Université du Québec

INRS-Eau, Terre et Environnement

DÉTERMINATION DE LA PRÉSENCE DE THIOSULFATE EN MILIEU NATUREL ET ÉVALUATION DE SON POTENTIEL DE STIMULATION DU TRANSPORT DU Hg CHEZ UNE ALGUE VERTE

Par

Yvan Tremblay

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de maître sciences (M.Sc.)

en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Examinateur externe

Marc Lucotte, Université du Québec à Montréal

Examinateur interne

Marc Amyot, Université de Montréal et professeur invité à l'INRS-ETE

Directeur de recherche

Peter G.C. Campbell, INRS-ETE

Codirecteur de recherche

Claude Fortin, INRS-ETE

[©] droits réservés de Yvan Tremblay, 2007



REMERCIEMENTS

La réalisation de cette étude a nécessité la collaboration de plusieurs personnes de près ou de loin.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur et codirecteur de recherche M. Peter Campbell et M. Claude Fortin pour leur professionnalisme, leur disponibilité, leur patience ainsi que l'encadrement démontrés dans le cheminement qui mène à ce diplôme.

Un gros merci à Ambroise Percheron pour son aide et les bons moments partagés lors des campagnes de terrain et à Claudine Goulet pour son aide précieuse lors de la relecture du mémoire. Un merci spécial à ma collègue de travail Séverine Le Faucheur sans qui la réussite des expériences de prise en charge n'aurait été possible.

Merci aux techniciens et techniciennes du laboratoire qui ont aidé à résoudre les problèmes d'ordre technique (analyses, dosages, etc.). Je remercie plus particulièrement Michelle G. Bordeleau et René Rodrigue pour leur aide précieuse.

Enfin, l'étude a été réalisée grâce au support financier des Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT).

iii

RÉSUMÉ

En dépit de plusieurs années de recherche dans le domaine de la biogéochimie du mercure, la forme chimique possible sous laquelle le mercure peut franchir la membrane cellulaire de bactéries ou d'algues est toujours méconnue. Ce projet de maîtrise s'inscrivait à l'intérieur d'une étude plus globale traitant de la biodisponibilité du mercure envers les micro-organismes aquatiques. Les informations obtenues visaient une meilleure compréhension et une meilleure prédiction de la biodisponibilité du mercure dans les écosystèmes possédant différentes caractéristiques physico-chimiques.

Des recherches précédentes ont démontré que les complexes de l'argent et du cadmium avec le thiosulfate pouvaient être pris en charge par *Chlamydomonas reinhardtii*. Par analogie avec les résultats obtenus pour l'Ag et le Cd, il est possible de faire les hypothèses suivantes : (1) le thiosulfate peut former un complexe stable avec le Hg(II); (2) ce complexe, Hg(S₂O₃)₂², peut être absorbé par les microorganismes; (3) ce mécanisme de transport membranaire peut mener à l'augmentation de la bioaccumulation chez l'algue. Avant de vérifier ces hypothèses, on a utilisé la chromatographie ionique, couplée à une étape de préconcentration sur résine, ce qui a permis de mesurer de basses concentrations de thiosulfate et vérifier s'il était présent en concentration appréciable dans quatre lacs du Québec. Des concentrations de 0,5 μ M ont été trouvées dans les lacs Pink et Holland. Ces concentrations ont été utilisées pour les expériences de prise en charge du mercure inorganique Hg(II); de cette façon, on pouvait avoir des conditions environnementales représentatives.

En ce qui concerne les hypothèses 2 et 3, lesquelles constitueraient une exception au modèle de l'ion libre (MIL), des travaux de laboratoire ont été effectués avec *C. reinhardtii* afin de déterminer si la prise en charge de Hg était en effet augmentée en présence de thiosulfate. Dans un premier temps, nous avons exposé cette algue verte à une concentration fixe de mercure sous forme de $Hg(OH)_2$ (20 nM), sans

V

présence de thiosulfate, pendant de courtes périodes (< 30 min) et nous avons suivi l'accumulation du mercure intracellulaire. Les résultats de ces expériences ont démontré une accumulation rapide et linéaire du mercure, et ils ont aussi mis en évidence l'inefficacité de l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) à désorber le mercure extracellulaire. La cystéine a été testée et elle s'est avérée efficace pour cette désorption. Dans un deuxième temps, la prise en charge du mercure complexé avec le thiosulfate a été mesurée avec un temps d'exposition et une concentration fixe de Hg. La présence du thiosulfate (avec ou sans sulfate dans les milieux d'exposition) a provoqué une complexation du mercure et une diminution progressive de la prise en charge du Hg lorsque la concentration du thiosulfate était augmentée.

Finalement, on a observé, indépendamment de la présence ou non de thiosulfate, que le sulfate a semblé augmenter la prise en charge du mercure sous forme d'Hg(OH)₂ présent dans les milieux d'exposition. Afin de confirmer ce phénomène, on a mesuré la prise en charge du Hg en présence de concentrations croissantes de sulfate (sans présence de thiosulfate pour éviter la complexation du Hg). L'accumulation du mercure a été favorisée à des concentrations en sulfate dans la gamme entre 40 et 120 μ M. Pour expliquer cette accumulation accrue du mercure, on a posé l'hypothèse que le Hg et le sulfate pouvaient entrer chez *Chlamydomonas reinhardtii* par cotransport, non pas comme complexe Hg-SO₄, mais plutôt comme deux entités distinctes.

TABLE DES MATIÈRES

RI	REMERCIEMENTS iii						
RI	RÉSUMÉv						
TA	ABLE	DES N	IATIÈRES	vii			
LI	STE	DES TA	ABLEAUX	xi			
LI	STE 1	DES FI	GURES	xiii			
LI	STE 1	DES Al	BRÉVIATIONS	xix			
1.	Intr	oductio	n	1			
	1.1	Cycle g	global du mercure	2			
		1.1.1	Sources de mercure	2			
		1.1.2	Spéciation du mercure dans l'environnement	4			
	1.2	Thiosu	lfate en milieu aquatique	8			
		1.2.1	Cycle du soufre	9			
		1.2.2	Présence du thiosulfate dans les rejets anthropiques	10			
		1.2.3	Présence du thiosulfate dans les eaux naturelles	11			
		1.2.4	Méthodes d'analyse du thiosulfate	12			
		1.2.5	Complexation thiosulfate-mercure	13			
	1.3	Interac	tion métaux-algues: Modèle de l'ion libre (MIL)	15			
		1.3.1	Hypothèses du MIL	18			
		1.3.2	1.3.1.1 Exceptions au MIL Transport transmembranaire				
			1.3.2.1 Métaux essentiels et toxiques1.3.2.2 Sulfate1.3.2.3 Mercure				
	1.4	Objecti	.fs				
2.	Thic	osulfate	en milieu naturel	27			
	2.1	Méthoo	lologie	27			

		2.1.1	Description des lacs d'intérêt	27
		2.1.2	Équipements, produits et réactifs	33
		2.1.3	Prélèvement d'échantillons dans la colonne d'eau	33
		2.1.4	Préservation des échantillons	35
		2.1.5	Analyse de sulfure d'hydrogène	36
		2.1.6	Analyse de sulfate	37
		2.1.7	Dosage de thiosulfate	37
		2.1.8	Chromatographie ionique	41
		2.1.9	Limite de détection	42
	2.2	Résultat	ts	43
		2.2.1	Méthode de préconcentration du thiosulfate	43
		2.2.2	Mesures en lacs	50
			2.2.2.1 Lac Bleu 2.2.2.2 Lac Pink	50
3.	Biod	lisponib	pilité du mercure	55
	3.1	Méthod	lologie expérimentale	56
		3.1.1	Produits, réactifs et conservation	56
		3.1.2	Préparation des milieux de culture	56
		3.1.3	Culture des algues	59
		3.1.4	Cycle de croissance et récolte des algues	60
		3.1.5	Comptage d'algues	61
		3.1.6	Modélisation thermodynamique	62
		3.1.7	Adsorption du mercure	62
		3.1.8	Méthodologie de prise en charge du Hg	63
			 3.1.8.1 Préparation des milieux d'exposition et de rinçage 3.1.8.2 Dosage du mercure (²⁰³Hg) intracellulaire 3.1.8.3 Distinction entre métal adsorbé et métal intracellulaire. 	63 64
			3.1.8.4 Expérience de cinétique de prise en charge du Hg(OH) ₂	67
		3.1.9	Cinétique de prise en charge du complexe Hg-thiosulfate	69
		3.1.10	Risques associés aux concentrations de mercure utilisées	
			lors des expériences de prise en charge	73

	3.2	Résultat	ts	74			
		3.2.1	Bilan de masse	74			
		3.2.2	Cinétique de prise en charge du Hg(OH) ₂	75			
		3.2.3	Cinétique de prise en charge du complexe mercure-				
			thiosulfate	80			
4.	Disc	ussion .		89			
	4.1	Mesure	de thiosulfate dans les lacs	90			
	4.2	Prise en charge du mercure en absence de thiosulfate					
	4.3	Prise en charge du mercure avec présence de thiosulfate					
	4.4	Effet de la concentration en sulfate98					
	4.5	Pertiner	nce environnementale	98			
5.	Con	clusion.		. 101			
6.	Bibl	iograph	ie	. 103			

ix

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 :	Émissions globales de Hg total (10 ⁶ kg an ⁻¹) provenant des sources
	naturelles. Traduit de (Richardson, 2001)
Tableau 1.2 :	Émissions globales de Hg total (10^6 kg an ⁻¹) provenant des sources
	humaines majeures. Traduit de (Nriagu et Pacyna, 1988)3
Tableau 1.3 :	Concentrations de thiosulfate retrouvées en milieu naturel11
Tableau 1.4	: Valeurs des constantes de formation recommandées pour les
	différents ligands13
Tableau 2.1:	Caractéristiques morphométriques des lacs échantillonnés33
Tableau 2.2:	Limite de détection du chromatographe ionique DX 50043
Tableau 2.3:	Taux de récupération d'une quantité de thiosulfate ajoutée à l'eau
	naturelle du lac Bleu51
Tableau 2.4:	Concentrations de thiosulfate mesurées à différentes profondeurs
	au lac Pink52
Tableau 2.5:	Concentration de thiosulfate mesurée à différentes profondeurs au
	lac Holland
Tableau 3.1:	Composition et concentration des solutions mères utilisées pour la
	préparation de différentes solutions
Tableau 3.2:	Volumes de solutions mères utilisées pour la préparation des
	milieux de culture (MHSM-2), d'exposition (MHSM-1, MHSM-3)
	et de rinçage (MHSM-R1 et MHSM-R2)58
Tableau 3.3:	Concentrations molaires des cations et anions qui composent les
	milieux de culture, d'exposition et de rinçage. Le pH a été
	maintenu à 7,0 dans ces trois milieux
Tableau 3.4:	Conditions d'exposition au mercure pour la première expérience70
Tableau 3.5:	Conditions d'exposition au mercure pour la deuxième expérience70
Tableau 3.6:	Conditions d'exposition au mercure pour la troisième expérience71
Tableau 3.7:	Conditions d'exposition au mercure pour la quatrième expérience71
Tableau 3.8:	Conditions d'exposition au mercure pour la sixième et septième
	expérience
Tableau 3.9:	Bilan de masse

хi

Tableau 3.10:	Concentrations nominales et mesurées des expériences de prise en				
	charge du Hg sans présence de thiosulfate77				
Tableau 3.11:	Concentrations nominales et mesurées des expériences de prise en				
	charge du complexe Hg-thiosulfate				

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1:	Diagramme des hydroxo et chloro complexes du Hg(II) (5-100
	pM) en fonction du pH et de la concentration des chlorures
	dans les conditions générales de l'eau douce et salée. Tirée de
	(Morel et al., 1998)7
Figure 1.2 :	Spéciation du mercure selon la concentration de thiosulfate
	calculée à l'aide du logiciel MINEQL+ 4.5 en utilisant une
	concentration totale de Hg de 20 nM à pH 7 et un milieu ouvert
	à l'atmosphère et en utilisant les concentrations des divers ions
	contenus dans le milieu d'exposition MHSM-1 (voir le tableau
	2.2 pour la composition de ce milieu)14
Figure 1.3	Représentation conceptuelle du transport transmembranaire de
	métaux non essentiels comme le Hg. La voie I représente un
	système de transport de métaux essentiels comme, par
	exemple, Ca, le Cu et le Zn. La voie II représente un système
	de transport d'acides aminés ou d'anions (Y = Cl-, CO32-,
	SO42- ou S2O32-). La voie III représente la diffusion passive
	de complexes lipophiles (modifiée de Fortin, 2000)20
Figure 1.4:	Représentation conceptuelle des interactions métaux-
	organismes. Mz + = ion libre ; ML = métal complexé ; Lz - =
	ligand (acide àminé, citrate, S2O32-, CO32-, Cl-) ; M-X =
	métal complexé à la surface (modifiée de Campbell, 1995)23
Figure 2.1:	Localisation des quatre lacs échantillonnés au Québec: 1) Lac
	Holland 2) Lac Pink 3) Lac Bleu 4) Lac Bédard (Tirée de
	Google Earth)
Figure 2.2:	Lac Bleu, région de Portneuf, Québec. Carte bathymétrique.
	Tirée (Dupont, 1986)). A: Station d'échantillonnage
Figure 2.3:	Lac Bédard, forêt Montmorency, Québec. Carte bathymétrique.
	A: Station d'échantillonnage
Figure 2.4:	Lac Pink, Parc de la Gatineau, Québec. Carte bathymétrique.
	A: Station d'échantillonnage

Figure 2.5:	Lac Holland, Gaspésie, Québec. Carte bathymétrique produite
	à l'aide d'un logiciel de cartographie. A: Station
	d'échantillonnage
Figure 2.6:	Montage expérimental lors de A) la préconcentration de la
	solution échantillonnée et B) de l'élution des différents anions40
Figure 2.7:	Taux de récupération du thiosulfate en fonction du débit de
	passage d'une solution synthétique à travers la résine
	échangeuse d'ions. Concentration de l'éluant KCl = 0,5 M.
	Débits de passage à travers la résine □: 1,5 mL•min-1; +: 2
	mL•min-1; ▼ : 2,5 mL•min-1; • : 3 mL•min-144
Figure 2.8:	Taux de récupération du thiosulfate en fonction du nombre de
	mL d'éluant lors du passage d'une solution synthétique à
	travers la résine échangeuse d'ions. Concentration de l'éluant
	$KCl = 0,5 M.$ Quantité d'éluant passée • : 20 mL; \circ 25 mL45
Figure 2.9:	Taux de récupération du thiosulfate en fonction du débit de
	passage de l'éluant après l'écoulement d'une solution
	synthétique à travers la résine échangeuse d'ions.
	Concentration de l'éluant KCl = 0,5 M46
Figure 2.10:	Taux de récupération du sulfate en fonction du volume d'éluant
	lors du passage d'une solution synthétique à travers la résine
	échangeuse d'ions. Concentration de l'éluant $KCl = 0,1$ M.
	Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de
	cinq mesures47
Figure 2.11:	Taux de récupération du sulfate et du thiosulfate en fonction de
	la concentration de l'éluant (KCl) lors du passage d'une
	solution synthétique à travers la résine échangeuse d'ions. Ions
	récupérés 0: thiosulfate; •: sulfate. Les barres d'erreur
	représentent l'écart-type sur la moyenne de cinq mesures
Figure 2.12:	Chromatogramme d'une solution synthétique contenant 2 μM
	de thiosulfate sans préconcentration sur la résine AG1-X849

xiv

Figure 2.13:	Chromatogramme d'une solution synthétique éluée au KCl (0,5
	M) contenant 2 µM de thiosulfate après une préconcentration
	sur la résine AG1-X850
Figure 2.14:	Caractérisation physico-chimique de la colonne d'eau du lac
	Pink
Figure 2.15:	Caractérisation physico-chimique de la colonne d'eau du lac
	Holland54
Figure 3.1:	Courbe de croissance typique de Chlamydomonas reinhardtii.
	Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de
	cinq mesures60
Figure 3.2:	Schéma de la méthodologie employée pour mesurer la prise en
	charge du mercure par des algues69
Figure 3.3:	Cinq essais indépendants de prise en charge du mercure par
	C. reinhardtii en présence d'une concentration nominale entre
	17 et 44 nM de HgT en milieu MHSM-1 à pH 7. Les algues ont
	été rincées à l'EDTA (10-2 M). Les barres d'erreur
	représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Voir
	le tableau 3.10 pour les conditions d'exposition76
Figure 3.4:	Essais indépendants de cinétique de prise en charge du mercure
	par C. reinhardtii en présence d'une concentration nominale
	entre 44 et 55 nM de HgT en milieu MHSM-1 à pH 7. • :
	algues rincées à l'EDTA (10-2 M) o : algues rincées à la
	cystéine (100 mM). Les barres d'erreur représentent l'écart-
	type sur la moyenne de trois mesures. Voir le tableau 3.10 pour
	les conditions d'exposition78
Figure 3.5:	Comparaison des cinétiques de prise en charge du mercure
	avec deux cultures indépendantes d'algues, avec ou sans
	agitation, en présence d'une concentration nominale de ~20
	nM de HgT en milieu MHSM-1 à pH 7 et rincées à la cystéine
	(\blacktriangle : sans agitation; \bullet : avec agitation). Les barres d'erreur
	représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Voir
	le tableau 3.10 pour les conditions d'exposition

XV

Figure 3.7:

Figure 3.8:

Effet de la concentration du thiosulfate dans les milieux d'exposition sur la cinétique de prise en charge du mercure à concentrations Hg(OH)2 variables et HgT (24 nM) constantes en présence de thiosulfate sans sulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Voir

Figure 3.9:

Figure 3.10:

3.10: Effet de la concentration de sulfate dans les milieux d'exposition sur la prise en charge du mercure à des concentrations de HgT nominales (30 nM) •: Hg intracellulaire o: Hg total mesuré pour chaque solution

Figure 3.11:



LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAP: Algal assay procedure Constante de complexation $(M + n L \leftrightarrow ML_n; \beta_n = [ML_n]/([M] \cdot [L]^n)$ β BLM : Modèle du ligand biotique CANMET : Canada Centre for Mineral and Energy Technology CPM : Comptes par minute DPM : Désintégrations par minute EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy HDPE : Polyéthylène à haute densité Acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonique **HEPES**: *High performance liquid chromatography* HPLC: HSM : High salt medium I : Force ionique K : Constante d'équilibre chimique L : Ligand M^{z^+} : Ion métallique libre Méthylmercure MeHg: MHSM : Modified high salt medium Modèle de l'ion libre MIL : Métal complexé ML : ML_n^{0} : Complexe neutre potentiellement lipophile $ML_n^{,\pm}$: Complexe hydrophile PC: Polycarbonate PFA: Polymère perfluoralkoxy PP: Polypropylène Polymère de tétrafluoroéthylène PTFE: Tétrafluoroéthylène TFE : UTCC : University of Toronto Culture Collection UV-VIS: Ultraviolet-visible spectroscopy



1. Introduction

Depuis l'aube de la préhistoire, les métaux ont fait l'objet de la convoitise des hommes. Recherchés pour une large part à des fins utilitaires ou comme sources de richesse, ils l'ont également été pour leurs propriétés esthétiques. Historiquement, le mercure, sous forme de cinabre (HgS), fut exploité aussi tôt que 700 ans av J.-C. par les phéniciens. Par la suite, les romains utilisèrent esclaves et prisonniers pour l'exploitation d'une des premières mines située en Espagne. Depuis, la production et l'exploitation de mercure ont été substantielles et les dommages à l'environnement importants. Par exemple, lors de la ruée vers l'or en Californie entre les années 1840 et 1900, le mercure a connu une forte hausse d'exploitation afin d'aider les prospecteurs à séparer l'or de son minerai (Schuster *et al.*, 2002). D'ailleurs, la quantité de mercure utilisée est estimée à 23 millions de kilogrammes afin de recueillir l'or contenu dans la Sierra Nevada en Californie. En conséquence, le mercure fut déversé dans les divers cours d'eau.

Depuis que le mercure est utilisé, les préoccupations de santé publique associées à la contamination environnementale de celui-ci sont nombreuses. Dès 1940, Hunter et Russell (1940) ont rapporté un empoisonnement au méthylmercure causé par les sols agricoles contaminés. De plus, en 1956, à Minamata au Japon, Takizawa rapporte qu'une quantité importante de rejets industriels riches en méthylmercure (MeHg) avait été déversée à travers les années dans la mer, causant la mort de 48 personnes et provoquant l'invalidité de 2 952 individus (Takizawa, 2000). Ces rejets, provenant d'une usine fabriquant de l'acétaldéhyde, ont entraîné une augmentation des concentrations de MeHg dans les mollusques, les crustacés et les poissons à la base du régime alimentaire des habitants de la baie (Takizawa, 2000). De façon générale, le processus clé entraînant une hausse de la neurotoxicité et de la capacité d'accumulation du mercure est sa méthylation en méthylmercure (MeHg), par les bactéries sulfato-réductrices de nos lacs et zones humides (Morel *et al.*, 1998). Afin d'être ainsi méthylé, le mercure doit tout d'abord franchir la membrane de la bactérie. Une fois le MeHg produit et excrété par les bactéries, il doit à nouveau franchir les

membranes des organismes à la base du réseau trophique, soit les producteurs primaires tels que les algues. Peu d'informations sont disponibles à propos des formes chimiques de mercure capables d'effectuer ce transfert transmembranaire chez les bactéries et les algues. Cette information est nécessaire afin de pouvoir comprendre et prédire la disponibilité du mercure dans différents écosystèmes ayant différentes caractéristiques physico-chimiques.

Antérieurement à 1980, les principales sources de mercure qui suscitaient un souci environnemental ont impliqué des décharges ponctuelles liées aux processus industriels (p. ex. usines de pâtes et papiers) et l'utilisation du mercure lors de la séparation de l'or. Depuis, la préoccupation concernant le mercure dans l'environnement a changé. Bien qu'il reste du mercure résiduel dans l'eau suite à ces opérations, les préoccupations qui concernent le mercure portent maintenant sur la contamination à l'échelle continentale en provenance du transport atmosphérique largement dû à l'activité humaine (Nriagu, 1989; Pirrone *et al.*, 1996; Schuster *et al.*, 2002).

1.1 Cycle global du mercure

1.1.1 Sources de mercure

Divers organismes, tant nationaux qu'internationaux, se sont impliqués dans l'évaluation de la contamination actuelle (de l'eau, de l'air) par le mercure en plus de soutenir le développement de stratégies et de politiques afin de réduire les émissions de ce polluant. Il est généralement reconnu qu'une compréhension du niveau de contamination de base et du cycle du mercure est essentielle afin d'estimer la portée et l'impact de rejets anthropiques de mercure dans l'environnement (Nriagu, 1989; Raport UNEP, 2006). Il existe deux catégories de mobilisation du mercure, soit de sources naturelles et anthropiques (Mason *et al.*, 1994; Morel *et al.*, 1998; Schuster *et al.*, 2002; Pacyna *et al.*, 2006). Les sources atmosphériques naturelles de Hg (Tableau 1.1) incluent le dégazage de la croûte terrestre, les éruptions volcaniques, les incendies de forêt, l'érosion des sols ainsi que le dégazage des eaux de surfaces (Nriagu, 1989; Nriagu, 1999; Richardson, 2001).

Poussières	Dégazage	Volcans	Embruns	Dégazage	Dégazage	Feux	Météorites	Végétation	Total
par le vent	des sols		marins	océans	eau douce	forêts			
0,03		0,01				0,04			0,08
0,035		0,03	0,006			0,03	0,03		0,071
0,005		>0,24	0,001			0,16			>0,4
1-2	0,06			2,3		1-2		1-2	3,3-4,3
0,03		0,03	0,003			0,1			0,16
0,05		1,0	0,02	0,77		0,02		0,61	2,5
	0,58-1,26	0,02-		2,0				0,85-2	
		0,09							
	1,12	0,447						0,9	2,47

Tableau 1.1 : Émissions globales de Hg total (10⁶ kg an⁻¹) provenant des sources naturelles. Traduit de (Richardson, 2001).

Tableau 1.2 : Émissions globales de Hg total (10⁶ kg an⁻¹) provenant des sources humaines majeures. Traduit de (Nriagu et Pacyna, 1988).

Sources	Émissions atmosphériques	Sources	Apports écosys. aquatiques	Sources	Émissions déposées sur les sols
Combustion de charbon				Déchets agricoles	0-1,5
-Utilisation d'électricité	0,16-0,54	Eaux usées domestiques	0-0,60	Résidus miniers	0,55-2,8
-Industriel/ domestique	0,5-2,97			Scorie de fonderie	0,05-0,28
Production métaux non-		Procédés	······································	Déchets animaux	0-0,2
ferreux		manufacturiers	0-0,75	Dragage et autres	
-Production du Pb	0,008-0,16	-Métaux	0,02-1,5	déchets de bois	0-2,2
-Production Cu-Ni	0,037-0,21	-Chimiques	0-0,02	Déchets domestiques	0-0,26
		-Produits pétroliers	0,22-1,8	Dépôts atmosphériques	0,63-4,3
		Dépôt atmosphérique			
Incinération déchets	·	Fonderie et affinage		Déchets solides	0-0,08
-Municipaux	0,14-2,1	-Métaux non-ferreux	0-0,04	Cendres charbon	0,37-4,8
-Boue d'épuration	0,015-0,06			Boues municipales	0,01-0,8
Combustion de bois	0,060-0,3	Stériles miniers/minage	0-0,15	Tourbières	0-0,02
		de métaux de base			
		Centrales thermiques	0-3,6	Dégradation de produits commerciaux	0,55-0,82
Total	0,91-6,2	Total	0,3-8,8	Total	2,2-18

Les principales sources d'émission d'origine humaine sont la combustion de charbon, le raffinage de métaux (principalement le cuivre et le nickel), la production d'acier et la mise au rebut de déchets contenant du mercure (Tableau 1.2) (Nriagu et Pacyna, 1988; Pacyna *et al.*, 2006). Un débat persiste quant à la contribution relative du mercure de sources naturelles par rapport aux émissions dans l'environnement dues à l'activité humaine (Fitzgerald *et al.*, 1998; Rasmussen, 1998; Lindberg *et al.*, 2007).

1.1.2 Spéciation du mercure dans l'environnement

De façon générale, le mercure se retrouve sous différentes formes physiques dans l'environnement, soit sous forme vapeur, dissous dans l'eau ou encore lié à des phases solides minérales ou organiques. Dans l'atmosphère, la distribution globale du Hg s'effectue par des processus d'oxydation/réduction et de déposition et il se présente comme un composé inorganique sous deux états d'oxydation : mercure élémentaire, Hg⁰, et mercure inorganique, Hg(II). La forme Hg⁰ constitue la majorité du mercure dans l'atmosphère (95-100 %) et prédomine sous forme gazeuse (Fitzgerald et Mason, 1996). Le Hg(II) tend plutôt à être présent dans l'eau atmosphérique, soit dissous ou adsorbé sur les particules contenues dans les gouttes d'eau. La grande affinité du Hg(II) pour les ligands sulfurés donneurs d'électron suggère que les complexes entre ces deux éléments sont des espèces importantes dans les nuages, et ce, même dans les régions où l'air est non pollué (Pai et al., 1997). Van Loon et al., (2000) ont rapporté que, dans certaines conditions, le complexe HgSO3 a pu être observé, mais celui-ci n'est généralement pas celui qui est le plus dominant et stable lorsque la concentration de S(IV) excède grandement celle du Hgtot. Ce composé instable se réduit de nouveau en Hg^0 et/ou en un complexe $Hg \cdot SO_{2(aq)}$ (Van Loon *et* al., 2001). Sous des conditions naturelles, il a été démontré que le complexe $Hg(SO_3)_2^{2^2}$ est celui présent dans les gouttelettes d'eau atmosphériques (Van Loon *et* al., 2001).

En phase gazeuse, plusieurs processus interviennent dans la chimie du mercure. Beaucoup d'incertitudes règnent à savoir lequel est le plus dominant parmi l'ensemble des processus. Selon certains, l'ozone semble jouer un rôle dans l'oxydation du mercure (Munthe, 1992). Des éléments tels que la variabilité de la

concentration du Hg similaire à celle de l'ozone en arctique après la levée du jour polaire et une corrélation positive observée sur le site (Schroeder *et al.*, 1998) viennent appuyer cette théorie à propos de l'oxydation du Hg⁰. Cependant, les réactions du Hg avec l'ozone et les halogènes moléculaires seraient trop lentes pour être considérées des éléments clés dans la diminution du mercure atmosphérique. De surcroît, ces réactions ne pourraient jouer un rôle important dans la diminution du Hg atmosphérique parce que ces dernières sont de nature photochimique et sont observées uniquement au lever du jour polaire et non durant l'hiver (Khalizov *et al.*, 2003). D'ailleurs, Ariya *et al.* (2002) ont mentionné qu'une baisse rapide du Hg⁰ et de l'ozone, coïncidant avec l'augmentation de la concentration d'halogènes, a été observée dans plusieurs régions de la haute arctique et subarctique, ce qui vient appuyer le fait que ce n'est pas l'ozone qui contribue a diminuer le Hg⁰, mais bien la présence d'halogènes qui diminuent les concentrations d'Hg⁰ et d'ozone.

La réaction entre le Hg^0 et les halogènes atomiques est considérablement plus rapide que celle entre le Hg^0 et l'ozone ou les halogènes moléculaires (Khalizov *et al.*, 2003; Ariya *et al.*, 2002). Il est très probable que celles-ci jouent un rôle important dans la chimie du mercure gazeux (particulièrement le Br parce que le Cl ne se retrouve pas en concentration assez élevée pour influencer la diminution du Hg atmosphérique) (Ariya *et al.*, 2002). Le BrO a été identifié comme agent oxydant et relié à la baisse de concentration du Hg^0 (Raofie et Ariya, 2004). Ils ont démontré, lors d'expériences, l'existence de composés tels que HgBr, HgBrO/HgOBr et le HgO dans la phase condensée (aérosol et dépôt).

L'oxydation du Hg atmosphérique par les radicaux HO (source d'agent oxydant du Hg qui est généralement considéré être le résultat de la photolyse de l'ozone suivie par des réactions avec la vapeur d'eau) est également une autre possibilité de réaction avec le Hg⁰. Suite à cette oxydation, le HgO a été identifié dans les formes gazeuses et d'aérosol (Biswajit et Ariya, 2004). Cependant, ce processus n'aurait qu'un impact mineur sur la diminution importante des concentrations de Hg⁰ dans l'arctique (Ariya *et al.,* 2002). D'autres processus d'oxydation par différents agents oxydants ont été

relevés comme thermodynamiquement favorables tels que OCl⁻, Cl₂ (Seigneur *et al.*, 1994), HNO₃ (Lin et Pehkonen, 1999) ou H_2O_2 (Tokos *et al.*, 1998).

Le retour du mercure de l'atmosphère vers la surface terrestre se produit en grande partie par le biais des dépôts humides du Hg(II) dissous. Puisque le processus d'oxydation du Hg⁰ en Hg(II) est relativement lent, le temps de séjour du mercure dans l'atmosphère peut s'échelonner en termes d'années (Fitzgerald et Mason, 1997; Schroeder *et al.*, 1998). Ce temps suffit pour que le mercure atmosphérique soit distribué partout autour du globe avant de retourner sur la surface de la terre. Une fois oxydé, 60 % du Hg(II) est déposé sur les milieux terrestres et 40 % sur les milieux aquatiques (Mason *et al.*, 1994; Mason et Sheu, 2002).

Dans les eaux oxiques naturelles (site non contaminé), le mercure est présent sous différentes formes physiques et chimiques à des concentrations qui varient entre 5-100 pM (= $5-100 \times 10^{-12}$ mol/L) (Morel *et al.*, 1998). Les concentrations présentes se répartissent entre trois phases distinctes, soit : dissoute, colloïdale et particulaire (Morel *et al.*, 1998). La proportion de chaque phase varie grandement selon les saisons et la profondeur dans la colonne d'eau. La concentration du mercure par unité de poids particulaire est relativement constante, ce qui reflète possiblement un équilibre d'adsorption entre la phase dissoute et la phase particulaire (Meili, 1997). Il n'existe pas d'évidence quant à la forme chimique exacte du mercure particulaire; il est probable qu'il soit lié à la matière organique en suspension (Morel *et al.*, 1998).

Le mercure dissous existe sous différentes formes, soit : Hg^0 ; Hg^{2+} ; composés organo-métalliques (monométhylemercure, CH_3Hg^+ ; diméthylemercure ($CH_3)_2Hg^0$); thiocomplexes (HgSR); complexes avec les ligands OH⁻, Cl⁻ et avec la matière organique. Les calculs thermodynamiques indiquent que le mercure divalent dans les eaux de surface, Hg(II), n'est à toute fin pratique pas présent sous sa forme libre, Hg^{2-} , mais devrait être complexé variablement aux ions hydroxydes ($Hg(OH)^+$, $Hg(OH)_2$, $Hg(OH)_3$) et aux chlorures ($HgCl^+$, HgClOH, $HgCl_2$, $HgCl_3^-$, $HgCl_4^{2-}$) selon le pH et la concentration d'ions Cl⁻ (Stumm et Morgan, 1996) (figure 1.1).



Figure 1.1: Diagramme des hydroxo et chloro complexes du Hg(II) (5-100 pM) en fonction du pH et de la concentration des chlorures dans les conditions générales de l'eau douce et salée. Tirée de (Morel *et al.*, 1998).

Par ailleurs, même si les ions chlorures et le pH jouent un rôle important dans la spéciation du mercure, il est possible, même dans la portion oxygénée de la colonne d'eau, de retrouver le Hg(II) lié avec les sulfures (S_2^- et HS⁻) malgré l'instabilité thermodynamique de ceux-ci en présence d'oxygène (Luther et Tsamakis, 1989). De plus, une fraction encore mal définie de Hg(II) est vraisemblablement liée aux acides humiques et fulviques (composés organiques constituant 50-90 % du carbone organique dissous dans les eaux naturelles). D'ailleurs, Meili (1997) suggère que 95 % du mercure inorganique oxydé dans les lacs soit lié à la matière organique dissoute.

Dans la portion anoxique de la colonne d'eau, la grande affinité du mercure pour les sulfures contrôle la spéciation du Hg(II), laquelle est complètement dominée par les complexes sulfurés et bisulfurés (HgS₂H₂, HgS₂H⁻ et HgS₂²⁻). Dans les sédiments, l'HgS(s) est considéré comme l'espèce particulaire qui contrôle la solubilité du Hg(II) dans les eaux anoxiques (Morel *et al.*, 1998). Il est cependant difficile d'affirmer analytiquement la nature chimique exacte du mercure présent dans les sédiments. Il est possible qu'en plus d'être précipité sous forme de HgS(s), le mercure dans les sédiments soit lié à la matière organique particulaire ou bien à des particules inorganiques telles que les oxydes de fer (Triffreau *et al.*, 1995).

1.2 Thiosulfate en milieu aquatique

L'analyse thermodynamique du processus d'oxydation des sulfures suggère que seul le sulfate devrait être produit; les limitations cinétiques mènent pourtant à la formation de composés partiellement oxydés tels que le thiosulfate (Wasserlauf, 1982). La détermination du soufre inorganique et des espèces oxydées de soufre est donc essentielle afin de comprendre plusieurs processus environnementaux incluant le métabolisme des bactéries sulfato-réductrices ainsi que la spéciation des métaux i) en milieu anoxique (Henneke et al., 1997; O'Reilly et al., 2001), ii) dans les lacs volcaniques (Takano, 1987) et iii) dans les sources hydrothermales (Webster, 1987; Webster, 1989; Xu et al., 1998; Xu et al., 2000; Druschel et al., 2003). La détermination de la spéciation du soufre est aussi importante dans plusieurs situations industrielles, particulièrement dans les effluents d'usines de pâtes et papiers (Kuban et Karlberg, 2000), de sites miniers (Hitchen et Smith, 1976; Makhija et Hitchen, 1979; Vigneault et al., 2003; Vigneault et al., 2003) ou de l'industrie de la photo (Purcell et Peters, 1998). Les formes réduites de soufre qui entrent dans l'environnement à partir des processus énumérés plus tôt peuvent influencer la biodisponibilité des métaux par précipitation ou en agissant comme agent complexant (Makhija et Hitchen, 1979; Morel et Hering, 1993; Morel et al., 1998; Fortin et Campbell, 2001) certaines de ces formes sont toxiques à basse concentration (Bagarinao, 1992).

1.2.1 Cycle du soufre

Les formes de soufre dans les lacs peuvent provenir des dépôts atmosphériques humides ou secs, de l'altération de sulfates ou du minerai sulfuré (Wetzel, 2001). Les sources atmosphériques anthropiques de soufre en Amérique du Nord sont principalement la combustion de combustibles fossiles ainsi que l'affinage de minerais sulfureux (Nriagu, 1999). Dans les eaux en contact avec l'atmosphère, le sulfate est l'espèce prédominante de soufre présente.

Les sulfates sont une partie importante du cycle biogéochimique du soufre et sont grandement influencés par la présence de zones oxiques/anoxiques dans la colonne d'eau et dans les sédiments. Ces zones constituent le produit du réchauffement de l'eau à la surface combiné à l'action du vent, qui contribuent à créer une couche qu'on appelle l'épilimnion. L'hypolimnion, eau plus profonde et parfois anoxique, a une température de ~4 °C et est séparé de l'épilimnion par le métalimnion et la thermocline. C'est principalement dans l'hypolimnion que le sulfate est soumis à une réaction principale, une réduction biologiquement catalysée par des mécanismes assimilatoires ou dissimilatoires. Concernant la réduction dissimilatrice de sulfate, elle est produite principalement par les bactéries sulfato-réductrices des genres Desulfovibrio et Desulfomaculum à l'interface de la zone oxique/anoxique (Marschall et al., 1993; Van Gemerden, 1993). À ce moment, le sulfate, dont l'état d'oxydation est de +6, est converti en sulfure d'hydrogène (état d'oxydation de -2). Les bactéries sulfato-réductrices, en l'absence d'oxygène, utilisent les ions sulfate comme accepteurs d'électron ou comme agents oxydants pour le métabolisme respiratoire de la matière organique (Van Gemerden, 1993).

À l'inverse, les sulfures, étant des ions réactifs, peuvent s'oxyder rapidement autant chimiquement que biologiquement (Zopfi *et al.*, 2001) en piégeant l'oxygène dissous contenu dans la colonne d'eau pour être convertis en différents oxyanions de soufre : sulfite $SO_3^{2^-}$, thiosulfate $S_2O_3^{2^-}$, tetrathionate $S_4O_6^{2^-}$, sulfate $SO_4^{2^-}$ (Kondo *et al.*, 2000). Plus spécifiquement, le thiosulfate est utilisé comme un donneur ou un accepteur d'électrons durant les réactions réductrices ou oxydantes réalisées par une variété de bactéries. Cependant, la plupart des espèces chimiques intermédiaires de soufre énumérées ci-haut sont des formes métastables qui seront éventuellement oxydées sous forme de sulfate, l'espèce chimique la plus stable en milieux oxiques (Stumm et Morgan, 1996).

1.2.2 Présence du thiosulfate dans les rejets anthropiques

L'occurrence en milieu aquatique de composés de soufre réduit, tels que le thiosulfate, est rendue possible par des processus biologiques et géochimiques naturels (Jorgensen, 1990a; Jorgensen, 1990b; Sass *et al.*, 1992; Van Gemerden, 1993), qui sont décrits dans la section précédente, ainsi que par le déversement en milieu naturel de rejets anthropiques. En effet, l'industrie minière rejette des thiosels produits au cours de la flottation de minerai sulfureux (Vigneault *et al.*, 2003). Purcell et Peters (1998) rapportent que plus de 99 % des industries photographiques déchargent leurs eaux usées, qui contiennent des complexes d'argent-thiosulfate, dans les systèmes publics de traitement de l'eau. Par exemple, à l'étape du traitement d'images photographiques, l'argent est complexé avec le thiosulfate puis rejeté lors du développement. L'argent, dans ces effluents, peut être présent sous diverses formes, mais principalement sous celle de complexe d'argent-thiosulfate Ag(S₂O₃)₂³⁻ et Ag(S₂O₃)₃⁵⁻. Durant le traitement des eaux usées, ce thiosulfate d'argent est converti en sulfure d'argent, lequel précipite durant le procédé (Purcell et Peters, 1998) tandis que le thiosulfate est oxydé sous forme de sulfate.

1.2.3 Présence du thiosulfate dans les eaux naturelles

Précédemment, la description générale du cycle du soufre a permis de détailler les processus généraux de formation du thiosulfate et d'expliquer la présence de thiosulfate dans les eaux naturelles. Même si la présence de thiosulfate a été démontrée, les calculs thermodynamiques indiquent qu'aucun des sulfuroxyanions en milieu naturel ne devrait avoir une concentration plus élevée que 0,01 % de la concentration dissoute de soufre total. Par conséquent, si 10^{-2} M est considérée comme étant une limite supérieure raisonnable dans la plupart des sources hydrothermales et d'eau douce, aucun des sulfuroxyanions ne devrait avoir une concentration excédant l μ M (Druschel *et al.*, 2003). Dans le tableau 1.3, on retrouve un résumé des différentes études qui démontrent qu'il est souvent possible de rencontrer dans les eaux naturelles des concentrations de thiosulfate dépassant 1 μ M.

Site	Source	$[S_2O_3^2]$	Référence
d'echantillonnage		(µM)	
Formation Dogger,	Saumure	100-200	(Boulegue 1978)
France			
Wai-O-Tapu,	Hydrothermale	705-875	(Webster, 1987; Webster, 1989)
Nouvelle-Zélande			
Bulgarie	Hydrothermale	5-38	(Veldeman <i>et al.</i> , 1991)
Italie	Hydrothermale	0-36	(Pentecost, 1995)
Ojo Caliente,	Hydrothermale	45	(Xu et al., 1998; Xu et al., 2000)
Parc Yellowstone, E-U			
Lac Suigetsu, Japon	Eau douce	1-60	(Kondo <i>et al.</i> , 2000)
Fosse de Cariaco,	Marine	0-12	(Zhang et Millero, 1993)
Venezuela			
Fjord Mariager,	Marine	5,2	(Zopfi et al., 2001)
Danmark			
Lac Solar	Marine	170	Jørgensen et al., 1990a
Lac Pavin	Eau douce	18 900	(Olive et Boulegue, 2004)
Lac Mahoney	Lac salin	1-20	(Overmann <i>et al.</i> , 1996)
Fjord Framvaren	Marin	7-35	(Millero, 1991)

Tableau 13 ·	Concentrations a	de	thiosulf	ate	retrouvées	en r	milien	naturel
1401044 1.5.	Concentrations	uc	unosun	aic	10000000		mucu	maturer.

Au Canada, particulièrement au Québec, peu de travaux de recherche ont évalué la présence de thiosulfate en milieux naturels : seules quelques recherches menées par les Laboratoires des mines et des sciences minérales (CANMET, Ressources naturelles Canada) portent sur la présence de thiosulfate dans les eaux résiduaires minières. Quant à la présence de thiosulfate en eau douce, seul le lac St-Pierre a fait l'objet d'analyses. Une concentration significative de thiosulfate de l'ordre de 1 μ M y a été trouvée (communication personnelle, B. Vigneault, Ressources naturelles Canada).

1.2.4 Méthodes d'analyse du thiosulfate

Plusieurs techniques analytiques ont été développées au fil des ans afin de déterminer la quantité d'ions sulfureux (sulfure (S²⁻); polysulfures (S_x²⁻, x \ge 2); sulfite (SO₃²⁻); sulfate (SO₄²⁻); thiosulfate (S₂O₃²⁻); dithionate (S₂O₆²⁻); polythionate (S_xO₆²⁻. x≥3)) dans divers milieux. Parmi ces techniques, des méthodes d'analyse chimiques existent pour la plupart des espèces mentionnées ci-haut (O'Reilly et al., 2001). Le principal désavantage de ces méthodes réside dans le fait qu'elles prennent beaucoup de temps et généralement elles ne sont applicables que pour la détermination d'un seul ion à la fois. La spectrophotométrie visible - ultraviolet (UV-VIS) est également utilisée avec une limite de détection de 10⁻⁶ M; elle présente toutefois le même désavantage que les méthodes chimiques humides, soit de ne pouvoir analyser qu'un seul élément à la fois. Les techniques électrochimiques, telles que la polarographie et la voltamétrie, peuvent déterminer deux ou trois espèces simultanément mais ne permettent pas d'analyser un spectre d'ions sulfureux en même temps. Les méthodes de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), de spectrométrie infrarouges par réflectance totale (FTIR) ainsi que celle de la spectrométrie Raman peuvent être utilisées pour l'analyse simultanée de plusieurs ions sulfureux en solution (O'Reilly et al., 2001). Le désavantage de ces méthodes est leur limite de détection, qui se situe typiquement entre 10⁻⁴ et 10⁻² M. La méthode d'analyse par chromatographie ionique moderne est devenue la technique de séparation la plus utilisée puisqu'elle permet de déterminer plusieurs anions sulfureux lors d'une seule analyse tout en gardant une limité de détection entre 10^{-7} à 10^{-5} M (O'Reilly *et al.*, 2001).

1.2.5 Complexation thiosulfate-mercure

Sous des conditions environnementales oxiques typiques, la spéciation du mercure inorganique est majoritairement dominée par les réactions avec les chlorures (section 1.1.2). Le Hg(II) étant cinétiquement labile, sa distribution entre différents ligands peut donc être estimée par une modélisation numérique si des valeurs fiables des constantes de stabilité sont disponibles. Par ailleurs, d'autres ligands significatifs présents dans l'environnement peuvent également avoir une influence sur la spéciation du Hg(II) (Morel et Hering, 1993). Certaines valeurs de constantes de formation pour les ligands ont été répertoriées (Powell *et al.*, 2004) (Tableau 1.4).

Tableau 1.4 : Valeurs des constantes de formation recommandées pour les différents ligands

Réactions avec les chlorures	
$HgCl_{2(aq)}, Hg^{2+} + 2Cl \leftrightarrow HgCl_{2(aq)}$	$\log \beta = 14,00$
$\mathrm{Hg}(\mathrm{OH})\mathrm{Cl}_{(\mathrm{aq})},\mathrm{Hg}^{2^{+}}{}_{(\mathrm{aq})}+\mathrm{Cl}^{-}{}_{(\mathrm{aq})}+\mathrm{H_{2}O}\longleftrightarrow\mathrm{Hg}(\mathrm{OH})\mathrm{Cl}_{(\mathrm{aq})}+\mathrm{H}^{+}{}_{(\mathrm{aq})}$	$\log \beta = 4,27$
Réaction selon le pH	
$\mathrm{Hg}^{2+} + 2\mathrm{H}_{2}\mathrm{O} \leftrightarrow \mathrm{Hg}(\mathrm{OH})_{2(\mathrm{aq})} + 2\mathrm{H}^{+}$	$\log \beta = -5,98$
Réactions avec les carbonates	
$Hg(OH)_2 + CO_{2(g)} \leftrightarrow HgCO_{3(aq)} + H_2O$	$\log K = -0,70$
$Hg(OH)_2 + CO_{2(g)} \leftrightarrow HgHCO_3 + H_2O$	log K = 3,63
$Hg(OH)_2 + HCO_3 \leftrightarrow Hg(OH)CO_3 + H_2O$	log K = 0,98
Réactions avec les phosphates	
$\mathrm{Hg}^{2^+} + \mathrm{HPO_4}^{2^-} \leftrightarrow \mathrm{HgHPO}_{4(\mathrm{aq})}$	log K = 8,8
$\mathrm{Hg}^{2^+} + \mathrm{HPO_4}^{2^-} \leftrightarrow \mathrm{HgPO_4}^- + \mathrm{H^+}$	$\log K = 3,25$
Réaction avec les sulfates	
$\mathrm{Hg}^{2+} + \mathrm{SO_4}^{2-} \leftrightarrow \mathrm{HgSO}_{4(\mathrm{aq})}$	log K = -1,4

Contrairement à certains de ces ligands, le thiosulfate n'a pas besoin d'être présent en concentration élevée pour influencer significativement la spéciation du mercure. Par exemple, pour une concentration de 20 nM de mercure, il ne faudrait que 40 nM de thiosulfate pour complexer la presque totalité du mercure (Figure 1.2). Ainsi, lorsque les conditions naturelles le permettent ou que l'environnement aquatique est perturbé par des apports anthropiques de thiosulfate, ce ligand inorganique peut former une série de complexes stables avec le mercure (Hg(S₂O₃)₂²⁻ log K = 29.86; Hg(S₂O₃)₃⁴⁻ log K = 32.26; Hg(S₂O₃)₄⁶⁻ log K = 33.61; (Petit et Powell 2003)).



Figure 1.2 : Spéciation du mercure selon la concentration de thiosulfate calculée à l'aide du logiciel MINEQL+ 4.5 en utilisant une concentration totale de Hg de 20 nM à pH 7 et un milieu ouvert à l'atmosphère et en utilisant les concentrations des divers ions contenus dans le milieu d'exposition MHSM-1 (voir le tableau 2.2 pour la composition de ce milieu).

1.3 Interaction métaux-algues: Modèle de l'ion libre (MIL)

Déjà avant 1975, l'interaction entre les métaux et les différents types d'organismes a été le sujet de plusieurs travaux de recherche (Mount, 1966; Barber et Ryther, 1969; Whitton, 1971; Bryan, 1971; Lewis *et al.*, 1972; Lewis *et al.*, 1973). À ce moment, l'accent était dirigé vers des organismes ciblés ainsi que sur l'influence sur certaines variables biologiques (stade de vie, nutrition, âge, etc.) sur la toxicité des métaux. Peu d'études se sont intéressées au milieu d'exposition (spéciation du métal, pH, alcalinité, force ionique I, etc.).

Plusieurs de ces expériences furent réalisées en ajoutant un métal d'intérêt à un milieu standard d'exposition sans tenir compte de l'effet de ce milieu sur le métal étudié. L'arrivée de programmes informatiques conçus pour réaliser des calculs d'équilibre chimique complexes au début des années 1970 a changé cette tendance. En effet, l'accès à ces programmes a permis de calculer la spéciation du métal et de réaliser des expériences en milieu synthétique défini contenant seulement des ligands aux constantes de stabilité connues. De cette façon, l'accent était mis sur le milieu d'exposition pour déterminer la réponse biologique (par exemple : prise en charge, toxicité) d'un organisme exposé à un métal. Par la suite, un nombre important d'expériences ont été effectuées selon cette approche sur une variété d'organismes (par exemple : algues, bactéries, micro-invertébrés et poissons). Plusieurs observations issues de ces expériences soutiennent le principe que la réponse biologique d'un organisme exposé à un métal est habituellement fonction de la concentration de l'ion métallique libre (M^{Z^+} ou M^{Z^+} (H_2O_n ; aquo-ion) présent sous forme dissoute. Le modèle de l'ion libre (MIL) a été développé suite à ces expériences (Morel, 1983). Ce modèle regroupe toutes les observations qui indiquent que la prise en charge, la nutrition et la toxicité des métaux traces cationiques varient en fonction de la concentration de l'aquo-ion. Le MIL a fait l'objet d'analyses critiques par Campbell (1995), Hudson (1998) et Campbell et al. (2002). Comme mentionné à la section 1.3.1.1, il existe des exceptions au MIL. Le mercure est un métal qui est de plus en plus mentionné. Des résultats suggèrent que le mercure, contrairement aux autres métaux, puisse entrer chez les bactéries et chez les algues

via une diffusion passive à travers la membrane de complexes neutres lipophiles tels que $HgCl_2^0$ et HgS^0 (Mason *et al.*, 1996; Benoit *et al.*, 1999; Benoit *et al.*, 2001a). La prémisse de base de cette hypothèse est que la prise en charge du Hg(II) est reliée à l'abondance d'espèces lipophiles neutres dans la solution d'exposition (Mason *et al.*, 1996).

D'autres résultats indiquent plutôt l'existence d'un mécanisme physiologiquement régulé de transport facilité du mercure chez *Vibrio anguillarum* et *Escherichia coli* (Golding *et al.*, 2002). Ces chercheurs ont étudié l'influence de la spéciation du mercure sur sa prise en charge par ces deux bactéries. Sommairement, s'il y avait eu diffusion passive, la prise en charge du mercure aurait dû être plus élevée dans la solution où l'espèce HgCl₂ prévaut que dans la solution où c'est l'espèce Hg(OH)₂ qui domine, ce qui n'était pas le cas pour ces deux espèces de bactérie. Golding *et al.* (2002) ont conclu que l'assimilation du Hg(II) par les bactéries se produisait par transport facilité (Figure 1.3, voie i ou ii).

Toutefois, pour la grande majorité des cas considérés, l'idée principale du MIL selon laquelle la concentration de l'ion libre métallique est le meilleur prédicteur de la réponse biologique à une exposition aux métaux demeure valable. Le MIL stipule également qu'afin d'observer une réponse biologique d'un organisme cible face à un métal, le métal doit interagir ou traverser une membrane cellulaire. Cette interaction du métal avec la surface cellulaire, qui inclut autant la forme libre en solution (M^{z+}) que les formes complexées (ML), peut être représentée par la formation du complexe M-X-cellule (M = métal; X-cellule = ligand cellulaire). Les réactions suivantes illustrent un cas simple où l'ion métallique libre entre en contact avec une surface cellulaire :
Équilibre en solution

$$M^{z^+} + L \xleftarrow{K_l} ML \tag{1.1}$$

$$\mathbf{K}_{I} = \frac{\left[\begin{array}{c} \mathbf{ML} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{c} \mathbf{M}^{z^{+}} \end{array} \right] \bullet \left[\begin{array}{c} \mathbf{L} \end{array} \right]}$$
(1.2)

Réaction de surface de M^{z+}

$$M^{z+} + X$$
-cellule $\longleftrightarrow^{\kappa_2} M$ -X-cellule (1.3)

$$\{ M-X-cellule \} = K_2 \{ X-cellule \} \bullet [M^{z+}]$$
 (1.4)

où K_1 et K_2 sont des constantes conditionnelles d'équilibre et L un ligand en solution dont la charge négative n'est pas indiquée pour simplifier les équations. Il est à noter que respectivement { } et [] font référence aux concentrations de surface et d'espèces dissoutes.

Selon Morel et Hering (1993), la réponse biologique est implicitement proportionnelle à la concentration du complexe de surface, c'est-à-dire selon le degré de saturation des sites "X-cellule. L'hypothèse de base étant que la concentration des sites "X-cellule demeure constante (les métaux dans l'environnement étant normalement présents en faibles concentrations), l'équation (1.4) indique donc que la réponse biologique peut varier directement en fonction de la concentration de M^{z+} en solution. De façon analogue, si c'est le complexe ML qui réagit avec la paroi cellulaire, la réponse biologique varie de nouveau en fonction de la concentration de $[M^{z+}]$, à condition que la réaction avec le ligand cellulaire s'effectue par échange de ligands, et alors l'équation (1.5) s'applique. En réarrangeant l'équation (1.2), on obtient l'équation (1.6). La substitution de cette dernière à l'intérieur de l'équation (1.7) mène à l'équation (1.8). Ces réarrangements indiquent que la concentration du complexe M-X-cellule demeure dépendante de la concentration du métal libre en solution, tel que démontré précédemment dans l'équation (1.4).

Réaction de surface de ML

$$ML + X-cellule \longleftrightarrow M-X-cellule + L$$

$$(1.5)$$

$$\frac{\left[ML \right]}{\left[L \right]} = K_{1} \bullet \left[M^{z+} \right]$$

$$(1.6)$$

$$\left\{ \text{ M-X-cellule} \right\} = K_3 \frac{\left\{ \text{ X-cellule} \right\} \bullet \left[\text{ ML} \right]}{\left[\text{ L} \right]}$$
(1.7)

$$\left\{ M-X-cellule \right\} = K_3 \bullet K_1 \bullet \left\{ X-cellule \right\} \bullet \left[M^{z^+} \right]$$
(1.8)

Considérons maintenant la possibilité que le ligand ne soit pas échangé, contrairement au cas illustré par l'équation (1.5). Ce type de réaction donnerait lieu à la formation d'un complexe ternaire L-M-X-cellule, tel qu'illustré dans l'équation (1.9). Dans cette éventualité, la concentration de métal à la surface deviendrait fonction du complexe ML plutôt que fonction de la concentration du métal libre en solution M^{z+} .

$$ML + X-cellule \longleftrightarrow (1.9)$$

$$\left\{ L-M-X-cellule \right\} = K_4 \bullet \left\{ X-cellule \right\} \bullet \left[ML \right]$$
(1.10)

1.3.1 Hypothèses du MIL

Les fondements à la base qui sous-tendent le MIL (Campbell, 1995) sont présentés ici (Campbell *et al.*, 2002) :

- 1. La membrane plasmique constitue le site primaire d'interaction entre le métal présent en solution et les organismes vivants.
- Cette interaction du métal avec la membrane mène à la formation d'un complexe de surface M-X-cellule décrit dans l'équation (3). La création de complexes de surface dépend également de la présence d'autres cations en solution, notamment les ions H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, qui peuvent concourir avec le

métal d'intérêt en se liant aux sites de complexation de surface sous forme H-X-cellule, Ca-X-cellule et Mg-X-cellule. De telles réactions contribueraient à réduire le nombre de sites de liaisons libres ainsi qu'à diminuer la réponse biologique de l'organisme cible.

- 3. Le transport du métal en solution vers la membrane cellulaire (Figure 1.3) ainsi que sa complexation de surface se produisent rapidement, menant à un pseudo-équilibre entre le métal en solution et la membrane cellulaire. La prise en charge du métal est l'étape limitante, étant plus lente que la phase transport en solution et la complexation de surface.
- 4. La réponse biologique (prise en charge, nutrition ou toxicité) est uniquement dépendante de la concentration du complexe de surface {M-X-cellule}.
- Dans la gamme de concentrations d'intérêt toxicologique du métal, la concentration de sites de liaisons libres {⁻X-cellule} doit demeurer à-peu-près constante et la variation du complexe M-X-cellule suit celle de [M^{z+}] (équations 1.4 et 1.8).
- Lors de l'exposition au métal d'intérêt, la nature de la surface biologique doit demeurer constante.

Toutes ces hypothèses de bases ont été conservées dans la manifestation la plus récente du MIL (Santore *et al.*, 2001; Di Toro *et al.*, 2001) appelée le « Modèle du Ligand Biotique » («Biotic Ligand Model» ou BLM). Dans le BLM, l'espèce {'X-cellule} a été renommée {'Ligand biotique}; autrement les deux modèles reposent sur les mêmes bases.



Figure 1.3 Représentation conceptuelle du transport transmembranaire de métaux non essentiels comme le Hg. La voie I représente un système de transport de métaux essentiels comme, par exemple, Ca, le Cu et le Zn. La voie II représente un système de transport d'acides aminés ou d'anions (Y = Cl-, $CO_3^{2^-}$, $SO_4^{2^-}$ ou $S_2O_3^{2^-}$). La voie III représente la diffusion passive de complexes lipophiles (modifiée de Fortin, 2000).

1.3.1.1 Exceptions au MIL

Les exemples où la biodisponibilité d'un métal ne suit pas l'activité de l'ion métallique libre sont plutôt rares. Ces quelques exceptions, provoquées par une nonconformité à l'une des différentes hypothèses du MIL, sont généralement regroupées en trois classes:

- Dans la littérature on retrouve quelques exemples où la biodisponibilité augmente après une complexation, cette disponibilité accrue étant attribuable à la formation de complexes neutres lipophiles, ML⁰ (Phinney et Bruland, 1994; Phinney et Bruland, 1997; Croot *et al.*, 1999). On pourrait s'attendre que ces complexes traversent la membrane biologique directement (Figure 1.3, voie III) sans devoir emprunter les systèmes de transport membranaire des métaux essentiels comme le Cu ou le Zn.
- Les exceptions de la deuxième classe impliquent la formation de complexes hydrophiles avec des ligands assimilables de faible poids moléculaire (p. ex., les acides aminés, l'acide citrique et le thiosulfate) pour lesquels il existe un transporteur au niveau de la membrane cellulaire (Campbell, 1995; Errécalde *et al.*, 1998; Errécalde et Campbell, 2000; Fortin et Campbell, 2001; Hiriart-Baer *et al.*, 2005). On suppose à ce moment que le transporteur responsable de l'assimilation du ligand L est peu sélectif et qu'il peut s'accommoder non seulement du ligand L, mais également du complexe ML. Ce transport accidentel offre donc au métal une voie additionnelle pour atteindre l'intérieur de la cellule (Figure 1.3, voie II).
- Le dernier type d'exception implique des métaux ayant une cinétique de complexation-dissociation lente (Hudson, 1998) et/ou un transport à travers la membrane biologique plus lent que la prise en charge (Hudson et Morel, 1990).

1.3.2 Transport transmembranaire

1.3.2.1 Métaux essentiels et toxiques

Dans la section précédente, il a été mentionné qu'il devait, préalablement à son internalisation, y avoir un lien entre le métal et la membrane sous forme d'un complexe de surface. Les macromolécules qui forment la membrane renferment une variété de groupements fonctionnels qui permettent ce lien. Dans le cas d'une algue comme *Chlamydomonas reinhardtii*, le lien consiste en des groupements carboxyliques, amino, thio, hydroxo et hydroxy-carboxyliques (Xue *et al.*, 1988).

Même si les divers types de membranes cellulaires ont des groupements et des caractéristiques distincts, ce sont plutôt les similarités entre les membranes qui sont d'intérêt. Trois mécanismes généraux de transport transmembranaire ont été identifiés: i) transport facilité du cation qui implique un transporteur transmembranaire protéique ou un canal transmembranaire (Stein, 1990; Campbell, 1995) ii) transport facilité d'un complexe métallique anionique, qui implique un transporteur d'anions peu sélectif (Campbell, 1995; Errécalde *et al.*, 1998; Errécalde et Campbell, 2000; Fortin et Campbell, 2001); iii) transport passif, par simple diffusion d'un complexe métallique neutre et lipophile (Bienvenue *et al.*, 1984; Phinney et Bruland, 1994; Mason *et al.*, 1996).

Normalement, les espèces métalliques les plus communes dans les eaux naturelles sont de nature hydrophile, ce qui fait en sorte que la plupart des métaux cationiques et leurs complexes ne peuvent traverser la membrane par diffusion simple, n'impliquant pas de transporteur; au contraire, et c'est la voie (*i*) qui prédomine (Campbell, 1995).

Dans le cas du transport général par la voie (*i*), on peut identifier quatre principales étapes menant à la prise en charge du métal (Figure 1.4) (Campbell *et al.*, 2002; Pelletier *et al.*, 2004) :

- Advection ou diffusion du métal (complexé ou non) de la solution vers la membrane biologique;
- Diffusion du métal au travers de la couche protectrice externe;
- Complexation du métal à des sites physiologiques inertes dans la couche protectrice (mucus pour un poisson et paroi cellulaire pour une algue);
- Prise en charge du métal (étape lente).

Dans ce cas du transport général par la voie (i), c'est le MIL qui s'applique et la réponse biologique varie en fonction de la concentration de l'ion métallique libre en solution.



Figure 1.4: Représentation conceptuelle des interactions métaux-organismes. Mz+= ion libre ; ML = métal complexé ; Lz-= ligand (acide aminé, citrate, $S_2O_3^{2-}$, CO_3^{2-} , $C\Gamma$) ; M-X = métal complexé à la surface (modifiée de Campbell, 1995).

1.3.2.2 Sulfate

En principe, l'assimilation de complexes hydrophiles (métal-ligand) peut se produire en présence de ligands inorganiques tels que les phosphate et sulfate. Pour la plupart des métaux, la formation d'aquo-complexes avec les ions phosphate ou sulfate est thermodynamiquement improbable. Cependant, suite aux recherches de Fortin et Campbell (2001) et à l'identification d'un mode de transport facilité d'un complexe métallique anionique (section 1.3.2.1), il importe d'aborder la notion de transport transmembranaire des métaux via le transporteur de sulfate. Le fait que les algues ont normalement une concentration en sulfate plus élevée que le milieu ambiant suppose un haut taux d'imperméabilité de la membrane cellulaire ainsi que l'existence de transporteurs (perméases) qui peut pomper les ions à travers la membrane contre un gradient de concentration (Epstein, 1976). Ce transporteur a été identifié chez *C. reinhardtii* (Yildiz *et al.*, 1994; Perez-Castineira *et al.*. 1998; Chen et Melis, 2004) ainsi que chez *Chlorella* (Vallée et Jeanjean, 1968; Biedlingmaier et Schmidt, 1988).

Il existe également plusieurs résultats à travers la littérature qui indiquent que le sulfate et thiosulfate peuvent partager le même système de transport membranaire chez les bactéries (Dreyfuss, 1964; Stahlmann *et al.*, 1991; Sirko *et al.*, 1995) et les algues (Hodson *et al.*, 1968; Perez-Castineira *et al.*, 1998). Durant les expériences de prise en charge de sulfate, un effet de compétition entre les deux ions se produit chez les algues (Vallée et Jeanjean, 1968; Biedlingmaier et Schmidt, 1988; Perez-Castineira *et al.*, 1998), ce qui cause un effet d'inhibition sur la prise en charge du sulfate. D'ailleurs, suite à une augmentation de l'ordre de six fois la prise en charge de l'argent en présence de thiosulfate (et en absence de sulfate), Fortin et Campbell (2001) ont conclu que le transporteur sulfate/thiosulfate était impliqué dans le transport membranaire de l'argent en présence de thiosulfate.

1.3.2.3 Mercure

Des résultats suggèrent que le mercure, contrairement aux autres métaux, puisse entrer chez les bactéries et chez les algues via une diffusion passive à travers la membrane de complexes neutres lipophiles tels que $HgCl_2^0$ et HgS^0 (Mason *et al.*, 1996; Benoit *et al.*, 1999; Benoit *et al.*, 2001a). La prémisse de base de cette hypothèse est que la prise en charge du Hg (II) est reliée à l'abondance d'espèces lipophiles neutres dans la solution d'exposition (Mason *et al.*, 1996).

D'autres résultats indiquent plutôt l'existence d'un mécanisme physiologiquement régulé de transport facilité du mercure chez *Vibrio anguillarum* et *Escherichia coli* (Golding *et al.*, 2002). Ces chercheurs ont étudié l'influence de la spéciation du mercure sur sa prise en charge par ces deux bactéries. Sommairement, s'il y avait eu diffusion passive, la prise en charge du mercure devrait être plus élevée dans la solution où l'espèce HgCl₂ prévaut que dans la solution où c'est l'espèce Hg(OH)₂ qui domine, ce qui n'était pas le cas pour ces deux espèces de bactérie. Golding *et al.* (2002) ont conclu que l'assimilation du Hg(II) par les bactéries se produisait par transport facilité (Figure 1.3, voie i ou ii).

Les travaux de Fortin et Campbell (2001) vont dans le même sens que ceux de Golding *et al.* (2002) en supposant que *C. reinhardtii* puisse prendre en charge le complexe anionique $AgS_2O_3^-$ via un transporteur anionique par mimétisme moléculaire. L'idée derrière ce concept est qu'un complexe formé entre le métal cationique et le ligand cellulaire mime structuralement le substrat endogène au point où le processus métabolique de la cellule fait erreur et confond le complexe anionique avec l'élément essentiel. Ce processus a été exploré dans le domaine de la toxicologie des métaux et revu à la fin du siècle passé (Clarkson, 1997). Dans les premières études, les exemples de mimétisme moléculaire étaient restreints et regroupaient les complexes métal-thiol et histidine-zinc. Plus récemment, des chercheurs (Bridges et Zalups, 2005) ont passé en revue le mode de transport par mimétisme ionique/moléculaire de divers métaux toxiques (Hg, Cd, Pb, As, Sb) chez différents organes et tissus.

1.4 Objectifs

Partant de la prémisse que le thiosulfate peut, via un transporteur d'anions peu sélectif, faciliter l'entrée d'un complexe métallique anionique chez *Chlamydomonas reinhardtii*, ce projet de recherche a comme objectif principal de déterminer si la prise en charge du mercure en présence d'un ligand inorganique tel que le thiosulfate suit les prédictions du modèle de l'ion libre.

Il est important de reproduire les expériences de prise en charge avec des concentrations de thiosulfate basées sur celles présentes dans les eaux naturelles afin d'avoir des conditions environnementales représentatives. Sachant qu'il existe peu de données publiées sur la quantité de thiosulfate présente dans les eaux de lacs, nous avons donc voulu déterminer, comme objectif complémentaire, si le thiosulfate se trouvait à l'interface oxique/anoxique et déterminer s'il était généré en quantité appréciable en milieu naturel.

2. Thiosulfate en milieu naturel

Plusieurs considérations justifient la mesure de la concentration de thiosulfate en milieu naturel. Par exemple, la spéciation du mercure en présence de thiosulfate est influencée par celui-ci; il est alors préférable de reproduire au mieux les conditions environnementales dans lesquelles les algues sont susceptibles de se trouver. Il est cependant difficile d'estimer les concentrations ambiantes probables puisque peu de données sur la concentration de thiosulfate en eau douce sont disponibles (Kondo *et al.*, 2000; Olive et Boulègue, 2004). Nous avons donc décidé de doser le thiosulfate dans quelques lacs du Québec. Pour atteindre cet objectif, il fallait trouver et adapter une méthode pour mesurer de faibles quantités de thiosulfate.

2.1 Méthodologie

2.1.1 Description des lacs d'intérêt

Quatre lacs ont été sélectionnés (Figure 2.1) afin de déterminer la présence de thiosulfate dans les eaux naturelles. Ces lacs ont été choisis selon trois critères afin de maximiser le potentiel d'y trouver une concentration mesurable de thiosulfate, soit : (i) une profondeur suffisante pour permettre une stratification; (ii) l'accessibilité au lac; (iii) la présence d'un hypolimnion anoxique. Également, lorsque disponible, nous avons tenu compte des données sur la présence de sulfates et de sulfures ainsi que la présence de bactéries sulfato-réductrices pour la sélection des lacs.



Figure 2.1: Localisation des quatre lacs échantillonnés au Québec: 1) Lac Holland2) Lac Pink 3) Lac Bleu 4) Lac Bédard (Tirée de Google Earth)

Le lac Bleu est situé dans la région de Québec, dans le comté de Portneuf, à environ 75 km de la ville de Québec et à une altitude de 265 m. Les coordonnées géographiques sont: 46° 55' 55'' N et 71° 59' 15'' W. Il est habité majoritairement sur sa portion sud et il est alimenté par deux tributaires, soit un à la partie nord-ouest, et un à la partie sud-ouest (Figure 2.2). Il possède une fosse de 48 m et il est considéré comme méromictique (Dupont, 1986). Un lac méromictique est un lac où les eaux de surface et de profondeur se mélangent moins d'une fois par an, et pour certains moins d'une fois par décennie ou par siècle (Wetzel, 2001). Ce phénomène se produit généralement pour les lacs profonds, peu étendus et abrités du vent comme le lac Bleu.

Ce lac a la particularité d'avoir de très faibles concentrations en oxygène (inférieures à 1 mg/L) à partir d'une profondeur de 28 m, ce qui empêche l'oxydation et la décomposition des matières organiques ainsi que le développement d'organismes vivants autres que des microorganismes anaérobies. Cette caractéristique en faisait le lac idéal pour échantillonner dès le mois de mai et valider les différentes méthodes de prises d'échantillons, les protocoles d'analyses ainsi que la méthode de préconcentration des échantillons d'eau.



Figure 2.2: Lac Bleu, région de Portneuf, Québec. Carte bathymétrique. Tirée (Dupont, 1986)). A: Station d'échantillonnage

Le lac Bédard est situé dans la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean à l'intérieur de la Forêt Montmorency dans le parc des Laurentides, à environ 80 km au nord de la ville de Québec et à une altitude de 755 m. Les coordonnées géographiques sont: 47°16'22[°]N et 71°07'30[°]W. Le territoire occupé par la forêt renferme deux lacs naturels et seul le lac Bédard présente une profondeur suffisante pour permettre une stratification thermique ainsi qu'une anoxie en profondeur. Le lac Bédard est d'origine glaciaire et, comme la carte bathymétrique l'indique (Figure 2.3), il a la forme d'une petite cuvette grossièrement elliptique avec une profondeur maximale de 10 m. Le principal tributaire, un ruisseau qui draine les eaux de ruissellement des collines avoisinantes et dont le débit semble assez faible, est situé à l'extrémité nordest du lac. Le débit entraîne un renouvellement très lent des eaux. Un autre élément qui a favorisé le choix du lac Bédard est la disponibilité de plusieurs données physico-chimiques, puisque ce lac est situé à l'intérieur d'une forêt d'études universitaires.



Figure 2.3: Lac Bédard, forêt Montmorency, Québec. Carte bathymétrique. A: Station d'échantillonnage

Le lac Pink est situé dans le parc de la Gatineau, tout juste au nord d'Ottawa à une altitude de 162 m. Ses coordonnées géographiques sont : 45°28'7"N et 75°48'36"W. Ce lac est considéré, non sans controverse, comme méromictique de par sa profondeur, sa petite surface et le fait qu'il soit encaissé; de cette façon, les eaux du lac ne se mélangent que difficilement (Dickman, 1975; Jones *et al.*, 1984). Le lac a une profondeur maximale de 20 m. Un ruisseau vient du nord et se déverse dans le lac, qui se déverse à son tour à l'est dans la rivière Gatineau. Le lac de couleur verte est en danger d'eutrophisation à cause de l'activité humaine dans son bassin versant (Dickman et Dorais, 1977). La couleur serait due à une prolifération d'algues ainsi qu'à l'érosion des sols contenant du phosphore (Dickman, 1973; Dickman et Dorais, 1977; Jones *et al.*, 1984; Jones *et al.*, 1984). Le lac Pink a été sélectionné pour son caractère méromictique, la quantité abondante d'algues, de bactéries et la présence d'une couche anoxique.



Figure 2.4: Lac Pink, Parc de la Gatineau, Québec. Carte bathymétrique. A: Station d'échantillonnage

Le lac Holland est situé près de la ville de Murdochville en Gaspésie, à une altitude de 470 m. Ses coordonnées géographiques sont 48°57'07 N et 65°22'15 W. Peu d'informations étaient disponibles sur ce lac, autres que celles transmises par un autre groupe de recherche de l'INRS-ETE et qui font état de la présence d'une couche importante de bactéries sous la thermocline qui peuvent générer du thiosulfate. Sur place on a effectué quelques transects à l'aide d'un sonar et enregistré des données de positionnement qui permettent de fournir une approximation de la bathymétrie de ce lac (Figure 2.5). Suite aux mesures effectuées à l'aide d'une sonde multiparamètre, la profondeur maximale est de 9 m et l'anoxie débute autour de 6 m.



Figure 2.5: Lac Holland, Gaspésie, Québec. Carte bathymétrique produite à l'aide d'un logiciel de cartographie. A: Station d'échantillonnage

Nom	Altitude	Superficie	Périmètre	Volume	Profondeur	Superficie
du	du lac	du lac		total	moyenne/maximale	du bassin
lac	(m)	(km^2)	(km)	(10^3 m^3)	(m)	versant
						(km^2)
Bleu	228	0,3	2,5	5 165	17,1/48	7,15
Pink	162	0,12	N.D.	1 455	13,3/19,8	0,95
Holland	470	N.D.	N.D.	N.D.	4/9	N.D.
Bédard	678	0,045	1,6	187	4,2/10	0,27

Tableau 2.1: Caractéristiques morphométriques des lacs échantillonnés

N.D. = Donnée non disponible

2.1.2 Équipements, produits et réactifs

Tous les produits chimiques qui ont été utilisés étaient de grade analytique ou ultrapur pour la préparation des réactifs (dans le cas d'analyse des sulfures), la précipitation des sulfures contenus dans l'eau lors d'analyse de thiosulfate, la détermination du pourcentage d'oxygène (méthode Winkler) et la préparation des milieux de culture, de rinçage et d'exposition. De l'eau ultrapure (18 M Ω •cm) a été utilisée pour la préparation de toutes les solutions utilisées lors des campagnes de terrain. Afin de prévenir la contamination, tous les contenants (téflon, polycarbonate, HDPE), les unités de filtration, les embouts de pipettes et le matériel qui ont été employés lors de la préconcentration des échantillons d'eau ont été trempés dans l'acide nitrique (10 %) pendant une période de 24 h. Par la suite, le matériel a été rincé vigoureusement sept fois avec de l'eau ultrapure et séché sous une hotte à flux laminaire.

2.1.3 Prélèvement d'échantillons dans la colonne d'eau

Tous les lacs ont été échantillonnés au début de l'automne 2006, période de l'année où la stratification des lacs est assurément présente, ce qui favorise la présence d'une interface oxique/anoxique propice à la formation de thiosulfate. De plus, les échantillons ont été collectés à partir d'une station localisée au point le plus profond de chaque lac. Ce point a été déterminé à l'aide des cartes bathymétriques des différents lacs. À l'arrivée aux stations d'échantillonnage, une caractérisation globale de la colonne d'eau a été effectuée à l'aide d'une sonde multiparamètre YSI 650 MDS (pH, température, oxygène dissous, conductivité, profondeur). Par la suite, une pompe péristaltique de terrain (modèle 7570 Masterflex) a été utilisée afin d'obtenir une bonne résolution verticale d'échantillonnage dans le but de prélever simultanément à chaque mètre plusieurs échantillons d'eau servant à l'analyse de sulfate, de sulfure et de thiosulfate. Cette pompe était reliée à un tube de plastique tygon marqué à chaque mètre (pouvant atteindre 35 m de long avec un diamètre interne de 0,95 cm); un poids de 1 kg à son embout facilitait le maintien du tuyau à la verticale. L'échantillonnage a toujours été effectué du point le plus profond du lac vers la surface (pour éviter de perturber la prochaine zone de prélèvement). Le contenu du tube a été purgé deux fois pour chaque profondeur échantillonnée afin de ne pas le contaminer avec de l'eau pompée un mètre plus bas.

Pour la prise d'échantillons servant à l'analyse de sulfate, l'eau était pompée à la surface à l'aide du système de pompage décrit précédemment puis passée à travers une seringue de 5 mL avec un filtre de 0,45 μ m à son embout afin d'enlever la plupart des microorganismes, minimiser leur action et assurer une certaine stérilité à l'échantillon. L'eau qui servait aux analyses de sulfure a été recueillie à chaque mètre du point le plus profond du lac jusqu'à quelques mètres au-dessus de l'interface oxique/anoxique. L'eau pompée a été transférée dans des contenants HDPE ambrés de 60 mL (méthode détaillée dans la section 2.1.5).

Relativement aux échantillons destinés à l'analyse de thiosulfate, il était important d'abord d'identifier la zone où l'eau a été échantillonnée. L'échantillonnage a débuté à une profondeur où la concentration d'oxygène dissous atteignait une valeur avoisinant 2 mg/L et se terminait lorsque cette concentration atteignait 0,9 mg/L. La valeur plancher de 0,9 mg/L indiquée par la sonde signifie qu'il n'y a plus d'oxygène dissous présent dans l'eau. Cette affirmation a été confirmée en soumettant les échantillons à une méthode précise de titrage (méthode de Winkler) qui a confirmé que la valeur de 0,9 mg/L correspondait bien en réalité à ~0 mg/L.

Suite à la détermination de la portion verticale de la colonne d'eau à échantillonner, l'eau pour l'analyse de thiosulfate a été pompée dans une bouteille de 1 L Nalgène HDPE claire. Elle a été remplie et vidée de son volume deux fois avant d'être remplie à nouveau au maximum de sa capacité obtenant ainsi l'échantillon qui a servi à l'analyse finale. De cette façon, cette technique permet de minimiser l'oxydation possible due à un contact avec l'air. Une quantité de 10 mL de ZnCl₂ (1 M) a été ajoutée aux échantillons avant leur entreposage dans la glace. Ce processus permet de précipiter sous forme de ZnS le H₂S présent à certaines profondeurs et, de ce fait, éviter une surestimation de la concentration de thiosulfate par l'oxydation de sulfures pendant la période postprélèvement (Druschel *et al.*, 2003).

2.1.4 Préservation des échantillons

Tel que mentionné à la section 1.2.3, les concentrations de thiosulfate retrouvées dans les divers milieux (particulièrement dans les eaux naturelles) sont faibles. De plus, les thiosels sont instables et facilement oxydables sous forme de sulfate en présence de bactéries (Wasserlauf, 1982; Jorgensen, 1990b; Vigneault *et al.*, 2003). Il devenait impératif de minimiser les facteurs qui auraient pu modifier la forme chimique sous laquelle le soufre se trouve, dans le cas présent, le thiosulfate.

La séparation d'échantillons de l'eau du milieu d'origine est l'un des facteurs qui peut influencer la forme chimique du thiosulfate : le temps écoulé entre le moment de la prise d'échantillons et son passage à travers le chromatographe ionique peut occasionner l'oxydation de l'échantillon et l'exposer à des conditions différentes de celles du milieu d'origine. À de faibles concentrations, ceci peut faire en sorte qu'on ne détecte pas la présence de thiosulfate alors qu'en réalité il était bien présent dans le milieu échantillonné. Il n'existe pas de moyens bien définis de préserver les échantillons qui contiennent des espèces réduites de soufre. La littérature mentionne qu'il est possible de minimiser l'oxydation du thiosulfate, mais ces méthodes ont été testées sur des échantillons à très grandes concentrations de thiosulfate (~5 mM) (Wasserlauf, 1982; Webster, 1989; Druschel *et al.*, 2003; Vigneault *et al.*, 2003). Ces résultats ne peuvent être utilisés dans la présente étude du fait que les conditions

d'échantillonnage n'étaient pas identiques et que la gamme de concentrations était beaucoup plus large.

À faibles concentrations, la première étape qui a permis de minimiser l'effet d'oxydation microbiologique a été la filtration sur un filtre d'une porosité de 0,45 μ m immédiatement après la prise d'échantillons (~30 min). Dans le cas de l'eau de lac chargée en matière en suspension, une filtration en deux étapes (initialement sous un filtre en fibre de verre de 1 μ m pour terminer avec un filtre 0,45 μ m en acétate de cellulose) a été préconisée afin de réduire le temps de filtration (~30 min pour huit échantillons). Les échantillons filtrés étaient ensuite mis dans une glacière remplie de glace à une température avoisinant 4 °C avant d'être transférés dans les réservoirs des colonnes de préconcentration (section 2.1.7). Le temps total entre la prise d'échantillons sur le lac jusqu'à l'analyse avec le chromatographe ionique (temps de transport inclus) était généralement de 12 h.

2.1.5 Analyse de sulfure d'hydrogène

Le sulfure d'hydrogène fut analysé en utilisant une méthode modifiée à partir de celle de Cline. Sommairement, cette méthode consiste à faire réagir le N,N'-diméthyl-pphénylènediamine avec le sulfure d'hydrogène en donnant la mercapto-3- diméthyl-pphénylène-diamine. Cette dernière, par combinaison avec une nouvelle molécule de N,N'-diméthyl-p-phénylènediamine, donne le leucodérivé du bleu de méthylène. Par addition de fer (III), celui-ci est ensuite oxydé en bleu de méthylène. Ainsi, l'intensité de la coloration bleue est proportionnelle à la concentration de sulfure présente dans les échantillons, puisque les réactifs sont en excès.

Les principales modifications apportées à la méthode de Cline impliquent des concentrations de réactifs et un rapport (quantité de réactifs/quantité d'échantillons d'eau) différents de ceux de la méthode d'analyse initiale. En effet, le réactif "A" consiste à une quantité de 0,05 g de N,N'-diméthyl-p-phénylènediamine sulfate dans 50 mL de HCl 50 % tandis que pour le réactif "B" il faut dissoudre 0,075 g de FeCl₃•6H₂O dans 50 mL HCl 50 %. Concernant le rapport de réactifs/quantité d'échantillons, 2,38 mL de chaque réactif a été ajouté à 59,5 mL d'échantillon d'eau.

Afin d'obtenir la concentration de sulfure à différentes profondeurs, il suffit de reporter les valeurs d'absorbance (mesurées à la longueur d'onde de 670 nm) obtenues avec le spectrophotomètre visible sur une courbe de calibration préalablement établie selon les concentrations rencontrées. D'ailleurs, lors de la campagne d'échantillonnage, le matin, il fallait préparer les étalons et les réfrigérer et ainsi faire en sorte qu'ils soient soumis aux mêmes conditions que les échantillons de lacs pour ne pas fausser les résultats. L'eau de lac n'étant pas filtrée pour ce genre d'analyse, des échantillons sans sulfures furent mesurés à titre de témoin négatif afin de pouvoir soustraire les valeurs obtenues et éviter une interférence positive causée par la matière humique, ce qui aurait causé une surestimation de la concentration de sulfures présents.

2.1.6 Analyse de sulfate

Les concentrations en ions sulfate des différents échantillons provenant des quatre lacs échantillonnés ont été déterminées par chromatographie ionique (Dionex DX 500). En effet, suite à un entreposage, à une température avoisinant 4 °C, les échantillons ont été analysés directement, sans prétraitement à travers la colonne d'échange ionique, dans un délai de < 24 h suivant l'échantillonnage. Par contre, les échantillons prélevés dans la zone de deux mètres, soit ceux où il est possible de trouver du thiosulfate, ont été passés à travers un processus de préconcentration à travers une colonne contenant une résine échangeuse d'anions retenant préférentiellement les ions SO₄²⁻ et S₂O₃²⁻ (section 2.1.7).

2.1.7 Dosage de thiosulfate

Préalablement à l'utilisation du chromatographe ionique, il est essentiel d'effectuer une préconcentration des échantillons d'eau recueillis afin de pouvoir analyser de faibles concentrations de thiosulfate potentiellement présentes dans les lacs du Québec. Pour ce faire, l'approche de (Druschel *et al.*, 2003) a été utilisée. Le choix de la résine est le premier élément à considérer dans la poursuite d'un objectif comme celui de séquestrer le thiosulfate des eaux lacustres pour ensuite obtenir un éluat à analyser par chromatographie ionique. La sélectivité d'une résine est le facteur clé qui détermine si l'anion voulu sera retenu parmi les autres présents en solution et est

contrôlée par le type de groupe fonctionnel présent sur la résine. Celle utilisée dans le cas présent est la résine échangeuse d'anions AG1-X8 de la compagnie Bio-Rad. Elle consiste en un copolymère de styrène/divinylbenzène avec un groupe fonctionnel d'ammonium quaternaire (R-CH₂N⁺(CH₃)₃) saturé avec un contre-ion, Cl⁻ (Druschel *et al.*, 2003). Le type de groupement fonctionnel de la résine détermine quelle sera la sélectivité du contre-ion et des différents ions présents dans la solution à analyser.

L'échange ionique se produit aux groupements fonctionnels de la résine s'ils sont exposés à une solution contenant l'anion pour lequel le groupement fonctionnel a une sélectivité plus grande que pour le contre-ion (85 pour le $SO_4^{2^-}$ et de 275 pour le $S_2O_3^{2^-}$ par rapport à 22 pour le Cl⁻) (Druschel *et al.*, 2003). Celui-ci est échangé seulement avec les ions de même charge, donc les espèces neutres ou les ions de charges opposées ne seront pas retenues sur les sites du contre-ion.

Une fois la résine sélectionnée, la colonne où se fera l'échange ionique doit être préparée soigneusement. La résine arrive sous forme de poudre (maille 100) et doit être mélangée avec de l'eau ultrapure avant d'être introduite dans la colonne préfabriquée, afin d'éviter la formation de bulles d'air. La colonne en polypropylène de forme cylindrique (Figure 2.6) a des dimensions de 0,8 cm de diamètre et de 9 cm de long (produit 731-1550EDU de la compagnie Bio-Rad). L'eau en surplus a été évacuée à l'aide d'une pompe péristaltique via un frité en polyéthylène situé à la sortie de la colonne. Dépendamment de la quantité d'eau passée à travers la résine et de la concentration d'analytes anticipée, il est important de s'assurer qu'il y aura suffisamment de résine afin de retenir l'équivalent des anions voulus présent dans l'échantillon. La résine AG1-X8 est caractérisée par une capacité de 1,2 méq•mL⁻¹ de résine (Druschel *et al.*, 2003). En excédant cette capacité, il en résulterait une capture incomplète des anions et une sous-estimation de la concentration en thiosulfate.

Durant la phase de développement de la méthode de préconcentration, des volumes de 400 mL à des concentrations connues de thiosulfate furent passés à travers la colonne pour définir les conditions optimales de débit d'élution et de débit de passage de l'échantillon (Figure 2.6A). Une fois la méthode bien définie, c'est un volume de 900 mL d'échantillons des différents lacs qui fut choisi. Cette quantité était basée sur une concentration potentiellement faible du thiosulfate; il fallait augmenter la quantité d'eau échantillonnée afin de maximiser le signal lors de l'analyse par chromatographie ionique.

Après le passage de l'échantillon dans la colonne, suivait une élution séquentielle de la résine avec des concentrations de 0,1 M et 0,5 M de KCl afin d'éluer les ions $SO_4^{2^-}$ et $S_2O_3^{2^-}$ respectivement (Figure 2.6B). D'ailleurs, des mesures des concentrations de sulfate dans l'éluat de thiosulfate et de thiosulfate dans l'éluat de sulfate ont été effectuées afin de s'assurer de la justessé de l'élution séquentielle. Donc, les anions retenus sur les groupes fonctionnels requièrent l'application d'un gradient d'ions Cl⁻ (ajouté sous forme de KCl) proportionnel à sa sélectivité sur la résine. L'anion avec une plus grande sélectivité requiert une plus grande concentration de Cl, pour qu'il soit élué de la structure de la résine. Tout comme dans la phase de préconcentration, une pompe péristaltique avec des tubes Tygon a été utilisée pour passer chaque éluant à travers la colonne à un flux de 2,0 mL/min. Il en résulte un éluat concentré contenant les anions respectifs prêts pour l'analyse au chromatographe ionique (section 2.1.8).



Figure 2.6: Montage expérimental lors de A) la préconcentration de la solution échantillonnée et B) de l'élution des différents anions.

Suite au développement de la méthode de préconcentration avec des solutions synthétiques connues, elle a été ensuite testée avec des solutions provenant du lac Bleu. L'aspect de la conservation des échantillons est importante (section 2.1.4) et a aussi été pris en compte lors des campagnes d'échantillonnage. Le temps le plus long écoulé entre le prélèvement de l'eau de lac et le passage de la résine était ~2 h. Les premiers échantillons prélevés était conservés dans une glacière jusqu'au moment de leur passage à travers la résine échangeuse d'ions. Le temps de passage des échantillons à travers cette résine était de 5 h pour un temps moyen total entre la prise d'échantillons et le dosage du thiosulfate de 12 h.

2.1.8 Chromatographie ionique

Depuis 1988, la chromatographie ionique est une méthode d'analyse très répandue pour déterminer plusieurs anions sulfureux (O'Reilly *et al.*, 2001). D'ailleurs, le thiosulfate est parmi les dix anions les plus fréquemment analysés par cette méthode. La précision, le court temps d'analyse et la possibilité d'analyser successivement plusieurs échantillons et simultanément plusieurs anions sont les facteurs clés justifiant l'utilisation de cette méthode.

Dans cette section, étant donné que le chromatographe utilisé possédait une colonne différente de celle utilisée par Druschel *et al.* (2003), on précise les modifications et adaptations faites à ce protocole d'analyse. Suite à l'élution des résines (telle que décrite dans la section précédente), toutes les aliquotes devaient avoir une matrice commune de KCl à 0,1 M. Donc, l'éluat contenant les ions $SO_4^{2^2}$ pouvait être analysé directement sans dilution. Par contre, pour l'éluat provenant du KCl 0,5 M, il devait être dilué à une concentration finale de 0,1 M de KCl; pour éviter d'endommager la colonne analytique.

Tous les échantillons étaient analysés en utilisant une élution isocratique à l'hydroxyde de potassium (KOH 19 mM) pendant 22 minutes à l'aide du chromatographe ionique Dionex DX 500 (Détecteur de conductivité CD20, cellule de conductivité DS3 et échantillonneur automatique AS50) en employant une colonne analytique AS18. Le bon choix de concentration d'éluant permettait de distinguer les pics du sulfate de celui du KCl et minimisait le temps d'analyse tout en captant le signal du pic du thiosulfate. En effet, le pic de la matrice de KCl est important et relativement évasé, ce qui pouvait, si la concentration de l'éluant n'était pas appropriée, recouvrir celui du sulfate.

Avant l'analyse d'échantillons, cinq étalons, ayant également comme matrice une solution de KCl 0,1 M, ont été insérés afin d'obtenir une série de cinq échantillons servant à la calibration du chromatographe et établir une courbe de calibration (concentration à 100 % étant égale à 100 μ M pour le thiosulfate et de 104 μ M pour le

sulfate pour être ensuite diluée de 25 %, 50 % et 75 %). De plus, ces solutions étalons ont été insérées à la suite de chaque série de cinq échantillons afin de s'assurer de la qualité des résultats et de constater une possible défaillance de l'appareil. Les solutions étalons furent préparées à partir de thiosulfate de sodium et d'une solution étalon prémélangée de sulfate dans une matrice de KCl 0,1 M. La prise de données, la manipulation de chromatogrammes ainsi que l'entrée de données de calibration ont été accomplies à l'aide du programme Chroméléon jumelé avec l'appareil.

2.1.9 Limite de détection

La limite de détection est la plus petite teneur de l'analyte pouvant produire un signal suffisamment important que 99 % des analyses à cette concentration produiront un signal détectable. Elle pourra servir de seuil pour prouver la présence (ou l'absence) de cet analyte. La méthode préconisée pour établir cette limite consiste en une lecture directe de dix mesures (réponse ou grandeur de l'analyte) d'étalons d'analyse indépendants contenant l'ensemble des constituants recherchés. La limite de détection correspond à la valeur de l'écart-type multiplié par 3,29 (Clesceri *et al.*, 1989). Le tableau suivant démontre que la concentration d'étalon employée et le temps de rétention des deux ions étudiés sont constants et répétables pour donner respectivement une limite de détection de 0,56 μ M et de 0,36 μ M pour le sulfate et thiosulfate.

No Éch.	[] du standard (µM)	Temps Élution (min)	[S ₂ O ₃ ²⁻] μΜ	[] du standard (µM)	Temps Élution (min)	[SO4 ²⁻] μΜ
1	10,0	11,70	9,83	10,4	5,24	10,11
2	10,0	11,70	10,06	10,4	5,24	10,04
3	10,0	11,69	9,75	10,4	5,24	10,26
4	10,0	11,69	10,00	10,4	5,24	9,93
5	10,0	11,69	9,91	10,4	5,24	9,89
6	10,	11,69	9,92	10,4	5,24	10,03
7	10,0	11,69	10,05	10,4	5,24	10,37
8	10,0	11,69	10,06	10,4	5,24	10,18
9	10,0	11,69	10,05	10,4	5,24	10,35
10	10,0	11,69	9,99	10,4	5,24	10,24
	Écart-type Limite de détectio	on	0,11	Écart-type Limite de détect	ion	0,17
			0,36 µM		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	0,56 µM

 Tableau 2.2:
 Limite de détection du chromatographe ionique DX 500

2.2 Résultats

2.2.1 Méthode de préconcentration du thiosulfate

La première étape du développement de la méthode de préconcentration avait pour but de déterminer l'influence du débit de passage de l'échantillon sur le taux de récupération du thiosulfate. Pour ce faire, quatre expériences ont été faites avec une solution synthétique de 200 mL à une concentration de 2 µM de thiosulfate. Le débit des quatre solutions a été varié selon la séquence 1,5, 2.0, 2,5 et 3,0 mL•min⁻¹ avec un débit de passage de l'éluant fixé à 2,0 mL•min⁻¹. La courbe à la figure 2.7 démontre qu'il y a une zone où le taux de récupération est maximisé autour de 2,0 mL•min⁻¹. Si le débit est supérieur ou inférieur à cette valeur, le taux de récupération du thiosulfate diminue de 5 à 10 %. Le débit de 1,5 mL•min⁻¹ a donné le même taux de récupération qu'à un débit de 2,0 mL•min⁻¹, mais pour un gain de temps, la valeur de 2,0 mL•min⁻¹ a été retenue pour la suite des expériences.



Figure 2.7: Taux de récupération du thiosulfate en fonction du débit de passage d'une solution synthétique à travers la résine échangeuse d'ions. Concentration de l'éluant KCl = 0,5 M. Débits de passage à travers la résine □: 1,5 mL•min⁻¹; +: 2 mL•min⁻¹; V : 2,5 mL•min⁻¹; •: 3 mL•min⁻¹.

La quantité d'éluant passée à travers la résine échangeuse d'ions est un autre facteur qui influence le taux de récupération du thiosulfate. À un débit fixe de 2,0 mL•min⁻¹, la quantité de 20 mL de KCl (0,5 M) est la valeur qui a été initialement testée. Dès lors, le taux de récupération était relativement élevé. La quantité a été augmentée à 25 mL sans changer notablement le taux de récupération (Figure 2.8). La quantité de 20 mL a été retenue pour la suite des expériences.



Figure 2.8: Taux de récupération du thiosulfate en fonction du nombre de mL d'éluant lors du passage d'une solution synthétique à travers la résine échangeuse d'ions. Concentration de l'éluant KCl = 0,5 M. Quantité d'éluant passée • : 20 mL; ○ 25 mL.

Le débit de passage de l'éluant préalablement utilisé par Druschel *et al.* (2003) pour déterminer la quantité optimale d'éluant était de 2,0 mL•min⁻¹. On a voulu tester des valeurs inférieures à 2,0 mL•min⁻¹ afin de savoir si cela aurait augmenté au-delà de 90 % le taux de récupération. Selon les résultats obtenus et présentés à la figure 2.9, la diminution du débit a fait en sorte de diminuer le taux de récupération du thiosulfate. La valeur de 2,0 mL•min⁻¹ a été retenue pour la suite des expériences.



Figure 2.9: Taux de récupération du thiosulfate en fonction du débit de passage de l'éluant après l'écoulement d'une solution synthétique à travers la résine échangeuse d'ions. Concentration de l'éluant KCl = 0,5 M.

La détermination de la concentration de sulfate n'était pas aussi importante que celle du thiosulfate, mais elle était un élément important pour trouver la zone à échantillonner dans les lacs (i.e. là où l'on trouve un gradient de concentration en sulfate). La concentration du KCl pour récupérer le sulfate était de 0,1 M et a nécessité un plus grand volume pour éluer un bon pourcentage du $SO_4^{2^-}$ initialement présent. Même une quantité de 200 mL à un débit de 2,0 mL•min⁻¹ n'a récupéré que 60 % du sulfate initialement présent (200 mL d'une solution de 10 µM) (Figure 2.10).



Figure 2.10: Taux de récupération du sulfate en fonction du volume d'éluant lors du passage d'une solution synthétique à travers la résine échangeuse d'ions. Concentration de l'éluant KCl = 0,1 M. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de cinq mesures.

La concentration d'éluant de KCl (0,1 M) n'ayant pas été adéquate, on a alors augmenté la concentration de l'éluant (Figure 2.11). Le pourcentage de sulfate récupéré a augmenté à environ 80 % avec une concentration de KCl plus élevée, mais le thiosulfate a aussi été élué en même temps (60 %) à partir d'une concentration de 0,3 M de KCl. Avec ces résultats, il était impossible d'augmenter la concentration de KCl sans risque d'éluer une partie du thiosulfate. Avec le volume élevé nécessaire d'éluant (200 mL) et le faible taux de récupération du sulfate (60 %), il était préférable de ne pas éluer la résine au KCl (0,1 M) pour obtenir la concentration de sulfate. Les sulfates ont donc été déterminés directement par chromatographie ionique, sans préconcentration.





L'utilité de recourir à une méthode de préconcentration est démontrée aux figures 2.12 et 2.13. Le chromatogramme de la figure 2.12 représente la solution synthétique, non passée à travers la résine échangeuse d'ions, qui a été utilisée pour le développement de la méthode de préconcentration. Le temps d'élution était de 18 min et le signal pour cette solution était faible et pourrait parfois être confondu avec la ligne de base.



Figure 2.12: Chromatogramme d'une solution synthétique contenant 2 μM de thiosulfate sans préconcentration sur la résine AG1-X8.

Les pics de la solution éluée qui avait une matrice de KCl (0,1 M), du SO_4^{2-} (10 μ M) et du $S_2O_3^{2-}$ (2 μ M) sont identifiés sur le chromatogramme de la figure 2.13 suite à une préconcentration de la solution synthétique sur la résine échangeuse d'ions. En comparaison à une solution non concentrée, le signal qui représente le thiosulfate est passé de 2 μ M à 40 μ M. En préconcentrant la solution synthétique, le signal a été ainsi amplifié de 20 fois, et ceci malgré la dilution obligatoire de l'éluat (5X).



Figure 2.13: Chromatogramme d'une solution synthétique éluée au KCl (0,5 M) contenant 2 μM de thiosulfate après une préconcentration sur la résine AG1-X8.

2.2.2 Mesures en lacs

2.2.2.1 Lac Bleu

À plusieurs reprises, une quantité connue de thiosulfate (équivalente à une concentration de 2 μ M) a été ajoutée à 1 L d'eau échantillonnée à 31 m et 32 m dans la zone anoxique du lac. Cette manipulation avait pour but de valider les paramètres établis à la section 2.2.1, ainsi que le processus de filtration et de préconcentration des échantillons. Les taux de récupération du thiosulfate ajouté à l'eau du lac Bleu (Tableau 2.3) étaient similaires à ceux mesurés lorsque le thiosulfate a été ajouté à une solution synthétique (~85 %). Suite à cette manipulation, on a mesuré s'il y avait présence ou non de thiosulfate dans la zone comprise entre 30-32 m du lac Bleu.



Figure 2.15: Caractérisation physico-chimique de la colonne d'eau du lac Holland

2.2.2.3 Lac Holland

La figure 2.15 regroupe également les données physico-chimiques importantes qui ont servi à identifier la zone de 2 m échantillonnée du lac Holland. La quantité d'oxygène dissous était de 100 % à la surface pour diminuer à près de zéro à ~6 m, ce qui indique le début de la zone anoxique. La concentration de H₂S a augmenté à partir de 7 m pour atteindre ~900 μ g•L⁻¹ (24 μ M) à ~9,5 m. Le croisement entre l'apparition d'H₂S et une faible quantité d'oxygène (2 mg•L⁻¹) et de sulfate (~0,5 mg•L⁻¹) détermine le début la zone d'échantillonnage à 7 m. Dans la colonne d'eau du lac Holland, on a détecté le thiosulfate à une profondeur de 7,9 m (Tableau 2.5).

Profondeur échantillonnée (m)	Temps de rétention (min)	[S ₂ O ₃ ²⁻] (μM)
7,0	18,2	0
7,2	18,6	0
7,4	18,8	0
7,6	19,2	0
7,7	18,2	0
7,8	18,3	0
7,9	19,5	0,49
8,0	19,7	0

Tableau 2.5:Concentration de thiosulfate mesurée à différentes profondeurs au lacHolland


Figure 2.14: Caractérisation physico-chimique de la colonne d'eau du lac Pink

Tableau 2.4:Concentrations de thiosulfate mesurées à différentes profondeurs au
lac Pink

Profondeur échantillonnée (m)	Temps de rétention (min)	$[S_2O_3^{2-}](\mu M)$
12		0
12,2	19,53	0,27
12,4	19,73	0,49
12,6		0

Comme dans le cas du lac Bédard, aucun thiosulfate n'a été relevé dans la portion de la zone anoxique préalablement déterminée (section 2.1.3).

Profondeur échantillonnée	$[S_2O_3^{2-}]$ mesurées (μ M)	Récupération (%)
31 m sans ajout de S_2O_3	0,00	
31 m sans ajout de S_2O_3	0,00	
32 m sans ajout de S_2O_3	0,00	2000
32 m sans ajout de S_2O_3	0,00	2200 C
31 m avec ajout de S_2O_3	1,59	79,6
31 m avec ajout de S_2O_3	1,71	85,3
32 m avec ajout de S ₂ O ₃	1,73	86,7
32 m avec ajout de S_2O_3	1,45	72,5
	Moyenne, de quatre mesures	81
	Écart-type	6,5

Tableau 2.3:Taux de récupération d'une quantité de thiosulfate ajoutée à l'eau
naturelle du lac Bleu.

2.2.2.2 Lac Pink

Comme mentionné dans la section 2.1.3, on a dû identifier une zone où le thiosulfate pourrait être détecté. La figure 2.14 regroupe plusieurs données physico-chimiques importantes (profondeur, oxygène dissous et [H₂S]) qui ont servi à identifier la zone de 2 m à échantillonner. La quantité d'oxygène dissous était de 100 % à la surface pour diminuer à près de zéro autour de 12 m, ce qui indique le début de la zone anoxique. La concentration de H₂S augmentait à partir de 12 m pour atteindre ~3 400 μ g•L⁻¹ (99 μ M) à 17 m. Le croisement entre l'apparition d'H₂S et une faible quantité d'oxygène (2 mg•L⁻¹) détermine le début la zone d'échantillonnage. Dans la colonne d'eau du lac Pink, on a mesuré une concentration de thiosulfate à deux profondeurs (Tableau 2.4).

3. Biodisponibilité du mercure

Le mercure est accumulé par les bactéries et les algues et c'est de cette manière que le mercure entre dans la chaîne alimentaire : il est d'abord transporté à travers la membrane cellulaire qui entoure ces microorganismes et est ensuite retenu lorsque ces organismes sont soumis à la prédation d'organismes supérieurs (Morel *et al.*, 1998). Quelques études ont démontré que le mercure pouvait entrer par diffusion passive à travers la membrane cellulaire chez la diatomée *T. weissflogii* (Mason *et al.*, 1996) ainsi que la bactérie *Desulfobulbus proprionicus* (Benoit *et al.*, 1999; Benoit *et al.*, 2001a). D'autres recherches indiquent l'existence d'un mécanisme physiologiquement régulé de transport facilité du mercure chez les bactéries *Vibrio anguillarum* et *Escherichia coli* (Golding *et al.*, 2002). Toutefois, comme il ne constitue pas un micronutriment essentiel à leur croissance, il est évident que le mercure doit entrer dans ces microorganismes par un système de transport qui n'a pas été conçu à cet effet.

La concentration de métal libre en solution joue un rôle clé lors de la prise en charge de métaux. La présence de ligands en solution aura tendance à favoriser la complexation du métal, ce qui fera diminuer la biodisponibilité du métal. Cependant, les ligands peuvent parfois stimuler la prise en charge des métaux. Certains ligands assimilables, tels que le thiosulfate et le citrate (Errécalde *et al.*, 1998; Fortin et Campbell, 2001) peuvent former des complexes assez stables avec des métaux non essentiels dans des conditions environnementales que l'on peut retrouver en eaux douces. L'assimilation de ces complexes, via les systèmes de transport conçus pour le ligand assimilable seul, constituerait une autre voie de prise en charge.

Le thiosulfate est un ligand assimilable et peut former une série de complexes hydrophiles très stables avec le mercure (section 1.2.5). Il a été démontré que ce genre de complexe peut traverser la membrane cellulaire par le biais d'un transporteur membranaire de sulfate; AgS_2O_3 (Fortin et Campbell, 2001), Cd S_2O_3 (Boily, 2004). On pose alors l'hypothèse que le complexe mercure thiosulfate peut être pris en charge par *C. reinhardtii*.

3.1 Méthodologie expérimentale

3.1.1 Produits, réactifs et conservation

Tous les contenants utilisés pour préparer et conserver les solutions étaient faits de polycarbonate (PC), de polyéthylène haute densité (HDPE), de polypropylène (PP) ou de tetrafluoroéthylène (PTFE). Tous les contenants et autres matériels nécessaires (unités de filtration, embouts de pipettes, pinces, etc.) ont été trempés dans un bain d'acide nitrique (10 % v/v) pendant 24 h puis rincés sept fois avec de l'eau ultrapure (résistivité 18 M Ω cm) et séchés sous une hotte à flux laminaire avant leur utilisation. Le port de gants sans poudre en nitrile ainsi que la préparation des expériences sous la hotte à flux laminaire visaient à minimiser le risque de contamination. Les réactifs utilisés étaient tous de grade analytique ou supérieur pour limiter leur contamination en métaux traces. Ces précautions ont été mises en place dans le but de réduire les risques de contamination au mercure lors des expériences.

3.1.2 Préparation des milieux de culture

Les solutions mères utilisées pour la préparation des milieux de culture MHSM-2 (modified high salt media) (Tableau 3.1) ont été mises dans des bouteilles de polypropylène préalablement autoclavées et conservées dans l'obscurité à 4 °C afin de prévenir une dégradation par la lumière ou la température. Les solutions ont été préalablement filtrées (0,2 µm; membrane en polycarbonate, Poretics) pour maintenir leur stérilité et éviter l'adsorption de métaux en solution sur des particules en suspension, ce qui aurait modifié la composition de ces solutions. La solution de culture (Tableaux 3.2 et 3.3) a été autoclavée à 12 °C pendant 15 minutes. Une

solution d'éléments traces a été ajoutée après une période de 24 h de refroidissement. Cette procédure a permis d'éviter la précipitation de certains métaux pendant ou après l'étape d'autoclavage (Price *et al.*, 1989). En dernier lieu, du tampon d'acide N-2hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonique (HEPES = 10 mM) a été ajouté pour permettre de maintenir le pH constant dans le milieu de culture et le pH a été ajusté à $7,0 \pm 0,1$ avec une solution de NaOH (0,1 M).

Solutions ⁽¹⁾	Duoduito	Concentration ⁽²⁾	Fournissour
Solutions	Produits	Concentration	Fourmisseur
Ammonium	NH ₄ NO ₃	15,0 g•L ⁻¹	Omega
	MgSO ₄ •7H ₂ O	$4,00 \text{ g} \bullet \text{L}^{-1}$	Omega
	$Ca(NO_3)_2 \bullet 4H_2O$	$3,21 \text{ g} \bullet \text{L}^{-1}$	Baker
Nitrate #1	NaNO ₃	$15,81 \text{ g} \bullet \text{L}^{-1}$	Omega
	MgSO ₄ •7H ₂ O	$3,25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	Fisher
	$Ca(NO_3)_2 \bullet 4H_2O$	$3,21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	Baker
Nitrate #2	NaNO ₃	$15,81 \text{ g} \bullet \text{L}^{-1}$	Omega
	$Mg(NO_3)_2$	$4,00 \text{ g} \bullet \text{L}^{-1}$	Fisher
-	$Ca(NO_3)_2 \bullet 4H_2O$	$3,21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	Baker
Phosphate #2	KH ₂ PO ₄	29,6 g•L ⁻¹	Fisher
	K ₂ HPO ₄	57,6 g•L ⁻¹	Fisher
AAP	H ₃ BO ₃	$186 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	ACP
(Algal Assay	MnCl ₂ •4H ₂ O	$415 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Fisher
Procedure)	FeCl ₃ •6H ₂ O	$160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	BDH
	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	$300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Fisher
	$Zn (1 g \bullet L^{-1})^{(3)}$	$1,59 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Fisher
	$Co (1 g \bullet L^{-1})^{(3)}$	$0,64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Fisher
	Mo $(1 \text{ g} \bullet L^{-1})^{(3)}$	2,88 mg•L ⁻¹	Fisher
	Cu $(1 \text{ g} \bullet \text{L}^{-1})^{(3)}$	4,47 μg•L ⁻¹	Fisher
Cystéine	H ₂ NCH(CH ₂ SH)COOH	1,2 g + 18 mL NaOH 0,5 M	Sigma
Thiosulfate #1	$Na_2S_2O_3 \bullet 5H_2O$	2,48 g•L ⁻¹	BDH
Tampon	HEPES	2,383 g•L ⁻¹	Sigma

Tableau 3.1:Composition et concentration des solutions mères utilisées pour la
préparation de différentes solutions

¹ Filtrées sur 0,2 µm; ² Concentration finale des produits dans chacune des solutions. ³ Étalon ICP.

Tableau 3.2: Volumes de solutions mères utilisées pour la préparation des milieux de culture (MHSM-2), d'exposition (MHSM-1, MHSM-3) et de rinçage (MHSM-R1 et MHSM-R2).

Solutions	MHSM-1	MHSM-2	MHSM-3	MHSM-R1	MHSM-R2
Nitrate #2	-	· -	$5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$		$5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$
Nitrate #1	$5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$	-	-	-	-
Ammonium #1	-	$5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$	-	$5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$	
NaOH (1 M)	$3,5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$	$3,5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$	$3,5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$	3,5 mL•L ⁻¹	3,5 mL∙L ⁻¹
Phosphate #2		250 μ L•L ⁻¹	-	250 μL•L ⁻¹	_
KNO ₃ (1,0 M)	4,0 mL•L ⁻¹	$4,0 \text{ mL} \bullet \text{L}^{-1}$	4,0 mL• L^{-1}	2,1 mL \bullet L ⁻¹	2,1 mL∙L ⁻¹
AAP	-	$1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$	-	-	

Tableau 3.3: Concentrations molaires des cations et anions qui composent les milieux de culture, d'exposition et de rinçage. Le pH a été maintenu à 7,0 dans ces trois milieux.

						(1)
Ions	MHSM-1	MHSM-2	MHSM-3	MHSM-R1	MHSM-R2	HSM
BO ₃	-	$3,01 \ge 10^{-6}$	-	-		3,01 x 10 ⁻⁶
Ca	6,80 x 10 ⁻⁵	$6,80 \ge 10^{-5}$	$6,80 \times 10^{-5}$	6,80 x 10 ⁻⁵	6,80 x 10 ⁻⁵	$6,80 \ge 10^{-5}$
Cl	-	$5,97 \ge 10^{-6}$	_	-	-	9,49 x 10 ⁻³
Co		$1,09 \ge 10^{-8}$	-	-	-	$1,09 \ge 10^{-8}$
CO ₃	-	atm ⁽²⁾	-	-	-	atm ⁽²⁾
Cu	-	7,04 x 10 ⁻¹¹	-		-	$7,04 \ge 10^{-11}$
EDTA	-	8,06 x 10 ⁻⁷	· _ ·	-	-	806 x 10 ⁻⁷
Fe	. .	$5,92 \times 10^{-7}$	-		· _	$5,92 \times 10^{-7}$
К	$4,00 \times 10^{-3}$	$4,14 \times 10^{-3}$	$4,00 \ge 10^{-3}$	$2,32 \times 10^{-3}$	$2,32 \times 10^{-3}$	$2,20 \times 10^{-2}$
Mg	8,15 x 10 ⁻⁵	8,15 x 10 ⁻⁵	$7,99 \times 10^{-5}$	8,15 x 10 ⁻⁵	7,99 x 10 ⁻⁵	8,12 x 10 ⁻⁵
Mn		$2,10 \times 10^{-6}$	-	-	-	$2,10 \ge 10^{-6}$
Mo	-	$3,00 \ge 10^{-8}$	-	-	-	$3,00 \times 10^{-8}$
Na	4,43 x 10 ⁻³	$3,50 \times 10^{-3}$	$4,43 \times 10^{-3}$	$^{-3}$,5 x 10 ⁻³	$4,43 \times 10^{-3}$	$1,02 \ge 10^{-4}$
NH ₄	-	9,38 x 10 ⁻⁴	-	9,38 x 10 ⁻⁴	-	9,35 x 10 ⁻³
NO ₃	4,93 x 10 ⁻³	$5,07 \times 10^{-3}$	$5,23 \times 10^{-3}$	$3,17 \times 10^{-3}$	$3,33 \times 10^{-3}$	
PO ₄	-	$1,37 \ge 10^{-4}$	-	1,37 x 10 ⁻⁴	1,37 x 10 ⁻⁴	$1,37 \ge 10^{-2}$
SO ₄	8,15 x 10 ⁻⁵	8,15 x 10 ⁻⁵	-	8,15 x 10 ⁻⁵	-	8,12 x 10 ⁻⁵
Zn	-	2,43 x 10 ⁻⁸				2,43 x 10 ⁻⁸

¹ Macfie *et al.* (1994). ² La concentration du carbonate s'ajuste par équilibre gazeux avec l'atmosphère.

3.1.3 Culture des algues

Durant la phase expérimentale, des cultures axéniques de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* ont été obtenues de l'Université de Toronto. Une souche avec paroi cellulaire a été utilisée (UTCC11: *C. reinhardtii* WT). *C. reinhardtii* est une algue motile (deux flagelles) avec un diamètre moyen entre 4 et 5 µm. Cette espèce a fait l'objet de nombreuses études, notamment en écotoxicologie. Elle a été choisie parce qu'elle est très étudiée au niveau génétique, facile à cultiver et reconnue pour son système de transport transmembranaire pour l'assimilation du sulfate (Yildiz *et al.*, 1994). Ce système de transport (Perez-Castineira *et al.*, 1998; Chen et Melis, 2004) a été identifié par Fortin et Campbell (2001) comme responsable de la prise en charge du complexe Ag-thiosulfate.

Les cellules algales étaient cultivées de façon axénique dans des fioles erlenmeyer en verre de 250 mL contenant 100 mL de milieu de culture MHSM-2 (Tableau 3.3). Ce milieu contient essentiellement moins d'ammonium, de chlorure et de phosphate que le milieu HSM (high salt media: force ionique de 6 méq•L⁻¹) (Macfie *et al.*, 1994). Des expériences préliminaires (Fortin, 2000) ont démontré que ces modifications au milieu de culture n'affectaient ni le taux de croissance ni le rendement des algues qui étaient obtenues avec le milieu HSM original. Les fioles erlenmeyers ont été maintenues sur une plaque agitatrice (~50 rpm) à une température (20 °C \pm 0,1 °C) et luminosité $(100 \pm 10 \text{ µmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$ constantes à l'intérieur d'une chambre de croissance (Conviron, CMP3023). Environ 2 mL de l'actuelle culture étaient prélevés de manière hebdomadaire pour être inoculés dans un autre Erlenmeyer afin d'éviter une dégradation physiologique des algues. Ce deuxième Erlenmeyer contenait lui aussi 100 mL de milieu de culture MHSM-2 frais, stérile et à pH 7,0. Après une vingtaine de transferts hebdomadaires d'algues, la culture était jetée et une nouvelle souche était utilisée. De façon épisodique, des vérifications de l'état de contamination bactérienne de la culture en cours ont été réalisées par placage sur une gélose nutritive (Dicto-Bacto Agar) afin d'éviter une possible influence des bactéries lors d'expériences de prise en charge du mercure.

3.1.4 Cycle de croissance et récolte des algues

La croissance des algues se produit en trois phases : latente, exponentielle et stationnaire (Figure 3.1). La phase de latence peut varier entre 0 et 24 h selon l'état physiologique des algues inoculées. Une fois adaptées aux conditions de croissance, les algues entrent dans la phase exponentielle pendant laquelle le taux de croissance est d'environ deux divisions cellulaires par jour. Dans les conditions d'incubation de la présente étude, la croissance exponentielle a duré environ 24 à 48 h. Après quelques jours de croissance, une phase stationnaire s'établit; cette phase est caractérisée par la constance de la densité cellulaire. Une carence dans la disponibilité de certains nutriments essentiels et la présence élevée de déchets métaboliques dans le milieu sont à l'origine de cette phase. Cet état stationnaire est caractérisé par une absence de division cellulaire malgré le maintien des activités métaboliques. Ultimement, la culture disparaîtra si elle n'est pas transférée dans un milieu de culture frais. La détermination de la phase exponentielle joue un rôle important puisqu'il est connu que l'état physiologique des algues affecte leur prise en charge du zinc (Bates et al., 1983). Dans le cadre de la présente étude, les algues ont été récoltées dans la phase exponentielle de chaque expérience.



Figure 3.1: Courbe de croissance typique de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de cinq mesures.

Dès le départ, la courbe de croissance de *C. reinhardtii* a été déterminée. La méthodologie utilisée pour la récolte des algues a été adaptée d'une méthode largement utilisée et décrite par le passé dans notre laboratoire (Bates *et al.*, 1982; Bates *et al.*, 1983; Harrison *et al.*, 1986; Schenck *et al.*, 1988).

Un Erlenmeyer rempli de 100 mL du milieu de culture frais et stérile a été inoculé d'algues afin d'obtenir une densité algale de 40 000 cellules/mL. Les algues ont crû pendant 48 h, ce qui correspond à la phase exponentielle. Au cours de cette phase, les algues ont été récoltées (pression \leq 10 cm Hg) sur un filtre en polycarbonate (47 mm) d'une porosité de 2 µm puis rincées cinq fois avec 10 mL de la solution de rinçage MHSM-R1 (qui ne contient ni phosphates ni métaux, Tableau 3.2). Le rinçage a permis d'éliminer les ligands présents dans le milieu de culture (EDTA et exsudats d'algues) qui peuvent perturber la spéciation du Hg dans les milieux d'exposition. Le rinçage a permis aussi de minimiser la présence de métaux (Fe, Cu, Mn, Zn) qui entrent potentiellement en compétition avec le mercure pour les sites de complexation et de transport à la surface des cellules.

3.1.5 Comptage d'algues

Les courbes de croissance et les volumes nécessaires pour obtenir les concentrations désirées d'algues dans les milieux d'exposition ont été établis à partir des mesures de densités algales. La densité ainsi que la superficie des algues ont été déterminées à l'aide d'un compteur de particules (Beckman Coulter Counter Multisizer III); une dilution de 1:10 dans une solution isotonique (Isoton[®] II) a été effectuée. Le fonctionnement du compteur de particules est simple. Il est basé sur la mesure de changement de la résistance électrique qui se produit quand les particules passent à travers l'ouverture de 70 μ m qui sépare deux électrodes. Quand une particule traverse l'ouverture, elle déplace son propre volume de liquide isotonique. Ce déplacement de volume est mesuré comme une impulsion de voltage. La hauteur de chaque impulsion est directement proportionnelle au volume de la particule. Un détecteur transforme ce changement de résistance en concentration de particules.

3.1.6 Modélisation thermodynamique

La spéciation du métal d'intérêt risque d'affecter grandement sa biodisponibilité (section 1.3); il importe donc qu'elle soit considérée lors de la planification d'expériences de prise en charge de mercure. L'utilisation de milieux d'exposition chimiquement bien définis permet d'utiliser un modèle d'équilibres chimiques (MINEQL+, v 4.5) pour calculer la spéciation du métal. Ce modèle calcule la concentration de diverses espèces chimiques à l'équilibre en s'appuyant sur une base de données qui contient les constantes d'équilibres de formation pour la plupart des espèces inorganiques rencontrées dans les eaux naturelles, dans des conditions de température et de pression atmosphérique définies. En entrant les éléments contenus dans les milieux d'exposition, il est simple de connaître la spéciation du mercure et d'ajuster la composition du milieu au besoin (pH, $[M^{z+}]$, [ligands]).

3.1.7 Adsorption du mercure

Divers facteurs influencent dans le temps la concentration totale des métaux présents dans un échantillon d'eau naturelle ou synthétique (Litman, 1975; Fadini et Jardim, 2000; Parker et Bloom, 2004; Parker et Bloom, 2004). Un facteur est le choix du matériau avec lequel les métaux en attente de différents traitements sont en contact. Selon le type de métal utilisé et l'échelle des travaux, plusieurs matériaux ont été utilisés (ex: polyéthylène de haute densité (HDPE), polypropylène (PP), téflon et polymère perfluoralkoxy (PFA)). Toutefois, peu importe le choix de contenant, certains métaux ont une plus forte tendance que d'autres à s'adsorber sur et migrer dans les parois de certains types de bouteilles (ex. Ag, Au, Hg). Cette tendance est moindre avec le téflon, mais elle mène généralement à une diminution de la concentration totale du métal en solution si la solution est entreposée pendant un certain temps (Reimann *et al.*, 1999). Ce phénomène de perte par adsorption est observé lors des expériences de prise en charge du mercure. Les solutions qui contiennent le mercure sont exposées aux parois et agitées durant une période de 24 h, ce qui permet aux différents éléments présents de s'équilibrer. Durant cette période, deux phénomènes peuvent survenir : 1) Le mercure peut s'adsorber aux parois du contenant, ce qui amène une diminution de la concentration totale du métal dissous; 2) L'utilisation de thiosulfate comme ligand peut complexer le mercure (log K = 29,86) dans le milieu d'exposition, mais aussi le mercure adsorbé préalablement aux parois, ce qui contribue à une contamination interne du milieu. Les deux phénomènes contribuent à modifier de façon aléatoire la concentration totale de métal présent, ce qui nuit à la répétabilité des expériences. Le choix du bon matériau permet de minimiser ces variations. La bouteille en téflon, qui a été employée pour l'ensemble des expériences effectuées dans le cadre de la présente étude, est standard et a été abondamment utilisée par plusieurs étudiants et chercheurs de l'INRS-ETE. Les bouteilles doivent être récentes puisqu'un nombre répété de lavages et d'autoclavages ou même l'utilisation fréquente d'un agitateur magnétique peuvent contribuer à la dégradation physique des parois. Lorsque des contenants usagés ont été utilisés, une perte qui peut atteindre 40 % du mercure initialement présent dans les solutions d'exposition a été observée. Pendant le processus expérimental, les Erlenmeyers en polycarbonate ou en verre peuvent également adsorber du mercure, mais dans une moindre mesure compte tenu du temps de séjour plus court (< 30 min).

3.1.8 Méthodologie de prise en charge du Hg

3.1.8.1 Préparation des milieux d'exposition et de rinçage

Dans le but de contrôler et de calculer la spéciation du mercure, la composition des milieux d'exposition pendant les expériences de prise en charge doit être connue de façon précise. L'utilisation d'un milieu chimiquement défini permet de respecter cette exigence. Dans le cadre de la présente étude, le milieu MHSM-1 a été utilisé comme milieu d'exposition lors d'expériences de prise en charge du mercure principalement sous forme Hg(OH)₂ sans thiosulfate mais avec sulfate. Ce milieu est caractérisé par l'absence de métaux traces, d'ammonium et de phosphate. L'absence de métaux traces élimine la compétition avec le mercure pour les sites de complexation à la surface des cellules; l'ammonium et le phosphate, absents du milieu, ne concourent pas avec le thiosulfate pour complexer le mercure.

Dans un contenant de polycarbonate, à partir de solutions mères décrites dans le tableau 3.1, le milieu d'exposition MHSM-1 et le milieu de rinçage MHSM-R1 ont été préparés à l'avance (Tableau 3.2) et stérilisés par autoclavage à 121 °C pendant 15 min. Pour le milieu d'exposition MHSM-1, le mercure a été ajouté 24 h avant l'expérience dans les différents contenants de téflon; la solution a été agitée avec un barreau magnétique pendant cette période de temps. Les solutions d'exposition stériles ont été filtrées (filtre en polycarbonate d'une porosité de 2 μ m, Poretics) juste avant d'être introduites dans les Erlenmeyers, afin d'éviter leur contamination par des particules. Le jour de l'expérience, les algues ont été récoltées par filtration (section 3.1.3) et les milieux de rinçage MHSM-R1 ou R2 ont été utilisés pour suspendre de nouveau les algues puis les rincer, avant de les inoculer dans les milieux d'exposition. La concentration de sulfate constitue la différence majeure entre les deux milieux de rinçage. Dans le milieu de rinçage MHSM-R2, utilisé lorsque le milieu d'exposition ne contenait pas de SO₄²⁻, le sulfate a été substitué par du nitrate afin d'obtenir une solution de rinçage sans sulfate (Tableau 3.2).

*3.1.8.2 Dosage du mercure (*²⁰³*Hg) intracellulaire*

Une source radioactive de la compagnie Eckert & Ziegler (HgCl₂ dans 1 M HCl) a été utilisée pour la totalité des expériences. L'activité du mercure radioactif était mesurée à l'aide d'un compteur gamma (Wallac 1480 WizardTM 3"). L'efficacité du compteur était déterminée en passant des dilutions (n = 3) de la solution de mercure radioactif d'activité connue. L'efficacité du compteur était de 52 ± 0,01 %. Le temps de comptage des échantillons a varié entre 1 000 et 2 000 secondes, avec un nombre limite commun de comptes de 10⁶. Le temps de comptage de 1 000 s était destiné spécifiquement aux analyses d'activités des solutions d'exposition, tandis que celui de 2 000 s servait à tout autre échantillon à plus faible activité radioactive. Les deux temps de comptage ont permis de minimiser l'erreur sur l'activité (≤ 5 %).

Le mercure était le seul élément à analyser. La fenêtre de mesure des désintégrations se situait autour de 279 keV. La préparation des échantillons d'algues a varié en fonction du but du dosage de métal, soit déterminer le mercure intracellulaire ou le mercure en solution. Pour le dosage du mercure intracellulaire, chaque filtre a été replié sur lui-même puis déposé dans un flacon à scintillation (Opticlear, borosilicate de 5 mL) contenant 2 mL d'eau ultrapure. Pour le dosage du mercure en solution, 2 mL ont été prélevés de chaque Erlenmeyer contenant la solution d'exposition puis injectés dans le même type de bouteille.

La normalisation du signal gamma en fonction de la surface totale des algues (en m²), indiqué sur les différents graphiques dans la section résultats (section 3.2), a été obtenue par transformation des résultats bruts du compteur gamma. Les comptes par minute (CPM) ont d'abord été transformés en désintégrations par minute (DPM), en les divisant par l'efficacité du compteur. Les DPM ont ensuite été divisés par λ , la constante de désintégration (équation 3.1), pour trouver le nombre d'atomes ²⁰³Hg. La division par le nombre d'Avogadro a permis d'obtenir le nombre de moles N de ²⁰³Hg.

$$\lambda = \frac{\ln 2}{t \frac{1}{2}} \tag{3.1}$$

où t $\frac{1}{2}$ est le temps de demi-vie du ²⁰³Hg (46,6 j) exprimé en secondes. Afin d'obtenir le nombre de moles de Hg_T, le nombre de moles de ²⁰³Hg était divisé par le rapport isotopique (équation 3.3) (corrigé pour la décroissance radioactive selon le jour de l'expérience, équation 3.2),

$$A = A_0 \bullet e^{\left[\frac{\ln 2 \cdot t}{t^{1/2}}\right]} \tag{3.2}$$

où A est l'activité à un temps t, A_0 est l'activité initiale et t¹/₂ est la demi-vie en jours du radio-isotope.

$$Rapport \ isotopique = \frac{2^{03} Hg}{Hg\tau}$$
(3.3)

où
$$^{203}Hg = \frac{A}{\lambda}$$
 et $Hg_T = ^{203}Hg + Hg$ non radioactif

Pour quantifier le mercure pris en charge par les algues, le nombre de moles de mercure total était divisé par la surface totale en m² (la densité cellulaire X le volume de solution en mL contenant les algues filtrées X superficie des algues).

3.1.8.3 Distinction entre métal adsorbé et métal intracellulaire

Il est important de distinguer le métal adsorbé à la surface de l'algue de celui absorbé par la cellule puisque l'effet biologique d'un métal adsorbé diffère de celui d'un métal qui a franchi la membrane cellulaire et atteint le milieu intracellulaire (cytosol). Lors d'expériences de prise en charge, une augmentation rapide de la quantité de métal accumulé dans les premières minutes de l'exposition est généralement associée à l'adsorption du métal à la surface de l'algue. La concentration du métal adsorbé atteint rapidement un plateau (< 5 min) lorsque les sites d'adsorption, composés principalement de groupements fonctionnels carboxylique, amino, thio, hydroxo et hydroxy-carboxylique, sont saturés (Bates *et al.*, 1982; Xue *et al.*, 1988). Le métal qui entre dans la cellule augmente de façon linéaire dans le temps jusqu'au moment où le taux d'entrée diminue ou que le taux de sortie augmente.

La quantité de métal adsorbé peut être déterminée en désorbant le métal par lavage des cellules à l'aide d'une solution qui contient un agent chélateur. L'extraction à l'EDTA a été employée lors des premières expériences de prise en charge du mercure. Cette méthode (EDTA 10^{-4} à 10^{-1} M) s'avère efficace pour désorber plusieurs métaux bivalents, tels que le Zn, le Cd, le Pb et le Cu (Bates *et al.*, 1982; Errécalde *et al.*, 1998; Hassler *et al.*, 2004). L'EDTA s'est toutefois avérée inefficace pour le Hg²⁺ (log K_{HgEDTA} = 29,5). La stabilité des complexes du Hg à la surface de la cellule est si élevée que l'EDTA ne réussit pas à concourir efficacement. Peu d'alternatives existent pour distinguer le mercure adsorbé du mercure intracellulaire.

Un ligand efficace doit avoir une bonne affinité avec le mercure et le complexe formé ne doit pas être pris en charge par les cellules algales. La cystéine a été considérée suite aux travaux en cours à l'INRS-ETE puisqu'elle possède une bonne affinité avec le mercure (log K₁= 37,8; log β_2 = 44 I = 0,1; (Petit et Powell, 2003)) et que le complexe Hg-cystéine n'est pas métabolisable par *C. reinhardtii* (section 3.2.2).

3.1.8.4 Expérience de cinétique de prise en charge du Hg(OH)₂

La prise en charge du mercure en l'absence de thiosulfate a d'abord été caractérisée. Dans cette première série d'expériences, l'accumulation du mercure par les algues dans le temps à une concentration initiale fixe de Hg a été évaluée. La cinétique d'accumulation du Hg entre 0 et 30 min a par la suite été mesurée à une concentration nominale fixe d'environ 20 nM. Aucun ligand n'a été ajouté de sorte que pratiquement tout le métal était présent sous la forme de Hg(OH)₂.

Les algues récoltées et rincées (section 3.1.8.1) étaient par la suite suspendues à nouveau dans 10 mL de solution MHSM-1 contenue dans une fiole d'HDPE de 45 mL. Le nombre d'algues et leur superficie moyenne ont rapidement été déterminés à l'aide du compteur de particules (section 3.1.4). Une fois cette étape terminée, les algues étaient distribuées dans les fioles d'exposition en polycarbonate (PC) et diluées avec le milieu d'exposition MHSM-1 (Tableau 3.2) jusqu'à une densité algale de 15 000 cellules•mL⁻¹. Cette densité a été choisie afin d'avoir une quantité suffisante d'algues pour détecter au compteur γ l'accumulation du Hg radioactif.

Des temps d'exposition de courte durée (5, 15, 30 minutes) ont été privilégiés pour minimiser la croissance des algues durant l'expérience ainsi que pour éviter de perturber la spéciation chimique du mercure par la production d'exsudats. Les expositions ont été réalisées à la température ambiante du laboratoire (21 °C) sur une plaque agitatrice du Conviron aux conditions décrites à la section 3.1.3. Pour chaque temps d'exposition, trois mesures ont été effectuées (i.e., trois fioles indépendantes ont été sacrifiées).

Une fois le temps d'exposition écoulé, une aliquote de 2 mL des Erlenmeyers a été transférée vers les fioles contenant de l'Isoton[®] II pour mesurer la densité algale (100 mL X 15 000 cellules•mL⁻¹ = 1 500 000 cellules). Les algues contenues dans 100 mL de milieu d'exposition ont ensuite été récoltées sur deux filtres de polycarbonate de 2 μ m superposés. Le deuxième filtre a servi à évaluer le bruit de fond causé par l'adsorption du mercure sur le filtre. La différence entre les deux filtres représentait la portion du métal prise en charge par les algues.

La récolte terminée, les algues sur les filtres ont été rincées avec 10 mL de solution d'EDTA 10^{-2} M pendant 10 minutes. L'EDTA n'a toutefois pas permis de désorber le mercure de la surface externe de l'algue (section 3.1.8.3); un rinçage avec 10 mL de cystéine (100 mM, pH 9) pendant 10 minutes a été pratiqué avec succès. Les filtres utilisés pour les solutions d'exposition, les aliquotes des différentes bouteilles d'exposition, les filtrats des Erlenmeyers contenant les solutions d'exposition, le filtrat des solutions de rinçage ainsi que les filtres ont été individuellement envoyés au compteur γ (Figure 3.2). Lorsqu'il s'agissait de filtres à compter, il fallait les recouvrir avec 2 mL d'eau ultrapure pour uniformiser les conditions de comptage. Rapidement après la fin de l'expérience, les échantillons d'algues prélevés dans les milieux d'exposition étaient passés au compteur de particules afin d'établir la superficie et le nombre de cellules par mL, deux paramètres qui ont servi à déterminer la quantité de mercure pris en charge par les algues (nmol·m⁻²).

La prise en charge a été mesurée après des temps de 5, 15 et 30 min d'exposition. La concentration nominale du mercure total variait entre 17 et 44 nM dans ces expériences. Les algues ont été rincées avec de l'EDTA 10⁻² M, ce qui signifie que le mercure intracellulaire exprimé à la figure 3.3 comprend le mercure intra- et extracellulaire.



Figure 3.3: Cinq essais indépendants de prise en charge du mercure par *C. reinhardtii* en présence d'une concentration nominale entre 17 et 44 nM de HgT en milieu MHSM-1 à pH 7. Les algues ont été rincées à l'EDTA (10⁻² M). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Voir le tableau 3.10 pour les conditions d'exposition.

Tableau 3.9:Bilan de masse

[²⁰³ Hg] nominal contenu dans les milieux d'exposition 2 100 (pmol/100 mL)						
	Moyenne ⁽¹⁾	%	Écart-type			
Entrées	(pmol/100 mL)					
²⁰³ Hg mesuré dans les milieux d'exposition après 24 h	1762	83,9	3,1			
d'équilibre						
	Moyenne ⁽¹⁾	%	Écart-type			
Sorties	(pmol/100 mL)					
Adsorption dans les parois du contenant de téflon après 24 h	338,7	16,1	3,1			
d'équilibre,						
Adsorption sur le contenant de verre lors de la filtration de la	0,0	0,0	0,0			
solution d'exposition.						
Adsorption sur le contenant de PC lors de l'exposition des	38,9	1,9	4,0			
algues.						
Filtre qui a servi à filtrer la solution d'exposition avant	7,1	0,3	R			
l'exécution de l'expérience.						
Filtre sur lequel les algues exposées au 203 Hg ont été filtrées	3,7	0,2	0,6			
Filtrat de la solution d'exposition suivant la filtration des	1 532	73,0	65,9			
algues.						
Solution de rinçage des algues à la cystéine après leur filtration.	10,3	0,5	0,9			
Somme	1 931	95,5				

(1); Moyennes de trois temps d'exposition (elles-mêmes sont des moyennes de trois mesures par temps d'exposition)

3.2.2 Cinétique de prise en charge du Hg(OH)₂

Cette première série d'expériences avait pour but de déterminer la prise en charge du mercure (sous la forme prédominante de Hg(OH)₂) par *C. reinhardtii* en absence de thiosulfate. Plusieurs essais ont été effectués afin de se familiariser avec le protocole expérimental. Ils ont été faits de façon indépendante avec le même milieu d'exposition MHSM-1 avec des concentrations en SO₄²⁻ de 81,5 μ M. Le mercure ne forme pas de complexes stables avec le sulfate. Pour les concentrations en sulfate employées, la présence de complexes avec le mercure était négligeable et donc le mercure était considéré présent uniquement sous forme de Hg(OH)₂.

atteint un maximum de croissance moins important lorsqu'exposées à une concentration de 1 000 μ g•L⁻¹ que lorsque le mercure était absent. Les deux études ont exposé les algues sur une plus longue période et à des concentrations en mercure beaucoup plus élevées que lors de nos expériences. Les résultats avec des concentrations en mercure qui s'approchent le plus des conditions d'exposition qu'on a utilisées n'indiquent pas une diminution très significative de la croissance des algues. On peut donc supposer qu'avec un temps d'exposition de 30 min et une concentration en mercure maximale de 34 μ g•L⁻¹, il n'y avait pas de risque d'affecter le cycle de croissance des algues lors des expériences de prise en charge.

3.2 Résultats

3.2.1 Bilan de masse

Le mercure est reconnu pour s'adsorber aux parois de différents matériaux (Litman, 1975). Comme nous avons utilisé divers types de contenants, il était important de déterminer où à travers le processus expérimental le mercure pouvait s'adsorber. L'acide nitrique (bain d'acide 10 %) a été préalablement dosé afin de connaître la concentration de ²⁰³Hg de base pour ensuite la déduire de toutes les autres mesures citées au tableau 3.9. À chacun des temps d'exposition lors d'une expérience typique de prise en charge, on a mis de côté les contenants utilisés à chaque étape du processus. Ces contenants ont été remplis d'acide pendant 24 h, échantillonnés et les aliquotes passées au compteur gamma pour établir la concentration de ²⁰³Hg (en pmol par 100 mL d'acide). Le bilan de masse ne pouvait être complet sans la mesure du ²⁰³Hg présent dans le filtrat de la solution d'exposition suivant la filtration des algues, dans la solution de rinçage des algues à la cystéine après leur filtration et sur le filtre qui a servi à filtrer la solution d'exposition.

en charge après un temps d'exposition fixe de 15 min a été mesurée en fonction de la concentration de sulfate, en l'absence de thiosulfate. La filtration des algues provenant d'un milieu de culture avec sulfate a précédé le rinçage avec la solution MHSM-R2 (sans sulfate). Avant de filtrer et rincer à nouveau les algues, elles ont été suspendues à nouveau et conservées au Conviron dans un milieu de culture (MHSM-2) sans sulfate (en remplaçant le MgSO₄ par le MgNO₃) pendant 4 h. La concentration de sulfate a été augmentée dans les milieux d'exposition sans thiosulfate de F1 à F5 (Tableau 3.8).

3.1.10 Risques associés aux concentrations de mercure utilisées lors des expériences de prise en charge

Les concentrations de Hg utilisées lors des expériences de prise en charge décrites à la section précédente étaient élevées si on les compare à celles présentes en milieu naturel (20 pM). De plus, la concentration en Hg biodisponible (34 µg/L ou 170 nM, sans présence de matière organique) était comparable à celles utilisées lors d'expériences de toxicité où des signes de sensibilité au mercure ont été observés chez quelques espèces d'algues unicellulaires (Eisler, 2006). De par ces deux observations, la sensibilité des algues (la réduction de croissance, le développement d'anomalies, l'inhibition de la photosynthèse et la mort) aurait pu être une préoccupation pour le bon déroulement des expériences. Cependant, les différentes espèces d'algues n'ont pas la même sensibilité lorsqu'exposées à une même concentration de Hg, de par des différences biologique, chimique et physique. Dans le cas de C. reinhardtii, deux études (Cain et Allen, 1980; Weiss-Magasic et al., 1997) ont été réalisées afin de tester l'effet du mercure sur la croissance des algues. Cain et Allen (1980) ont exposé les algues sur une période de sept jours à des concentrations de Hg qui variaient entre 500 μ g·L⁻¹ et 1 400 μ g·L⁻¹ (sous forme de HgCl₂). À la fin de la période d'exposition à une concentration de 500 µg•L⁻¹, ils ont observé une diminution de croissance de 7 % par rapport à une culture témoin non exposée au mercure. Weiss-Magasic et al. (1997), quant à eux, ont exposé les algues sur une période de 21 jours à un pH de 7,9 et des concentrations de Hg (sous forme de HgCl₂) qui variaient entre 1 000 et 10 000 μ g·L⁻¹. Les algues ont crû moins rapidement et ont

5) La cinquième expérience a servi à évaluer si le complexe Hg-cystéine est pris en charge au rinçage lors de la récolte des algues (section 3.1.3). Un milieu d'exposition (MHSM-1) sans mercure a été préparé, dans lequel les algues ont été inoculées et agitées pendant 15 min (section 3.1.2). Une fois la récolte sur filtre terminée, les algues étaient submergées pendant une période de 10 min dans 10 mL d'une solution à base d'eau ultrapure dont la concentration nominale de Hg était de 200 nM et qui contenait de la cystéine (100 mM) à pH 9 (Tableau 3.1). Cette étape devait simuler l'extraction du Hg extracellulaire, pratiquée sur les algues récoltées après exposition au mercure radioactif. Après la période de 10 min, les algues étaient filtrées et ensuite les filtres ont été passés au compteur γ pour identifier si le complexe Hg – cystéine avait traversé la membrane biologique.

6) La sixième expérience a servi à évaluer si la présence de sulfate pouvait augmenter la prise en charge du Hg comme entrevue lors de l'expérience cinq. La prise en charge après un temps d'exposition fixe de 15 min a été mesurée en fonction de la concentration de sulfate, en l'absence de thiosulfate. La concentration de sulfate a été augmentée dans les milieux d'exposition sans thiosulfate de E1 à E5 (Tableau 3.8).

Expérience	Variables	E1	E2	E3	E4	E5
	$[Hg]_T(nM)$	30	30	30	30	30
6	$[SO_4^{2^+}](\mu M)$	0	40	81,5	120	160
	$[S_2O_3^{2^*}](nM)$	0	0	0	0	0
Expérience	Variables	Fl	F2	F3	F4	F5
	$[Hg]_{T}(nM)$	41	41	41	41	41
7	$[SO_4^{2^+}]$ (μM)	0	40	81,5	120	160
	$[S_2O_3^{2*}](nM)$	0	0	0	0	0

Tableau 3.8: Conditions d'exposition au mercure pour la sixième et septième expérience

7) La septième expérience a servi à évaluer si l'absence de sulfate dans le milieu de culture, préalablement à la période d'exposition, pouvait augmenter la prise en charge du sulfate et du Hg par cotransport, comme entrevue lors de l'expérience six. La prise

Expérience	Variables	CI	C2	C3	C4	C5
	$[Hg]_{T}(nM)$	24	24	24	24	24
2	$[Hg(OH)_2](nM)$	24	19	14	4	0
2	[SO ₄ ²⁻] (µM)	0	0	0	0	0
	$[S_2O_3^{2-}](nM)$	0	10	20	40	60

Tableau 3.6: Conditions d'exposition au mercure pour la troisième expérience

4) Afin d'éviter des différences dues à la variation intergénérationnelle de deux lots d'algues dans les résultats, les expériences 2 et 3 ont été combinées dans la quatrième expérience. La prise en charge après un temps d'exposition fixe de 15 min a été mesurée en fonction de la concentration de thiosulfate en présence et en l'absence de sulfate (MgSO₄•7H₂O remplacé par le Mg(NO₃)₂). La solution mère de mercure radioactif étant vieille, nous avons dû augmenter la concentration nominale de mercure total, qui a été maintenue à 158 nM dans chaque milieu. La concentration de thiosulfate a été augmentée dans les milieux d'exposition sans sulfate de D1 à D4 et la concentration de thiosulfate a été augmentée dans les milieux d'exposition avec sulfate de D5 à D8 (Tableau 3.7) pour complexer progressivement le mercure.

Expérience	Variables	DI	D2	D3	D4
	$[Hg]_T(nM)$	158	158	158	158
	$[Hg(OH)_2](nM)$	158	117	83,5	42
	$[SO_4^{2^-}](\mu M)$	0	0	0	0
	$[S_2O_3^{2^2}](nM)$	0	100	158	250
4	Variables	D5	D6	D7	D8
	$[Hg]_{T}(nM)$	158	158	158	158
	$[Hg(OH)_2](nM)$	158	117	83,5	42
	$[SO_{4}^{2^{2}}] (\mu M)$	81,5	81,5	81,5	81,5
	$[S_2O_3^{2^2}](nM)$	0	100	158	250

Tableau 3.7: Conditions d'exposition au mercure pour la quatrième expérience

Expérience	Variables	A1	A2
	$[Hg]_T(nM)$	22	2
	$[Hg(OH)_2](nM)$	20	0
L	[SO ₄ ²⁻] (µM)	81,5	81,5
	$[S_2O_3^{2-}](nM)$	0	1000

Tableau 3.4: Conditions d'exposition au mercure pour la première expérience

2) La deuxième expérience a permis de vérifier la gamme de concentrations de thiosulfate où la prise en charge du mercure serait maximale. La prise en charge, après un temps d'exposition fixe de 15 min a été déterminée en fonction de la concentration de thiosulfate en présence de sulfate. La concentration nominale de mercure total a été maintenue à 24 nM dans chaque milieu. La concentration de thiosulfate dans les milieux d'exposition B1 à B5 (Tableau 3.5) a été augmentée afin de complexer progressivement le mercure.

Expérience	Variables	Bl	B2	B3	B4	В5
	$[Hg]_T(nM)$	24	24	24	24	24
	$[Hg(OH)_2](nM)$	24	19	14	4	0
2	[SO ₄ ²⁻] (µM)	81,5	81,5	81,5	81,5	81,5
	$[S_2O_3^{2-}](nM)$	0	10	20	40	60

Tableau 3.5: Conditions d'exposition au mercure pour la deuxième expérience

3) La troisième expérience a consisté en une prise en charge avec un temps d'exposition fixe de 15 min. La prise en charge a été mesurée en fonction de la concentration de thiosulfate sans la présence de sulfate (MgSO₄•7H₂O remplacé par le Mg(NO₃)₂). La concentration nominale de mercure total a été maintenue à 24 nM dans chaque milieu. La concentration de thiosulfate dans les milieux d'exposition C1 à C5 (Tableau 3.6) a été augmentée.



Figure 3.2: Schéma de la méthodologie employée pour mesurer la prise en charge du mercure par des algues.

3.1.9 Cinétique de prise en charge du complexe Hg-thiosulfate

Au total, six expériences ont été réalisées.

1) Dans une expérience exploratoire, la cinétique d'accumulation du mercure a été déterminée après 5, 15 et 30 min dans deux milieux d'exposition (A1, A2; Tableau 3.4). La concentration nominale de Hg total était similaire dans les deux milieux d'exposition, soit 20 nM. La concentration libre de Hg était cependant différente dans les deux milieux parce que le thiosulfate a été ajouté dans le milieu A2 (Tableau 3.4), ce qui a permis de complexer la quasi-totalité du mercure en solution. Les deux milieux contenaient du sulfate à une concentration égale à celle habituellement employée dans le milieu d'exposition MHSM-1. Les milieux témoins (qui contenaient uniquement le mercure principalement sous forme $Hg(OH)_2$) et d'exposition (où le mercure était complexé au thiosulfate) étaient inoculés avec le même lot d'algues pour minimiser les variations intergénérationnelles.

L'allure des courbes à la figure 3.3 démontre que l'accumulation intracellulaire était rapide et linéaire sur une période de 30 min. Cette linéarité laisse croire qu'à cette concentration, le taux de sortie du Hg n'est pas important sur 30 min. Il est à noter que les mesures initiales de prise en charge du mercure (t = 5 min) étaient élevées (la régression linéaire ne passait pas par l'origine), démontrant que le rinçage à l'EDTA n'était pas efficace à désorber le mercure à la surface de l'algue. La variabilité des mesures et l'utilisation d'un lot différent d'algues pour chaque expérience expliqueraient la variation des taux de prise en charge observée à la figure 3.3. En ce qui concerne les concentrations de mercure pour ces expériences, le tableau 3.10 résume les concentrations nominales et mesurées. Il contient également toutes les mesures de Hg des expériences de cinétiques effectuées en absence de thiosulfate.

 Tableau 3.10: Concentrations nominales et mesurées des expériences de prise en charge du Hg sans présence de thiosulfate.

No de	Courbes ciblées	[Hg _T] nominales	Moy. des [Hg _T]	%	Écart-type
figure	·	(nM)	mesurées (nM) ⁽¹⁾		
3,3	1	44,4	24,8	56	0,41
	2	17,5	9,3	53	0,15
	3	21,0	14,3	68	
	4	21,6	17,6	81	0,04
	5	19,5	13,9	71	0,21
3,4	Rinçage EDTA	44,4	24,8	56	0,41
	Rinçage cystéine	55,4	31,4	57	0,18
3,5	Avec agitation	21,6	17,6	81	0,04
	Sans agitation	23,4	17,6	75	0,12
	En médaillon	30	20,5	68	

(I) :

Moyennes des trois temps d'exposition (elles-mêmes sont des moyennes de trois mesures par temps d'exposition). La différence entre les concentrations nominales et mesurées était surtout due à l'adsorption sur les parois des contenants (Tableau 3.9).



Figure 3.4: Essais indépendants de cinétique de prise en charge du mercure par *C. reinhardtii* en présence d'une concentration nominale entre 44 et 55 nM de HgT en milieu MHSM-1 à pH 7. ● : algues rincées à l'EDTA (10⁻² M) ○ : algues rincées à la cystéine (100 mM). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Voir le tableau 3.10 pour les conditions d'exposition.

Vu l'inefficacité de l'EDTA à désorber le mercure extracellulaire des algues, nous avons fait un essai additionnel avec de la cystéine (100 mM à pH 9). Deux lots différents d'algues ont été utilisés dans cette variante de la première expérience. Les résultats de cette expérience démontrent la même tendance de linéarité de la prise en charge du mercure. Contrairement aux expériences illustrées à la figure 3.3, le rinçage à la cystéine a été très efficace à désorber le mercure (Figure 3.4). On ne retrouve plus après 5 min cet excédent de mercure adsorbé à la surface des algues (36 nmol Hg·m⁻²), mais plutôt une faible quantité (3 nmol Hg·m⁻²). Même si on ne peut être certain que tout le mercure a été désorbé, l'extraction avec la cystéine est nettement plus efficace que celle avec l'EDTA et, par conséquent, la cystéine a été utilisée pour les prochaines expériences. Comme mentionné à la section 3.1.9, l'expérience six visait à déterminer si le complexe Hg-cystéine était pris en charge par l'algue. Sur

une période de 10 min (selon les conditions de rinçage) ~0 nmol Hg•m⁻² a été mesuré au compteur gamma.





L'agitation semble affecter la prise en charge du Hg (Figure 3.5). La courbe avec agitation en est une représentative de la prise en charge du mercure tandis que celle sans agitation provient d'une expérience où les Erlenmeyers qui contenaient la solution d'exposition et les algues était déposés sur un chariot (luminosité ~19 μ mol·m⁻²·s⁻¹) et non sur une plaque agitatrice (avec une luminosité plus importante de 100 ± 10 μ mol·m⁻²·s⁻¹). Il y avait une augmentation apparente de la prise en charge dans le temps entre 12 et 16 fois selon que les expériences aient été réalisées avec ou sans agitation. La linéarité également était affectée par l'agitation (r² = 0,85 lorsque quiescent comparativement à r² = 0,99 lorsqu'agité). On a répété les expériences avec et sans agitation (figure en médaillon de la figure 3.5) sur un seul temps d'exposition dans les mêmes conditions d'éclairage et avec le même lot d'algues; les résultats vont dans le même sens que la première expérience, mais l'effet sur la prise en charge du Hg est nettement moins important (différence non significative, test de Student, P > 0.05).

3.2.3 Cinétique de prise en charge du complexe mercure-thiosulfate

La première expérience de cinétique consistait à déterminer la prise en charge du mercure par *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de thiosulfate.





Cette première expérience a permis de mesurer simultanément la prise en charge du mercure sous forme de $Hg(OH)_2$ et celle du mercure complexé au thiosulfate, avec le même lot d'algues. De cette façon, on a pu établir une comparaison directe et constater l'effet de l'ajout du thiosulfate tout en évitant une discontinuité des résultats due à l'utilisation de deux lots différents d'algues.

Pour ce faire, le milieu d'exposition simple MHSM-1 a été utilisé parce que ne contenant pas de ligands pouvant concourir pour la complexation du mercure. La concentration totale de mercure pour les deux expériences était de 20 nM tandis que celle du thiosulfate pour la deuxième expérience était fixe à 1 μ M. De cette façon, on s'assurait que le mercure présent serait complexé au thiosulfate. À la figure 3.6, la prise en charge du mercure sans ajout de thiosulfate suit relativement la même linéarité vue précédemment à la figure 3.3. Cependant, lorsque le mercure était quasi complètement complexé sous forme Hg(S₂O₃)₂²⁻ (Figure 1.2), la prise en charge du mercure était inexistante. En ce qui concerne les concentrations de mercure pour ces deux expériences, le tableau 3.11 résume les concentrations nominales et mesurées. Il contient également toutes les mesures de Hg des expériences de prise en charge effectuées avec la présence de thiosulfate. On note que les pertes de Hg sont plus importantes en absence de thiosulfate.

 Tableau 3.11: Concentrations nominales et mesurées des expériences de prise en charge du complexe Hg-thiosulfate.

No de tableau	No de figure	Courbes ciblées	[Hg _T] nominales	Moy. [Hg _T] mesurées	Écart-type
3,4	3,6	Sans $S_2O_3^{2-}$	22,0	17,6	0,0
(milieu A)	· · ·	Avec $S_2O_3^{2-}$	23,0	25,1	0,2
3,5	3,7	Avec $S_2O_3^{2}$	24,0	19,2	1,5
(milieu B)					
3,6	3,8	Avec $S_2 O_3^{2-}$	24,0	22,6	2,2
(milieu C)					
3,7	3,9	Avec $S_2O_3^{2-} + SO_4^{2-}$	158	155	14,3
(milieu D)		Avec $S_2O_3^{2-}$ sans SO_4^{2-}	158	152	17,3
3,8	3,10	Avec SO_4^2 et sans $S_2O_3^2$	30	19,6	2,0
(milieu E)					
. 3,8	3,11	Avec SO_4^{2-} et sans $S_2O_3^{2-}$	41	35,7	1,1
(milieu F)			· · ·		

Dans la deuxième expérience on a fait varier la concentration de thiosulfate pour mesurer l'effet sur l'accumulation de mercure intracellulaire (Figure 3.7). La concentration totale de mercure dans les milieux d'exposition (MHSM-1) était de 24 nM tandis que la concentration de Hg non complexé par le thiosulfate variait entre 0 et 24 nM (Tableau 3.5). La concentration de $SO_4^{2^-}$ était maintenue constante à 81,5 µM, mais celle du thiosulfate variait entre 0 et 60 nM. Le temps d'exposition était de 15 min. Sans aucun ajout de thiosulfate au milieu d'exposition, la prise en charge du mercure était comparable à celle déjà observée dans les expériences antérieures. Cependant, la complexation croissante du mercure par le thiosulfate dans les milieux B2 à B5 a provoqué une diminution progressive jusqu'à des niveaux presque nuls de Hg pris en charge par l'algue verte.





La troisième expérience a permis de vérifier l'effet de la concentration du thiosulfate dans les milieux d'exposition sur la cinétique de prise en charge du mercure en l'absence de sulfate à un temps d'exposition fixe de 15 min. La concentration totale de mercure dans les milieux d'exposition (MHSM-2) était constante à 24 nM tandis que la concentration de Hg non complexé par le thiosulfate variait entre 0 et 24 nM (Tableau 3.6). Lorsqu'on a fait varier la concentration de thiosulfate entre 0 et 60 nM dans les milieux C2 à C5, la complexation du mercure par le thiosulfate a provoqué une diminution progressive du mercure pris en charge (Figure 3.8), tout comme dans le cas où le sulfate était présent dans les milieux d'exposition (Figure 3.7). On note sur cette figure qu'à une concentration nulle de thiosulfate (et de sulfate), la prise en charge du mercure semble moins élevée que dans l'expérience précédente (Figure 3.7 11,3 nmol Hg·m⁻²), laquelle a été réalisée en présence de sulfate.



Figure 3.8: Effet de la concentration du thiosulfate dans les milieux d'exposition sur la cinétique de prise en charge du mercure à concentrations Hg(OH)₂ variables et Hg_T (24 nM) constantes en présence de thiosulfate sans sulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Voir les tableaux 3.6 et 3.11 pour les conditions d'exposition.

La quatrième expérience a permis de mesurer simultanément (avec le même lot d'algues) la prise en charge par les algues du mercure complexé au thiosulfate avec et sans sulfate. Dans les deux sous-expériences (avec et sans sulfate), le temps d'exposition était fixe à 15 min et la concentration nominale de mercure dans les milieux d'exposition (MHSM-2) était constante à 158 nM. La concentration de Hg non complexé avec le thiosulfate variait entre 42 et 158 nM. La complexation du mercure s'est effectuée progressivement à travers les différents milieux d'exposition en augmentant la concentration de thiosulfate (Tableau 3.7). Les deux expériences suivent la même tendance, celle d'une diminution progressive du mercure pris en charge par les algues, mais la prise en charge est moins importante en l'absence de sulfate (Figure 3.9), cet effet étant davantage évident à faible [S₂O₃].





Effet de la concentration du thiosulfate dans les milieux d'exposition sur la prise en charge du mercure à concentrations de $Hg(OH)_2$ variables et de Hg_T constantes (158 nM) • : en présence de thiosulfate, mais avec sulfate et \circ : en présence de thiosulfate, mais sans sulfate. Le même lot d'algues était utilisé et le temps d'exposition fixé à 15 min. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Voir les tableaux 3.7 et 3.11 pour les conditions d'exposition. La sixième expérience a permis de mesurer simultanément (avec le même lot d'algues) la prise en charge du mercure par les algues avec présence croissante de sulfate. Le temps d'exposition était fixe à 15 min et la concentration nominale de mercure dans les milieux d'exposition (MHSM-2) était constante à 30 nM. L'augmentation de la concentration en sulfate de 0 à 160 nM (Tableau 3.8) n'affecte pas la spéciation du mercure, qui demeure sous forme de $Hg(OH)_2$ (Tableau 3.8). L'ajout d'une faible quantité de SO_4^{2-} ne semble pas augmenter l'accumulation de Hg par les algues. Cependant, lorsque la $[SO_4^{2-}]$ passe de 80 à 120 µM, la prise en charge augmente d'un facteur de 1,7 pour ensuite redescendre lorsque le niveau de sulfate passe à 160 µM (Figure 3.10).





Effet de la concentration de sulfate dans les milieux d'exposition sur la prise en charge du mercure à des concentrations de Hg_T nominales (30 nM) • : Hg intracellulaire • : Hg total mesuré pour chaque solution d'exposition. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Voir les tableaux 3.8 et 3.11 pour les conditions d'exposition.



Figure 3.11: Effet de la concentration de sulfate dans les milieux d'exposition sur la prise en charge du mercure par les algues, préalablement incubées dans un milieu de culture sans sulfate pendant 4 h, à des concentrations de Hg_T nominales (41 nM)
• : Hg intracellulaire. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois mesures. Voir les tableaux 3.8 et 3.11 pour les conditions d'exposition.

La septième expérience a servi à évaluer si l'absence de sulfate dans le milieu de culture, préalablement à la période d'exposition, pouvait augmenter la prise en charge du sulfate et du Hg par cotransport. Le temps d'exposition était fixe à 15 min et la concentration nominale de mercure dans les milieux d'exposition (MHSM-2) était constante à 41 nM. L'augmentation de la concentration en sulfate de 0 à 160 nM (Tableau 3.8) n'affecte pas la spéciation du mercure, qui demeure sous forme de $Hg(OH)_2$ (Tableau 3.8). On a posé l'hypothèse que l'absence de sulfate dans le milieu de culture pendant une période de 4 h aurait stimulé la prise en charge du sulfate par les algues (Yildiz *et al.*, 1994) et par cotransport celle du Hg, mais il ne semble pas y avoir de différence apparente dans le comportement des algues comparativement à

l'expérience six (où il n'y avait pas de pré-incubation sans sulfate, Figures. 3.10 et 3.11).
4. Discussion

Comme mentionné précédemment, cette recherche avait initialement pour but de définir l'effet de la complexation du mercure par le thiosulfate sur la biodisponibilité de ce métal. Dès le départ du projet, il était important de réaliser les expériences de prise en charge dans des conditions environnementales représentatives du milieu naturel. La plupart des mesures de thiosulfate rapportées dans la littérature scientifique ont été effectuées sur des sources hydrothermales, dans les milieux marins ou dans les lacs salins; peu ont été réalisées en eau douce (Tableau 1.3). Le premier objectif consistait donc déterminer la concentration réelle de thiosulfate dans quatre lacs du Québec.

Par ailleurs, en ce qui concerne le rôle du thiosulfate dans le cycle biogéochimique du mercure, nous voulions tester l'hypothèse que le thiosulfate augmenterait la prise en charge du mercure chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce ligand et le sulfate partagent le même système de transport chez les bactéries (Dreyfuss, 1964; Stahlmann *et al.*, 1991; Sirko *et al.*, 1995) et les algues (Hodson *et al.*, 1968; Perez-Castineira *et al.*, 1998). De ce fait, le complexe mercure-thiosulfate entrerait à l'intérieur de la cellule par mimétisme via le même transporteur membranaire et ajouterait une voie d'accumulation à celles déjà existantes (par transport facilité impliquant un système de transport de métaux essentiels (Golding *et al.*, 2002) ou par diffusion passive (Mason *et al.*, 1996)). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons suivi la prise en charge de mercure sur une courte période de temps de moins de 30 min, en présence ou non de thiosulfate. Il s'agissait du second objectif de cette recherche.

4.1 Mesure de thiosulfate dans les lacs

En milieu naturel, le $S_2O_3^{2^-}$ est susceptible de se retrouver dans l'environnement via la métabolisation des sulfates par les bactéries sulfato-réductrices (Jorgensen, 1990a; Jorgensen, 1990b; Sass *et al.*, 1992; Van Gemerden, 1993). Il peut également être associé aux rejets anthropiques (Purcell et Peters, 1998; Vigneault *et al.*, 2003). Pour déterminer les concentrations en thiosulfate dans les eaux lacustres, nous avons eu recours à une méthode de préconcentration de l'eau échantillonnée (Druschel *et al.*, 2003). Elle consiste en une élution séquentielle des ions sulfate et thiosulfate à partir d'une résine échangeuse d'anions (à l'aide d'un éluant de KCl 0,1 M et 0,5 M respectivement). Ce protocole à permis de lier les ions présents dans la solution échantillonnée aux groupements fonctionnels de la résine afin d'obtenir un éluat concentré. Avec cet éluat, on pouvait doser au chromatographe ionique de faibles concentrations de thiosulfate.

À partir de la méthode originale, quelques modifications ont été faites afin d'adapter la méthode de Druschel et al. (2003) à la réalité des faibles concentrations potentiellement présentes dans les lacs du Québec. En effet, cette méthode avait été développée pour analyser des concentrations de thiosulfate présentes dans des sources hydrothermales de l'ordre de 50 μ M (c'est-à-dire des concentrations de ~100X supérieur aux concentrations que nous avons mesurées). Avec une solution synthétique de faible concentration de thiosulfate, des ajustements ont été faits sur le débit de passage de la solution échantillonnée (2,0 mL/min) et de l'éluant (20 mL/min), sur la quantité d'éluant (30 mL) et sur le volume de la solution échantillonnée (1 L) afin de maximiser le taux de récupération du thiosulfate (85 %). L'utilisation du KCl (0,1 M) initialement prévue par Druschel et al. (2003) pour récupérer le sulfate n'a pas été retenue. Le faible taux de récupération (60 %), même avec un grand volume d'éluant, nous a amenés à doser les sulfates directement par chromatographie ionique sans préconcentration. De plus, l'utilisation du chromatographe ionique diffère de celle préconisée dans la méthode de Druschel et al. (2003), notamment au niveau de la colonne (AS18), du type d'éluant et de la concentration de celui-ci (KOH 19 mM).

Dans la colonne d'eau du lac Pink, on a détecté du thiosulfate à deux profondeurs $(0,27 \ \mu\text{M} \text{ à } 12,2 \text{ m et } 0,49 \ \mu\text{M} \text{ à } 12,4 \text{ m})$ par rapport à la profondeur totale de 19,8 m. De plus, à 7,9 m dans la colonne d'eau du lac Holland (profondeur totale de 9 m), nous avons constaté la présence de thiosulfate à une concentration de 0,5 µM. Dans les deux cas, ces pics de thiosulfate se trouvaient situés, tels qu'anticipés, immédiatement sous la thermocline, là où l'oxygène est faible et les sulfures apparaissent. La comparaison de ces valeurs à la littérature scientifique est cependant difficile, peu de mesures en lac ayant été réalisées. Le tableau 1.3 indique que le lac Pavin (Olive et Boulegue, 2004) et le lac Suigetsu (Kondo et al., 2000) ont été échantillonnés pour mesurer la [S2O3²⁻]. L'aspect méromictique, la présence de sulfures et une anoxie dans la colonne d'eau de ces deux lacs semblent favoriser la production de thiosulfate. Des similarités existent entre ces plans d'eau et ceux échantillonnés dans le cadre de la présente étude, ce qui pourrait expliquer la présence de thiosulfate dans deux des lacs visités. Dans le cas du lac Pavin, l'oxydation de la matière organique par les bactéries a lieu dans le sédiment par réduction des sulfates et méthanogénèse. Puis, la diffusion, à partir du sédiment, a entraîné un enrichissement de thiosulfate des eaux du fond.

L'influence des bactéries sulfato-réductrices est également suggérée pour expliquer la forte concentration en thiosulfate du lac Suigetsu. Les profils de thiosulfate et de sulfures démontrent une variation similaire avec la profondeur, ce qui suggère un lien entre les deux espèces. Le $S_2O_3^{2^2}$ a vraisemblablement été généré par une oxydation chimique et biologique du H₂S débutant à l'interface oxique/anoxique (7-8 m) pour atteindre un maximum à une profondeur de 15 m (Kondo *et al.*, 2000).

Le lac Pink est également considéré comme un lac méromictique (Dickman, 1975; Jones *et al.*, 1984) et il contient une bactérie photosynthétique rose qui utilise le sulfate (présente dans l'eau profonde) au lieu de l'oxygène dans son processus de transformation de la lumière en énergie (Dickman, 1973). Ces deux éléments sont similaires à ceux retrouvés au lac Suigetsu et expliqueraient la présence du thiosulfate dans ce lac.

Concernant le lac Holland, il n'est pas méromictique et est peu profond comparativement aux autres lacs ciblés. Peu d'informations étaient disponibles sur ce lac, autres que celles transmises par un autre groupe de recherche de l'INRS-ETE et qui faisaient état de la présence d'une couche importante de bactéries sous la thermocline. L'action de ces bactéries, la présence de sulfures et une anoxie autour de 6 m expliqueraient le fait qu'une concentration mesurable de S₂O₃²⁻ était présente à 7,9 m.

Les concentrations de thiosulfate des lacs Pavin et Suigetsu sont beaucoup plus élevées que celles rencontrées dans les lacs Pink et Holland. Ce phénomène peut être attribuable à plusieurs facteurs. On peut spéculer que des concentrations de H_2S de l'ordre de 14 mM (lac Pavin) et 7 mM (lac Suigetsu), jumelées à une présence bactérienne plus importante, auraient pu provoquer une augmentation de la production de thiosulfate.

4.2 Prise en charge du mercure en absence de thiosulfate

Peu de travaux de recherche ont été menés relativement à la prise en charge du mercure inorganique à la base de la chaîne alimentaire. Des travaux faits sur la bactérie *Desulfobulbus propionicus* (1pr3) ont démontré une prise en charge par diffusion passive (Benoit *et al.*, 2001b) tandis que Golding *et al.* (2002) ont plutôt établi une prise en charge facilitée du mercure inorganique chez *Vibrio anguillarum* et *Escherichia coli*. Chez le phytoplancton, Mason *et al.* (1996) ont mesuré l'accumulation du mercure inorganique (sous forme HgCl₂) par la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* sur une période de 4 h. Leurs résultats ont démontré une prise en charge par diffusion passive du mercure inorganique quand la concentration de Cl' était $\geq 10^{-3.3}$ M.

Nos travaux s'ajoutent aux recherches précédemment mentionnées. Dans un premier temps, pour déterminer la prise en charge du mercure inorganique (sous forme $Hg(OH)_2$) en absence de thiosulfate, nous avons réalisé des expériences de cinétique avec un milieu d'exposition simplifié (avec sulfate), une concentration de Hg_T fixe et

de courtes périodes d'exposition (5, 15, 30 min). Les expériences de prise en charge dans cette première partie n'ont pas été réalisées avec un lot commun d'algues. Comme le démontrent les taux de prise en charge lorsque $[Hg_T] \sim 20$ nM, il existe une certaine variabilité dans les valeurs de prise en charge mesurées dans des expériences distinctes, avec des lots d'algues différents. Ceci confirme l'importance d'utiliser la même culture d'algues pour obtenir une comparaison valable (comparer les figures 3.3 et 3.4). Les expériences de prise en charge réalisées avec des algues devraient être généralement planifiées de sorte qu'un seul lot homogène de cellules soit utilisé quand on doit comparer diverses modifications apportées aux milieux d'exposition contenant les algues (Fortin et Campbell, 2000). Privilégier cette approche permet de minimiser la variabilité intrinsèque des algues et d'éviter une mauvaise interprétation des résultats. La comparaison des résultats provenant de lots cultivés séparément devrait être mise en perspective et interprétée avec une certaine prudence. Afin de pouvoir conclure sur une modification de traitement le plus justement possible, les expériences ultérieures ont été organisées en utilisant des lots de cellules homogènes.

Les expériences réalisées en absence de thiosulfate font état de résultats cinétiques (Figure 3.3) de prise en charge rapide et presque linéaire à l'intérieur du temps d'exposition de 30 min. Ce phénomène a été observé également avec l'Ag (Fortin, 2000) et le Cd (Boily, 2004). La combinaison de l'adsorption extracellulaire et de l'absorption intracellulaire modifie l'allure des courbes d'accumulation et masque certaines tendances. En effet, l'adsorption des métaux aux surfaces algales étant normalement un phénomène très rapide (Bates *et al.*, 1982), la mesure initiale de prise en charge à ~5 min a tendance à s'écarter de l'origine lorsque la désorption du métal est incomplète. La proportion de Hg adsorbé à la surface des algues (telle que déterminée par extraction avec la cystéine) était élevée et se situait entre 44 et 68 % de l'accumulation totale après 30 min d'exposition.

Initialement l'EDTA (10^{-2} M) a été utilisé pour la désorption du mercure sur les parois algales. Ce choix a été motivé par les travaux de Hassler *et al.* (2004) qui ont évalué l'efficacité de divers protocoles de désorption. Ces chercheurs ont considéré la nature chimique du réactif utilisé pour effectuer la désorption, sa concentration

(ex: une solution de 5 x 10^{-3} M d'EDTA) et l'effet du temps de contact entre ces réactifs et les organismes biologiques. Cela leur a permis de déterminer la capacité des différents agents, dont l'EDTA, à extraire les métaux adsorbés aux surfaces biologiques afin de bien distinguer la partie internalisée de la partie extracellulaire. Le ligand employé doit avoir une forte constante de stabilité avec le métal à complexer et être en excès par rapport au métal. L'utilisation d'un agent complexant requiert une période d'optimisation adaptée à l'organisme et aux conditions expérimentales particulières. Récemment, une concentration de 10^{-3} M à 10^{-5} M d'EDTA a été utilisée pour distinguer la partie internalisée de la partie extracellulaire lors d'expériences de prise en charge du Cd par l'algue *C. reinhardtii* (Boily, 2004).

Dans la présente étude, le prolongement des courbes à la figure 3.3 met en évidence l'inefficacité de l'EDTA à l'étape de désorption du Hg lié à la surface des algues. En conservant l'EDTA comme agent pour enlever le Hg présent à la surface cellulaire, on risquait de surestimer la prise en charge du mercure par les algues. La cystéine (100 mM à pH 9) a été utilisée dans d'autres travaux en cours à l'INRS-ETE. Le choix et la façon d'utiliser la cystéine répondent aux critères énumérés par Hassler *et al.* (2004). Elle possède une bonne affinité avec le mercure (log K₁= 37,8; log β_2 = 44), elle a été utilisée en excès tant en quantité qu'en concentration et on a démontré que dans le même contexte expérimental, le complexe Hg-cystéine n'était pas métabolisable par *C. reinhardtii* (section 3.2.2).

Toutes les expériences sauf une ont été effectuées avec l'agitation des Erlenmeyers sur une plaque agitatrice (section 3.1.3). Normalement, l'agitation n'a pas d'effet sur la prise en charge d'un métal (Fortin, 2000) parce que le transport du métal en solution vers la membrane cellulaire ainsi que la complexation de surface se produisent rapidement (section 1.3.1). La prise en charge du métal (c'est-à-dire, son transport transmembranaire) est l'étape limitante, étant plus lente que la phase de transport en solution et la complexation de surface. Si, par contre, l'étape lente est le processus de transport de la solution vers la surface algale, alors l'agitation de la solution d'exposition peut être un facteur important dans la mesure où l'épaisseur de la couche non mélangée autour de chaque cellule peut être amincie. La figure 3.5 illustre l'influence apparente de l'agitation sur la prise en charge du mercure. Pour expliquer ce résultat, nous avons d'abord considéré la possibilité que la prise en charge du mercure soit limitée par le transport diffusif en solution. En effet, si la formation du complexe Hg-X-cellule et le transport transmembranaire du Hg se produisent très rapidement, ils peuvent créer (en absence d'agitation) une zone autour de l'algue où la concentration du mercure est plus basse que la concentration dans la solution d'exposition. Bien entendu, une telle baisse de la concentration en mercure près de la surface algale affecterait la vitesse de prise en charge du métal. L'agitation des solutions pendant la période d'exposition permettrait alors de maintenir un apport régulier de mercure et d'éviter la création d'une zone de déplétion autour de la cellule algale. Afin de vérifier si la diffusion du Hg de la solution jusqu'à la surface algale pourrait limiter la vitesse de prise en charge du métal, on peut calculer un flux théorique du Hg dans cette couche non mélangée. L'équation 4.1 a été utilisée pour ce calcul :

$$J = \frac{4\pi D(\frac{r_c r_d}{r_d - r_c})(C_b - C_s)}{A}$$

$$\tag{4.1}$$

où r_c représente le rayon de la cellule (2 x 10^{-4} cm); r_d, le rayon de la cellule additionné à l'épaisseur de la zone non mélangée (1 x 10^{-3} cm); D, le coefficient de diffusion utilisé pour le Hg qui est la limite inférieure des coefficients publiés (Mills et Lobo, 1989) (8,47 x 10^{-6} cm²·sec⁻¹); A, la surface de l'algue (5,02 x 10^{-7} cm²); C_b et C_s respectivement les concentrations de Hg dans la solution externe (20 nM) et à la surface (~0 nM).

Selon ce calcul, le flux maximal calculé serait de 375 nmol Hg•m⁻²•min⁻¹, alors que le flux mesuré est de 0,67 nmol Hg•m⁻²•min⁻¹. Afin d'affirmer que la diffusion à travers la couche non mélangée limite la prise en charge du Hg, les taux d'internalisation mesurés devraient s'approcher du taux maximal théorique. Dans le cas présent, le flux mesuré est négligeable par rapport au flux maximal calculé et on doit donc rejeter l'hypothèse d'un transport diffusif limitant.

Comment expliquer l'effet apparent de l'agitation sur la vitesse de prise en charge? Il faut se rappeler que les deux courbes dans la figure 3.5 correspondent à deux lots d'algues différents. Lorsque la même comparaison a été faite avec des algues provenant du même lot (voir l'encadré dans la figure 3.5), la différence entre les milieux agités et non agités était beaucoup plus faible. Il faut aussi se rappeler que les deux expériences cinétiques présentes la figure 3.5 ont été réalisées sous des régimes lumineux différents ($100 \pm 10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ dans l'expérience avec agitation; ~19 µmol \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} dans l'expérience en charge du mercure était sensible à l'irradiation, cette différence en luminosité pourrait être à l'origine de l'effet apparent de l'agitation.

4.3 Prise en charge du mercure avec présence de thiosulfate

Afin de déterminer le rôle du thiosulfate dans la prise en charge du mercure chez *C. reinhardtii*, nous avons réalisé des expériences de prise en charge dans des milieux simplifiés sur une période fixe de 15 min (section 3.1.9). Dans ces expériences, on a fait varier les concentrations de thiosulfate en présence ou non de sulfate. Nous avons utilisé un lot d'algues homogène et avons choisi un temps d'exposition court pour minimiser les changements dans le milieu d'exposition ($[Hg_T]\downarrow$; $[exsudats]\uparrow$) et ainsi faciliter l'interprétation des résultats.

Lors d'expériences précédentes dans nos laboratoires (Fortin, 2000; Boily, 2004), il a été démontré que la présence de thiosulfate augmentait la prise en charge de l'Ag et du Cd chez *C. reinhardtii*. L'accumulation de l'Ag (après 15 min d'exposition) avec la présence de thiosulfate ($[Ag^+] = 10$ nM; $[Cl^-] = 5 \mu$ M; $[S_2O_3^{2^-}] = 114$ nM; $[SO_4^{2^-}] = 82 \mu$ M) était environ deux fois supérieure à la prise en charge lorsque l'algue était exposée dans une solution sans thiosulfate ($[Ag^+] = 10$ nM; $[Cl^-] = 5 \mu$ M; $[SC_4^{2^-}] = 82 \mu$ M). L'accumulation du Cd après 31 min d'exposition dans un milieu avec la présence de thiosulfate et de sulfate ($[Cd^{2^+}] = 2.75$ nM, $[S_2O_3^{2^-}] = 1.00$ mM; $[SO_4^{2^-}] = 82 \mu$ M)) était environ 1,5 fois plus élevée que dans un milieu sans thiosulfate mais avec sulfate ($[Cd^{2^+}] = 2,75$ nM; $[SO_4^{2^-}] = 82 \mu$ M).

Contrairement aux résultats obtenus avec l'argent et le cadmium, on a constaté à la première expérience (Figure 3.6) que la complexation du Hg par le thiosulfate n'augmentait pas la prise en charge du mercure. La concentration élevée (1 μ M) de thiosulfate (avec [SO₄²⁻] = 82 μ M) a fait en sorte de complexer la quasi-totalité du Hg sous forme de Hg(S₂O₃)₂²⁻ (Figure 1.2). Dans ces conditions, la prise en charge du mercure a été complètement supprimée.

Par la suite, la variation de la $[S_2O_3^{2^-}]$ dans les milieux d'exposition (avec et sans sulfate, en utilisant un lot homogène d'algues) visait à déterminer si cette suppression de la prise en charge s'appliquait aussi à des rapports Hg : $S_2O_3^{2^-}$ inférieur à deux qui pourraient favoriser la formation du complexe HgS₂O₃⁰ plutôt que Hg(S₂O₃)₂²⁻. La concentration de mercure total était constante à 158 nM (Tableau 3.7) et le temps d'exposition était de 15 min. En augmentant les concentrations de thiosulfate, on a observé une diminution progressive de la prise en charge dès le premier ajout de thiosulfate. En revanche, signalons que lors d'une expérience subséquente (Figure 3.9), à aucune concentration la présence de thiosulfate n'a stimulé la prise en charge du mercure, et ce, avec ou sans la présence de sulfate dans les milieux d'exposition.

Ces résultats, concernant l'effet du thiosulfate sur la prise en charge du Hg, diffèrent de ceux obtenus pour l'argent et pour le cadmium de Fortin (2000) et de Boily (2004). Le complexe $Hg(S_2O_3)_2^{2^-}$ ne semble pas biodisponible pour *C. reinhardtii*. Ce phénomène peut être en partie expliqué par le fait que le complexe Hg-thiosulfate est sous forme $Hg(S_2O_3)_2^{2^-}$ plutôt que sous forme d'un complexe neutre HgS_2O_3 . En effet, même si plusieurs publications scientifiques indiquent que les algues partagent un même système de transport membranaire pour le sulfate et le thiosulfate (Vallée et Jeanjean, 1968; Hodson *et al.*, 1968; Perez-Castineira *et al.*, 1998), il est possible que la trop grosse taille du complexe $Hg(S_2O_3)_2^{2^-}$ l'empêche d'emprunter le système de transport du sulfate.

4.4 Effet de la concentration en sulfate

On a observé lors de la quatrième expérience, où l'on a fait varier la concentration de thiosulfate en présence ou non de sulfate (Tableau 3.7), que la prise en charge du mercure était systématiquement plus élevée en présence de sulfate qu'en son absence (Figure 3.9). Ces résultats ont été confirmés dans la sixième expérience, où l'on a fait varier la concentration de sulfate (sans que le thiosulfate soit présent) (Tableau 3.8). En effet, la prise en charge du mercure est augmentée (par un facteur \sim 2) dans la gamme de concentrations de sulfate entre 80 et 120 µM de sulfate (Figure 3.10).

Contrairement au thiosulfate (dans le cas de l'argent et du cadmium), on ne peut pas invoquer de changement de spéciation du mercure pour expliquer l'augmentation de la prise en charge du Hg. L'association mercure-sulfate est grandement défavorisée (HgSO₄; log K = -1,4, (Petit et Powell, 2003)) comparativement à celle avec le thiosulfate (section 1.2.5). Pour expliquer cette accumulation accrue du mercure en présence du sulfate, on a posé l'hypothèse que le mercure et le sulfate pouvaient entrer chez C. reinhardtii par cotransport, non pas comme complexe Hg-SO₄, mais plutôt comme deux entités distinctes. Dans la littérature scientifique sur les algues, il existe quelques exemples de cotransport d'ions inorganiques, notamment pour le couple H⁺-Cl⁻ (cotransport impliqué dans la régulation du pH de la cellule (Raven, 1980) ainsi que pour le couple K⁺-Cl⁻ (Raven, 1976). Alors le fait que la prise en charge du Hg ne soit pas nulle en absence de sulfate (Figure 3.10) implique qu'il y aurait au moins deux voies d'entrée pour le mercure, l'une qui n'implique pas le sulfate (ex. : transport facilité du Hg par un transporteur normalement réservé à un ou des métaux essentiels (Golding et al., 2002) et l'autre qui est favorisée à des concentrations de sulfate dans la gamme entre 80 et 120 μ M.

4.5 **Pertinence environnementale**

Une certaine quantité de thiosulfate se retrouve dans la colonne d'eau non seulement dans certains Grands Lacs salins (section 1.2.3), mais aussi dans des lacs d'eau douce (sections 1.2.3; 2.2.2.2; 2.2.2.3). Les mesures dans les lacs Holland et Pink ont permis de détecter des concentrations de thiosulfate en milieu naturel de l'ordre de 0.5μ M.

Ces concentrations ont été mesurées dans le but de simuler le plus justement les conditions environnementales lors d'expériences de prise en charge du Hg. Afin d'avoir un signal détectable au compteur gamma, les concentrations de mercure utilisées lors de ces expériences étaient plus importantes que celles présentes dans l'environnement. On peut supposer que les concentrations de mercure présentes dans les eaux naturelles sous différentes formes chimiques varient entre 5 et 100 pM (Morel *et al.*, 1998).

Comme mentionné plus tôt, l'échantillonnage a révélé la présence de thiosulfate dans une zone restreinte de la colonne d'eau dans deux lacs échantillonnés. Même si cette zone est restreinte à l'intérieur de la colonne d'eau, elle correspond aussi à la zone où potentiellement la méthylation peut se produire (Eckley *et al.*, 2005; Eckley et Hintelmann, 2006). Donc, le thiosulfate pourrait potentiellement affecter la biodisponibilité du mercure.

Le logiciel de modélisation WHAM VI (Windermere Humic Aqueous Model) a été utilisé pour calculer l'impact du thiosulfate sur la spéciation du mercure dans les eaux lacustres. La base de données thermodynamique du logiciel a été mise à jour (Tipping, 2007). Les données utilisées pour la modélisation provenaient d'une étude de terrain dans la région de Rouyn-Noranda (communication personnelle de C. Fortin, INRS-ETE; Perceval et al., 2002) et comprenaient la composition chimique de 14 lacs (pH, Na, K, Ca, Mg, Cl, CO₃, SO₄, NO₃, Al, Fe, Mn, Ni, Pb, Cd, Cu, Zn, acides fulvique et humique). À ces données, nous avons ajouté une concentration totale en Hg dissous de 25 pM, et une concentration en thiosulfate de 0,5 µM. Avec ces paramètres, on a trouvé que > 99 % du mercure devait être complexé à l'acide fulvique et à l'acide humique. La plus grande proportion calculée de Hg lié au thiosulfate était de 0,10 % dans le cas d'un lac acide (pH = 5,1) qui contient peu de MOD (5,8 mg/ L^{-1}). Selon ces calculs, le thiosulfate ne peut concourir efficacement avec la matière organique naturelle, malgré sa forte affinité pour le mercure; les substances humiques jouent un rôle prépondérant en déterminant la spéciation du mercure en milieu naturel (Tipping, 2002). On peut penser que, dans un milieu avec

peu de matière organique présente, le thiosulfate pourrait avoir un rôle à jouer dans la complexation du mercure.

Également, les résultats obtenus sur l'augmentation de la prise en charge du mercure en présence de sulfate peuvent avoir une signification environnementale. Il a été démontré que lorsque du sulfate est ajouté dans un milieu humide, il y a une augmentation de la production de méthylmercure dans les eaux interstitielles des sédiments (Jeremiason *et al.*, 2006). Aucun mécanisme convaincant n'a été suggéré pour expliquer ce phénomène, mais il nous semble plausible que le processus de cotransport du mercure et du sulfate puisse contribuer à augmenter la biodisponibilité du mercure inorganique vis-à-vis des bactéries sulfato-réductrices.

5. Conclusion

L'échantillonnage de manière fiable et reproductible d'une phase intermédiaire et instable de soufre a été rendue possible suite au développement d'une méthode de préconcentration impliquant une résine échangeuse d'ions. Autant au laboratoire que sur le terrain, le $S_2O_3^{2-}$ peut être élué et récupéré à un taux variant entre 80-96 % pour des concentrations connues de thiosulfate. L'analyse au chromatographe ionique de l'éluant concentré a permis de mesurer de faibles concentrations présentes dans deux lacs du Québec. Ces concentrations ont été ensuite utilisées afin d'avoir une bonne représentativité des conditions environnementales lors d'expériences de prise en charge. La prise en charge du mercure sous forme d'Hg(OH)₂ en absence de thiosulfate a d'abord été étudiée. L'accumulation du Hg par l'algue *C. reinhardtii* est rapide et linéaire sur une période de 30 min et à des concentrations en Hg de ~20 nM. Une adsorption rapide dans les premières minutes d'exposition a causé une surestimation du mercure accumulé.

Comme le rinçage à l'EDTA s'est avéré inefficace pour désorber le mercure lié à la surface de l'algue. La cystéine a par la suite été utilisée efficacement et il a été démontré que le complexe Hg-cystéine ne traversait pas la membrane cellulaire. Une certaine variabilité intergénérationnelle a été remarquée dans les résultats, ce qui a nécessité que les expériences soient réalisées en parallèle avec un milieu d'exposition de référence.

Le modèle qui prévaut dans l'interprétation de données de prise en charge des métaux par les organismes aquatiques est le Modèle de l'Ion libre (MIL), qui présume que les métaux entrent dans les cellules vivantes par transport facilité de cations. La plupart des exceptions au MIL impliquent soit des ligands qui forment des complexes lipophiles $M-L_n^0$, qui peuvent passer outre les mécanismes habituels de transport et traverser les membranes biologiques par diffusion passive (Phinney et Bruland, 1994; Phinney et Bruland, 1997; Croot *et al.*, 1999) ou encore la formation de complexes hydrophiles avec des ligands assimilables de faible poids moléculaire pour lesquels il existe un transporteur au niveau de la membrane cellulaire (Campbell, 1995; Errécalde et Campbell, 2000; Fortin et Campbell, 2001; Hiriart-Baer *et al.*, 2005). Les résultats de Fortin (2000) et Boily (2004) ont démontré qu'il était possible que les complexes Ag-thiosulfate et Cd-thiosulfate franchissent la membrane de l'algue par transport facilité. Dans le cas du complexe Hg-thiosulfate, la présence de thiosulfate n'a pas stimulé la prise en charge du mercure, et ce, avec ou sans la présence de sulfate dans les milieux d'exposition. Ce complexe, qui implique non pas un mais deux ions S₂O₃ (contrairement aux complexes simples AgS₂O₃ et CdS₂O₃), est peutêtre trop encombrant pour « tromper » le transporteur de sulfate/thiosulfate chez *C. reinhardtii.*

6. Bibliographie

- Ariya, P.A., A. Khalizov et A. Gidas (2002) Reactions of gaseous mercury with atomic and molecular halogens: kinetics, product studies and atmospheric implactions. J. Phys. Chem., 106, 7310-7320.
- Bagarinao, T. (1992) Sulfide as an environmental factor and toxicant: Tolerance and adaptations in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, **24**, 21-62.
- Barber, R.T. et J.H. Ryther (1969) Organic chelators factors affecting primary production in the Cromwell current upwelling. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 3, 191-199.
- Bates, S.S., A. Tessier, P.G.C. Campbell et J. Buffle (1982) Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. J. Phycol., 18, 521-529.
- Bates, S.S., M. Létourneau, A. Tessier et P.G.C. Campbell (1983) Variation in zinc adsorption and transport during growth of *Chlamydomonas variabilis* (Chlorophyceae) in batch culture with daily addition of zinc. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 40, 895-904.
- Benoit, J.M., C. C. Gilmour, R. P. Mason et A. Heyes (1999) Sulfide controls on mercury speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore waters. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 951-957.
- Benoit, J.M., C.C. Gilmour et R.P. Mason (2001a) Aspects of bioavailability of mercury for methylation in pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). Appl. Environ. Microbiol., 67, 51-58.
- Benoit, J.M., C.C. Gilmour et R.P. Mason (2001b) The influence of sulfide on solid phase mercury bioavailability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 127-132.

- Biedlingmaier, S. et A. Schmidt (1988) Sulfate transport in normal and S-deprived *Chlorella fusca. Z. Naturforsch,* 44c, 495-503.
- Bienvenue, E., A. Boudou, J.P. Desmazes, C. Gavach, D. Georgescauld, J. Sandeaux et P. Seta (1984) Transport of mercury compounds across biomolecular lipid membranes: effect of lipid composition, pH and chloride concentration. *Chem. Biol. Interactions*, 48, 91-101.
- Biswajit, P. et P.A. Ariya (2004) Gas phase HO initiated reactions of elemental mercury: kinetics, product studies and atmospheric implications. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 5555-5566.
- Boily, F. (2004) Mécanismes de prise en charge et toxicité du cadmium en présence de thiosulfate chez une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*. Mémoire de maîtrise, INRS-ETE, Québec, QC, 124 p.
- Boulègue, J. (1978) Metastable sulfur species and trace-metals (Mn, Fe, Cu, Zn, Cd, Pb) in hot brines from French Dogger. Am. J. Sci., 278, 404-460.
- Bridges, C.C. et R.K. Zalups (2005) Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **204**, 274-308.
- Bryan, G.W. (1971) Effects of heavy metals (other than mercury) on marine and estuarine organisms. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, **177**, 389-410.
- Cain, J.R. et R.K. Allen (1980) Use of a cell wall-less mutant strain to assess the role of the cell wall in cadmium and mercury tolerance by *Chlamydomonas reinhardtii. Bull. Environ. Contam. Toxycol.*, **25**, 797-801.
- Campbell, P.G.C. (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms :
 A critique of the free-ion activity model. Dans : A. Tessier et D.R. Turner,
 (Ed.) Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, pp. 45-102.
 New York, NY, USA : John Wiley & Sons.

- Campbell, P.G.C., O. Errécalde, C. Fortin, W.R. Hiriart-Baer et B. Vigneault (2002)
 Metal bioavailability to phytoplankton applicability of the Biotic Ligand
 Model. Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol., 133, 189-206.
- Chen, H.C. et A. Melis (2004) Localization and function of sulp, a nuclear-encoded chloroplast sulfate permease in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, **220**, 198-210.
- Clarkson, T. (1997) The toxicology of mercury. Crit. Rev Clin. Lab. Sci., 34, 369-403.
- Clesceri, L.S., A.E. Greenberg et R.R. Trussell (1989) Standard methods for the examination of water and wastewater, 17th edition edn. American Public Health Association.
- Croot, P.L., J.W. Moffett et G.W. Luther (1999) Polarographic determination of halfwave potentials for copper-organic complexes in seawater. *Marine Chem.*, **67**, 219-232.
- Di Toro, D.M., H. E. Allen, H.L. Bergman, J.S. Meyer, P.R. Paquin et R.C. Santore (2001) Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 2383-2396.
- Dickman, M. (1973) A documentation for the National Capital Commission of some factors affecting the rapid eutrophication of Pink's Lake, Quebec, University of Ottawa.
- Dickman, M. (1975) Limnological baseline study Gatineau park lakes., Ottawa University.
- Dickman, M. et M. Dorais (1977) The impact of human trampling on phosphorus loading to a small lake in Gatineau park, Québec, Canada. J. Environ. Manage.. 5, 335-344.

Dreyfuss, J. (1964) Characterization of a sulfate and thiosulfate transporting system in Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem., 239, 2292-2297.

- Druschel, G.K., A.A.M. Schoonen, K.D. Nordstrom, J.W. Ball, Y. Xu et C.A. Cohn (2003) Sulfur geochemistry of hydrothermal waters in Yellowstone National Park, Wyoming, USA. III. An anion-exchange resin technique for sampling and preservation of sulfoxyanions in natural waters. *Geochem. Trans.*, 4, 12-19.
- Dupont, J. (1986) Évolution spatiale et temporelle de l'acidité de 14 lacs de la région de Portneuf pour la période de 1982-1983; Ministere de l'Environnement du Québec, 93 p.
- Eckley, C.S. et H. Hintelmann (2006) Determination of mercury methylation potentials in the water column of lakes across Canada. *Sci. Tot. Environ.*, **368**, 111-125.
- Eckley, C.S., C.J. Watras, H. Hintelmann, K. Morrison, A.D. Kent et O. Regnell (2005). Mercury methylation in the hypolimnetic waters of lakes with and without connection to wetlands in northern Wisconsin. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 62, 400-411.
- Eisler, R. (2006) Mercury hazards to living organisms. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 312 p.
- Epstein, E. (1976) Kinetics of ion transport and the carrier concept. Luttge, U. and M.G. Pittman, (Eds.) 2 B. Berlin: Springer-Verlag.
- Errécalde, O., M. Seidl et P.G.C. Campbell (1998) Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: an exception to the freeion model. *Wat. Res.*, **32**, 419-429.

- Errécalde, O. et P.G.C. Campbell (2000) Cadmium and zinc bioavailability to Selenastrum capricornutum (Chlorophyceae): Accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate. J. Phycol., 36, 473-483.
- Fadini, P.S. et W.F. Jardim (2000) Storage of natural water samples for the total and reactive mercury analysis in PET bottles. *Analyst*, **125**, 549-551.
- Fitzgerald, W.F. et R.P. Mason (1996) The global mercury cycle: Oceanic and anthropogenic aspects. Dans : W. Baeyens, O. Vasiliev et R. Ebinghaus (éds.).
 Regional and Global Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances.
 Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 85-108.
- Fitzgerald, W.F. et R.P. Mason (1997) Biogeochemical cycling of mercury in the marine environment. *Metal Ions in Biol. Syst.*, **34**, 53-111.
- Fitzgerald, W.F., D.R. Engstrom, R.P. Mason, et E.A. Nater. (1998). The case for atmospheric mercury contamination in remote areas. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 1-7.
- Fortin, C. (2000) Mécanismes de prise en charge et toxicité de l'argent chez une algue verte en relation avec la spéciation chimique. Thèse de doctorat. INRS-ETE, Québec, QC, 159 p.
- Fortin, C. et P.G.C. Campbell (2000) Silver uptake by the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, in relation to chemical speciation: influence of chloride. *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**, 2769-2778.
- Fortin, C. et P.G.C. Campbell (2001) Thiosulfate enhances silver uptake by green alga: Role of anion transporters in metal uptake. *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 2214-2218.
- Golding, G.R., C.A. Kelly, R. Sparling, P.C. Loewen, J.W.M. Rudd et T. Barkay (2002) Evidence for facilitated uptake of Hg(II) by *Vibrio anguillarum* and *Escherichia coli* under anaerobic and aerobic conditions. *Limnol. Oceanogr.*, 47, 967-975.

- Harrison G.I., P.G.C. Campbell et A. Tessier (1986) Effects of pH changes on zinc uptake by *Chlamydomonas variabilis* grown in batch culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43, 687-693.
- Hassler, C.S., V.I. Slaveykova et K. Wilkinson (2004) Discrimination between intraand extracellular metals using chemical extractions. *Limnol. Oceanogr. Methods*, 2, 237-247.
- Henneke, E., G. W. Luther, G. J. De Lange et J. Hoefs (1997) Sulphur speciation in anoxic hypersaline sediments from the eastern Mediterranean Sea. Geochim. Cosmochim. Acta, 61, 307-321.
- Hiriart-Baer, V.P., C. Fortin, D.-Y. Lee et P.G.C. Campbell (2005) Toxicity of silver to the freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture: influence of thiosulfate. Aquat. *Toxicol.*, **78**, 136-148.
- Hitchen, A. et C.W. Smith (1976) A review of analytical methods for the determination of polythionates, thiosulphate, sulphite and sulphide in mining effluents. CANMET, Mineral Sciences Laboratories. Report MRP/MSL 76-208 (LS) in the Mineral research program.
- Hodson, R.G., J.A. Schiff et A.J. Scarsella (1968) Studies of sulfate utilization by algae. 7. In vivo metabolism of thiosulfate by Chlorella. Plant Physiol., 43, 570-577.
- Hudson, R.J.M. et F.M.M. Morel (1990) Iron transport in marine-phytoplankton kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnol. Oceanogr.*, 35, 1002-1020.
- Hudson, R.J.M. (1998) Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of non-equilibrium effects. *Sci. Tot. Environ.*, 219, 95-115.

- Hunter, D. et D.S. Russell (1940) Poisoning by methylmercury compounds. *Quart. J. Med.* **9**: 193-213.
- Jeremiason, J.D., D.R. Engstrom, E.B. Swain, J.E. Almendinger, B.A. Monson et R.K. Kolka (2006) Sulfate addition increases methylmercury production in an experimental wetland. *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 3800-3806.
- Jones, R., M.D. Dickman, R.J. Mott et M. Ouellet (1984) Late quaternary diatom and chemical profiles from a meromictic lake in Québec, Canada. Chem. Geol., 44, 267-286.
- Jorgensen, B.B. (1990a) The sulfur cycle of freshwater sediments: role of thiosulfate. *Limnol. Oceanogr.*, **35**, 1329-1342.
- Jorgensen, B.B. (1990b) A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. Science, 249, 152-154.
- Khalizov, A.F., B. Viswanathan, P. Larregaray et P.A. Ariya (2003) A theoretical study on the reaction of Hg with halogens: atmospheric implications. J. Phys. Chem. A, 107, 6360-6365.
- Kondo, R., N. Kasashima, H. Matsuda et Y. Hata (2000) Determination of thiosulfate in a meromictic lake. *Fisheries Sci.*, **66**, 1076-1081.
- Kuban, P. et B. Karlberg (2000) On-line monitoring of Kraft pulping liquors with a valveless flow injection capillary electrophoresis system. *Anal. Chim. Acta*, 404, 19-28.
- Lewis, A.G., P.H. Whitfield et A. Ramnarine (1972) Some particulate and soluble agents affecting the relationship between metal toxicity and organism survival in the calanoid copepod *Euchaeta japonica*. *Mar. Biol.*, 215-221.
- Lewis, A.G., P.H. Whitfield et A. Ramnarine (1973) The reduction of Cu toxicity in a marine copepod by sediment extract. *Limnol. Oceanogr.*, **18**, 324-326.

- Li, Y.H. et S. Gregory (1974) Diffusion of ions in sea water and in deep-sea sediments . *Geochim. Cosmochim. Acta*, **38**, 703-714.
- Lin, C.J. et S.O. Pehkonen (1997) Aqueous free radical chemistry of mercury in the presence of iron oxides and ambient aerosol. *Atmos. Environ.*, **31**, 4125-4137.
- Lin, C.J. et S.O. Pehkonen (1999) The chemistry of atmospheric mercury: a review. Atmos. Environ., 33, 2067-2079.
- Lindberg, S., R. Bullock, R. Ebinghaus, D. Engstrom, X. Feng, W. Fitzgerald, N. Pirrone, E. Prestbo et C. Seigneur (2007) A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. *Ambio*, 36, 19-32.
- Litman, R. (1975) Evaluation of sample pretreatments for mercury determination. Anal. Chem., 47, 2364-2369.
- Luther, G.W. et E. Tsamakis (1989) Concentration and form of dissolved sulfide in the toxic water column of the ocean. *Marine Chem.*, **27**, 165-177.
- Macfie S.M., Y Tarmohamed et P.M. Welbourn (1994) Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influence of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 27, 454-458.
- Makhija, R.C. et A. Hitchen (1979) The titrimetric determination of sulfate, thiosulfate and polythionates in mining effluents. *Anal. Chim. Acta*, **105**, 375-389.
- Marschall, C., P. Frenzel et H. Cypionka (1993) Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.*, **159**, 168-173.

- Mason, R.P., W.F. Fitzgerald et F.M.M. Morel (1994) The biogeochemical cycling of elemental mercury: Anthropogenic influences. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 58, 3191-3198.
- Mason, R.P., J.R. Reinfelder et F.M.M. Morel (1996) Uptake, toxicity and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. *Environ. Sci. Techol.*, **30**, 1835-1845.
- Mason, R.P. et G.-R. Sheu (2002) Role of the ocean in the global mercury cycle. Global Biogeochem. Cycles, 16, 40-1 – 40-14.

Meili, M. (1997) Mercury in Lakes and Rivers. Metal Ions in Biol. Syst., 34, 21-51.

- Millero, F.J. (1991) The oxidation of H₂S in Framvaren Fjord. *Limnol. Oceanogr.*, **36**, 1007-1014.
- Morel, F.M.M. (1983) Principles of Aquatic Chemistry, New York, NY, USA: John Wiley & Sons.
- Morel, F.M.M. et Hering, J.G. (1993) *Principles and applications of aquatic chemistry*, New York: John Wiley & Sons.
- Morel, F.M.M., A.M.L. Kraepiel et M. Amyot (1998) The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **19**, 543-566.
- Mount, D.I. (1966) The effect of total hardness and pH on acute toxicity of zinc to fish. *Air Wat. Pollut. Internat.*, **10**, 49-56.
- Munthe, J. (1992) The aqueous oxidation of elemental mercury by ozone. *Atmos. Environ.*, **26**, 1461-1468.
- Munthe, J., Z.F. Xiao et O. Lindqvist (1991) The aqueous reduction of divalent mercury by sulfite. *Water Air Soil Pollut.*, **56**, 621-630.
- 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.

- Nriagu, J.O. (1989) A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, **338**, 47-49.
- Nriagu, J.O. (1994) Mechanistic steps in the photoreduction of mercury in naturalwaters. *Sci. Tot. Environ.*, **154**, 1-8.
- Nriagu, J.O. (1999) Global climate change and cycling of mercury in North America.A background report to the commission for environmental cooperation.University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109.
- Olive, P. et J. Boulègue (2004) Biogeochemical study of a meromictic lake: Pavin lake, France. Géomorphologie: relief, processus, environnement, 4, 305-316.
- Overmann, J., J.T. Beatty, H.R. Krouse et K.J. Hall (1996) The sulfur cycle in the chemocline of a meromictic salt lake. *Limnol. Oceanogr.*, **41**, 147-156.
- O'Reilly, J.W., G.W. Dicinosky, M.J. Shaw et P.L. Haddad (2001) Chromatographic and electrophoretic separation of inorganic sulfur and sulfur-oxygen species. *Anal. Chim. Acta*, **432**, 165-192.
- Pacyna, E.G., J.M. Pacyna, F. Steenhuisen et S. Wilson (2006) Global anthropogenic mercury emission inventory for 2000. *Atmos. Environ.*, 40, 4048-4063.
- Pai, P., P. Karamchandani et C. Seigneur (1997) Simulation of the regional atmospheric transport and fate of mercury using a comprehensive Eulerian model. *Atmos. Environ.*, **31**, 2717-2732.
- Parker, J.L. et N.S. Bloom (2004) Preservation and storage technique for low-level aqueous mercury speciation. *Sci. Tot. Environ.*, **337**, 253-263.
- Pelletier, E., P.G.C. Campbell et F. Denizeau (2004) Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement. Sainte-Foy, Québec. Presses de l'Université du Québec.
- Pentecost, A. (1995) The microbial ecology of some Italian hot-spring travertines. *Microbios*, **81**, 45-58.

- Perceval, O., B. Pinel-Alloul, G. Methot, Couillard Y., A. Giguere, P.G.C. Campbell et L. Hare (2002) Cadmium accumulation and metallothionein synthesis in freshwater bivalves (*Pyganodon* grandis): Relative influence of the metal exposure gradient *versus* limnological variability. *Environ. Pollut.*, **118**, 5-17.
- Perez-Castineira, J.R., J.L. Prieto, J.G. Gonzalez-Arroyo et J.M. Vega (1998) Kinetic properties of sulfate uptake in two types of eukaryotic green microalgae. J. *Plant Physiol.*, 153, 324-331.
- Petit, L.D. et K.J. Powell (2003) IUPAC stability constants database. IUPAC/Academic software: Otley, UK.
- Phinney, J.T. et K.W. Bruland (1994) Uptake of lipophilic organic Cu, Cd, and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira-Weissflogii*. Environ. Sci. Technol., 28, 1781-1790.
- Phinney, J.T. et K.W. Bruland (1997) Trace metal exchange in solution by the fungicides ziram and maneb (dithiocarbamates) and subsequent uptake of lipophilic organic zinc, copper and lead complexes into phytoplankton cells. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 2046-2053.
- Pirrone, N., G.J. Keeler et J.O. Nriagu (1996) Regional differences in worldwide emissions of mercury to the atmosphere. *Atmos. Environ.*, 30, 2981-2987.
- Powell, K.J., P.L. Brown, R.H. Byrne, T. Gajda, G. Hefter, S. Sjoberg et H. Wanner (2004) Chemical speciation of Hg(II) with environmental inorganic ligands. *Austral. J. Chem.*, 57, 993-1000.
- Price N.M., J.I. Harrison, J.G. Hering, R.J. Hudson, P.M. Nirel, B. Palenik et F.M.M.
 Morel (1989) Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium
 Aquil. *Biol. Oceanogr.*, 6, 443-461.
- Purcell, T.W. et J.J. Peters (1998) Sources of silver in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**, 539-546.

- Raofie, F. et P.A. Ariya (2004) Product study of the gas-phase BrO-initiated oxydation of Hg⁰: evidence for stable Hg¹⁺ compounds. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 4319-4326.
- Rasmussen, P.E. (1998) Long-range atmospheric transport of trace metals: the need for geoscience perspectives. *Environ. Geol.*, **33**, 96-108.
- Raven, J.A. (1976) Transport in algal cells. Dans : Pirson A, Zimmermann MH, (éds)
 Encyclopedia of Plant Physiology, Academic, New York, NY, USA, 2A, 129-188.
- Raven, J.A. (1980) Nutrient transport in microalgae. Dans : Rose AH, Morris JG, (éds) Microbial Physiology, Academic, New York, NY, USA, 21, 47-226.
- Reimann, C., U. Siewers, H. Skarphagen et D. Banks (1999) Does bottle type and acid-washing influence trace element analyses by ICP-MS on water samples? *Sci. Tot. Environ.*, 239, 111-130.
- Richardson, M.G. (2001) Critical review on natural global and regional emissions of six trace metals to the atmosphere. Prepared for ILZRO; ICA; NiPera, final report.
- Santore, R.C., D.M. Di Toro, P.R. Paquin, H.E Allen et J.S. Meyer (2001) Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and daphnia. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 2397-2402.
- Sass, H., J. Steuber, M. Kroder, P.M.H. Kroneck et H. Cypionka (1992) Formation of thionates by fresh-water and marine strains of sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.*, 158, 418-421.
- Schenck, R.C., A. Tessier et P.G.C. Campbell (1988) The effect of pH on iron and manganese uptake by green alga. *Limnol. Oceanogr.*, **33**, 538-550.

Schroeder, W.H., K.G. Anlauf, L.A. Barrie, J.Y.Lu, A. Steffen, D.R. Schneeberger et T. Berg (1998) Arctic springtime depletion of mercury. *Nature*, **394**, 331-332.

- Schuster, P.F., D.P Krabbenhoft, D.L Naftz, L. Dewayne Cecil, M.L. Olson, J.F. Dewild, D.D. Susong, J.R. Green et M.L. Abbott (2002) Atmospheric mercury deposition during the last 270 years: A glacial ice core record of natural and anthropogenic sources. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 2303-2310.
- Seigneur, C., J. Wrobel et E. Constantinou (1994) A chemical kinetic mechanism for atmospheric inorganic mercury. *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 1589-1597.
- Sirko, A., M. Zatyka, E. Sadowy et D. Hulanicka (1995) Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia-Coli* K-12 - Evidence for a functional overlapping of sulfate-binding and thiosulfate-binding proteins. J. Bacteriol., 177, 4134-4136.
- Stahlmann, J., R. Warthmann et H. Cypionka (1991) Na⁺-dependent accumulation of sulfate and thiosulfate in marine sulfate-reducing bacteria. Arch. Microbiol., 155, 554-558.
- Stein, W.D. (1990) Channels, carriers, and pumps: an introduction to membrane transport, San Diego: Academic Press.
- Stumm, W. et J.J. Morgan (1996) Aquatic Chemistry, New-York, NY, John Wiley and Sons, Inc.
- Takano, B. (1987) Correlation of volcanic activity with sulfur oxyanion speciation in Crater Lake. *Science*, **235**, 1633-1635.
- Takizawa, Y. (2000) Understanding Minamata disease and strategies to prevent further environmental contamination by methylmercury. *Water Sci. Technol.*, 42, 138-146.
- Tipping, E. (2002) Cation binding by humic substances, United Kingdom: Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Tipping, E. (2007) Modelling the interactions of Hg(II) and methylmercury with humic substances using WHAM/Model VI. *Appl. Geochem.*, **22**, 1624-1635.
- Tokos J.J.S., B. Hall, J.A. Calhoun et E.M. Prestbo (1998) Homogeneous gas-phase reaction of Hg⁰ with H₂O₂, O₃, CH₃I, and (CH₃)₂S: implications for atmospheric Hg cycling. *Atmos. Environ.*, **32**, 823-827.
- Triffreau, C., J. Lutzenkirchen et P. Behra (1995) Modeling the adsorption of mercury(II) on (hydr)oxides: I, amorphous iron oxide and a-quartz. J. Colloid Interf. Sci., 172, 82-93.
- UNEP, (2006) Report on the international mercury conference: how to reduce mercury supply and demand.
- Vallée, M. et R. Jeanjean (1968) Le système de transport de SO₄²⁻ chez *Chlorella pyrenoidosa* et sa régulation. *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 606-617.
- Van Gemerden, H. (1993) Microbial mats: A joint venture. *Marine Geology*, **113**, 3-25.
- Van Loon, L.L., E.A. Mader et S.L. Scott (2000) Reduction of the aqueous mercuric ion by sulfite: UV spectrum of HgSO₃ and its intramolecular redox reaction. J. *Phys. Chem. A*, **104**, 1621-1626.
- Van Loon, L.L., E.A. Mader et S.L. Scott (2001) Sulfite stabilisation and reduction of the aqueous mercuric ion: kinetic determination of sequential formation constants. J. Phys. Chem. A, 105, 3190-3195.
- Veldeman, E., L. Vantdack, R. Gijbels et E.N. Pentcheva (1991) Sulfur species and associated trace-elements in South-West Bulgarian thermal waters. *Appl. Geochem.*, 6, 49-62.
- Vigneault, B., J. Holdner et J. Bélanger (2003) Validation of an anion exchange method for the preservation and analysis of thiosalt speciation in mining waste waters. CANMET Ressources naturelles. Report MMSL 03-002.

- Wasserlauf, M. et J.E. Dutrizac (1982) The chemistry, generation and treatment of thiosalts in milling effluents. CANMET, Ressources naturelles. Report 82-4E.
- Webster, J.G. (1987) Thiosulphate in surficial geothermal waters, North Island, New Zealand. *Appl. Geochem.*, **2**, 579-584.
- Webster, J.G. (1989) An analytical scheme for the determination of sulphide, polysulphide, thiosulphate, sulphite and polythionate concentrations in geothermal waters. Report CD 2406.
- Weiss-Magasic, C., B. Lustigman et L.H.Lee (1997) Effect of mercury on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii. Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **59**,187-193.
- Wetzel, R.G. (2001) Limnology : Lake and River Ecosystems. 3rd éd. San Diego: Academic Press.
- Whitton, B.A. (1971) Toxicity of heavy metals to freshwater algae -a review. *Phykos*, **9**, 116-123.
- Xu, Y., M.A.A Schoonen, D.K. Nordstrom, K.M. Cunningham et J.W. Ball (1998)
 Sulfur geochemistry of hydrothermal waters in Yellowstone National Park: I.
 The origin of thiosulfate in hot spring waters. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 62, 3729-3743.
- Xu, Y., M.A.A Schoonen, D.K. Nordstrom, K.M. Cunningham et J.W. Ball (2000)
 Sulfur geochemistry of hydrothermal waters in Yellowstone National Park,
 Wyoming, USA. II. Formation and decomposition of thiosulfate and
 polythionate in Cinder Pool. J. Volcan. Geoth. Res., 97, 407-423.
- Xue, H.-B., W. Stumm et L. Sigg (1988) The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water. Res.*, **22**, 917-926.
- Yildiz, F.H., J.P. Davies et A.R. Grossman (1994) Characterization of sulfate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfursufficient growth. *Plant Physiol.*, **104**, 981-987.

- Zhang, J.Z. et F.J. Millero (1993) The chemistry of the anoxic waters in the Cariaco Trench. *Deep-sea Research I*, **40**, 1023-1041.
- Zopfi, J., T.G. Ferdelman, B.B. Jřrgensen, A. Teske et B. Thamdrup (2001) Influence of water column dynamics on sulfide oxidation and other major biogeochemical processes in the chemocline of Mariager Fjord (Denmark). *Marine Chem.*, 74, 29-51.