus minutus* [Cd]_f sont identiques entre les traitements mais variables au cours de l'expérience. La concentration de Cd dans l'eau de lac synthétique est maintenue identique entre les traitements et constante au cours de l'expérience. L'expérience, (Figure 3) se fait en 5 étapes :

1-Contamination des algues (Description dans la section de la partie 2.1.3)

2-Contamination des proies de *Chaoborus*, *Diaptomus minutus*

Toutes les 24 heures, environs 500 copépodes sont maintenues dans de l'eau contaminée en Cd et nourris avec des algues contaminées en Cd. [Cd]_{algue} et [Cd²⁺] sont variables au

cours de l'expérience. Au 4^{ième} et 9^{ième} jours, nous mesurons $[Cd]_{\text{copépode}}$ dans 3 réplicats de 60 copépodes chacun ($0,13 \pm 0,01$, $0,12 \pm 0,01$, pmol pour les périodes 0-4 et 5-9 jours). Les proies sont mesurées comme décrit dans la section 2.5.3. Les copépodes sont mis à dépurés pendant 4 heures dans de l'eau contaminée avant d'être offerts aux *Chaoborus*. Ceci diminue les différences de $[Cd]_{\text{copépode}}$ entre les premiers copépodes consommés par les larves et ceux consommés 4 heures après.

3-Contamination des *Chaoborus americanus*

Seules les larves au 4^{ième} stade sont utilisées dans les expériences. La description du montage expérimental (Figure 4) de l'exposition des larves au pH, à l'eau et à la nourriture contaminée est décrite dans la partie 2 du mémoire. Toutes les 5 heures durant la journée, les proies non consommées sont retirées et remplacées par de nouvelles proies contaminées. Nous comptons chaque jour le nombre de proie consommée. Le pH est mesuré toutes les 6 heures durant la journée et ajusté avec un ajout de NaOH ou de HNO₃ (10^{-2} M). $[Cd^{2+}]$ est mesurée au 4^{ième} jour ($[Cd^{2+}] = 8\text{nM} (\pm 0,4)$; n= 9) et au 9^{ième} jour ($[Cd^{2+}] = 7\text{nM} (\pm 0,3)$; n=9) dans tous les traitements.

4-Mesure de Cd dans *Chaoborus*

24 heures avant chaque temps de mesure, aux 4^{ième} et 9^{ième} jours, les larves ne reçoivent pas de nourriture pour que leur tractus soit vide lors de la mesure. Les larves sont ensuite rincées 5 fois avec de l'eau de lac synthétique propre, placées au compteur gamma pendant 30 minutes puis remises dans leur milieu d'exposition.

5-Calcul de l'efficacité d'assimilation, AE

Pour déterminer si la compétition $H^+ - Cd^{2+}$ a lieu chez *Chaoborus*, nous calculons et comparons les efficacités d'assimilation déterminées à partir des quantités de Cd accumulées par les *Chaoborus*. Le modèle de bioaccumulation (Équation 3) nous permet d'écrire:

$$\frac{d[Cd]_{\text{Chaoborus}}}{dt} = k_w[Cd^{2+}] + k_f[Cd]_f - (k_e + k_g)[Cd]_{\text{Chaoborus}} \quad \text{Équation 5}$$

Où k_e est la constante de taux de perte (j^{-1}), k_g la constante de taux de croissance (j^{-1}) que nous considérons négligeable dans notre expérience. k_w , la constante de prise en charge

($l.g^{-1}.j^{-1}$) par l'eau est considérée négligeable car les travaux de Munger et Hare (1997) ont montré que la nourriture était la principale source de Cd pour *Chaoborus*. k_f est la constante de prise en charge par la nourriture et correspond à :

$$K_f = AE \times IR \quad \text{Équation 6}$$

où IR est le taux d'ingestion ($proie.j^{-1}$).

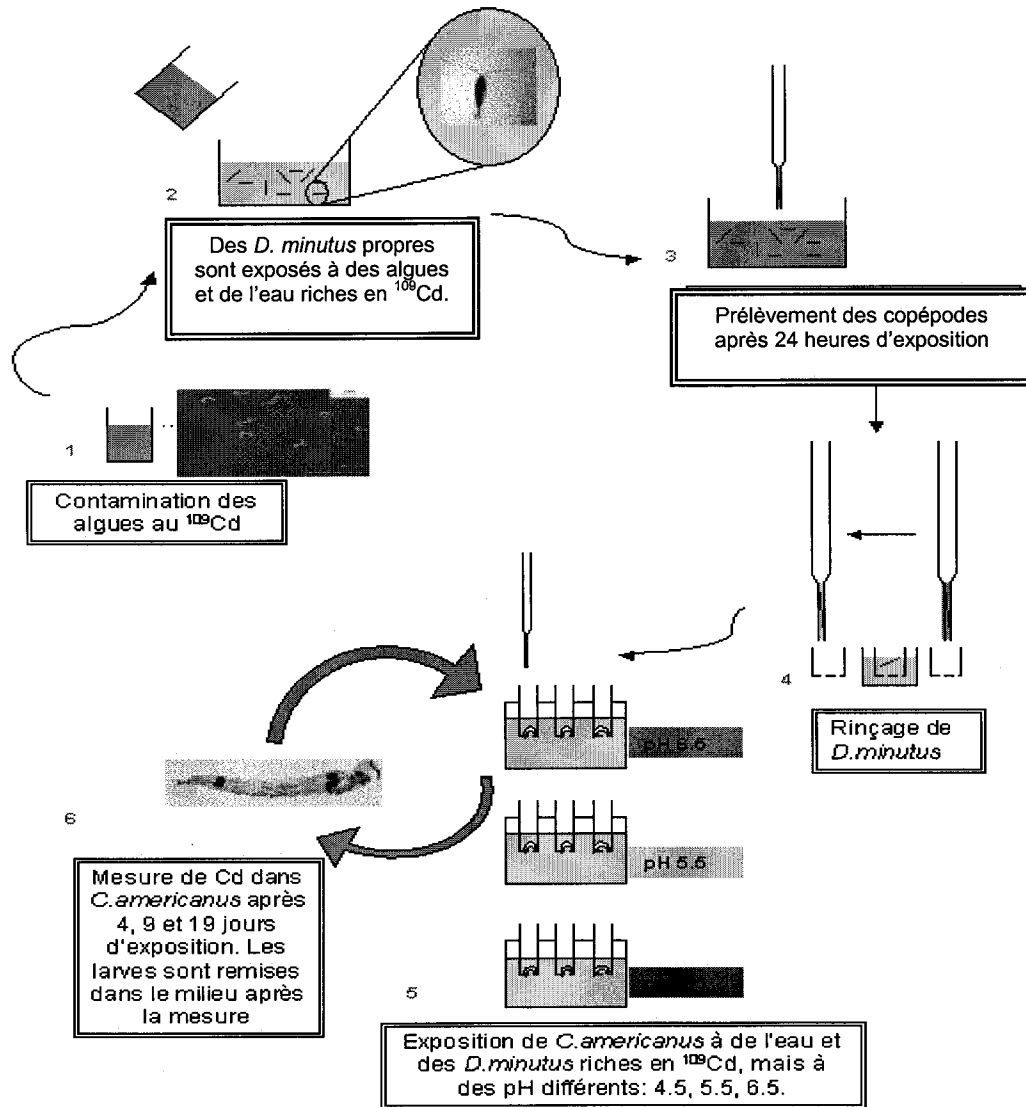
En remplaçant l'équation 6 dans l'équation 5 on a :

$$\frac{d[Cd]_{Chaoborus}}{dt} = (AE \times IR) \times [Cd]_f - (K_e)[Cd]_{Chaoborus} \quad \text{Équation 7}$$

En remplaçant les concentrations de Cd par les quantités de Cd ingérées et en ne tenant pas compte de la perte on obtient :

$$AE = \frac{dQ_{Cd-Chaoborus}/dt}{IR \times Q_{Cd-prey}} \times 100 \quad \text{Équation 8}$$

FIGURE 3 : Montage expérimental de l'expérience de détermination de la compétition entre H^+ et Cd^{2+} chez *C. americanus*



2.4.2 Mesures de pH dans le pH du tractus de *Chaoborus americanus*

Pour déterminer le pH du tractus de *Chaoborus*, nous avons utilisé une mesure de pH colorimétrique. Le corps des *Chaoborus* étant transparent, nous pouvons déterminer, à l'aide d'indicateurs de pH colorés, le pH dans le tractus des larves. Dix larves ont été placées dans un milieu d'eau de lac synthétique acide à pH 4,5 contenant un indicateur de pH, le lacmoïde. Le lacmoïde est rouge vin pour un pH inférieur à 4,5 et change graduellement de couleur pour devenir bleu foncé à partir de 6. Après 24 heures, la couleur du tractus des larves fut observée avec un binoculaire puis comparée à la couleur de l'indicateur titré de pH 4,5 à pH 6,5. De la même façon que précédemment, 10 larves ont été placées dans un milieu d'eau de lac synthétique basique à pH 9 contenant un autre indicateur de pH, l'alizarin. L'alizarin est rouge marron pour un pH supérieur à 9 et change graduellement de couleur pour devenir orange à partir de 8,5. Après 24 heures d'exposition, la couleur de l'indicateur dans le tractus a été comparée à la couleur de l'indicateur, alizarin, titré de pH 9 à pH 8.

2.4.3 Détermination des voies d'entrée du Cd chez le copépode *D. minutus*.

Pour déterminer la source de Cd chez *Diaptomus minutus*, nous mesurons l'accumulation de Cd chez des copépodes exposés à un seul pH (5,5), aux mêmes algues contaminées et à 2 concentrations de Cd²⁺ dans l'eau. Le montage expérimental est semblable à celui illustré dans la figure 4, excepté que les copépodes sont exposés un seul pH (5,5) et à 2 concentrations de Cd²⁺. L'expérience se divise en 4 étapes :

1-Contamination des algues (la description est donnée dans la section 2.1.3)

Après 4 jours de croissance, on obtient 2 flacons de 500 ml d'algues concentrées contaminées qui sont utilisés comme nourriture pour les copépodes. Au cours de l'expérience, ces algues sont maintenues sous les mêmes conditions que durant la période de culture.

2-Préparation des 2 milieux d'exposition

Deux nouveaux milieux d'exposition sont préparés toutes les 6 heures. Les milieux d'exposition sont préparés à partir des 2 flacons d'algues contaminées. Pour préparer un milieu d'exposition on prend 150 ml d'algues contaminées, les algues sont rincées par 3 centrifugations de 4 minutes à 6000g et 4 resuspensions dans l'eau de lac synthétique. La dernière resuspension se fait dans 2 volumes de 160 ml d'eau de lac synthétique. Dans une des solutions on ajuste le pH à 5,5 en ajoutant du HNO_3 et on obtient un milieu d'exposition à faible concentration de $[\text{Cd}^{2+}]$, suite à la désorption de Cd par les algues. Dans l'autre solution, on ajoute 57 μl de la solution intermédiaire de ^{109}Cd de façon à obtenir une solution d'exposition de concentration $[\text{Cd}^{2+}] = 5\text{nM}$. On ajuste ensuite le pH à 5,5 ml en ajoutant du NaOH et en contrôlant avec le pH mètre.

3-Contamination des copépodes *Diaptomus minutus*

Pendant 24 heures les copépodes sont mis dans de l'eau de lac synthétique propre, à pH 5,5 et nourris avec des algues propres. Après la période d'acclimatation, les copépodes sont placés dans leur milieu d'exposition comme décrit dans la partie 2 du mémoire. $[\text{Cd}]_{\text{algue}}$ et $[\text{Cd}^{2+}]$ sont mesurées une seule fois au cours de l'expérience dans les 3 traitements. Le pH est mesuré toutes les 12 heures. Les algues et l'eau sont renouvelées toutes les 6 heures. Des expériences préliminaires nous ont montré que $[\text{Cd}]_{\text{algue}}$ et $[\text{Cd}^{2+}]$ restait constante dans les algues contaminées mises dans de l'eau de lac synthétique propre et de l'eau de lac synthétique contaminée pendant 10 heures.

4-Mesure de $[\text{Cd}]_{\text{copépo\`de}}$

Au temps 0,79; 1,21; 2,0; 2,33 jours, on vérifie au microscope que le tractus des copépodes est plein. Les copépodes morts sont comptés et retirés de l'expérience. Les copépodes vivant sont rincés 5 fois avec l'eau de lac synthétique propre, placés au compteur gamma pendant 200 secondes, puis remis dans leur milieu d'exposition. Connaissant le nombre d'individu mesuré, le poids sec moyen d'un copépo\`de (1,1 μg /individu ; Munger et Hare 2000) et la quantité de Cd accumulée dans les copépodes, nous calculons la concentration dans les copépodes $[\text{Cd}]_{\text{copépo\`de}}$.

2.4.4 Détermination de la compétition H^+ - Cd^{2+} chez *D. minutus*.

Pour déterminer la compétition H^+ - Cd^{2+} chez *Diaptomus minutus*, nous mesurons l'accumulation de Cd chez des copépodes exposés à 3 pH (4,8; 5,5; 6,5), à la même concentration de Cd^{2+} dans l'eau et aux mêmes algues contaminées. Le montage expérimental est illustré à la figure 4. Le pH le plus acide est de 4,8 car les copépodes sont moins résistants en dessous de ce pH. L'expérience se divise en 4 étapes :

1-Contamination des algues (la description est donnée dans la section 2.1.3)

Après 4 jours de croissance, on obtient 2 flacons de 500 ml d'algues concentrées contaminées qui sont utilisés comme nourriture pour les copépodes. Au cours de l'expérience, ces algues sont maintenues sous les mêmes conditions que durant la période de culture.

2-Préparation des milieux d'exposition

Des nouveaux milieux d'exposition sont préparés toutes les 6 heures. Les milieux d'exposition sont préparés à partir des 2 flacons d'algues contaminées. Pour préparer un milieu d'exposition on prend 150 ml d'algues contaminées, les algues sont rincées par 3 centrifugations de 4 minutes à 6000g et 4 resuspensions dans l'eau de lac synthétique. La dernière resuspension se fait dans 600 ml d'eau synthétique auquel on ajoute 214 μ l de solution intermédiaire de ^{109}Cd pour obtenir une solution d'exposition de concentration $[Cd^{2+}] = 5$ nM. On ajuste ensuite le pH à 4,8 puis à 5,5 puis à 6,4 en ajoutant du NaOH et en contrôlant avec le pH mètre.

3-Contamination des copépodes *Diaptomus minutus*

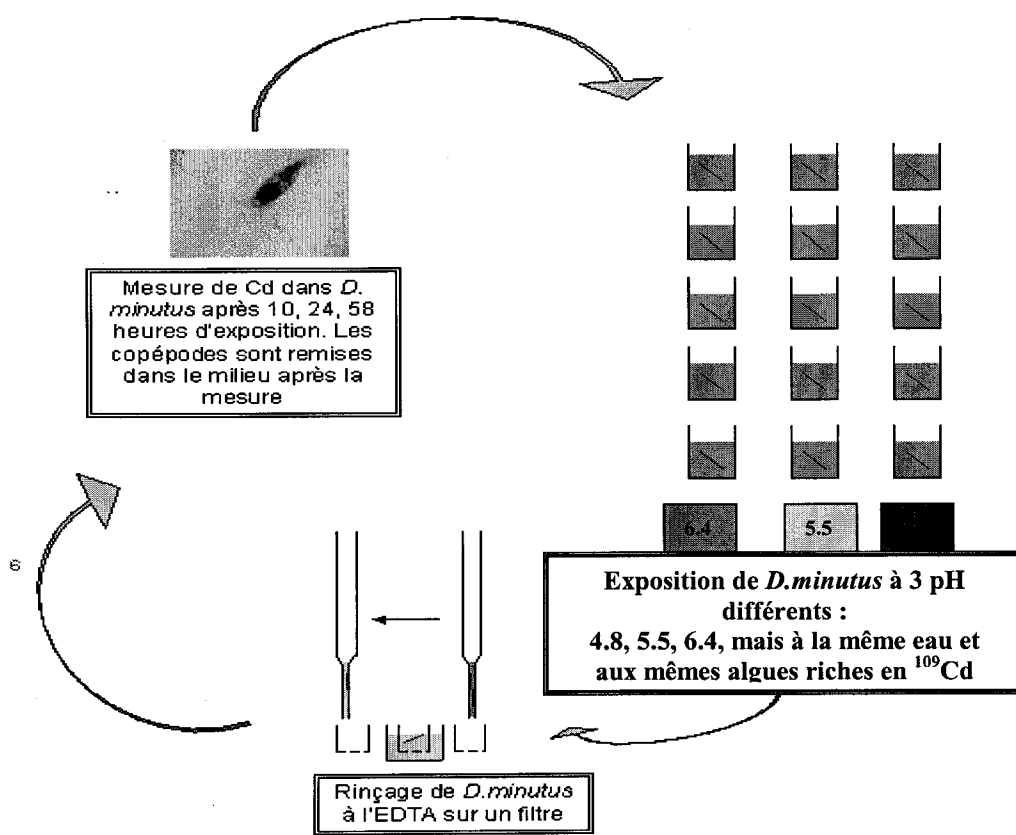
Pendant 24 heures les copépodes sont mis dans de l'eau de lac synthétique propre, à pH 4,8, 5,5 et 6,4 et nourris avec des algues propres, excepté pour les copépodes à pH 6,5 qui, suite à une mauvaise manipulation, n'ont pas reçu de nourriture durant cette période d'acclimatation. Les copépodes sont ensuite placés dans leur milieu d'exposition comme décrit dans la partie 2 du mémoire. $[Cd]_{algue}$ et $[Cd^{2+}]$ sont mesurées à 1,58 et 2 jours. La

mesure est faite dans les 3 traitements, (2 réplicats par traitement). Le pH est mesuré toutes les 12 heures. Les milieux d'exposition sont renouvelés toutes les 6 heures.

4-Mesure de $[Cd]_{\text{copépodes}}$

A temps 0,63; 1,04; 1,58; 2,54 jours, on mesure $[Cd]_{\text{copépode}}$ selon la méthode décrite dans la section précédente.

FIGURE 4 : Montage expérimental de l'expérience de détermination de la compétition H^+ - Cd^{2+} chez *D. minutus*.



2.4.5 Expérience de perte du Cd chez *D. minutus*.

Pendant 3 jours, des copépodes placés à pH 4,8; 5,5 et 6,4 sont exposés à de l'eau et à des algues contaminées en ^{109}Cd . Les copépodes sont ensuite rincés 5 fois avec de l'eau de lac synthétique propre et placés dans un milieu d'eau de lac synthétique et d'algues propres. A temps 0,02; 0,04; 0,06; 0,25; 1,00 jours, on mesure la concentration de Cd dans les copépodes selon la méthode décrite précédemment puis on les replace dans un nouveau milieu d'algue et d'eau propre.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 La compétition entre H^+ et Cd^{2+} , a-t-elle lieu dans le tractus digestif de *Chaoborus americanus* ?

3.1.1 Expérience de compétition H^+ - Cd^{2+} chez *C. americanus*

Pour déterminer si la compétition H^+ - Cd^{2+} a lieu chez *Chaoborus*, nous comparons les efficacités d'assimilation chez des larves exposées à pH 6,5, 5,5 et 4,5. La comparaison des différences d'efficacité d'assimilation permet de tenir compte des différences d'accumulation de Cd dues aux différences de taux d'ingestion. Nos résultats indiquent qu'après 4 et 9 jours d'accumulation, il n'y a pas de différences significatives entre les efficacités d'assimilation du Cd chez les larves (Figure 1 dans la partie 2). La compétition entre H^+ et Cd^{2+} n'a donc pas lieu chez *C. americanus*.

3.1.2 pH du tractus digestif de *Chaoborus americanus*

Afin d'expliquer l'absence de compétition H^+ - Cd^{2+} dans le tractus digestif de *Chaoborus*, nous mesurons le pH du tractus de larves placées pendant 10 heures dans des milieux d'exposition acides et basiques. La couleur bleue de l'indicateur de pH lacmoïde dans le

tractus de *Chaoborus* (Figure 5), nous montre que les larves sont capables de maintenir le pH de leur tractus au dessus de 6 lorsqu'elles sont dans un milieu acide à pH 4.5. La couleur orange de l'indicateur de pH alizarin dans le tractus de *Chaoborus* (Figure 6), nous montre que les larves sont capables de maintenir le pH de leur tractus au dessous de 8,5 lorsqu'elles sont dans un milieu basique à pH 9. Les *Chaoborus* sont donc capable de maintenir le pH de leur tractus entre 6 et 8,5 quand le pH du milieu extérieur varie de 4.5 à 9. La stabilité du pH du tractus des *Chaoborus* explique l'absence de compétition Cd^{2+} - H^+ dans le tractus de *Chaoborus*. La technique colorimétrique employée a l'avantage d'être facile à utiliser et de permettre de faire des mesures sur des organismes vivants. Elle est cependant subjective et peu précise.

FIGURE 5 : Photos de l'indicateur de pH lacmoïde dans le tractus antérieur (a gauche) et moyen (a droite) de *C. americanus*

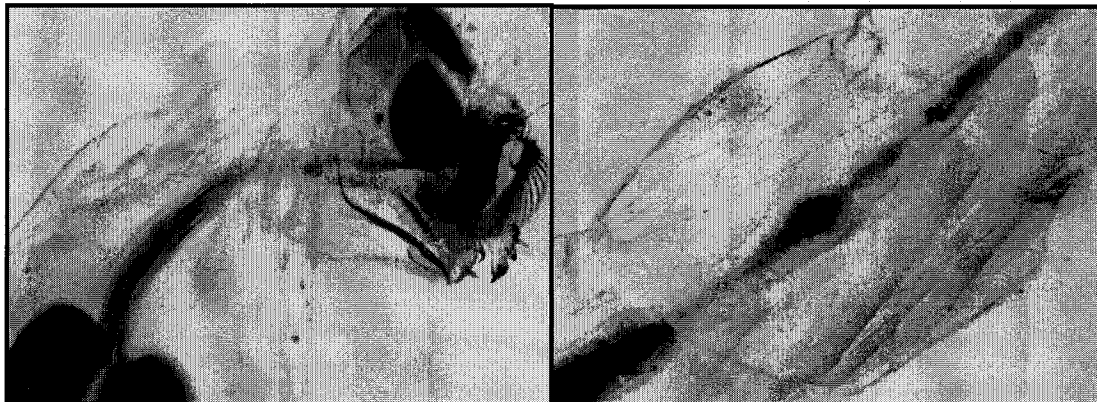
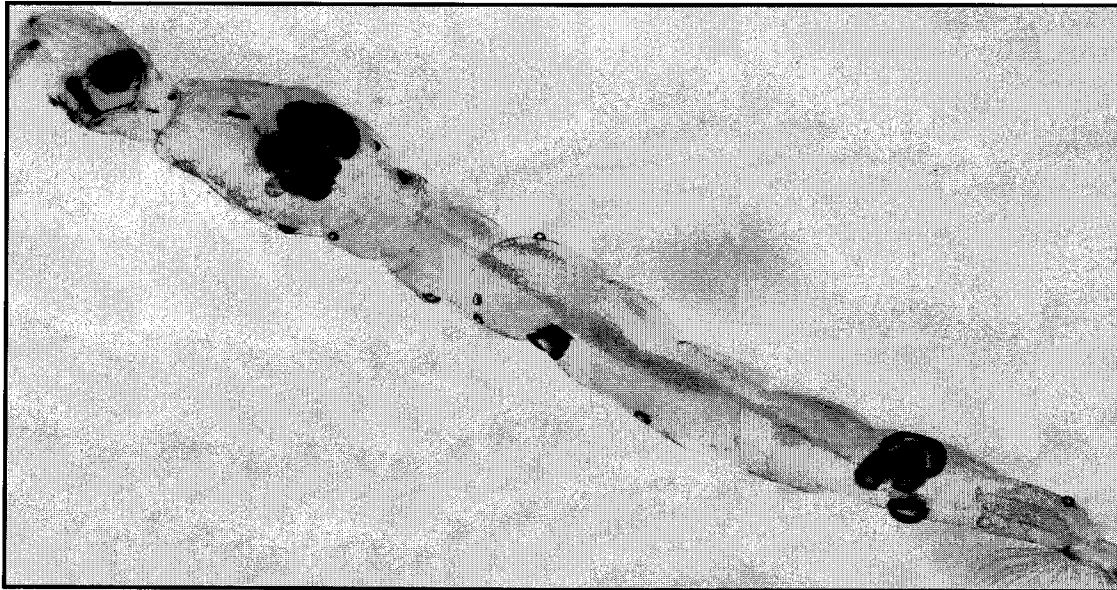


FIGURE 6 : Photos de l'indicateur de pH alizarin dans le tractus de *C. americanus*



3.2 La compétition entre H^+ et Cd^{2+} , a-t-elle lieu chez *D. minutus* ?

3.2.1 Voies d'entrées du Cd chez *Diaptomus minutus*

Pour déterminer quelle est la source de Cd pour les copépodes, nous exposons des copépodes à deux concentrations de $[Cd^{2+}]$, $[Cd]_{high} = 5 \text{ nM}$ et $[Cd]_{low} = 1,6 \text{ nM}$ et nous maintenons la concentration dans la nourriture et le pH constants. Les concentrations de Cd^{2+} et de Cd_{algue} ont été mesurés une seule fois dans les 2 traitements au cours de l'expérience, nous assumons que les concentrations restent constantes et que la variabilité est égale à la variabilité maximum observée dans les expériences préliminaires similaires. Nos résultats (Figure 2 dans la partie 2 du mémoire) montrent que les copépodes accumulent moins de Cd aux basses concentrations de Cd^{2+} . L'eau est donc une source de Cd pour les copépodes. Pour quantifier l'importance de l'eau et de la nourriture comme source de Cd pour les copépodes, nous utilisons le modèle de bioaccumulation présenté dans la section 1.2.6. En intégrant l'équation (5) nous obtenons :

$$[\text{Cd}]_{\text{copepode}} = \frac{k_w[\text{Cd}^{2+}] + k_f[\text{Cd}]_f}{k_e} \times (1 - e^{-k_e t}) + [\text{Cd}_0] e^{-k_e t} \quad \text{Equation 9}$$

Où k_e est la constante de taux de perte (j^{-1}), k_g la constante de taux de croissance (j^{-1}) considérée négligeable dans notre expérience, k_w est la constante de prise en charge ($\text{l.g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) de Cd par l'eau, k_f , la constante de prise en charge de Cd par la nourriture (j^{-1}), $[\text{Cd}_0]$ est la concentration initiale de Cd dans les copépodes. Dans nos expériences, la concentration de cadmium radioactive est nulle au temps initial, l'équation 9 s'écrit donc :

$$[\text{Cd}]_{\text{copepode}} = \frac{k_w[\text{Cd}^{2+}] + k_f[\text{Cd}]_f}{k_e} \times (1 - e^{-k_e t}) \quad \text{Equation 10}$$

k_e est déterminé par une expérience de perte réalisé à pH 4,8, 5,5 et 6,4. Nous supposons que la perte suit un modèle de premier ordre à un compartiment. Le modèle s'écrit (Newman et Unger 2003):

$$[\text{Cd}]_{\text{copepode}} = [\text{Cd}_0] e^{-k_e t} \quad \text{Équation 11}$$

Où $[\text{Cd}_0]$ est la concentration de Cd initiale dans les copépodes. Les paramètres k_e (Tableau 3) sont estimés par une opération de <curve fitting> réalisé par le logiciel SigmaPlot. Les valeurs déterminées correspondent aux valeurs de k_e pour lequel le modèle (Équation 11) décrit le mieux les données observées. Le temps de dépuración du tractus des copépodes étant de 30 minutes, nous estimons le paramètre k_e seulement à partir des valeurs de concentration de Cd mesurées 30 minutes après le début de l'expérience de perte. Nous constatons que les courbes de pertes prédites par le modèle, (Figure 4 dans la partie 2 du mémoire) ne décrivent pas toutes les données observées, un

modèle à deux compartiments serait donc peut-être plus adapté pour décrire nos données (Croisetière et al. 2005).

Pour déterminer k_w , nous substituons les valeurs connues dans l'équation d'accumulation (Equation 10) ce qui donne un équation pour chaque exposition, c'est à dire, à $[Cd^{2+}] = 1.6 \text{ nM}$ et $[Cd^{2+}] = 5 \text{ nM}$. Nous soustrayons les 2 équations pour isoler k_w , ce qui nous permet d'écrire :

Equation 12

$$\text{Moy}[Cd_{\text{high}}]_{\text{copépo}} - \text{Moy}[Cd_{\text{Low}}]_{\text{copépo}} = k_w/k_e ([Cd^{2+}]_{\text{high}} - [Cd^{2+}]_{\text{low}}) \times (1 - e^{-k_e t})$$

Où $\text{Moy}[Cd_{\text{high}}]_{\text{copépo}}$ et $\text{Moy}[Cd_{\text{Low}}]_{\text{copépo}}$ sont les moyennes des valeurs observé à chaque temps. k_w (Tableau 3) est estimé par l'opération de <curve fitting> du logiciel SPSS et correspond à la valeur du paramètre pour laquelle l'équation 12 décrit le mieux les données observées. k_f (Tableau 3) est estimé par l'opération de <curve fitting> du logiciel SPSS, et correspond à la valeur du paramètres pour laquelle l'équation 10 décrit le mieux les données observées. A partir des valeurs de k_w , k_f , $[Cd^{2+}]$ et $[Cd]_f$ nous calculons les pourcentages de Cd accumulés par les copépodes à partir de l'eau et de la nourriture. Nos résultats, (Tableau 3) montrent que 63% du Cd viennent de l'eau et 37% de la nourriture. Comme une partie important du Cd vient de l'eau, la compétition $H^+ - Cd^{2+}$ peut donc avoir lieu chez les copépodes.

3.2.2 Expérience de Compétition $Cd^{2+} - H^+$ chez *Diaptomus minutus*

Pour déterminer si la compétition $H^+ - Cd^{2+}$ a lieu chez les copépodes, nous exposons des copépodes à des milieux de pH différents (4,8, 5,5, 6,5) et nous maintenons les concentrations de Cd dans la nourriture constantes. Les concentrations de Cd dans l'eau $[Cd^{2+}]$ sont différentes entre les pH, suite à la dilution due à l'ajout de NaOH lors de l'ajustement des pH des milieux d'exposition (Tableau 3), mais restent constantes au cours de l'expérience. Nos résultats (Figure 3 dans la partie 2 du mémoire) montrent que les copépodes accumulent moins de Cd à pH 4,8 qu'à pH 5,5. A pH 6,5, les concentrations de Cd dans les copépodes sont plus faibles qu'aux autres pH au début de

l'expérience car les copépodes n'ont pas consommé d'algue lors des 6 premières heures car ils n'ont pas été acclimatés à la nourriture avant l'expérience. Pour vérifier si la compétition entre les ions H^+ et Cd^{2+} chez les copépodes explique la différence d'accumulation entre les pH, nous utilisons un modèle de bioaccumulation qui tient compte de la compétition. En utilisant la même approche que Hare et Tessier (1996, 1998) ont utilisé pour développer l'équation 4, nous modifions l'équation de bioaccumulation (Équation 9) par l'expression ci-dessous afin de tenir compte de la compétition H^+ - Cd^{2+} :

$$k_w = \frac{\phi}{[H^+] + k_a} \quad \text{Équation 13}$$

où k_a est la constante de pseudoéquilibre de liaison des ions H^+ aux sites de prise en charge biologique sur les membranes et Φ la constante de proportionnalité spécifique du Cd aux copépodes. Le modèle de bioaccumulation du Cd chez les copépodes qui tient compte de la compétition s'écrit donc :

$$[Cd]_{\text{copepode}} = \frac{\phi [Cd^{2+}]}{k_e (H^+ + k_a)} + \frac{k_f [Cd]_f}{k_e} \times (1 - e^{-k_e t}) + [Cd]_0 e^{-k_e t} \quad \text{Equation 14}$$

k_f (Tableau 3) est estimé par l'opération de <curve fitting> du logiciel SPSS; l'estimé correspond aux valeurs du paramètres pour lequel le modèle (Équation 10) décrit le mieux les données observées à pH 5.5. La valeur de k_f n'est pas identique à celle déterminée dans l'expérience précédente car les copépodes ont pas tous été collectés à l'automne mais à 2 mois d'intervalle ce qui peut avoir un effet sur le taux d'ingestion et donc sur k_f . Les faibles taux de mortalité et la présence de nourriture dans le tractus des copépodes observés à tous les pH nous font considérer que l'IR est constant pour tous les pH si nous assumons que le pH n'a pas d'effet sur l'AE, comme nous l'avons observé chez *Chaoborus*. Nous pouvons donc considérer k_f (AE x IR) identique pour les 3 pH. k_w

(Tableau 3) est estimé par l'opération de <curve fitting> du logiciel SPSS; l'estimé correspond à la valeur du paramètre pour laquelle le modèle (Équation 10) décrit le mieux les données observées au pH 4.8. k_a et Φ sont obtenus en résolvant les deux équations obtenues en remplaçant dans l'équation 13 les paramètres déterminés aux pH 4,8 et 5,5. Nous validons le modèle (Équation 14) avec les données observées à pH 6,4. Nous modélisons l'accumulation de Cd à partir du temps $t = 0,63$ j. Le graphe (Figure 3 dans la partie 2 du mémoire) montre que le modèle décrit bien les données observées et que la compétition $Cd^{2+}-H^+$ a donc lieu chez les copépodes. D'après les calculs des pourcentages de Cd accumulé à partir de l'eau et de la nourriture (Tableau 2 dans la partie 2), on s'attend à ce que l'effet de compétition augmente avec une augmentation du pH et avec une diminution dans la concentration du Cd chez les algues.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHES

Nos travaux indiquent que la compétition entre les ions H^+ et Cd^{2+} n'a pas lieu dans le tractus des larves de *Chaoborus americanus* car ces organismes, dans des conditions fortement acides ou basiques, ont la capacité de régulariser le pH de leur tractus. Par contre, nos expériences en laboratoire, nous indiquent que la compétition H^+-Cd^{2+} a lieu chez une des proies de *Chaoborus*, un calanoïde de l'espèce *Diaptomus minutus*. Notre étude indique également que chez ce copépode, l'eau et la nourriture représentent tous les deux des parties importants de l'apport de Cd. Globalement, nos expériences contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes de prise en charge et du transfert de Cd le long d'une chaîne trophique planctonique.

Dans nos travaux, nous avons fait des expériences sur seulement une espèce de proie de *Chaoborus*, alors que dans la nature ce prédateur se nourrit de plusieurs espèces. On peut s'attendre à ce que l'effet de compétition varie selon le type de proies dépendant de l'importance de l'eau comme source de Cd pour chaque proie. Il serait donc intéressant

de refaire ces expériences sur d'autres types de proies de *Chaoborus* (comme des cladocères), afin de pouvoir généraliser nos observations. Il serait également intéressant de pouvoir déterminer si le pH peut influencer le taux d'ingestion des copépodes, par exemple, en marquant les algues avec des radioisotopes d'éléments essentielles comme le phosphore ou le carbone. Enfin, des expériences au niveau des algues permettraient de déterminer si une compétition entre H^+ et Cd^{2+} a lieu également comme nous le supposons, au bas de la chaîne trophique menant vers *Chaoborus*.

5. BIBLIOGRAPHIE

- Allen, H.E., R.H. Hall et T.D. Brisbin. (1980). Metal speciation: effects on aquatic Toxicity. *Environmental Science and Technology*. 14: 441-442.
- Borgmann, U. Metal speciation and toxicity of free metal ions to aquatic biota. *Aquatic Toxicology Advanced Environmental Science Technology*. 13: 47-51.
- Borgmann, U., M. Nowierski, L.C. Grapentine et D.G. Dixon. (2004). Assessing the cause of impacts on benthic organisms near Rouyn-Noranda, Quebec. *Environmental Pollution*. 129: 39-48.
- Borkent, A. (1981). The distribution and habitat preferences of the Chaoboridae (*Culicomorpha*: Diptera) of the Holarctic region. *Canadian Journal of Zoology*. 59: 122-133.
- Campbell, P.G.C. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In *Trace metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Tessier. A. et D.R. Turner [Eds.], Wiley. New York, N.Y., 45-72.

Croisetière, L., L. Hare, A. Tessier et S. Duchesne. (2005). Modeling cadmium exchange by an aquatic moss (*Fontinalis dalecarlica*). *Environmental Science and Technology*. 39: sous presse.

Croteau, M.-N., L. Hare et A. Tessier. (1998). Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environmental Science and Technology*. 32: 1348-1353.

Croteau, M.-N., L. Hare et A. Tessier. (2001). Differences in Cd accumulation among species of the lake-dwelling biomonitor *Chaoborus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 58: 1737-1746.

Croteau, M.-N., L. Hare et A. Tessier. (2002). Increases in food web cadmium following reductions in atmospheric inputs to some lakes. *Environmental Science and Technology*. 36: 3079-3082.

Croteau, M.-N., L. Hare et P. Marcoux. (2003). Feeding patterns of migratory and non-migratory *Chaoborus* species in an acidic and metal contaminated lake: importance of prey ingestion rate in predicting metal bioaccumulation. *Archiv für Hydrobiol.* 158: 57-74.

Cusimano, R.F., D.F. Brakke et G.A. Chapman. (1986). Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal and Fisheries and Aquatic Sciences*. 43: 1497-1503.

George, S.G. et B.J.S. Pirie. (1980). Metabolism of zinc in the mussel *Mytilus edulis* (L.): a combined ultrastructural and biochemical study. *Journal of Marine Biology Association of United Kingdom*. 60: 575-590.

Giguère, A., P.G.C. Campbell, L. Hare, D.G. McDonald et J.B. Rasmussen. (2004). Influence of lake chemistry and fish age on Cd, Cu and Zn concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal and Fisheries and Aquatic Sciences*. 61: 1702-1716.

Gosselin, A. et L. Hare. (2004). Effect of sedimentary cadmium on the behavior of a burrowing mayfly (Ephemeroptera, *Hexagenia limbata*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23: 383-387.

Gurney, R. (1931). British Fresh-Water Copepoda, Vol. I. General; Calanoida. The Ray Society, London, U.K. 1-238.

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

Hare L. et A. Tessier. (1996). Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature*. 380: 430-432.

- Hare L. et A. Tessier. (1998). The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes. *Limnology and Oceanography*. 43: 1850-1859.
- Illes, J., R.D. Evans et G.C. Balch. (2001). Influence of food-capture nets on cadmium uptake by net-spinning caddisfly (Trichoptera: Hydropsychidae) larvae. *Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology*. 66: 484-491.
- Keller, W., J.R. Pitblado et J. Carbone. (1992). Chemical responses of acidic lakes in the Sudbury, Ontario, area to reduced smelter emissions, 1981-89. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 49: 25-32.
- Lévesque, H.M. J. Dorval, A. Hontela, G.J. van der. Kraak et P.G.C. Campbell. (2003). Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposures. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. Part A, 66: 657-676.
- Mackay, D. et A. Fraser. (2000). Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution*. 110: 375-391.
- Moore, M.V. (1988). Differential use of food resources by the instars of *Chaoborus punctipennis*. *Freshwater Biology*. 19: 249-268.
- Morel, F.M.M. (1983). *Principles of Aquatic Chemistry*. J. Wiley & Sons, New York, N.Y., U.S.A.

- Munger, C. et L. Hare. (1997). Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): Implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environmental Science and Technology*. 31: 891-895.
- Newman, M.C. et McIntosh, A.W. (1991). Stochastic Models of Bioaccumulation. In *Metal Ecotoxicology*. Lewis publishers. Boca Raton, FL., 171-207.
- Newman, M.C. et M.A. Unger. (2003). *Fundamentals of ecotoxicology- 2nd ed.*, Lewis publishers. Boca Raton, FL., 1-458.
- Nriagu, J.O. et J.M. Pacyna. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*. 333: 134-139.
- Peacock, A. (1982). Responses of *Cyclops bicuspidatus thomasi* to alterations in food and predators. *Canadian Journal of Zoology*. 60: 1446-1462.
- Peacock, A. et J.P. Smyly. (1983). Experimental studies on the factors limiting *Tropocyclops prasinus* (Fischer 1860) in an oligotrophic lake. *Canadian Journal of Zoology*. 61: 250-265.
- Peterson, H.G., F.P. Healy et R. Wagemann. (1984). Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. *Canadian Journal and Fisheries and Aquatic Sciences*. 41: 974-979.

Phillips, D.J.H. et P.S. Rainbow. (1993). Biomonitoring of trace aquatic contaminants.

Elsevier, London, U.K. 1-679.

Pope G.F., J.C.H. Carter et G. Power. (1973). The influence of fish on the distribution of

Chaoborus spp. (Diptera) and density of larvae in the Matamek river system,

Québec. *Transactions of the American Fisheries Society*. 102: 707-714.

Shaw, M.A. et J.R.M. Kelso. (1992). Environmental factors influencing zooplankton

species composition of lakes in north-central Ontario, Canada. *Hydrobiologia*.

241: 141-154.

Sloman, K.A., D.W. Baker, C.M. Wood et D.G. McDonald. (2002). Social interactions

affect physiological consequences of sublethal copper exposure in rainbow trout,

Oncorhynchus mykiss. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21: 1255–1263.

Sloman, K A, T.P. Morgan; D.G. McDonald et C.M. Wood. (2003). Socially-

induced changes in sodium regulation affect the uptake of water-borne copper and

silver in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry*

and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology. 135C: 393-403.

Sprules, W.G. (1975a). Factors affecting the structure of limnetic crustacean

zooplankton communities in central Ontario lakes. *Verhandlungen Internationale*

Verein Theoretische Angewandte

Limnologie 19: 635-643.

Sprules, W.G. (1975b). Midsummer crustacean zooplankton communities in acid-stressed lakes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 32: 389-395.

Tessier, A., J. Buffle et P.G.C. Campbell. (1994). Uptake of trace metals by aquatic organisms. In *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Processes*. J. Buffle [Ed]. Lewis publishers. Chelsea, MI., 201- 235.

Tessier, A. et R. Turner. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the Free-ion Activity Model. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic systems*. Wiley, Chichester, UK, 45-102.

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

Wetzel, R.G. (2001). *Limnology*, 3rd ed. Academic Press, San Diego, CA, 1-1006.

Williamson, C.E. (1991). Copepoda. In *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. J.H. Thorp et A.P. Covich [Eds.]. Academic Press, San Diego, CA, 787-822.

Wilson, M.S. (1959). *Calanoida*, In *Fresh-Water Biology*, 2nd ed. W.T. Edmondson [Ed.]. John Wiley & Sons, New York, N.Y. 738-794.

White, S.L. et P.S. Rainbow. (1984). Zinc flux in *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda): moulting, individual variation and tissue distribution. *Marine Ecology Progress Series*. 19: 153-166

Xue, H.B. et L. Sigg. (1990). Binding of Cu(II) to algae in a metal buffer. *Water Research*. 24: 1129-1136.

2^ère partie : Article

**Competition between protons and cadmium ions in the planktonic food
chain leading to the phantom midge *Chaoborus***

Jord Orvoine, Landis Hare,¹ and André Tessier

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

For submission to *Limnology and Oceanography* as an article

Running head: Cd trophic transfer and H ion competition

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

Acknowledgments

Funding was provided by the Fonds de Recherche du Québec sur la Nature et les Technologies, the Metals In The Environment Research Network, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Ontario Power Generation and the Mining Association of Canada. Assistance from A. Boullemant, P. Boucher, C. Dion, C. Durand, S. Duval, L. Rancourt and R. Rodrigue is gratefully acknowledged as are comments on the manuscript by C. Fortin and J. McGeer.

Abstract

Cadmium concentrations in the phantom midge *Chaoborus* can be related to those of Cd^{2+} in lakewater provided that the competitive influence of H ions on Cd uptake sites is considered. Because this predator takes up its Cd from plankton, competition between H^+ and Cd^{2+} ions could take place at several levels in the food chain to which this insect belongs. To identify at which trophic levels this occurs, we first measured H^+ - Cd^{2+} competition in the gut of *Chaoborus* by exposing it to constant Cd concentrations in water and food but at various pH's (4.5, 5.5, 6.5). There was no difference in the efficiency with which this predator assimilated Cd at the various pHs suggesting that H ions swallowed by *Chaoborus* do not compete with Cd at uptake sites in its gut. pH-sensitive dyes showed that *Chaoborus* is able to maintain its gut pH between 6.5 and 8.0, even when ambient pH varies beyond this range (4.5-9.0). We then determined whether H^+ - Cd^{2+} competition is likely to take place on prey of *Chaoborus* by measuring the importance of water as a Cd source for the calanoid copepod *Diaptomus minutus*. Copepods fed with Cd-rich green algae and exposed to either a high [Cd^{2+}] (5 nM) or a low [Cd^{2+}] (1.6 nM) accumulated a majority of their Cd from water, suggesting that H^+ and Cd^{2+} ions are likely to compete at Cd uptake sites on these crustaceans. Lastly, we measured Cd accumulation by this copepod at constant Cd concentrations in water and food (the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*) but at various pHs. Copepods held at pH 4.8 accumulated less Cd than those at pH 5.5, suggesting that H^+ - Cd^{2+} competition occurs in this animal. A bioaccumulation model designed to take into account H^+ - Cd^{2+} competition was parameterized using our data for Cd accumulation by copepods at pH 4.8 and 5.5 and then successfully used to predict measured responses at pHs 4.8, 5.5 and 6.4.

Introduction

Mining, smelting and other industrial activities have increased the flux of cadmium (Cd), a potentially toxic metal, to aquatic ecosystems (Chapman et al. 2003). Because not all of the Cd in these systems is available for uptake by organisms, total Cd concentrations in water or sediment cannot necessarily be used to predict the bioaccumulation or effects of this metal (Campbell 1995; Hare et al. 2003). For this reason, a variety of freshwater and marine organisms have been used as biomonitors to estimate bioavailable Cd concentrations in their surroundings (Phillips and Rainbow 1993). To use a biomonitor effectively, we need to be able to relate contaminant concentrations in the organism to those in its environment. Models that consider the characteristics of both the pollutant and the biomonitor organism provide the best means of achieving this goal (Pace 2001).

In lakes, larvae of the phantom midge *Chaoborus* have been proposed as a Cd biomonitor by Hare and Tessier (1996, 1998) and Croteau et al. (1998, 2002). These researchers showed that by using the tenants of the Free Ion Activity Model (or its offshoot the Biotic Ligand Model) they could predict Cd concentrations in *Chaoborus*, $[Cd]_{Chaoborus}$, from those of the free Cd ion, $[Cd^{2+}]$, provided that they considered competition between hydrogen ions and free cadmium ions at biological uptake sites, that is,

$$[\text{Cd}]_{\text{Chaoborus}} = \frac{F \times [\text{Cd}^{2+}]}{[\text{H}^+] + K_a} \quad (1)$$

where K_a is a pseudoequilibrium constant for the binding of H ions to uptake sites on biological membranes and F is a proportionality constant specific to Cd and *Chaoborus*. However, because subsequent studies showed that larvae of this insect do not take up Cd from water but from their planktonic prey (Munger and Hare 1997; Munger et al. 1999), the trophic level(s) at which Cd^{2+} - H^+ competition occurs is open to doubt. We conducted laboratory experiments on *Chaoborus* and its prey (a copepod) to determine at which of these trophic levels Cd and H ions compete. In doing so, we hope to put equation 1 on a better mechanistic footing.

We first determined if H^+ and Cd^{2+} ions swallowed by *Chaoborus* compete for Cd-uptake sites on its gut wall by comparing the efficiency with which *Chaoborus* larvae assimilate Cd from prey when held in water at a constant $[\text{Cd}^{2+}]$ but over a range of ambient pHs. To help explain these experimental results we measured the gut pH of *Chaoborus* using pH-sensitive dyes.

We then determined if prey take up Cd from water by exposing copepods to two different concentrations of dissolved Cd; if prey take up Cd from water, then Cd^{2+} - H^+ competition is likely to occur at this trophic level. Lastly, we measured the influence of pH on Cd bioaccumulation by feeding copepods Cd-rich algae at a constant $[\text{Cd}^{2+}]$ but over a range of ambient pH. We used these experimental data, along with measurements

of Cd efflux, to determine if a one-compartment model could predict Cd bioaccumulation in the copepod and account for H^+ - Cd^{2+} competition at this trophic level.

METHODS

Collection of invertebrates—We collected invertebrates for our experiments from two low-Cd lakes located near Quebec City, Quebec. The calanoid copepod *Diaptomus minutus* was collected from Lake Bleu (pH 5.6, 46°55'N, 71°58'W) and larvae of the phantom midge *Chaoborus americanus* were collected from Lake Pelouse (pH 5.6, 47°01'N, 72°05'W). These species are common residents of many Canadian Shield lakes (Keller and Pitblado 1984; Borkent 1981; respectively) and copepods are an important prey for *Chaoborus* (Fedorenko 1975; Hare and Carter 1987). Both invertebrates were taken by hauling a 104- μ m mesh-aperture plankton net horizontally in the water column during the day. Plankton samples were transported to the laboratory in a cooler and then held at 15°C in a temperature-controlled environmental chamber where all experiments took place. When *D. minutus* were required for an experiment, they were removed from the bulk plankton using a Pasteur pipette under a microscope. Conditions for the various experimental treatments described below are summarized in Table 1. Artificial lakewater for all experiments was prepared according to the information given in the footnote to Table 1. Speciation calculations (MINEQL+; Schecher and McAvoy 1998) showed that all of the Cd in the artificial lakewater was present as the free ion.

Experiment 1; Cd²⁺-H⁺ competition in the gut of Chaoborus—Fourth instar *C. americanus* larvae were selected on the basis of their head-capsule length (~1 mm, Fedorenko and Swift 1972) and held for a 1-d acclimation period in 30-ml, high-density polyethylene (HDPE) containers filled with Cd-free artificial lakewater and a mixture of copepods collected from Lake Bleu as food. At the same time, 9 basins lined with Teflon sheeting were each filled with 1.5 l of artificial lakewater (Table 1) and their pH was adjusted to 4.5, 5.5, or 6.5 (\pm 0.1 pH unit, 3 basins per pH). We then added sufficient ¹⁰⁹Cd as CdCl₂ (71 mCi.mol⁻¹ specific activity) to attain a Cd²⁺ concentration of 10 nM, which is reported for some metal-contaminated lakes (Croteau et al. 1998). Cadmium speciation in the basin was estimated using the MINEQL+ speciation code (Schecher and McAvoy 1998). Three 10-ml HDPE containers were suspended in each basin so that their openings were above the water level; the bottoms of these containers had been previously removed and replaced with 100- μ m mesh-aperture netting to allow water to circulate through each container. After allowing the exposure system to stabilize for 1 d, we placed one *C. americanus* in each container.

Every 24 h, we prepared fresh prey for *C. americanus* by exposing ~500 *D. minutus* to ¹⁰⁹Cd-rich green algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*, cultured as described below) at a density of $\sim 8 \times 10^4$ cells ml⁻¹ in artificial lakewater (Table 1) containing ~10 nM dissolved Cd. We did not rigorously control the Cd concentrations in algae and water because our goal was simply to produce prey of known Cd concentration. At the end of the 24-h prey exposure period, we held copepods for 4 h in Cd-contaminated water without food so that they would eliminate their gut contents (verified by microscope); we

did this to ensure that *Chaoborus* would not consume prey containing variable amounts of algae in their guts.

We fed these depurated prey to *C. americanus* at the daily rate of ~10 copepods per predator. Uneaten prey were removed after 5 h and replaced with the same number of fresh prey to ensure that prey Cd concentrations remained constant. The exact number of prey consumed by each predator was noted so that ingestion rates could be calculated. On days 4 and 9, *C. americanus* larvae were removed and held for 24 h in Cd-contaminated artificial lakewater without food to eliminate any Cd-contaminated crop contents (verified under a microscope). Larvae were then rinsed 5 times with uncontaminated artificial lakewater (Table 1) and placed in a counting vial for 30 min to measure their ^{109}Cd content (see below). On day 4, *C. americanus* were replaced in the Cd-exposure medium and feeding was continued as described above. We measured Cd in depurated prey by pooling 60 copepods in each of three samples on days 4 and 9.

Experiment 2; gut pH of Chaoborus—To measure the gut pH of *C. americanus* larvae, we used two pH-sensitive dyes the colors of which would be visible through the transparent body of this insect. The first dye, lacmoides, is wine-red at pH < 4.5; as the pH rises, it gradually changes to dark blue at pH 6.5. The second pH-sensitive dye, alizarin yellow, is orange-red at pH 9 and higher but gradually changes to yellow at pHs below 8. We held 10 *C. americanus* larvae in artificial lakewater at pH 4.5 containing lacmoides or at pH 8.5 containing alizarin yellow. After 24 h, we compared, under a

microscope, the color of the larval gut fluid to samples of water containing the dyes at various pHs between 4.5 and 9. Prey were not present in these experiments.

Experiment 3; relative importance of water and food as Cd sources for copepods—To acclimate copepods to the experimental conditions (Table 1), we held 50 *D. minutus* in each of 12 30-ml HDPE containers filled with Cd-free artificial lakewater and the alga *P. subcapitata* for 24 h in the dark on a shaker (to maintain algae in suspension). In the first treatment level, copepods from 6 containers were transferred to 6 similar containers filled with ^{109}Cd -labeled artificial lakewater (5 nM Cd^{2+}) and fed ^{109}Cd -labeled *P. subcapitata* (labeling described below) having a mean Cd concentration of 218 ± 48 (SD) nmol Cd g⁻¹. In the second treatment level, copepods were treated the same except that the artificial lakewater was initially Cd-free. However, because algae lost Cd, Cd^{2+} concentrations in the second treatment level reached 1.6 nM. In both treatment levels (Table 2), water and algae were changed every 6 h. After 18, 30, 48 and 54 h, copepods were removed for ^{109}Cd counting.

Experiment 4; Cd^{2+} - H^+ competition on copepods—We placed 120 *D. minutus* in each of 15 30-ml HDPE containers filled with artificial lakewater adjusted to pH 4.7, 5.5 or 6.5 (5 containers per pH) and containing the green alga *P. subcapitata* (1.6×10^6 cells ml⁻¹). They were held for 24 h in the dark on a shaker to acclimate to experimental conditions. However, the containers at pH 6.5 spilled on the shaker and thus copepods at this pH did not undergo acclimation. We then transferred the copepods to 30-ml HDPE containers filled with artificial lakewater at these same pH's and containing 5 nM Cd^{2+} as well as

Cd-contaminated *P. subcapitata* (exposure described below) in excess of the copepods' needs (1.6×10^6 cells ml^{-1}). Every 6 h, we changed the exposure water and algae as well as readjusting the pH as necessary. After 12, 24, 36, 60 and 72 h of Cd exposure, we removed dead *D. minutus* (if any) and measured ^{109}Cd in copepods by sieving them onto a nylon mesh, rinsing them 5 times in Cd-free artificial lakewater and placing them live in counting vials. After 200 sec, copepods were returned to fresh exposure medium and the experiment was continued. There was no significant difference in copepod mortality among the three pHs ($P > 0.5$; ANOVA) suggesting their health was not influenced by ambient pH.

Experiment 5; Cd loss from copepods —To measure the loss of Cd from copepods, we transferred *D. minutus* that had been exposed to Cd at various pHs for 72 h (as described for experiment 4) to 30-ml HDPE containers filled with artificial lakewater to which an excess of uncontaminated *P. subcapitata* had been added as food; water and algae were subsequently changed every 6 h. A total of 12 containers was used, 4 for each pH (4.7, 5.5 or 6.5). After 0.5, 1.5, 6 and 24 h, we sieved, rinsed and measured ^{109}Cd in live copepods, as described for experiment 4 above, and then replaced them in their containers until the next counting time. To calculate Cd concentrations in *D. minutus*, we assumed a dry weight of 1.1 ± 0.3 [SD] μg copepod $^{-1}$ (Munger and Hare 2000). On the basis of preliminary microscopic observations on 10 copepods held without food after feeding on algae, we considered that most copepods emptied their gut of algae within 30 minutes. Thus, for the calculation of the Cd loss rate constant, we considered that physiological Cd loss began after 30 min.

Radio-labeling phytoplankton—The green alga *P. subcapitata* was maintained in simplified Bold Basal Medium (BBM) at 20°C at a constant illumination of 60 μmol of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Simplified BBM (Table 1) contained no added EDTA or trace metals. Cells in the late log phase were rinsed 4 times by centrifuging them at 6,000 g for 4 min and resuspending them in simplified BBM. We then spiked 4×10^5 cells ml^{-1} into Cd-contaminated simplified BBM; after 4 d of growth, cell densities reached 1.2×10^6 cells ml^{-1} and they were considered to be uniformly labeled. Cells were subsequently rinsed 4 times at 6,000 g for 4 min in Cd-contaminated or Cd-free artificial lakewater (Table 1), according to the treatment, and fed to copepods. For the measurement of algal Cd, algae were collected onto 0.4- μm polycarbonate filters (Poretics[®], Osmonics Inc, Livermore, CA, USA) and rinsed with 10 ml of 10^{-2} M EDTA for 10 min to remove any surface-bound ^{109}Cd . Algal growth and surface area were quantified using a particle counter (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA).

Radioactivity measurements and statistical analyses—Radioactive Cd in water, algae and invertebrates were measured by gamma counting (1480 Wallac Wizard 3, NaI(Tl) well-type counter; 60% counting efficiency for ^{109}Cd) and converted to total Cd concentrations based on the specific activities of the various Cd solutions used in our experiments. Counting times were sufficient to yield propagated counting errors of < 5% and blanks were used to verify that samples were uncontaminated by experimental manipulations.

Differences in Cd assimilation efficiency by *C. americanus* were compared across treatments (pH 4.5, 5.5 and 6.5) and times (days 4 and 9) using a repeated-measures ANOVA. Differences in Cd concentrations in copepods were also compared using a repeated-measures ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. All statistical tests were performed using SAS (SAS Institute Inc.).

RESULTS AND DISCUSSION

Although acidic lakes have some of the highest dissolved Cd concentrations reported from freshwaters, larvae of the phantom midge *Chaoborus* that live in such lakes are reported to be low in Cd (Croteau et al. 1998, Hare and Tessier 1996 and 1998). These results suggest that H ions compete with Cd ions at biological uptake sites in these highly acidic lakes. We tested for such competition at two trophic levels, that of the predator *Chaoborus* and that of its zooplanktonic prey.

Experiment 1; Cd²⁺-H⁺ competition in the gut of Chaoborus —Because *Chaoborus* larvae take up Cd from their food (Munger and Hare 1997, Munger et al. 1999), competition between Cd and H ions for biological uptake sites in the digestive tract could occur in the gut of these larvae if they swallow sufficient acidic water along with their prey (Croteau et al. 2003a). For example, the pH of the gut of fish is reported to be influenced by the pH of their food and water (Amerio et al. 1991). By exposing *Chaoborus* larvae to the same Cd concentrations in prey and water, but at various [H⁺] (experiment 1), we were able to determine if *Chaoborus* assimilate Cd less efficiently

from prey when both predator and prey are held in acidic water. For this purpose we compared the proportion of prey Cd that was assimilated by *C. americanus*, rather than [¹⁰⁹Cd] in this predator, because the former allowed us to take into account differences in feeding rates among individuals whereas the latter did not. We calculated Cd assimilation efficiencies (AE, %) using equation 2

$$AE = \frac{dQ_{Cd-Chaoborus} / dt}{IR \times Q_{Cd-prey}} \times 100 \quad (2)$$

where $dQ_{Cd-Chaoborus} / dt$ is the mean quantity of Cd (pmol) retained by *C. americanus* d^{-1} , $Q_{Cd-prey}$ is the mean quantity (\pm SD) of Cd in an individual copepod (0.13 ± 0.01 ($n = 3$) for the period 0-4 d and 0.12 ± 0.01 ($n = 3$) for the period 5-9 d) and IR is the mean number of copepods ingested per day (38 ± 7 ($n = 27$) for the period 0-4 d and 21 ± 7 ($n = 27$) for the period 5-9 d). We calculated AE's independently for each of the three time periods. We ignored Cd losses from the predator because Cd loss rates for *C. americanus* are very low, that is, Croteau et al. (2002) reported a loss rate constant of $0.0007 d^{-1}$ for larvae at $14^{\circ}C$, a temperature similar to that of our experiment ($15^{\circ}C$).

The efficiency with which *C. americanus* larvae assimilated Cd from their copepod prey did not vary with ambient pH (Fig. 1; $P > 0.05$, ANOVA), and this over a 2 orders of magnitude range in $[H^+]$. The mean (\pm 95% CI) AE of $58 \pm 5\%$ for *C. americanus* feeding on the calanoid copepod *D. minutus* at $15^{\circ}C$ is identical to that of 58% reported by Croteau et al. (2002) for this *Chaoborus* species feeding on calanoid copepods at $5^{\circ}C$. Although Croteau et al. (2002) also reported a corresponding AE for animals held at $14^{\circ}C$ (18%), they questioned the reliability of this value because the *C. americanus* larvae

they used were near pupation. Our results suggest that their AE value at 14 °C is indeed an underestimate and that *C. americanus* larvae assimilate Cd with equal efficiency at 5 and 14 °C.

Experiment 2; gut pH of Chaoborus—To explain the lack of competition between Cd and H ions in the gut of *Chaoborus*, we determined if the gut pH of *C. americanus* varies with ambient pH by holding 10 larvae in two pH-sensitive dyes without prey. After 3 h, all individuals had ingested some ambient water because the contents of both the pharynx (the anterior portion of the gut in which prey are crushed) and the intestine were colored by the dye. At an ambient pH of 4.5, lacmoides dye in the gut was dark blue, suggesting a gut pH above 6.5. At an ambient pH of 9, alizarin yellow in the gut was yellow suggesting a pH below 8. Thus, the gut pH of *Chaoborus* larvae lies between 6.5 and 8 and is independent of ambient pH. Circum-neutral to weakly acidic gut-pHs have been reported for a variety of aquatic invertebrates (Hare 1992, Ahrens and Lopez 2001). Control over gut pH explains why Cd assimilation by *C. americanus* (experiment 1) was not influenced by ambient $[H^+]$. We conclude that H ions do not compete with Cd for uptake sites in the gut of *Chaoborus*, but that such competition occurs at a lower level in the food chain leading to this predator.

Experiment 3; relative importance of water and food as Cd sources for copepods—We reasoned that if copepods take up Cd from water this should result in competition between Cd and H ions at Cd-uptake sites on these crustaceans. To determine if water is a Cd source for copepods, we exposed *D. minutus* to the same Cd

concentrations in food (the alga *P. subcapitata*) but to different Cd concentrations in water at constant pH. Because there was a significant difference in the Cd concentrations of copepods that had been exposed to the two $[Cd^{2+}]$ (Fig. 2; $P < 0.05$, ANOVA), these crustaceans must take up Cd from water.

To quantify the relative importance of water and food as Cd sources for this copepod, we used equation 3, which describes temporal changes in copepod Cd concentrations, $d[Cd]_{\text{copepod}}/dt$, as the difference between Cd influx from water and food and physiological Cd efflux (Thomann 1981, Munger 1999), that is,

$$\frac{d[Cd]_{\text{copepod}}}{dt} = \underbrace{k_w [Cd^{2+}]}_{\text{Cd influx from water}} + \underbrace{k_f [Cd]_f}_{\text{Cd influx from food}} - \underbrace{k_e [Cd]_{\text{copepod}}}_{\text{Cd efflux}} \quad (3)$$

where k_w ($L g^{-1} d^{-1}$) and k_f ($m^2 g^{-1} d^{-1}$) are rate constants for Cd uptake from water and food, respectively, and k_e (d^{-1}) is the rate constant for Cd loss from the copepods.

Integrating this equation yields

$$[Cd]_{\text{copepod}} = \frac{k_w [Cd^{2+}] + k_f [Cd]_f}{k_e} \times (1 - e^{-k_e t}) + [Cd_0] e^{-k_e t} \quad (4)$$

where $[Cd_0]$ is the initial Cd concentration in the copepods. To solve equation 4 for our two treatment levels (high $[Cd^{2+}]$ and low $[Cd^{2+}]$) we began by estimating the value of the rate constant for Cd efflux, k_e . To do this, we ignored the Cd uptake terms in equation 3

(Cd concentrations in food and water were negligible during the Cd-efflux experiment) and integrated the resulting equation to give

$$[\text{Cd}]_{\text{copepod}} = [\text{Cd}_0] \times e^{-k_e t} \quad (5)$$

We used this equation to fit a theoretical curve to our data from the Cd-efflux experiment (experiment 5), from which we extracted the value of k_e (Table 2) by non-linear regression using the computer program SigmaPlot. The model curves for Cd efflux (Fig. 3), although close to our experimental data, did not fit them exactly suggesting that a more complex model might be needed to improve on the fit (e.g., a two compartment model; Croisetièrè et al. 2005).

We then determined the value of the rate constant for Cd influx from water, k_w . Using equation 4, we wrote an equation for each treatment level and then subtracted the two equations to give

$$[\text{Cd}_{\text{high}}]_{\text{copepod}} - [\text{Cd}_{\text{low}}]_{\text{copepod}} = \frac{k_w}{k_e} \left([\text{Cd}^{2+}]_{\text{high}} - [\text{Cd}^{2+}]_{\text{low}} \right) \times (1 - e^{(-k_e t)}) \quad (6)$$

where the subscripts “high” and “low” refer to the two treatment levels. By substituting the estimated value of k_e in equation 6 and assuming that $[\text{Cd}_0]$ is negligible ($[^{109}\text{Cd}]$ at time 0 was negligible in our Cd-uptake experiments) we were able to

determine the mean value of k_w (Table 2) by nonlinear regression using the computer program SPSS.

We substituted the estimated values of k_e and k_w , into equation 4 and solved for k_f (the rate constant for Cd uptake from food, Table 2) by nonlinear regression using the computer program SPSS. Knowing the values of these three rate constants, we estimated the relative proportions of Cd that copepods took up from water and from their algal food at the high-Cd treatment level; that is, in which algae and copepods were exposed to the same $[Cd^{2+}]$ (as would be the case in nature). Comparing the water and food terms in equation 3 ($k_w[Cd^{2+}]$ and $k_f[Cd]_f$) revealed that the majority of the Cd taken up by copepods came from water (63 ± 10 (SD) %), which suggests that direct competition between Cd^{2+} and H^+ at uptake sites on these crustaceans is likely in highly acidic lakes. Because these animals also take up a substantial proportion of their Cd from food (37 ± 9 %), lakewater pH could also indirectly influence their Cd concentrations because their algal food is likely to be lower in Cd in highly acidic lakes (Campbell and Stokes 1985) and algal community structure is likely to be influenced by lakewater pH (Nicholls et al. 1992).

Experiment 4; Cd^{2+} - H^+ competition on copepods—Planktonic crustaceans in metal-contaminated acidic lakes are reported to contain little Cd in spite of the high Cd concentrations measured in surrounding waters (Yan et al. 1990, Croteau et al. 2003 a and b). To determine if competition between Cd and H ions for uptake sites on these crustaceans could explain their low Cd concentrations in acidic lakes (as well as those in

their predators), we exposed the copepod *D. minutus* to constant Cd concentrations in water and food but at three different $[H^+]$. Cadmium concentrations in copepods held at pH 4.8 were significantly lower ($P < 0.05$, ANOVA) than those held at pH 5.5 (Fig. 4), which would be expected if Cd^{2+} - H^+ competition was occurring. In contrast, copepods held at pH 6.4 did not differ in their Cd concentrations from those held at pH 4.8 ($P > 0.05$, ANOVA; Fig. 4). This anomaly is explained by the fact that copepods held at pH 6.4 ate little during the initial part of the experiment (0-6 h time period; verified microscopically) because they had not been properly acclimated to experimental conditions (see Methods). Copepods at the two lower pHs were properly acclimated and had their guts filled with algae throughout the experiment, as verified microscopically.

To model the impact of H ions on Cd uptake by copepods, we modified the proportionality constant k_w in equation 4 to take into account H^+ - Cd^{2+} competition (cf. equation 1), that is,

$$k_w = \frac{\phi}{[H^+] + K_a} \quad (7)$$

where K_a is a pseudoequilibrium constant for the binding of H^+ to uptake sites on copepods and ϕ is a proportionality constant specific to Cd and the copepod that we studied. Substituting equation 7 into equation 4 yields

$$[\text{Cd}]_{\text{copepod}} = \frac{\phi[\text{Cd}^{2+}] + k_f[\text{Cd}]_f}{k_e(\text{H}^+ + k_a)} + \frac{k_f[\text{Cd}]_f}{k_e} \times (1 - e^{-k_e t}) + [\text{Cd}_0]e^{-k_e t} \quad (8)$$

In order to use equation 8 to generate model curves for our data at the three pHs, we first estimated the value of k_f using our data at pH 5.5. Although we could have used the k_f value obtained from experiment 3, we did not do so because copepods used in experiments 3 and 4 were collected 2 months apart; physiological differences between the two groups could have influenced their ingestion rates (a key component of k_f). Substituting the values of k_e (experiment 5) and k_w at pH 5.5 (experiment 3) in equation 4, we estimated k_f (Table 2) by nonlinear regression using the computer program SPSS. We assumed that this k_f value does not vary with pH and used it for calculations at all pHs. We based this assumption on the fact that copepod ingestion rates did not appear to vary with pH because their guts were always full during our experiments (apart from an initial lag in feeding at pH 6.4, see Methods). We also assumed that H^+ - Cd^{2+} competition does not occur in the gut of copepods such that Cd assimilation efficiency is not influenced by ambient pH (see experiment 1).

Knowing k_f and k_e (Table 2) we estimated the value of k_w at pH 4.8 by nonlinear regression (using the computer program SPSS) by using equation 4 and our experimental values measured at this pH. We then used the values of k_w estimated for pHs 4.8 and 5.5 to generate two equations (using equation 7) to solve for k_a and ϕ . Our estimate of k_a ($7.4 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) is close to those reported for Cd binding sites on fish gills ($4 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$; Cusimano et al. 1986) and *Chaoborus punctipennis* ($1.9 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$; Hare and Tessier

1996). The model curves generated using our estimated values for all constants in equation 8 closely fits our experimental data for pHs 4.8 and 5.5 (Fig. 4), suggesting that the model is adequate for describing H^+ - Cd^{2+} competition at Cd uptake sites on copepods. Lastly, we used the values of these constants to generate a model curve for our data at pH 6.4 (these data did not serve in the generation of values for the constants). The model curve also fit these data well, supporting the robustness of our estimates for the model constants.

Conclusions—We set out to determine the trophic levels at which Cd^{2+} - H^+ competition could occur in the food chain leading to the predator *Chaoborus* to explain why this insect has low Cd concentrations in highly-acidic Cd-rich lakes. The results of our laboratory experiments suggest that *Chaoborus* itself is not the site at which this competition occurs because this predator does not take up Cd from water (Munger et al. 1999) and because it is able to maintain its gut pH circum-neutral and constant in highly acidic water. However, copepods, a common prey for *Chaoborus* larvae, do take up a majority of their Cd from water and H ions appear to compete at Cd uptake sites on these crustaceans. Thus the low Cd concentrations in *Chaoborus* larvae in highly acidic lakes can be explained in part by a reduced Cd uptake by the crustaceans that serve as their food. Although we did not investigate Cd^{2+} - H^+ competition on the algae consumed by copepods, it is likely that this also occurs (Campbell and Stokes 1985) and that this also contributes to the low Cd concentrations of predators higher up in the planktonic food chain.

References

- AHRENS, M. J., AND G. R. LOPEZ. 2001. In vivo characterization of the gut chemistry of small deposit-feeding polychaetes, p. 349-368. *In* J. Y. Aller, S. A. Woodin, R. C. Aller [eds.], *Organism-sediment interactions*. Univ. S. Carolina Press.
- AMERIO, M., E. CADEMARTIRY, A. MOIETTA, N. DEPAUW, AND J. JOUCE. 1991. Effect of acidified feeds on some physiological aspects of rainbow trout (*Onchoryhncus mykiss*). *Spec. Publ. European Aquacult. Soc.* **14**: 9.
- BORKENT, A. 1981. The distribution and habitat preferences of the Chaoboridae (Culicomorpha: Diptera) of the Holarctic region. *Can. J. Zool.* **59**: 122-133.
- CAMPBELL, P. G. C. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model, p. 45-102. *In* A. Tessier and D. Turner [eds.], *Trace metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Wiley.
- CAMPBELL, P. G. C. AND P. M. STOKES. 1995. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **42**: 2034-2049.
- CHAPMAN, P. M., F. WANG, C. R. JANSSEN, R. R. GOULET, AND C. N. KAMUNDE. 2003. Conducting ecological risk assessments of inorganic metals and metalloids: current status. *Human Ecol. Risk Assess.* **9**: 641-697.
- CROTEAU, M.-N., L. HARE, AND P. MARCOUX. 2003a. Feeding patterns of migratory and non-migratory *Chaoborus* species in an acidic and metal contaminated lake: importance of prey ingestion rate in predicting metal bioaccumulation. *Archiv für Hydrobiol.* **158**: 57-74.
- CROTEAU, M.-N., L. HARE, AND A. TESSIER. 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 1348-1353.
- CROTEAU, M.-N., L. HARE, AND A. TESSIER. 2002. Increases in food web cadmium following reductions in atmospheric inputs to some lakes. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 3079-3082.

- CROTEAU, M.-N., L. HARE, AND A. TESSIER. 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., D. F. BRAKKE, AND G. A. CHAPMAN. 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.
- FEDORENKO, A. Y. 1975. Feeding characteristics and predation impact of *Chaoborus* (Diptera, Chaoboridae) larvae in a small lake. *Limnol. Oceanogr.* **20**: 250-258.
- FEDORENKO, A. Y., AND M. C. SWIFT. 1972. Comparative biology of *Chaoborus americanus* and *Chaoborus trivittatus* in Eunice Lake, British Columbia. *Limnol. Oceanogr.* **17**: 721-730.
- HARE, L. 1992. Aquatic insects and trace metals: Bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **22**: 327-369.
- HARE, L., AND J. C. H. CARTER. 1987. Zooplankton populations and the diets of three *Chaoborus* species (Diptera, Chaoboridae) in a tropical lake. *Freshw. Biol.* **17**: 275-290.
- HARE, L., AND A. TESSIER. 1996. Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature* **380**: 430-432.
- HARE, L., AND A. TESSIER. 1998. The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 1850-1859.
- HARE, L., A. TESSIER, AND U. BORGMANN. 2003. Metal sources for freshwater invertebrates: pertinence for risk assessment. *Human Ecol. Risk Assess.* **9**: 779-793.
- KELLER, W., AND J. R. PITBLADO. 1984. Crustacean plankton in northeastern Ontario lakes subjected to acidic deposition. *Water Air Soil Pollut.* **23**: 271-291.
- MUNGER, C., AND L. HARE. 1997. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): Implications for predicting Cd bioaccumulation in the field. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 891-895.

- MUNGER, C., AND L. HARE. 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., L. HARE, AND A. TESSIER. 1999. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in the field. *Limnol. Oceanogr.* **44**: 1763-1771.
- NICHOLLS, K.H., L. NAKAMOTO, AND W. KELLER. 1992. Phytoplankton of Sudbury area lakes (Ontario) and relationships with acidification status. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **49** (Suppl. 1): 40-51.
- PACE, M. L. 2001. Prediction and the aquatic sciences. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **58**: 63-72.
- PACZYNA, J. M., M. T. SCHOLTZ, AND Y.-F. LI. 1995. Global budget of trace metal sources. *Environ. Rev.* **3**: 145-159.
- PARENT, L. AND P.G.C. CAMPBELL. 1994. Aluminium bioavailability to the green alga *Chlorella pyrenoidosa* in acidified synthetic soft water. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**: 587-598.
- PHILLIPS, D. J. H., AND P. S. RAINBOW. 1993. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. Elsevier.
- SCHECHER, M. E., AND D. MCAVOY. 1998. MINEQL+. Environmental Research Software.
- THOMANN, R. V. 1981. Equilibrium model of fate of microcontaminants in diverse aquatic food chains. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**: 280-296.
- YAN, N. D., G. L. MACKIE, AND P. J. DILLON. 1990. Cadmium concentrations of crustacean zooplankton of acidified and nonacidified Canadian Shield lakes. *Environ. Sci. Technol.* **24**: 1367-1372.

TABLE 1. Composition of the media and treatment levels used in our experiments.

Experiment	Alga (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	Herbivore (<i>Diatomus minutus</i>)	Predator (<i>Chaoborus americanus</i>)
<i>Experiment 1; Cd²⁺-H⁺ competition in the gut of Chaoborus</i>	Simplified BBM ^a MES ^b 10 ⁻² M NTA ^c 10 μM NaOH 10 ⁻² M pH 6.3 [Cd ²⁺] ^d 10 nM [Cd] 640 nM	Artificial lakewater ^e [Cd] = [Cd ²⁺] = 10 nM pH 6.3 Cd-contaminated algae	3 treatment levels: pH 4.5, 5.5 and 6.5 ^g Artificial lakewater ^e [Cd] = [Cd ²⁺] ^d = 10 nM Cd-contaminated prey
Water and food as Cd sources for the herbivore	Simplified BBM ^a MES ^b 10 ⁻² M NTA ^c 10 μM NaOH 10 ⁻² M pH 6.3	2 treatment levels: Cd-contaminated algae in artificial lakewater ^e with either low [Cd ²⁺] ^d = 1.6 nM or high [Cd ²⁺] ^d = 5 nM	
Cd ²⁺ -H ⁺ competition on the herbivore	[Cd ²⁺] ^d 5 nM [Cd] 320 nM	3 treatment levels: pH 4.8, 5.5 or 6.4 ^f Artificial lake water ^e Cd-contaminated algae	

^a Bold Basal Medium without metals and EDTA.

^b 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid, pK_a = 6.1, an inert biological pH buffer.

^c Nitrilo Triacetic Acid

^d [Cd²⁺] calculated using the chemical speciation program MINEQL+ (Schecher and Mcavoy, 1998).

^e Artificial lakewater for all uses was prepared using the concentrations of major ions (μM) measured in a lake representative of those sampled, that is, Ca²⁺ (21), Mg²⁺ (9.2), Na⁺ (23.6), K⁺ (2.3), SO₄²⁻ (21), Cl⁻ (7.5), NO₃⁻ (6.3).

^f pH adjusted every 6 h using NaOH or HNO₃.

^g pH adjusted every 12 h using NaOH or HNO₃.

TABLE 2. Parameters estimated during the experiments : Cd^{2+} - H^+ competition on copepods and relative importance of water and food as Cd sources for copepods (\pm SD).

pH	$[\text{H}^+]$ $\mu\text{mol.l}^{-1}$	$[\text{Cd}^{2+}]$ nmol.l^{-1}	$[\text{Cd}]_{\text{algue}}$ nmol.g^{-1}	ke j^{-1}	kw $\text{l.g}^{-1}.\text{j}^{-1}$	kf j^{-1}	ka nmol.l^{-1}	ϕ $\text{nmol.g}^{-1}.\text{j}^{-1}$
<i>Cd^{2+}-H^+ competition on copepods</i>								
pH 5.5 n= 4	3	1.6 (± 0.74)	218 (± 48)	0.34 (± 0.08 n = 5)	19.17 (± 0.74 n= 5)	0.26 (± 0.02 n = 5)	7.4×10^6 (± 0.8)	20 (± 3)
pH 5.5 n=4	3	4 5 (± 0.78)	218 (± 48)	0.34 (± 0.08 n = 5)	19.17 (± 0.74 n= 5)	0.26 (± 0.03 n = 5)	7.4×10^6 (± 0.8)	20 (± 3)
<i>relative importance of water and food as Cd sources for copepods</i>								
pH 4.8 (± 0.04) n= 30	16	4.4 (± 0.23 n = 4)	134 (± 20 n = 10)	0.34 (± 0.13 n = 5)	8.7 (± 1 n= 5)	0.62 (± 0.035 n = 5)	7.4×10^6 (± 0.8)	20 (± 3)
pH 5.5 (± 0.06) n= 30	3	3.9 (± 0.13 n = 4)	134 (± 20 n = 10)	0.34 (± 0.08 n = 5)	19.17 (± 0.74 n= 5)	0.62 (± 0.035 n = 5)	7.4×10^6 (± 0.8)	20 (± 3)
pH 6.4 (± 0.09) n=30	0.3	2.8 (± 0.27 n = 3)	134 (± 20 n = 10)	0.45 (± 0.12 n = 5)	26.3	0.62 (± 0.035 n = 5)	7.4×10^6 (± 0.8)	20 (± 3)

Figure captions

Fig. 1. Efficiency (mean \pm SD, n = 9) with which larvae of *Chaoborus americanus* assimilated Cd from their prey (the copepod *Diaptomus minutus*) for 2 time periods (0-4 and 5-9 d) and its relationship to ambient pH.

Fig. 2. Temporal changes in Cd concentrations in the copepod *Diaptomus minutus* (mean \pm SD, n = 5; $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) exposed at pH 5.5 to Cd in both food and in water at either a high $[\text{Cd}^{2+}]$ (solid symbol) or a low $[\text{Cd}^{2+}]$ (open symbol).

Fig. 3. Loss of Cd over time from the copepod *Diaptomus minutus* (means \pm SD, n = 6) that had been previously exposed to Cd in both water and food at a pH of 4.8 (solid circle), 5.5 (open circle) or 6.4 (triangle) and then placed in Cd-free water and offered Cd-free prey at these same pHs. Model curves were generated using equation 5 (see text for explanation).

Fig. 4. Temporal changes in Cd concentrations in the copepod *Diaptomus minutus* (means \pm SD, n = 6) exposed to Cd in both water and its algal food at a pH of 4.8 (solid circle), 5.5 (open circle) or 6.4 (triangle). Model curves were generated using equation 8 (see text for explanation). For the model curve at pH 6.4, $[\text{Cd}_0]$ was taken as the value measured at 0.63 d to avoid the initial period during which copepods did not feed to satiation (see Methods).

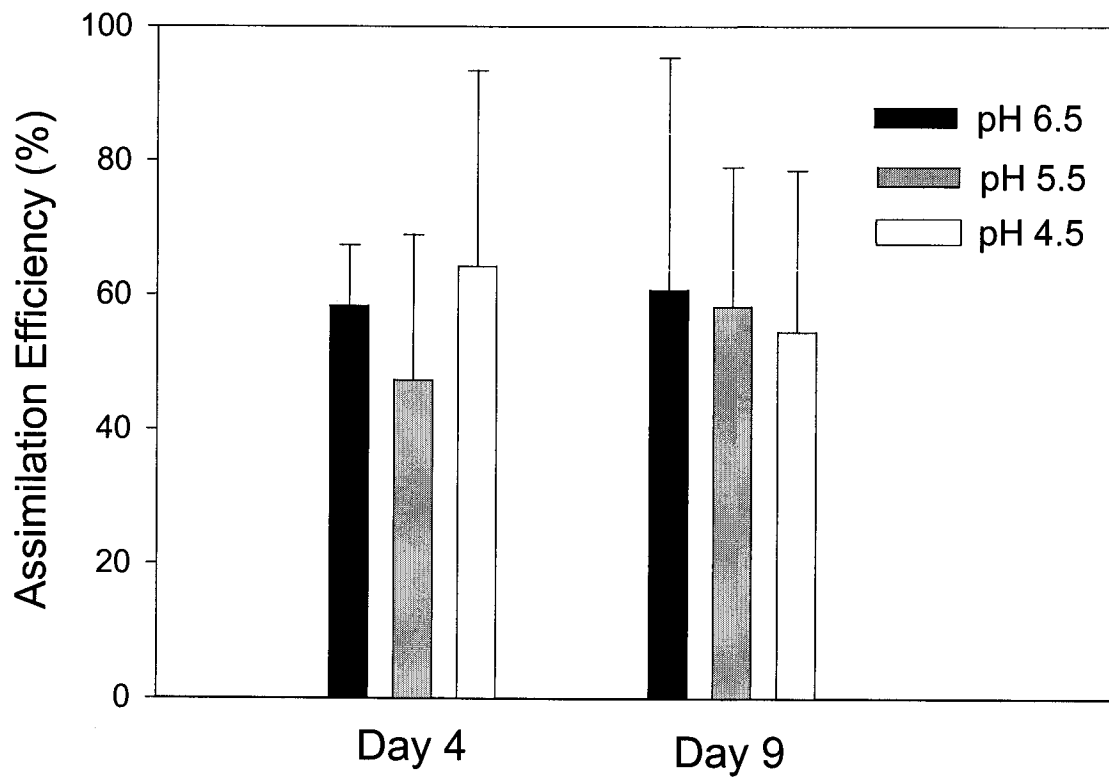


Figure 1. Orvoine et al.

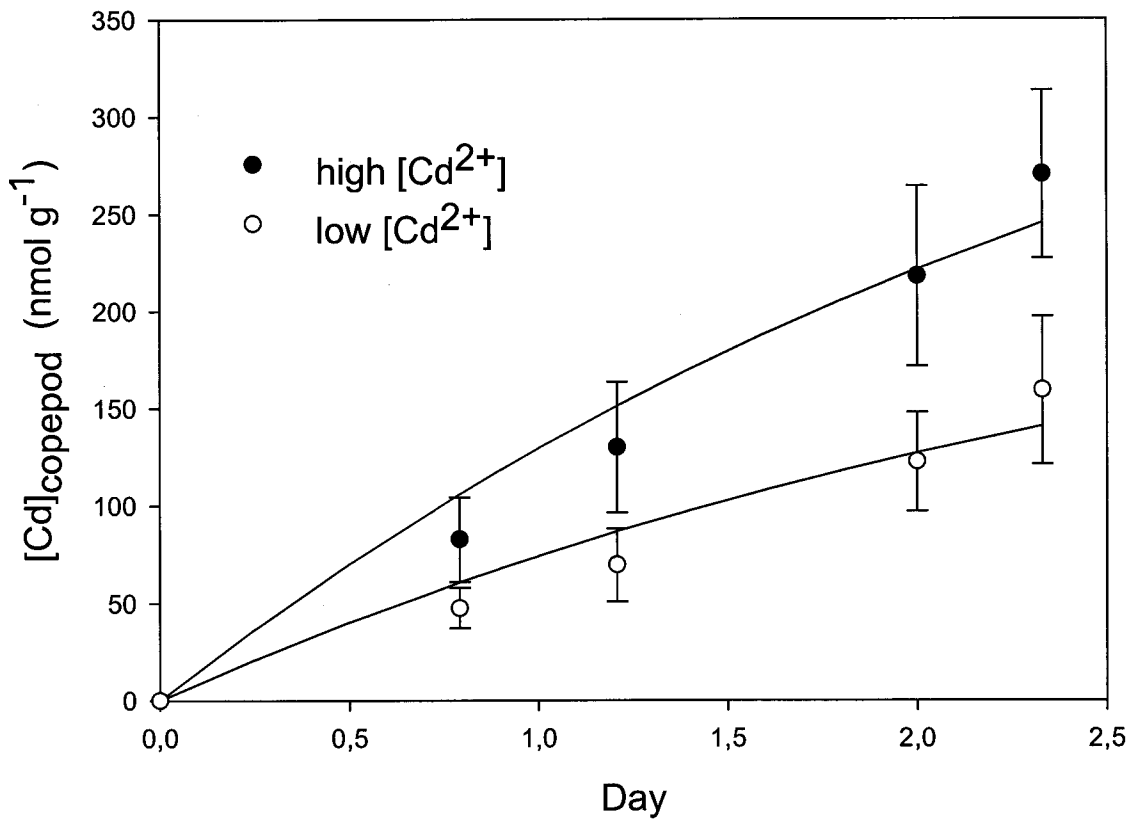


Figure 2. Orvoine et al.

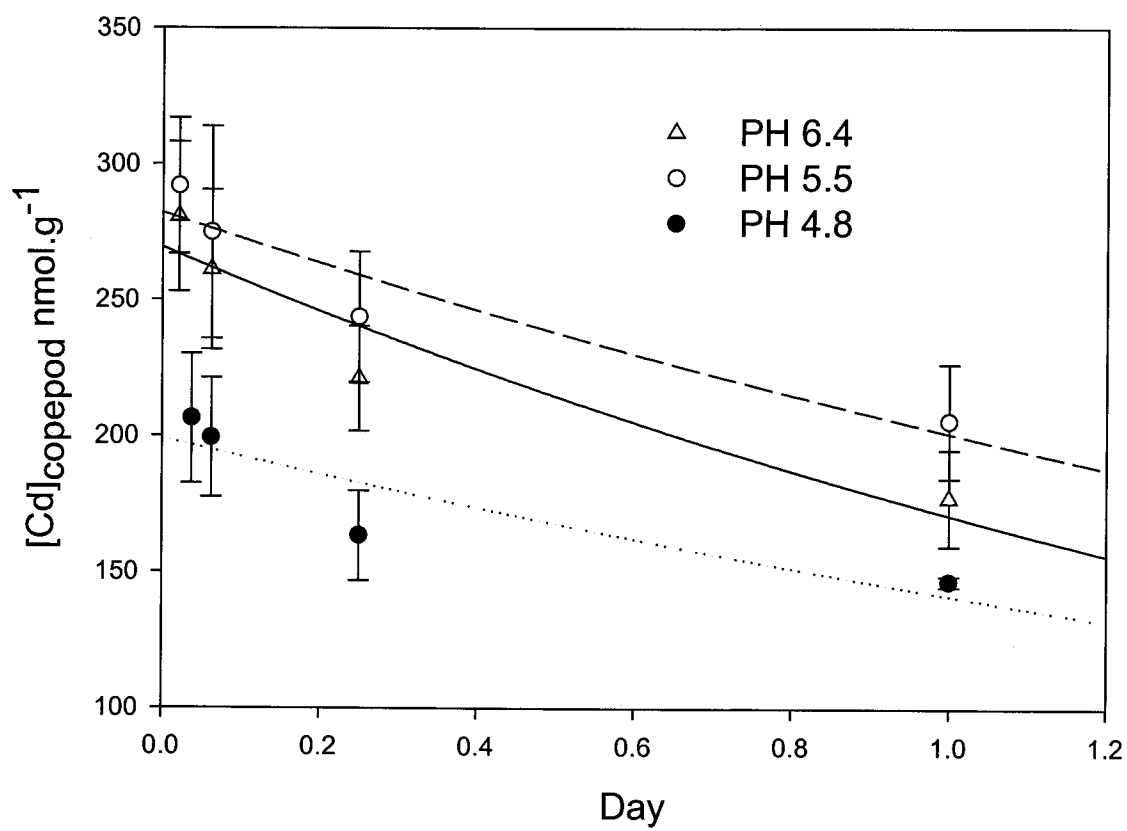


Figure 3. Orvoine et al.

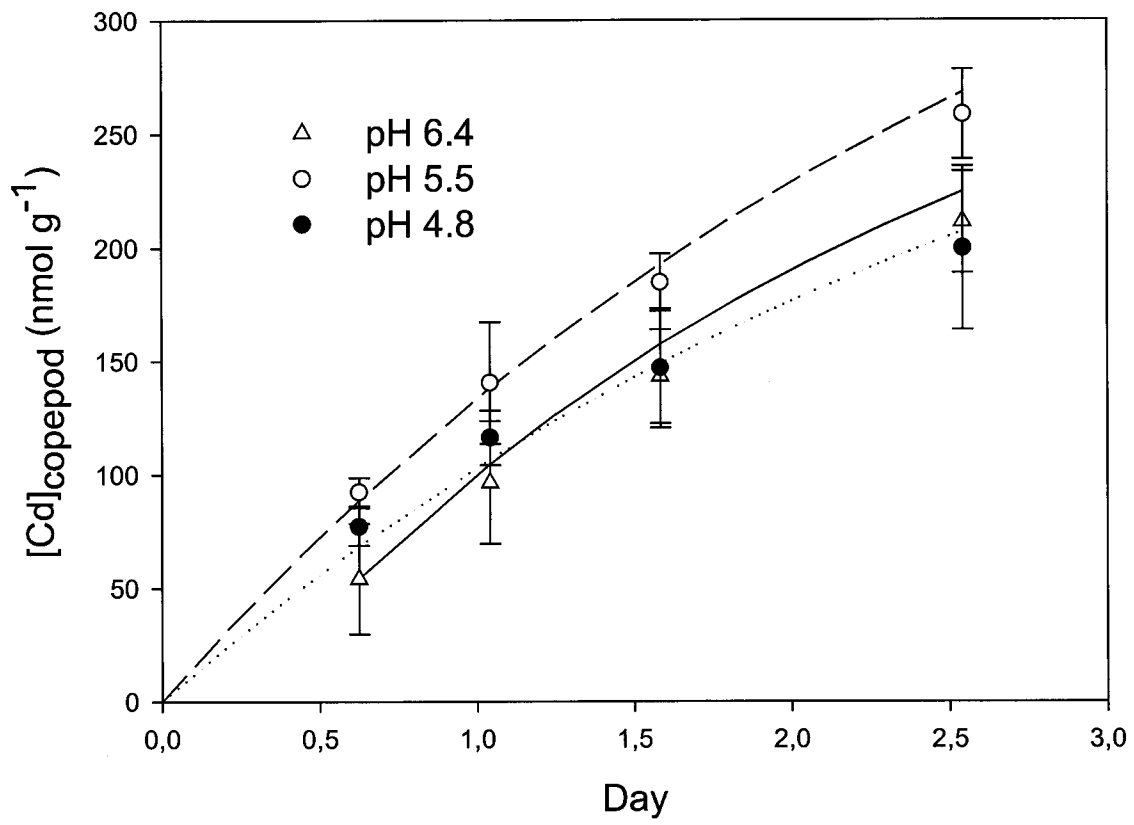


Figure 4. Orvoine et al.

