



**HAL**  
open science

# Rôle de différents compartiments microbiens (biofilms, matières en suspension, sédiments de surface) et de leurs constituants (bactéries, polymères extracellulaires et biominéraux) sur la méthylation et la réduction de HgII

Paul-Philippe Remy

## ► To cite this version:

Paul-Philippe Remy. Rôle de différents compartiments microbiens (biofilms, matières en suspension, sédiments de surface) et de leurs constituants (bactéries, polymères extracellulaires et biominéraux) sur la méthylation et la réduction de HgII. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0076 . tel-01751715

**HAL Id: tel-01751715**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751715v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

**Par Paul-Philippe REMY**

**Rôle de différents compartiments microbiens (biofilms, matières en suspension, sédiments de surface) et de leurs constituants (bactéries, polymères extracellulaires et biominéraux) sur la méthylation et la réduction de Hg<sup>II</sup>**

**Le 1<sup>er</sup> juillet 2015**

**MEMBRES DU JURY :**

**Rapporteurs :**

**M. Rémy GUYONEAUD**

**M. Laurent CHARLET**

**PU, Université de Pau et des Pays de l'Adour**

**PU, Université Joseph Fourier, Grenoble**

**Examineurs :**

**M. François GUYOT**

**M. Michel GRIMALDI**

**M. Patrick BILLARD**

**M. Jörg SCHÄFER**

**PU, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris**

**DR, Institut de Recherche pour le Développement, Paris**

**MCU, Université de Lorraine**

**PU, Université de Bordeaux (co-encadrant)**

**Directeur de thèse :**

**M. Frédéric JORAND**

**PU, Université de Lorraine**











**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

**Par Paul-Philippe REMY**

**Rôle de différents compartiments microbiens (biofilms, matières en suspension, sédiments de surface) et de leurs constituants (bactéries, polymères extracellulaires et biominéraux) sur la méthylation et la réduction de Hg<sup>II</sup>**

**Le 1<sup>er</sup> juillet 2015**

**MEMBRES DU JURY :**

**Rapporteurs :**

**M. Rémy GUYONEAUD**

**M. Laurent CHARLET**

**PU, Université de Pau et des Pays de l'Adour**

**PU, Université Joseph Fourier, Grenoble**

**Examineurs :**

**M. François GUYOT**

**M. Michel GRIMALDI**

**M. Patrick BILLARD**

**M. Jörg SCHÄFER**

**PU, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris**

**DR, Institut de Recherche pour le Développement, Paris**

**MCU, Université de Lorraine**

**PU, Université de Bordeaux (co-encadrant)**

**Directeur de thèse :**

**M. Frédéric JORAND**

**PU, Université de Lorraine**



*En premier lieu, je tiens à remercier Alain Walcarius pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire LCPME et m'avoir permis d'y réaliser ma thèse.*

*Je remercie particulièrement mon directeur de thèse, Frédéric Jorand, tout d'abord pour m'avoir proposé ce sujet à l'issue de mon Master et pour m'avoir encadré au cours de ces trois ans et demi ainsi que pour son aide dans l'organisation et la rédaction de ce manuscrit. Un grand merci à Jörg Schäfer qui m'a accueilli à maintes reprises au sein de l'équipe « Transferts Géochimiques des Métaux à l'interface continent océan » du laboratoire EPOC et pour les nombreuses discussions qui ont incontestablement enrichi ce travail. Un grand merci aussi à Patrick Billard pour son aide précieuse et l'apport essentiel de la biologie moléculaire dans ce travail.*

*Je tiens à remercier Rémy Guyoneaud, Laurent Charlet, François Guyot et Michel Grimaldi pour avoir accepté la tâche de juger ce travail ainsi que pour les échanges enrichissants lors de la soutenance.*

*Cette étude n'aurait pas été possible sans les financements du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, de l'Agence Nationale de la Recherche ainsi que de la Zone Atelier Moselle.*

*J'aimerais remercier vivement toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont eu un rôle dans ce projet. Un grand merci à Lionel Dutruch pour m'avoir accompagné patiemment dans la spéciation du mercure et dans les calculs qui en découlent et à Christophe Cloquet qui m'a ouvert les portes de son service d'analyse (SARM) ainsi qu'à Nicolas Estrade, Barbara Marie et Pierre-Yves Martin pour leur aide et leurs conseils quant à l'utilisation du DMA. Laurent Lanceleur et Emmanuel Tessier, je vous remercie pour votre soutien et votre aide lors de l'échantillonnage dans le Grand Nord mais aussi plus généralement pour les moments inoubliables que nous avons passé ensemble au Canada. J'aimerais remercier aussi très chaleureusement Moustapha Abdelmoula pour les analyses en spectroscopie Mössbauer, Christelle Despas pour m'avoir formé à l'HPLC, Jaafar Ghanbaja et Sylvie Migot pour les analyses en microscopie électronique, Isabelle Bihannic, Lise*

## Remerciements

---

Salsi et Renaud Gley pour les analyses DRX, Brian Grégoire et Angelina Razafitianamaharavo pour les analyses BET. Je tiens aussi à remercier les étudiants stagiaires que j'ai eu l'opportunité d'encadrer, Alice, Darelle et Sarah, et qui ont participé à la réalisation de ce projet.

Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans les acteurs canadiens du projet Arctic Metals, Jean Carignan qui a initié ce projet mais n'en aura malheureusement pas vu l'aboutissement ainsi que Warwick Vincent, Reinhard Pienitz, Julie Sansoulet et plus généralement les membres de Takuvik ou du CEN que j'ai eu le plaisir de croiser notamment au centre de recherche de Whapmagoostui-Kuujuarapiik mais aussi Oleg Pokrovsky, le coordinateur du projet.

Merci bien sûr à tout le personnel du LCPME pour son accueil et sa sympathie et plus particulièrement Jean-Paul, Gérard, Patrick, Sébastien N., Sébastien G., Khalil, Christelle C., Marie, Jacqueline, Christelle R., Cédric, Christian, Christophe M., Mathieu, Christophe G, et tous les autres.

Je souhaite remercier aussi les personnes qui m'ont encadré et que j'ai côtoyé au cours de mes trois ans de monitorat notamment Virginie, Cyril, Claire, Isabelle et Stéphane du laboratoire DynAMic pour m'avoir conseillé et pour leur disponibilité.

Baptiste, Jean-Sébastien, Florence, Marjo et Stéphane, nous avons incontestablement partagé bien plus qu'un bureau et une salle de manip et pour tous les bons moments passés ensemble je vous remercie de tout cœur !

Anne-Sophie, Erell et Asfaw, vous m'avez tellement apporté tant sur le plan personnel que professionnel, merci pour tout !

A tous mes amis qui m'ont épaulé (porté parfois) au cours de ces quatre dernières années (et pour certains depuis bien plus longtemps) un grand MERCI ! Quent, Mia et Julien, Dach, Paulo et Lulu, Gilloux et Cha, Lolo, Ké et Marianne, Gros Morel et Stéph, Fax, Lulu, Thibaut et Ninon, Romain, Guigui, Marion, Bruno, Nico, Cécile et Jean-Lou, Mangin, Hervé et l'Abricot, Pierre et Lili, Marie-Hélène, que ceux que j'oublie me pardonnent.

## Remerciements

---

*Mes plus sincères remerciements vont aux membres de ma famille qui m'ont toujours motivé et ont su cultiver mon goût pour la Science. Maman, Papa, Tata Brigitte, Tata Christiane et Tonton Jacques, je ne saurais vous dire à quel point je vous aime et vous suis reconnaissant d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Mamie, je sais que tu es fière de moi là où tu es.*

*Nicole et Georges, Ninie et Chris, Pauline et Louis, vous m'avez accueilli dans votre famille et avez toujours cru en moi et je vous suis reconnaissant pour ça.*

*Et ma chérie, toi qui partages ma vie depuis bientôt onze ans, tu m'as accompagné tout au long de cette aventure. Tu as toujours été là pour moi, faisant preuve de patience et de compréhension et tu as sans aucun doute une part très importante dans l'aboutissement de ce travail.*

*Vic, tu aurais certainement soutenu ta thèse prochainement dans cette même salle de la Faculté de pharmacie. Malheureusement, le sort en a décidé autrement. Tu étais et restera pour moi un ami extraordinaire. Cette thèse je te la dédie.*





<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>V</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>3</b>
<b>CHAPITRE 1 : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>11</b>
<b>A. LE MERCURE, CYCLE BIOGEOCHIMIQUE ET METHYLATION.....</b>	<b>13</b>
I. LE MERCURE DANS L'ENVIRONNEMENT.....	13
1) <i>L'élément mercure</i> .....	13
2) <i>Réactions redox</i> .....	17
II. IMPACTS SANITAIRES ET TOXICITE DU MERCURE DANS L'ENVIRONNEMENT.....	19
1) <i>Les différentes formes organiques du mercure</i> .....	19
2) <i>Epidémiologie de l'exposition au mercure</i> .....	19
3) <i>Cas de l'environnement subarctique canadien</i> .....	22
a) <i>Caractéristiques du milieu subarctique canadien</i> .....	23
b) <i>Les mares thermokarstiques en Territoire Nunavik</i> .....	25
c) <i>L'écosystème aquatique subarctique canadien</i> .....	27
d) <i>Origine, devenir et impact des polluants sur les populations autochtones</i> .....	28
III. LA METHYLATION DU MERCURE.....	31
1) <i>Voies d'entrée du mercure dans la cellule et principaux substrats à la méthylation</i> .....	32
a) <i>Transport basé sur les protéines codées par l'opéron mer</i> .....	34
b) <i>Diffusion simple d'espèces neutres dissoutes</i> .....	34
c) <i>Diffusion facilitée et transport actif</i> .....	35
d) <i>Hg<sup>0</sup> comme substrat de la méthylation</i> .....	36
2) <i>Transformations biologiques et microorganismes impliqués</i> .....	36
3) <i>Génétique et mécanisme enzymatique de la méthylation</i> .....	38
4) <i>Méthylation abiotique</i> .....	45
5) <i>Déméthylation</i> .....	45
IV. FACTEURS BIOGEOCHIMIQUES IMPACTANT LA METHYLATION.....	49
1) <i>Facteurs impactant l'activité bactérienne</i> .....	49
a) <i>Etat physiologique des bactéries</i> .....	49
b) <i>Concentration en sulfate et sulfure</i> .....	49
c) <i>Rôle de la matière organique</i> .....	51
d) <i>Température</i> .....	52
2) <i>Biodisponibilité du substrat</i> .....	52
a) <i>Passage dans le milieu intracellulaire</i> .....	52
b) <i>Effet de la matière organique</i> .....	53
c) <i>Effet du pH</i> .....	55
d) <i>Potentiel redox</i> .....	56
<b>B. LE BIOFILM MICROBIEN ET SES INTERACTIONS AVEC LE MERCURE.....</b>	<b>60</b>
I. LE BIOFILM MICROBIEN.....	60
1) <i>Définition et organisation du biofilm</i> .....	60
2) <i>Etapes de la formation d'un biofilm en milieu naturel</i> .....	63
3) <i>Interactions des communautés microbiennes au sein du biofilm</i> .....	64
4) <i>La matrice d'EPS, une barrière diffusive</i> .....	66
II. LE BIOFILM : SIEGE POTENTIEL DE LA FORMATION DE MINERAUX Fe <sup>II</sup> REACTIFS (ROUILLE VERTE) VIS-A-VIS DU MERCURE.....	68
1) <i>Les rouilles vertes</i> .....	69
2) <i>Stabilité et réactivité des RVs</i> .....	70
III. LE BIOFILM ET LA METHYLATION DU MERCURE.....	73

<b>CHAPITRE 2 : POTENTIELS DE METHYLATION DE DIFFERENTS COMPARTIMENTS MICROBIENS (EAU BRUTE, BIOFILM, SEDIMENT DE SURFACE) AU SEIN DE MARES DULCICOLES TEMPEREES ET DE MARES THERMOKARSTIQUES SUBARCTIQUES ET SPECIFICITE DE LA METHYLATION DU MERCURE PAR LE BIOFILM. ....</b>	<b>79</b>
I. INTRODUCTION .....	81
II. MATERIELS ET METHODES.....	84
1) Sites d'étude : localisations et caractéristiques .....	84
2) Echantillonnage .....	91
3) Caractérisation des échantillons.....	95
a) Détermination de la densité bactérienne .....	95
b) Concentration en COT et matière sèche .....	96
c) Analyses élémentaires .....	96
d) Concentrations en Hg <sub>inorg</sub> et MeHg .....	97
i) En phase dissoute : eau brute.....	97
ii) En phase particulaire : biofilms et sédiment de surface .....	99
4) Méthylation du mercure .....	100
a) Incubations avec le mercure .....	100
i) Echantillons environnementaux .....	100
ii) Souche pure méthylante.....	101
b) Ajout monoisotopique et détermination des vitesses de méthylation .....	104
III. RESULTATS.....	108
1) Caractérisation des échantillons.....	108
a) Sites d'étude .....	108
b) Echantillons .....	109
i) Eau brute.....	109
ii) Sédiment de surface .....	113
iii) Biofilm.....	119
2) Vitesses de méthylation du mercure des trois compartiments microbiens (eaux brutes, biofilms, sédiments de surface).....	120
a) Eau brute.....	127
b) Biofilm .....	128
c) Sédiment de surface.....	129
d) Vitesses de déméthylation .....	133
e) Effet de la température d'incubation sur la vitesse de méthylation .....	134
f) Extrapolation à une mare thermokarstique .....	135
3) Impact des caractéristiques du biofilm sur l'activité méthylante .....	141
a) Impact de la structure du biofilm sur la vitesse de méthylation .....	141
b) Effet du mode de croissance planctonique versus biofilm sur la vitesse de méthylation ( <i>Desulfobulbus propionicus</i> 1pr3) .....	145
i) Culture de la souche <i>Desulfobulbus propionicus</i> 1pr3 .....	145
ii) Vitesses de méthylation de la souche <i>Desulfobulbus propionicus</i> 1pr3.....	146
iii) Impact des EPS sur la vitesse de méthylation de <i>Desulfobulbus propionicus</i> 1pr3 .....	148
IV. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	150
<b>CHAPITRE 3 : GROUPES METABOLIQUES BACTERIENS IMPLIQUES DANS LA METHYLATION DU MERCURE PAR LE BIOFILM.....</b>	<b>157</b>
I. INTRODUCTION .....	159
II. MATERIELS ET METHODES.....	161
1) Enrichissement en groupes métaboliques SRB et IRB et validation des inhibiteurs spécifiques .....	161
a) Dosage du sulfate.....	163
b) Dosage du Fe <sup>II</sup> et Fe <sup>total</sup> par spectrophotométrie .....	163
2) Détection et diversité des séquences hgCA .....	164
a) Extraction de l'ADN .....	164

b)	Quantification d'ADN par spectrophotométrie .....	164
c)	Amplification par PCR en point final .....	164
d)	Electrophorèse sur gel d'agarose et purification des produits de PCR .....	165
e)	Clonage de produits PCR .....	165
f)	Transformation d' <i>Escherichia coli</i> .....	166
g)	Séquençage des produits PCR et traitement des données.....	166
3)	<i>Méthylation du mercure</i> .....	167
III.	RESULTATS ET DISCUSSION .....	168
1)	<i>Enrichissement en groupes métaboliques SRB et IRB et validation des inhibiteurs spécifiques</i> .....	168
2)	<i>Recherche du gène <i>hgcA</i> au sein des échantillons environnementaux et analyse de sa diversité</i> .....	174
a)	Validation de la méthode d'amplification du gène <i>hgcA</i> par PCR.....	176
b)	Recherche de séquences du gène <i>hgcA</i> .....	177
c)	Clonage des produits de PCR.....	180
3)	<i>Vitesses de méthylation du mercure en présence d'inhibiteurs spécifiques de croissance</i> .....	184
IV.	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	189
<b>CHAPITRE 4 : REACTION DE PSEUDO-PREMIER-ORDRE DE ROUILLES VERTES ABIOTIQUES OU BIOLOGIQUE VIS-A-VIS DU Hg<sup>II</sup> ET DU C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>. EFFET DU PH ET D'AGENTS STABILISANTS (PHOSPHATE, SILICATE, ACIDE POLYACRYLIQUE ET CELLULES BACTERIENNES) .....</b>		<b>193</b>
I.	SYNTHÈSE DES RÉSULTATS .....	195
II.	ABSTRACT .....	200
III.	INTRODUCTION .....	201
IV.	CHEMICAL BACKGROUND .....	203
1)	<i>Mercury and GR</i> .....	203
2)	<i>Methyl red and GR</i> .....	204
V.	MATERIALS AND METHODS.....	205
1)	<i>Chemicals</i> .....	205
2)	<i>Synthesis of GRs</i> .....	205
3)	<i>Experimental set-up of Hg<sup>II</sup> and methyl red reduction by GRs</i> .....	206
4)	<i>Analyses</i> .....	207
VI.	RESULTS AND DISCUSSION .....	209
1)	<i>Characterization of GRs</i> .....	209
2)	<i>Kinetics of Hg<sup>II</sup> reduction by GRs</i> .....	212
a)	Evolution of the Fe <sup>II</sup> concentration and determination of the stoichiometry of the reduction of Hg <sup>II</sup> species by GRs .....	213
b)	Effect of pH on GR reactivity .....	216
c)	Minor impact of cells and phosphate on the Hg <sup>II</sup> reduction .....	218
3)	<i>Kinetics of methyl red reduction by GRs</i> .....	218
a)	Critical role of bacterial cells and phosphate on MR reduction .....	219
b)	A moderate inhibition of GRs reactivity towards MR by silicate and polyacrylic acid.....	222
4)	<i>MR and Hg<sup>II</sup> reduction mechanisms by GRs</i> .....	223
a)	Estimation of the number of moles of contaminant that could be reduced by GRs .....	223
b)	Parameters influencing the kinetics of the MR reduction vs the Hg <sup>II</sup> reduction .....	224
VII.	CONCLUSION .....	226
<b>CONCLUSION - DISCUSSION .....</b>		<b>229</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>239</b>
<b>ANNEXES AUX CHAPITRES 2 ET 3 .....</b>		<b>263</b>
<b>ANNEXES AU CHAPITRE 4 POUR L'ARTICLE : .....</b>		<b>275</b>



---

## Liste des abréviations

**ppb** : partie par milliard ( $1/10^9$ )  
**Hg<sub>inorg</sub>** : mercure inorganique  
**Hg<sub>Dinorg</sub>** : mercure inorganique dissous  
**Hg<sub>Pinorg</sub>** : mercure inorganique particulaire  
**MeHg** : monométhylmercure  
**MeHg<sub>D</sub>** : monométhylmercure dissous  
**MeHg<sub>P</sub>** : monométhylmercure particulaire  
**ANR** : Agence Nationale de la Recherche  
**CESA** : Contaminants et Environnements : Santé, Adaptabilité, Comportements et Usages  
**PCB** : polychlorobiphényles  
**DDT** : dichlorodiphényltrichloroéthane  
**HAP** : hydrocarbure aromatique polycyclique  
**ATP** : adénosine triphosphate  
**K<sub>ow</sub>** : coefficient de partage octanol-eau  
**DTE** : dithioerythritol  
**SRB** : *sulfate reducing bacteria* (bactéries sulfatoréductrices ou sulfidogènes)  
**IRB** : *iron reducing bacteria* (bactéries ferriréductrices)  
**MPA** : *methane producing archaea* (archées méthanogènes)  
**ATCC** : *American type culture collection*  
**PCA** : *Plate count agar*  
**MOD** : matière organique dissoute  
**EPS** : *extracellular polymeric substances* (substances polymériques extra-cellulaires)  
**PET** : particules exopolymériques transparentes  
**RV(s)** : rouille(s) verte(s) = *green rust* (GR)  
**BESA** : acide 2-bromoéthanesulfonique  
**PTFE** : polytétrafluoroéthylène  
**CEN** : Centre d'Etude Nordique  
**ARS** : Agence Régionale de la Santé  
**BRGM** : Bureau de Recherche Géologiques et Minières  
**MES** : matières sèches en suspension  
**HDPE** : *high density polyethylene* (polyéthylène haute densité)  
**LDPE** : *low density polyethylene* (polyéthylène basse densité)  
**MH** : matière humide  
**MS** : matière sèche  
**MSSC** : matière sèche sans cendre  
**COT** : carbone organique total  
**GC-ICP-MS** : couplage chromatographe en phase gazeuse et spectromètre de masse à plasma couplé induit  
**HPLC** : *high-performance liquid chromatography* = chromatographie en phase liquide à haute performance  
**cps** : coups par seconde  
**AAS** : *atomic adsorption spectrometry* (spectrométrie d'absorption atomique)  
**DMA** : *direct mercury analyser*  
**EB** : eau brute (non filtrée, non autoclavée)  
**EBA** : eau brute autoclavée (non filtrée)  
**DO** : densité optique  
**LD** : limite de détection  
**%MeHg** : potentiel de méthylation  
**%MeHg j<sup>-1</sup>** : vitesse de méthylation  
**%DeMeHg j<sup>-1</sup>** : vitesse de déméthylation  
**NA** : non applicable  
**ND** : non déterminé  
**cell** : cellule(s) bactérienne(s)

---

**PCR** : *polymerase chain reaction* = amplification en chaîne par polymérase (ACP)  
**q-PCR** : PCR quantitative  
**qRT-PCR** : *quantitative Reverse Transcriptase PCR* = PCR associée à une étape de transcription inverse (recherche d'une séquence d'ARN)  
**LB** : *lysogeny broth* = bouillon lysogène  
**DRX** : diffraction des rayons X  
**MET** : microscopie électronique à transmission  
**CIP** : Collection Institut Pasteur  
**GR1<sub>ab</sub>** : rouille verte carbonatée synthétisée chimiquement  
**GR2<sub>ab</sub>** : rouille verte sulfatée synthétisée chimiquement  
**GR1<sub>bio</sub>** : rouille verte carbonatée biotique  
**GR1<sub>ab+P</sub>** : rouille verte carbonatée synthétisée chimiquement en présence de phosphate  
**GR1<sub>ab+Si</sub>** : rouille verte carbonatée synthétisée chimiquement en présence de silicate  
**GR1<sub>ab+paa</sub>** : rouille verte carbonatée synthétisée chimiquement en présence d'acide polyacrylique  
**GR2<sub>ab+cells</sub>** : rouille verte sulfatée synthétisée chimiquement en présence des corps bactériens  
**A** : aire de la surface spécifique par unité de volume ( $\text{m}^2 \text{L}^{-1}$ )  
 **$k_{\text{obs}}$**  : constante de cinétique de pseudo-premier ordre ( $\text{min}^{-1}$ )  
 **$k_{\text{FeII}}$**  :  $k_{\text{obs}}$  normalisé par la quantité de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  structural de la RV ( $\text{L mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$ )  
 **$k_{\text{S}}$**  :  $k_{\text{obs}}$  normalisé par la quantité de sites  $\text{Fe}^{\text{II}}$  de surface de la RV ( $\text{L mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$ )  
**paa** : *polyacrylic acid* = acide polyacrylique







---

# **INTRODUCTION GENERALE**



Le mercure est un élément trace métallique présent dans l'environnement principalement sous forme de mercure élémentaire gazeux ( $\text{Hg}^0$ ) dans l'atmosphère et de mercure mercurique ( $\text{Hg}^{\text{II}}$ ) dissous ou particulaire dans les milieux aquatiques. L'activité anthropique a largement contribué, notamment à partir de la révolution industrielle, à déséquilibrer le cycle naturel du mercure et à conduire à une augmentation des flux entre les différents compartiments de l'environnement. Parmi les transformations qui affectent le cycle biogéochimique du mercure, sa méthylation est une des plus étudiées du fait de la toxicité des espèces associées : le monométhylmercure ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , MeHg) et le diméthylmercure ( $\text{CH}_3\text{HgCH}_3$ , DMeHg). Bien que le DMeHg soit bien plus toxique que le MeHg, il est bien moins stable que ce dernier, c'est donc le MeHg qui est le plus préoccupant. Sa forte liposolubilité lui permet de facilement franchir les membranes cellulaires ce qui favorise sa bioaccumulation au sein des organismes exposés (*e.g.* dans la chair et la graisse des poissons). Il est alors bioamplifié et se retrouve donc chez les superprédateurs à des concentrations suffisamment élevées pour que son caractère neurotoxique s'exprime.

Au sein d'un écosystème environnemental, la teneur en MeHg est la résultante des processus de méthylation et de déméthylation du Hg. Depuis une quarantaine d'années, de nombreuses études ont montré que l'activité de microorganismes anaérobies est associée majoritairement à la méthylation du Hg dans les environnements aquatiques, alors que la déméthylation résulte aussi bien de processus biologiques que chimiques. Les travaux antérieurs portant sur la biométhylation du mercure suggèrent que ce phénomène est vraisemblablement fortuit, c'est-à-dire que la méthylation du mercure n'apporte aucun avantage sélectif aux microorganismes. Ces études ont, de plus, permis d'identifier des groupes métaboliques bactériens ayant une implication significative dans la méthylation ou dans la déméthylation : les bactéries sulfatoréductrices (*sulfate reducing bacteria*, SRB), les *Archaea* méthanogènes (*methane producing Archaea*, MPA) et les ferriréductrices (*iron reducing bacteria*, IRB).

La plupart des études se sont focalisées sur la vitesse de méthylation de cultures planctoniques de souches pures cultivées en laboratoire et peu sur des *consortia* environnementaux comme les biofilms. Un biofilm est défini comme une communauté complexe de microorganismes (virus, bactéries, et protistes) adhérents entre eux ou à une surface et enrobés d'une matrice de substances polymériques extracellulaires. Il est en général admis que la croissance en biofilm constitue la forme de vie microbienne la plus représentative des microorganismes dans l'environnement aquatique. Au sein du biofilm, même en aérobie, la présence de microniches anoxiques abrite des groupes métaboliques anaérobies susceptibles d'être impliqués dans la méthylation du mercure. Par ailleurs, il a été montré que des cocultures de souches bactériennes conduisaient à une méthylation

du mercure qui n'était pas observé en culture pure. Ce phénomène s'expliquait par des relations trophiques entre les souches permettant leur croissance. Les biofilms, du fait de la proximité physique des microorganismes entre eux, sont susceptibles de favoriser de telles relations trophiques. De plus, le biofilm est décrit comme relativement riche en MeHg, sa rétention serait accentuée à la fois par le caractère hydrophobe du biofilm et du MeHg. Il entre dans la chaîne trophique par les organismes brouteurs qui le consomment. Le MeHg du biofilm pourrait alors représenter ainsi une voie majeure d'entrée du mercure dans la chaîne alimentaire. Malgré tout, le rôle du biofilm bactérien dans la méthylation du mercure reste sujet à débat. Certains travaux suggèrent que le MeHg du biofilm provient de l'activité méthyliante des bactéries en suspension dans la colonne d'eau (bactéries planctoniques), alors que d'autres proposent que l'activité méthyliante du biofilm est prépondérante. Toutefois, certains constituants du biofilm, comme ceux de la matrice (les substances polymériques extracellulaires ou EPS), pourraient entraver la méthylation en jouant le rôle de barrière diffusive, ou diminuant la biodisponibilité du mercure inorganique. D'autres constituants, formés par l'activité ferriréductrice des bactéries du biofilms, pourraient réagir avec  $\text{Hg}^{\text{II}}$  et entrer ainsi en compétition avec la méthylation du mercure. Les hydroxy-sels  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$  de type rouille verte ont cette capacité en réduisant  $\text{Hg}^{\text{II}}$  en  $\text{Hg}^0$ . Ils peuvent être biogénérés par des bactéries ferriréductrices en anoxie. Ainsi, il a été montré récemment que des biofilms ferrugineux incubés en anoxie conduisaient à la formation de rouille verte. Les rouilles vertes de synthèse sont connues pour leur capacité à réduire un certain nombre de composés organiques et inorganiques (notamment le mercure cationique), en revanche, les rouilles vertes obtenues par voie biologique sont susceptibles de « perdre » cette réactivité du fait des composés polymériques et anioniques sorbés à leur surface. Cette perte de réactivité a été décrite vis-à-vis des nitrates, mais aucune étude n'a, à ce jour, porté sur leur réactivité vis-à-vis du mercure.

A partir de ces observations, nous avons fixé cinq objectifs pour mieux comprendre la contribution des biofilms à la méthylation du mercure :

- i) Examiner la contribution à la méthylation du mercure de compartiments microbiens de différents environnements (région subarctique et de climat tempéré) : i) matières en suspension dans la colonne d'eau, ii) biofilms installés dans la colonne d'eau sur des supports artificiels et iii) sédiments de surface.
- ii) Montrer s'il existe une méthylation propre au biofilm qui pourrait par exemple être liée à sa structure ou à la présence d'EPS.
- iii) Rechercher un lien éventuel entre la présence du gène *hgcA* (« le gène » de la méthylation) dans les compartiments microbiens et le taux de méthylation.
- iv) Identifier les groupes métaboliques bactériens impliqués dans la méthylation du mercure au sein des compartiments microbiens.
- v) Evaluer la réactivité d'une rouille verte biologique vis-à-vis du mercure et son impact sur la méthylation du mercure.

Le premier chapitre de ce manuscrit présente une analyse bibliographique sur le cycle biogéochimique du mercure et son impact sanitaire sur l'environnement. Un accent est porté sur l'environnement subarctique canadien. En effet, cette étude s'inscrit dans un projet ANR (Arctic Metals, CESA) visant à mieux comprendre les sources et les transformations de certains métaux traces (Hg, Se) au sein de l'environnement arctique et subarctique dans le contexte du changement climatique. L'analyse bibliographique traitera également du biofilm microbien. Un regard particulier sera porté aux rouilles vertes, des minéraux susceptibles d'être biogénés par ces biofilms.

Le deuxième chapitre est consacré à l'évaluation des vitesses de méthylation du mercure des différents compartiments microbiens de mares dulcicoles (Lorraine et Canada). Les échantillons prélevés sur ces sites ont été incubés en présence d'une source monoisotopique de mercure inorganique. L'évolution des rapports isotopiques des échantillons a permis d'estimer les vitesses de méthylation. Par ailleurs, l'influence de la structure du biofilm et des EPS sur la méthylation a été étudiée.

Le troisième chapitre vise à identifier les groupes métaboliques impliqués dans la méthylation du mercure au sein des compartiments microbiens, en combinant une approche moléculaire

(recherche et séquençage du gène *hgcA*) à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de groupes métaboliques.

Dans le dernier chapitre, la réactivité de différentes rouilles vertes produites par voie biologique vis-à-vis du mercure cationique a été comparée à celle de rouilles vertes synthétiques. Enfin, l'ensemble des résultats seront discuté au travers d'une conclusion-discussion.

Nous montrerons que le biofilm bactérien ne constitue pas un site privilégié de la méthylation du mercure dans les écosystèmes étudiés contrairement au sédiment de surface. Pour la première fois, les vitesses de méthylation de sédiments de surface provenant de mares thermokarstiques subarctiques ont pu être quantifiées. Les sulfatoréductrices et les ferriréductrices ont pu être identifiées comme les groupes métaboliques majoritairement impliqués dans la méthylation du mercure au sein de nos échantillons. Enfin, la rouille verte carbonatée, susceptible d'être formée par l'activité ferriréductrice de certains biofilms, est capable de réduire  $\text{Hg}^{\text{II}}$  en  $\text{Hg}^0$  et ainsi d'entrer en compétition avec la méthylation du mercure.







---

## **CHAPITRE 1 : Analyse bibliographique**



## A. Le mercure, cycle biogéochimique et méthylation

### I. Le mercure dans l'environnement

#### 1) L'élément mercure

Le mercure, de symbole Hg, est un élément présent dans la croûte terrestre à des concentrations allant de 21 ppb (croûte profonde) à 56 ppb (croûte superficielle) (Wedepohl, 1995) sous forme de minerais, le cinabre ou méta-cinabre (HgS).

Le mercure pénètre dans l'environnement lors de l'érosion naturelle, par le vent ou l'eau, de roches et du sol et se retrouve dans les eaux de surfaces et l'atmosphère. Il est également rejeté naturellement dans l'air par les effluents volcaniques ou lors de feux de forêt. Depuis l'ère industrielle, l'équilibre du cycle naturel du mercure a été profondément bouleversé par l'activité humaine (Mason *et al.*, 1994). A l'heure actuelle, l'apport de mercure anthropique au cycle naturel est considérable et représente 75 % du mercure environnemental (Mason *et al.*, 1996 ; Schuster *et al.*, 2002). A titre d'exemple, les dépôts atmosphériques de mercure ont quadruplé au cours du siècle dernier du fait de l'essor de l'industrie (Figure 1).

Certaines activités rejettent du mercure directement dans le sol ou l'eau comme l'usage de fertilisants agricoles ou les rejets d'eaux usées industrielles. Alors que d'autres, la combustion de combustibles fossiles, l'exploitation minière, la fonderie ou l'incinération de déchets comme les lampes fluo-compactes, les batteries, les amalgames dentaires, *etc* impactent l'atmosphère, principalement sous les formes inorganiques et notamment Hg<sup>0</sup> (Stein *et al.*, 1996 ; Pacyna *et al.*, 2006). Le Hg<sup>0</sup> gazeux présente un temps de résidence dans l'atmosphère d'environ 6 mois à un an (Fitzgerald, 1991) ce qui implique qu'on peut retrouver des pollutions au mercure relativement loin des lieux d'émission. L'ensemble du mercure rejeté dans l'environnement se retrouve finalement dans les sols et les eaux de surface par les interactions dynamiques entre les différents compartiments de l'environnement. En milieu aquatique, il a tendance à se sorber sur les surfaces disponibles notamment dans le sédiment ou sur les particules organiques (*e.g.* bactéries, algues ; ① Figure 2) et inorganiques (minéraux, colloïdes) en suspension dans la phase eau (Craig et Moreton,

1986 ; Cossa *et al.*, 1994). Ainsi, la concentration en mercure, sa mobilité et son transport entre la colonne d'eau et le sédiment est souvent corrélée avec la quantité de matière organique (Lindberg et Harriss, 1974 ; Benoit *et al.*, 1998) ou de minéraux comme les oxydes de fer et de manganèse, eux-mêmes associés ou non à la matière organique. En effet, ces oxydes semblent jouer un rôle prépondérant dans le devenir du mercure du fait de leur grande surface d'adhésion et de leur capacité à le sorber et co-précipiter mais aussi à le libérer lors de leur dissolution (Mason *et al.*, 1993 ; Fagerström et Jernelöv, 1972). Une fois sous forme particulaire, le mercure a tendance à être accumulé notamment dans les sédiments (② Figure 2) et les glaces (Lorey et Driscoll, 1999 ; Schuster *et al.*, 2002) en attendant d'être remobilisé (remise en suspension du sédiment, fonte de la glace) (③ Figure 2) ou enfouit dans la roche (réservoir). Le devenir du mercure entre le sol, l'eau et l'atmosphère est influencé par des réactions de complexation et d'oxydoréduction (Fitzgerald *et al.*, 1991 ; Gabriel *et al.*, 2004) de nature biotique ou abiotique (Figure 2).

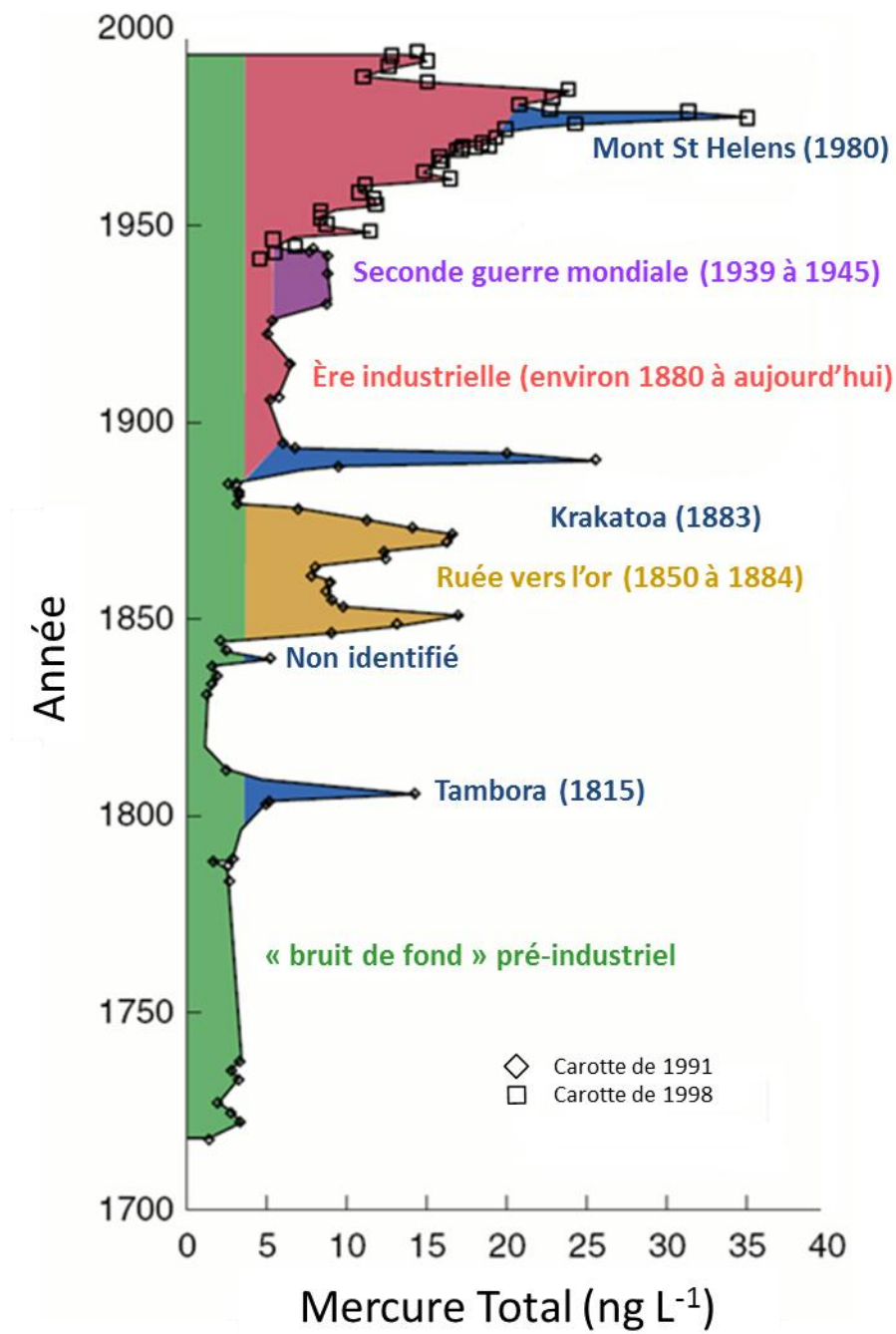


Figure 1. Evolution des dépôts atmosphériques de mercure au cours des 300 dernières années et événements historiques marquants pouvant expliquer des anomalies observées par rapport au « bruit de fond » préindustriel d'environ 4 ng L<sup>-1</sup> (en vert). Les évènements représentés en bleu correspondent à des éruptions volcaniques. Les valeurs représentées par des losanges proviennent d'une carotte extraite en 1991 et celles représentées par des carrés proviennent d'une carotte extraite en 1998 du glacier du Pic Fremont (Wyoming, USA) (d'après Schuster *et al.*, 2002).

Bien que relativement peu soluble, ( $\approx 10 \mu\text{g L}^{-1}$  d'eau pour le cinabre ; Weast, 1973), les formes dissoutes du mercure peuvent varier entre trois états de valence +2, +1 et 0 et évoluer entre des espèces inorganiques à des espèces organiques (Figure 2).

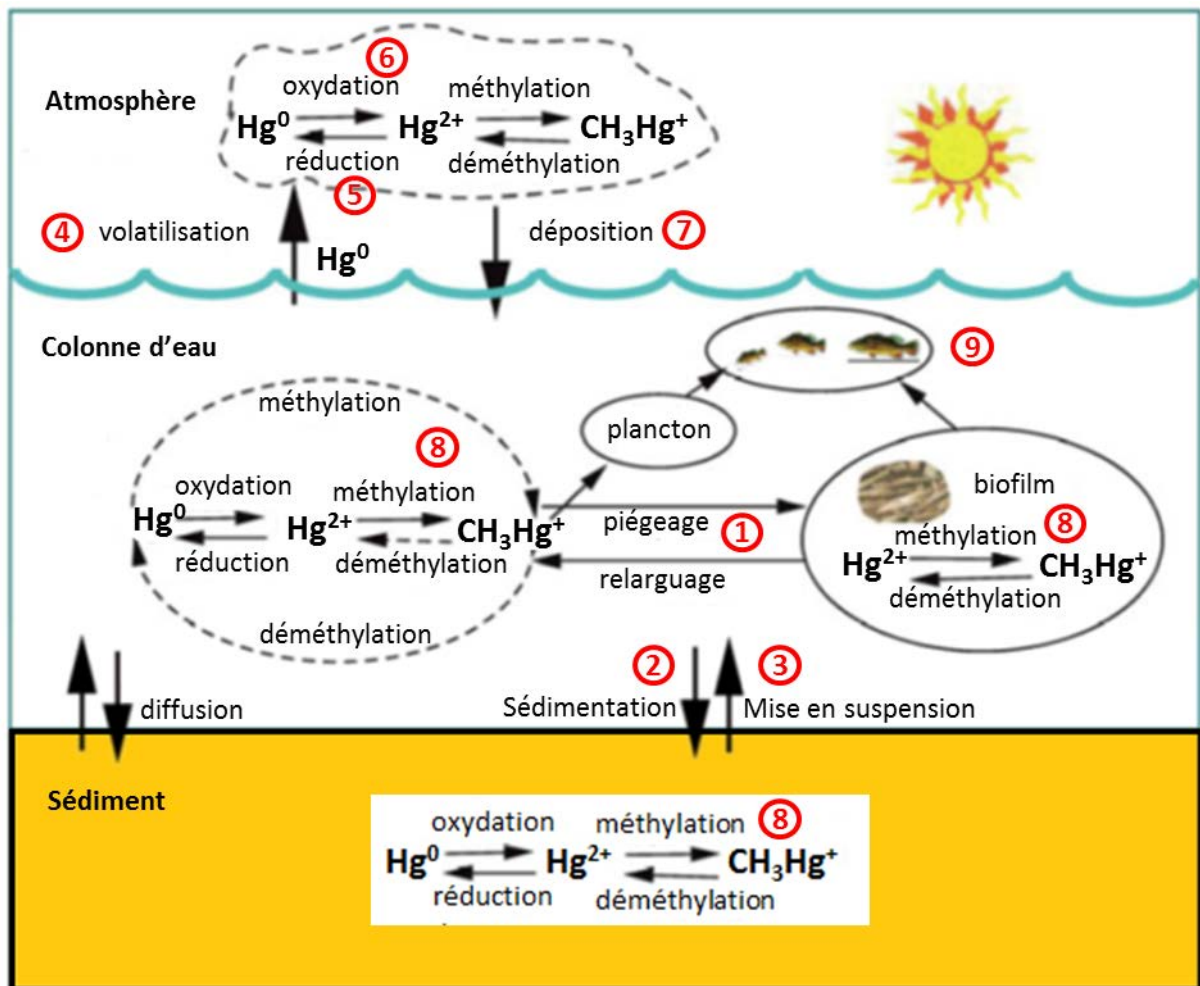


Figure 2. Cycle biogéochimique du mercure entre l'atmosphère, le milieu aquatique et le sédiment (d'après Li et Cai, 2013).  $\text{Hg}^0$  représente le mercure élémentaire et  $\text{Hg}^{2+}$ , l'ion mercurique. L'ion mercurique  $\text{Hg}^+$ , très labile, n'est pas représenté ici.  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  correspond au monométhylmercure, la forme organique la plus représentée dans l'environnement. Les réactions d'oxydoréduction entre  $\text{Hg}^0$  et  $\text{Hg}^{\text{II}}$  sont représentées ainsi que les réactions de méthylation/déméthylation entre  $\text{Hg}^{\text{II}}$  et  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ . ① piégeage du mercure ou méthylmercure dans la matière organique (e.g. biofilm) ; ② accumulation dans le sédiment de Hg particulaire ; ③ transfert de Hg du sédiment vers la colonne d'eau par la mise en suspension du sédiment ; ④ volatilisation de  $\text{Hg}^0$  depuis la colonne d'eau vers l'atmosphère ; ⑤ photoréduction dans l'atmosphère ; ⑥ photooxydation dans l'atmosphère ; ⑦ déposition via les précipitations (pluie et neige) ; ⑧ méthylation par les microorganismes de la colonne d'eau (planctoniques ou sous forme de biofilm) et du sédiment du  $\text{Hg}^{\text{II}}$  ou  $\text{Hg}^0$  ; ⑨ transfert du  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  vers la chaîne trophique via le plancton ou les organismes brouteurs qui consomment le biofilm.

A l'état d'oxydation 0, le mercure « élémentaire » purifié se présente sous la forme d'un métal argenté brillant qui a pour caractéristique d'être sous forme liquide dans les conditions normales de température et de pression (conditions dans lesquelles ce métal est volatil). La forme mercureuse  $\text{Hg}^{\text{I}}$  est stable seulement sous forme du dimère  $\text{Hg}_2^{2+}$  en solution qui peut dismuter en  $\text{Hg}^0$  et  $\text{Hg}^{2+}$  (Ullrich *et al.*, 2001). Dans les milieux dulcicoles peu chargés en sulfure, le mercure inorganique est majoritairement présent sous forme de complexes neutres  $\text{Hg}(\text{OH})_2$ ,  $\text{HgOHCl}$  et  $\text{HgCl}_2$ . D'autres espèces peuvent apparaître selon la concentration en chlorure comme  $\text{HgCl}^+$ ,  $\text{HgCl}_3^-$  et  $\text{HgCl}_4^{2-}$ , notamment dans l'eau de mer (Stumm et Morgan, 1996). Ces espèces sont en équilibre constant avec des complexes formés par des ligands organiques comme les acides humiques et fulviques en eau douce où le mercure a tendance à se lier aux groupements thiols (-RSH) (Lindqvist *et al.*, 1991) mais aussi aux colloïdes organiques (Guentzel *et al.*, 1996). D'après les modèles développés par Hudson *et al.* (1994) sur les lacs du Wisconsin, 94 à 99 % du  $\text{Hg}^{\text{II}}$  inorganique et 72 à 97 % du MeHg sont complexés avec la matière organique dissoute en conditions aérobies (Benoit *et al.*, 2001c). En conditions anaérobies en revanche, comme dans les sédiments, la chimie du mercure est très dépendante des réactions avec les sulfures (Mason et Lawrence, 1999). En présence d'une faible concentration en sulfures, la forme insoluble  $\text{HgS}_s$  peut être formée à pH acide. Dans les conditions inverses (pH basique et concentration en sulfure élevée) et à un faible potentiel redox, le mercure peut se trouver sous forme de complexes solubles comme  $\text{HgS}_2^{2-}$  et d'autres espèces ( $\text{HgSH}^+$ ,  $\text{Hg}(\text{SH})_2$ ,  $\text{Hg}(\text{SH})\text{S}^-$ , *etc.*).

La concentration moyenne en mercure total dans l'eau douce non contaminée est généralement inférieure à  $5 \text{ ng L}^{-1}$  (soit 25 pM) (Bloom, 1989) même si des concentrations allant jusqu'à 10 ou 20  $\text{ng L}^{-1}$  peuvent être retrouvées dans des lacs chargés en matière humique ou en Hg particulaire (Meili, 1997). Au sein de sites contaminés en revanche, la concentration en Hg total peut atteindre  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

La quantité de mercure retrouvée dans les sédiments est comparable à celle rencontrée dans les sols non contaminés ( $0,02$  à  $0,5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) alors que dans des zones riches en cinabre ou contaminées par l'activité industrielle, la concentration en mercure peut atteindre  $100 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  (Ullrich *et al.*, 2001 ; Craig, 1986).

## 2) Réactions redox

La réduction des espèces oxydées du mercure en  $\text{Hg}^0$  aboutit à l'émission du mercure dans l'atmosphère en raison de la faible solubilité de  $\text{Hg}^0$  dans l'eau ( $60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  à  $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) et de sa volatilité (constante de Henry = 0,3) (Weast, 1973) (⊕ Figure 2). Malgré cela, le mercure élémentaire dissous

représente 10 à 30 % du mercure total dans les océans et dans l'eau douce (Mason et Fitzgerald, 1993 ; Vandal *et al.*, 1991). La réduction biologique est largement responsable de ce phénomène notamment dans les zones contaminées riches en  $\text{Hg}^{\text{II}}$  où l'expression de l'opéron *mer* de bactéries résistantes est sollicitée (Barkay, 1987 ; Barkay *et al.*, 1991 ; Siciliano *et al.*, 2002) (voir section A. III. 5)). En parallèle, certaines algues peuvent réduire le  $\text{Hg}^{\text{II}}$  par l'intermédiaire de métabolites extracellulaires (Ben-Bassat et Mayer, 1978 ; Devars *et al.*, 2000). Une réduction abiotique peut être observée via des radicaux formés par la photodégradation de molécules carbonées (Nriagu, 1994) ou en présence de radicaux liés à des acides organiques (Skogerboe et Wilson, 1981 ; Allard et Arsenie, 1991). La photoréduction de  $\text{Hg}^{\text{II}}$  en  $\text{Hg}^0$  (⑤ Figure 2), est décrite comme la principale réaction ayant lieu dans les eaux de surface (Amyot *et al.*, 2004) et la neige (Lalonde *et al.*, 2002). Enfin, certaines espèces  $\text{Fe}^{\text{II}}$  sont connues pour réduire  $\text{Hg}^{\text{II}}$  (O'Loughlin *et al.*, 2003a ; Wiatrowsky *et al.*, 2009, Remy *et al.*, 2015).

A l'inverse, le  $\text{Hg}^0$  peut être oxydé en  $\text{Hg}^{\text{II}}$ , particulièrement en présence de chlorures (Yamamoto, 1996) via des hydroperoxydases de certaines bactéries aérobies (Smith *et al.*, 1998) ou des catalases d'origine végétale ou animale (Kim *et al.*, 1997 ; Magos et Clarkson, 1978). De récentes études ont mis en évidence la capacité de bactéries anaérobies comme *Desulfovibrio desulfuricans* et *Desulfovibrio alaskensis* à oxyder le  $\text{Hg}^0$  en  $\text{Hg}^{\text{II}}$  (Colombo *et al.*, 2013 ; Hu *et al.*, 2013). L'oxydation abiotique du  $\text{Hg}^0$  survient dans l'atmosphère (⑥ Figure 2), par photooxydation catalysée par le dioxygène, les chlorures,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'ozone, ainsi que des radicaux libres ( $\text{BrO}$ ,  $\text{Br}$ , *etc*) (Lalonde *et al.*, 2001 ; de Magalhaes et Tubino, 1995). Le  $\text{Hg}^{\text{II}}$  formé étant rapidement fixé par la pluie, la neige ou les particules aéroportées, ceci accroît considérablement la redéposition du mercure (⑦ Figure 2). En conditions anaérobies, l'oxydation du  $\text{Hg}^0$  peut être induite lors de la complexation à des ligands thiols (Gu *et al.*, 2011).

Ainsi, le cycle du mercure est conditionné à la fois par des mécanismes abiotiques (complexation, photodégradation, réduction par des minéraux) et biotiques. Les microorganismes de la colonne d'eau ou du sédiment interviennent dans les réactions d'oxydoréduction entre  $\text{Hg}^{\text{II}}$  et  $\text{Hg}^0$  mais participent aussi, comme nous allons le voir par la suite, à transformer les espèces inorganiques  $\text{Hg}^{\text{II}}$  et  $\text{Hg}^0$  en espèces organiques comme le méthylmercure (⑧ Figure 2) qui peut ensuite contaminer la chaîne trophique (⑨ Figure 2).



## II. Impacts sanitaires et toxicité du mercure dans l'environnement

### 1) Les différentes formes organiques du mercure

Si les formes majoritaires du mercure dans l'environnement naturel sont les formes inorganiques ( $\text{Hg}^{\text{II}}$  et  $\text{Hg}^0$  inorganique) (Lawson et Mason, 2001), elles peuvent être transformées en espèces organiques mercuriques  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  (monométhylmercure),  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$  (diméthylmercure) et  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$  (monoéthylmercure) dans des conditions biogéochimiques précises. Seul le monométhylmercure est détecté dans l'environnement étant donné sa stabilité thermodynamique contrairement au monoéthylmercure qui est très rapidement décomposé en éthane et  $\text{Hg}$  inorganique et au diméthylmercure, très volatil et insoluble (Craig, 1986 ; Talmi et Mesmer, 1975). Ce dernier est, de plus, très instable à des valeurs de pH inférieures à 7 où il est rapidement transformé en monométhylmercure ce qui peut expliquer qu'il est très peu détecté en eau douce. En milieu marin, en revanche, et notamment dans les eaux profondes, sa stabilité est accrue par l'absence de lumière, la basse température, et un pH plutôt basique (Fitzgerald et Mason, 1997). Ainsi, certains auteurs suggèrent que le diméthylmercure serait le produit principal de la méthylation du mercure dans les océans et que le monométhylmercure retrouvé dans ce type de milieu serait exclusivement issu de sa dégradation (Mason et Fitzgerald, 1993 ; Mason et Sullivan, 1999).

Les réactions d'oxydoréduction détaillées ci-dessus, en augmentant (oxydation) ou en appauvrissant (réduction) le pool de  $\text{Hg}^{\text{II}}$  (substrat méthyliable) impactent donc le taux de méthylation au sein d'un environnement donné.

### 2) Epidémiologie de l'exposition au mercure

Le mercure sous ses différentes formes, fait partie des polluants métalliques les plus toxiques et les plus répandus. Parmi les contaminants environnementaux et notamment les polluants métalliques comme le plomb, l'arsenic ou le cadmium, le mercure représente le danger le plus préoccupant aussi bien pour la santé humaine que pour la biocénose (Mc Donald *et al.*, 2005). Au cours des dernières décennies, des pollutions et des empoisonnements au mercure ont été mis en évidence dans de nombreux pays (Japon, Etats-Unis, Canada, Suède ou Norvège). A titre d'exemple, il y a une dizaine d'années aux Etats-Unis, 630000 enfants (sur 4060000, soit 1,5 %) naissaient chaque année avec des doses de mercure dans le sang deux fois supérieures aux

concentrations communément observées chez des individus non exposés (soit  $< 20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Renner, 2004).

La toxicité du mercure dépend notamment de son degré d'oxydation. A l'état de valence nulle, il est très volatile, peu soluble et présente un léger effet nocif pour la santé sous forme de vapeurs (Fielder *et al.*, 1999). Au degré +II, il est plus toxique et plus stable qu'au degré +I. Même si le monométhylmercure et diméthylmercure ne représentent pas une fraction très importante dans l'environnement, ce sont les formes les plus préoccupantes d'un point de vue sanitaire. Le diméthylmercure, bien que moins souvent rencontré du fait de son caractère très labile, demeure la forme la plus toxique du mercure. Le cas du docteur Karen Wetterhahn illustre la dangerosité de ce composé. Cette professeure de chimie du Dartmouth College (New Hampshire, USA) est décédée en juin 1997 après avoir reçu un an auparavant quelques gouttes de diméthylmercure sur la peau à travers les gants en latex qu'elle portait. Les symptômes furent des difficultés à s'exprimer ainsi que des troubles de la motricité et de la vision puis le coma et la mort. Les analyses ont montré une concentration sanguine en mercure extraordinairement élevée de  $4000 \mu\text{g L}^{-1}$  de sang au lieu de 1 à 8 pour des personnes non exposées, le seuil de dangerosité pour l'organisme étant de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de sang (Nierenberg *et al.*, 1998 ; Blayney, 2001). Trois autres employés de laboratoires avaient déjà trouvé la mort après avoir synthétisé du diméthylmercure en 1865 et dans les années 1950 (Pazderova *et al.*, 1974 ; Nierenberg *et al.*, 1998).

Le monométhylmercure reste toutefois la forme organique la plus préoccupante du fait de sa plus grande stabilité et de ses propriétés physico-chimiques. Son caractère hydrophobe lui confère une liposolubilité permettant le passage des barrières cellulaires. Il est donc facilement bioaccumulable au sein des organismes qui y sont exposés (poissons prédateurs, coquillages filtreurs) et bioamplifiable au fil de la chaîne alimentaire (Boudou et Ribeyre, 1997). Les organismes en bout de chaîne trophique (Homme, prédateurs) sont donc exposés à des concentrations relativement élevées ( $> 1 \text{ ppm}$ ) où l'effet neurotoxique du MeHg peut s'exprimer (Mergler *et al.*, 2007). Même les poissons d'élevage peuvent être touchés par l'intermédiaire de nourriture contaminée (Choi et Cech 1998 ; Foran *et al.*, 2004). La culture de riz dans des zones fortement impactées peut aussi aboutir à des contaminations (Horvat *et al.*, 2003) mais la principale source de MeHg dans l'alimentation humaine reste le poisson carnassier (thon, saumon, ...), le MeHg se liant particulièrement aux protéines et acides aminés composant les tissus musculaires, les parties préférentiellement consommées.

Les effets du MeHg sur l'organisme ont été mis en évidence par McAlpine et Araki en 1958 suite à ce qui fut plus tard appelé « la catastrophe de Minamata ». Cette intoxication à grande échelle (plus de 25 000 cas recensés) est le fait d'une usine pétrochimique qui a déversé pendant une trentaine d'années des tonnes de déchets mercuriels (> 400 t) dans la baie de Minamata au Japon. Le mercure inorganique accumulé dans la baie a été petit à petit méthylié au sein des sédiments et le méthylmercure formé a finalement contaminé les poissons, principale source de nourriture pour les populations locales.

Une partie du méthylmercure traverse la barrière hémato-encéphalique par transport actif après liaison avec la fonction thiolate du glutathion (Kerper *et al.*, 1992). Le cerveau et le système nerveux ont ainsi été identifiés comme les cibles principales de la molécule conduisant à des perturbations sensorielles, la réduction du champ de vision, l'ataxie (perte de coordination des mouvements), la dysarthrie (trouble de la parole) ainsi que des convulsions (Harada, 1995 ; Clarkson *et al.*, 2003). Cependant, la plus grande partie suit un cycle entéro-hépatique : le foie excrète le méthylmercure par la bile, puis celui-ci est réabsorbé à 80 % au niveau intestinal. Cet événement a aussi permis de mettre en évidence la vulnérabilité des fœtus exposés par le biais des acides aminés traversant la barrière placentaire au cours de la grossesse (Kajiwara *et al.*, 1996). Il en a résulté des retards mentaux sévères, de mauvais développement des réflexes, ou encore des troubles psychiatriques comme l'hyperkinésie (hyperactivité). Des troubles cardiovasculaires (Stern, 2005), de la reproduction (Sakamoto, 2001) ou du système immunitaire (Silbergeld *et al.*, 2005) ont aussi été observés.

L'activité cytotoxique du mercure est liée d'une part à sa grande affinité pour le soufre, entraînant le blocage des fonctions thiol (-SH) des protéines (modifiant ainsi leur structure tertiaire et quaternaire), des peptides (glutathion) ou des acides aminés soufrés (cystéine). Les protéines touchées peuvent être des enzymes, des protéines des membranes cellulaires (notamment des récepteurs d'hormones et de neuromédiateurs), des protéines membranaires des organites cellulaires (mitochondries, lysosomes...), des protéines membranaires impliquées dans les transports ioniques (ATPase Na-K, canaux calciques) ou encore la tubuline et la myéline, ce qui provoque de graves perturbations dans la conduction de l'influx nerveux (Mergler *et al.*, 2007). D'autre part, le mercure inhibe les systèmes de protection cellulaire contre les radicaux libres ainsi que les enzymes à zinc du fait d'une compétition entre ces deux métaux. Il peut provoquer la lyse des membranes cellulaires, sans doute en catalysant l'oxydation d'un phospholipide membranaire particulier (Segall et Wood, 1974). Enfin, des effets clastogènes du mercure ont été observés dans des lymphocytes de sujets ayant ingéré des poissons contaminés par du méthylmercure : cassure de chromosomes,

présence de fragments ou de chromosomes surnuméraires ou absence de centromère (Skerfving, 1974 ; De Flora, 1994).

Les communautés humaines vivant de la pêche et de la chasse dans des zones impactées sont donc particulièrement menacées (Grandjean *et al.*, 1995 ; Van Oostdam *et al.*, 2005 ; Maury-Brachet *et al.*, 2006) comme par exemple dans les îles Féroé, aux Seychelles ou encore chez les Amérindiens du bassin Amazonien où les concentrations de MeHg dans des prélèvements des cheveux peuvent être quinze fois supérieures ( $15 \mu\text{g g}^{-1}$ ) aux standards mesurés chez des populations non exposées ( $< 1 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Pirrone et Mahaffey, 2005). Le bassin amazonien est particulièrement contaminé en mercure du fait des activités humaines passées et actuelles. La ruée vers l'or qui débuta dans les années soixante-dix est en partie responsable de cette pollution, le mercure étant couramment utilisé lors de l'amalgamation des paillettes d'or (Goulding *et al.*, 1996 ; Fréry *et al.* 2001 ; Gochfeld *et al.*, 2003). Les orpailleurs sont les premiers touchés puisqu'ils respirent les vapeurs de mercure lors de cette étape (Pfeiffer *et al.*, 1993 ; Passos et Mergler, 2008). D'après certains auteurs, ces activités illégales et incontrôlées ont menées au relargage de tonnes de mercure dans l'environnement aquatique amazonien faute de traiter les déchets qui en résultent (Pfeiffer *et al.*, 1989). Les apports de mercure inorganique dans le réseau hydrographique peuvent aussi résulter de l'érosion des sols, naturellement riches en mercure, lors de fortes précipitations faisant suite à la déforestation (Roulet *et al.*, 1998, 1999, 2000 ; Mainville *et al.*, 2006). Le mercure peut ensuite être transformé en méthylmercure dans la zone anoxique de l'environnement aquatique et notamment dans les zones où la forêt a été ennoyée lors de la création de retenues artificielles du fait de l'activité bactérienne qui d'y développe (Guimaraes *et al.*, 2000 ; Huguet *et al.*, 2010). Les populations locales sont alors exposées par le biais des poissons qu'ils consomment, le méthylmercure représentant souvent 70 % à 90 % du mercure total de l'organisme chez les individus étudiés (Pinheiro *et al.*, 2003, 2007). En moyenne, la teneur en mercure total dans les cheveux des populations amazoniennes est comprise entre 2 et  $20 \mu\text{g g}^{-1}$  (sachant que la norme pour les populations non-exposées est de 1 à  $2 \mu\text{g g}^{-1}$  selon l'Organisation Mondiale de la Santé) (Dolbec *et al.*, 2001).

### 3) Cas de l'environnement subarctique canadien

Si les populations autochtones du bassin Amazonien peuvent être exposées au mercure par le biais de pollutions locales, d'autres communautés peuvent être menacées par des pollutions diffuses

comme dans les zones arctiques et subarctiques du fait de la déposition de particules aéroportées provenant de sources géographiquement éloignées. La présente étude repose en partie sur un projet (ANR CESA « Arctic Metals ») concernant le devenir (apports et transformations) de certains métaux traces comme le mercure, le sélénium et le cadmium en milieu arctique et subarctique. Ce paragraphe a pour objectif de décrire brièvement les particularités du milieu subarctique canadien et notamment de la zone étudiée située le long du littoral de la baie d'Hudson en Territoire Nunavik (Province de Québec).

a) Caractéristiques du milieu subarctique canadien

Le Canada est un pays qui s'étend sur 9,98 millions de km<sup>2</sup> (deuxième plus grande superficie mondiale après la Russie). Cette immense surface étant soumise à des conditions climatiques et géologiques variées, le paysage écologique est diversifié et se divise en plusieurs écozones (Figure 3). Le cercle polaire arctique (latitude 66,5 °N) marque la limite entre la zone arctique (au nord) et subarctique (au sud). Ces deux environnements se distinguent principalement par des différences de température et de précipitation. En zone subarctique, les températures moyennes annuelles sont comprises entre -5,4 °C et -8,7 °C contre -19 °C en zone arctique. Les précipitations y sont aussi plus abondantes ; 800 mm an<sup>-1</sup> contre 400 mm an<sup>-1</sup> (Evans *et al.*, 2005a). Ces conditions climatiques extrêmes affectent fortement le paysage, ainsi, en zone subarctique, rivières et lacs sont gelés plusieurs mois dans l'année de début octobre à fin juin, et le permafrost est discontinu alors qu'il est plus répandu en zone arctique. Le terme permafrost ou pergélisol désigne un sol dont une partie est gelée en permanence au moins pendant deux ans d'affilé, il couvre un cinquième de la surface terrestre dont 90 % du Groenland, 80 % de l'Alaska, 50 % du Canada et de l'ex-Union soviétique. La persistance d'un sol gelé en permanence est un héritage des nombreux épisodes de glaciation qu'a connu cette partie du globe, le dernier ayant pris fin il y a 12 000 ans.

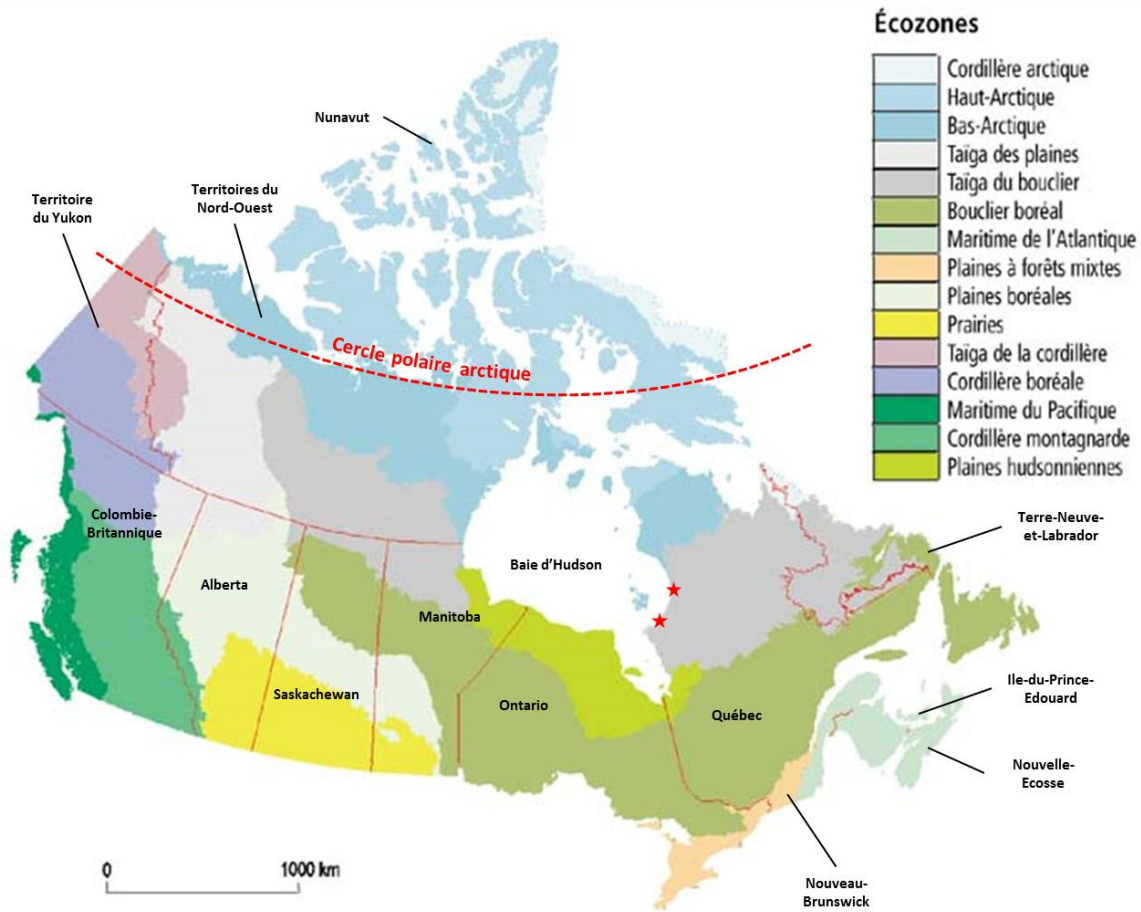


Figure 3. Carte du Canada montrant les différentes Provinces et Territoires ainsi que les écozones qui les composent. Les étoiles rouges localisent les sites d'échantillonnages présentés dans cette étude. Ils se situent au sein de la Taïga du Bouclier dans le Territoire du Nunavik (voir Figure 4) (Province de Québec). Le cercle polaire arctique (latitude 66,5 °N) est représenté par les pointillés rouges. (d'après <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca>).

b) Les mares thermokarstiques en Territoire Nunavik

La zone d'échantillonnage dont il est question dans cette étude se situe le long du littoral de la Baie d'Hudson en Territoire Nunavik (Figure 4).

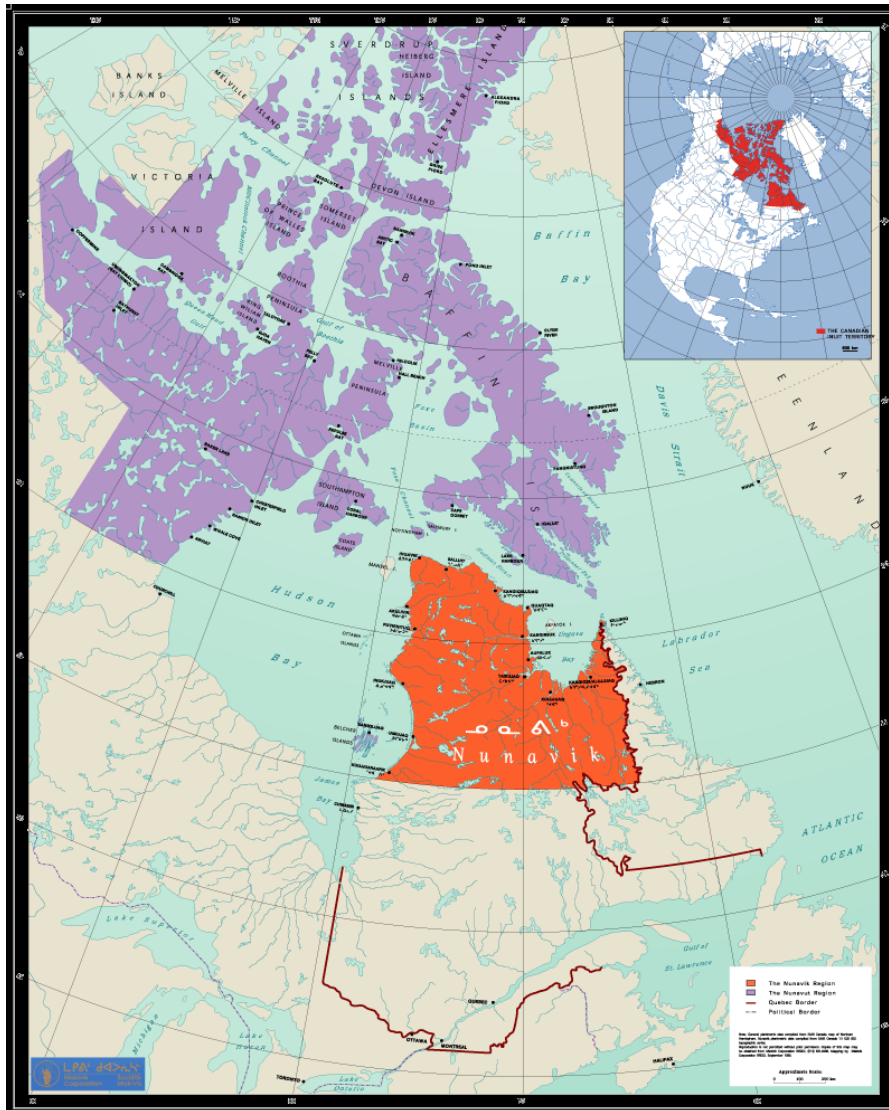


Figure 4. Carte montrant le Territoire du Nunavik (en orange) au sein de la Province de Québec délimitée par la ligne rouge. Le Territoire du Nunavut est représenté en violet. (Source : <http://www.makivik.org>).

Ce territoire repose, tout comme le Nunavut et le Labrador, sur des terrains dont la géologie en surface consiste en des sols fins formés de limons marins post-glaciaires sous lesquels se trouvent des roches ignées et métamorphiques du « bouclier précambrien ». Le paysage du Nunavik, qui s'étend sur une superficie d'environ 507 000 km<sup>2</sup>, est composé de nombreux lacs alimentés par les glaciers, de toundra et de forêt boréale, la majorité des cours d'eau menant à la Baie d'Hudson. Cet environnement est aussi caractérisé par la présence d'une multitude de mares dites « thermokarstiques » (Figure 5). Elles représentent l'écosystème aquatique le plus répandu dans les régions arctiques et subarctiques (Vincent *et al.*, 2009). Leur formation résulte de l'affaissement du sol dû à l'alternance de gel et de dégel que connaît le permafrost (Yoshikawa et Hinzman, 2003 ; Calmels et Allard, 2004) et elles peuvent persister quelques jours à quelques centaines d'années (Pienitz *et al.*, 2008). C'est un phénomène naturel permanent mais qui est accéléré par le réchauffement climatique et la fonte du permafrost observés dans le nord du Canada, en Sibérie, en Europe du Nord et en Alaska depuis une vingtaine d'années (Richter-Menge, 2006). Dans les régions subarctiques où le permafrost est discontinu, leur formation nécessite plus que le réchauffement saisonnier classique de la couche supérieure de sol, elle est donc clairement liée aux changements climatiques actuels (Bowden *et al.*, 2008).



Figure 5. Vue aérienne de mares thermokarstiques du littoral Est de la Baie d'Hudson au sein du Territoire du Nunavik (Province de Québec).



Une mare thermokarstique subarctique typique est de forme circulaire et fait environ 4 à 30 mètres de diamètre et 1 à 3 mètres de profondeur et aucun réseau hydrographique (connu à ce jour) ne les relie entre elles (Breton *et al.*, 2009). La composition du sol et du sous-sol, et notamment la présence de couches de limons marins comme le schiste argileux (shale), confère à ces terrains une grande imperméabilité et contribue à la persistance de ces mares (Calmels et Allard, 2004). Lorsqu'elles sont situées dans des zones tourbeuses et végétalisées, leur formation s'accompagne généralement d'apports soudains de matière organique (mais aussi d'ammonium, nitrate, phosphate) jusque-là emprisonnée. Cette libération de substances nutritives est propice au développement de microorganismes dont l'activité métabolique rejette du CO<sub>2</sub>, du N<sub>2</sub>O et du CH<sub>4</sub>, des gaz à effet de serre, dans des quantités non négligeables (hypersaturation du milieu avec des pressions partielles de l'ordre de 1 atm (101 kPa) en CO<sub>2</sub> et 20 matm (2,03 kPa) en CH<sub>4</sub> dans l'eau alors que dans l'atmosphère elles n'atteignent respectivement que 379 et 1,77 matm (38,4 et 0,179 kPa)) (Oechel *et al.*, 1993 ; Christensen *et al.*, 1999 ; Laurion *et al.*, 2010). Ce phénomène est responsable d'un « *feedback* » positif sur le réchauffement (Shuur *et al.*, 2008). La grande variabilité locale des caractéristiques physicochimiques des mares peut leur conférer des teintes très différentes (beiges, brunes, noirâtres ou même vertes, Figure 5) (Calmels et Allard, 2004 ; Breton *et al.*, 2009) au gré des « *blooms* » algaux qui peuvent survenir au cours de l'été (Breton *et al.*, 2009).

c) L'écosystème aquatique subarctique canadien

L'écosystème aquatique subarctique canadien est caractérisé par une faible diversité des organismes (moins d'une dizaine d'espèces majoritaires de poissons) par rapport à ce qui est observé dans des régions plus au sud du fait de la jeunesse de ce milieu (sa formation datant de la fin de la dernière glaciation, il y a 12 000 ans) ainsi que la faible capacité des populations du sud d'y migrer et d'y survivre. En revanche, en ce qui concerne les microorganismes, les communautés rencontrées en milieu subarctique sont relativement proches (du point de vue de la nature et de la diversité) de celles observées dans des environnements tempérés (Evans *et al.*, 2000).

Les conditions climatiques particulières (été frais et court, hiver long et froid) limitent la production primaire au sein des environnements aquatiques ce qui affecte le développement des organismes qui en dépendent : les invertébrés peuvent ainsi nécessiter deux ans pour que leur cycle de croissance s'achève, les poissons ont des taux de croissance faibles et n'emmagasinent pas suffisamment d'énergie en une saison pour pouvoir se reproduire chaque année ce qui entraîne une plus longue espérance de vie et donc un plus fort potentiel d'accumulation de contaminants. De

plus, les adaptations aux conditions de ces régions (*i.e.* hibernation, formation de spores, période de dormance), et plus particulièrement l'accumulation de réserves de graisse et un métabolisme ralenti, permettent la survie lorsque la nourriture devient indisponible mais accroît aussi le potentiel de bioaccumulation de contaminants organiques. En effet, les composés comme les PCB (polychlorobiphényles), le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) ou le MeHg ont tendance à présenter une forte affinité pour les tissus graisseux (*e.g.* le foie de lotte est plus riche en organochlorés que les muscles qui sont moins riches en graisses ; Braune *et al.*, 1999).

d) Origine, devenir et impact des polluants sur les populations autochtones

Le Grand Nord canadien est particulièrement peu peuplé et sauvage et donc peu urbanisé et industrialisé. Les seuls villages sont ceux des natifs Amérindiens, dont les communautés les plus représentées sont les Premières Nations Cree et Chipewyan (en zone subarctique) et Inuit (en zone arctique). Leurs campements se situent plutôt sur les côtes le plus souvent à l'embouchure des cours d'eau alors que certains groupes vivent encore de façon nomade en fonction du climat et des sources de nourriture. Vivant majoritairement de la chasse et de la pêche, ces populations sont particulièrement exposées à des polluants capables de s'accumuler au fil de la chaîne trophique.

Les principaux polluants rencontrés dans le Grand Nord canadien sont les métaux lourds (mercure, cadmium, plomb, cuivre, sélénium, zinc) ainsi que des composés organiques (organochlorés, HAP). Mis à part les populations autochtones, l'activité humaine au sein du Grand Nord canadien se résume à quelques sites miniers, militaires, de raffineries ou de centrales hydroélectriques (Projet de la Baie James). De plus, la présence naturelle de métaux dans les sols reste anecdotique ; si les roches de type schiste argileux, pouvant abriter du cinabre ou de l'uranium, sont assez répandues dans le Grand Nord canadien, leur exploitation n'est pas justifiée au vu des concentrations rencontrées (50 à 100 ppb pour le Hg) (Evans *et al.*, 2005a ; Lockhart *et al.*, 2005). Les sources de pollutions locales sont donc rares, et l'apport de ces contaminants est dominé par les dépôts atmosphériques d'origine lointaine impactant la neige et la glace qui les libèrent ensuite dans les cours d'eau lors de la fonte (Evans *et al.*, 2000). Ces dépôts se font généralement au printemps et sont en partie dus à l'oxydation du mercure élémentaire Hg<sup>0</sup> par les composés halogénés issus des aérosols marins (Ariya *et al.*, 2002a). Ces contaminations sont généralement diffuses contrairement aux pollutions industrielles locales classiques dont la détection et le traitement sont facilités par la relativement faible étendue géographique impactée. A titre d'exemple, une étude focalisée sur les flux de mercure pré et post ère industrielle autour de la baie

d'Hudson au Canada a mis en évidence que les flux atmosphériques avaient évolué de 0,1 à 1,5 t an<sup>-1</sup> et que l'apport des rivières était passé de 0,6 à 1,9 t an<sup>-1</sup> (Hare *et al.*, 2008). Ces polluants peuvent ensuite être transformés puis bioaccumulés au sein des réseaux trophiques terrestres, dulcicoles et marins et deviennent ainsi préoccupant d'un point de vue environnemental et sanitaire (Braune *et al.*, 1999). L'activité humaine peut faciliter les transformations qui touchent ces polluants notamment par le biais de la formation de lacs réservoirs pour le fonctionnement des centrales hydroélectriques (Verdon *et al.*, 1991). L'intense activité bactérienne qui s'y développe peu après l'enneigement (en lien avec la dégradation de la matière organique immergée) peut être couplée à la production de méthylmercure à partir du mercure inorganique initialement présent, comme c'est le cas pour d'autres exemples de réservoirs artificiels (Huguet *et al.*, 2010).

Une autre explication de l'augmentation des flux de ce type de polluants au sein des réseaux hydrographiques et trophiques repose sur une plus forte mobilisation des métaux et de la matière organique en raison du changement climatique actuel. En effet, une période de dégel accrue a pour conséquence de favoriser l'activité biologique dans ces zones et notamment celle des microorganismes aquatiques qui s'y développent. Une activité microbienne plus soutenue une partie de l'année et la présence de matière organique disponible pourraient potentiellement impacter le devenir du mercure notamment par le biais de la méthylation. Des concentrations significatives ont ainsi été observées dans les eaux et la neige de régions arctiques et subarctiques allant jusqu'à 0,2 ng L<sup>-1</sup> dans les prélèvements environnementaux et > 1 ng L<sup>-1</sup> après incubation d'échantillons de sol à des températures estivales (4 °C à 8 °C) (Hammerschmidt et Fitzgerald, 2006 ; St Louis *et al.*, 2005 ; Larose *et al.*, 2010).

De plus, le réchauffement global peut aussi impacter la dynamique de ces polluants au sein de la chaîne trophique. Des étés plus longs sont propices à des phases de croissance plus longues des organismes. Une plus forte quantité de biomasse et un temps d'exposition accru aux polluants peut donc engendrer une augmentation de la bioaccumulation (Evans *et al.*, 2005b). Ainsi, si les poissons benthiques se nourrissant de vase restent peu impactés, les poissons prédateurs (truite, brochet), très consommés, présentent des teneurs en Hg parfois supérieures à 0,2 µg g<sup>-1</sup> (qui correspond au seuil concernant les consommateurs fréquents) et 0,5 µg g<sup>-1</sup> (qui correspond au seuil pour la commercialisation) (Lockhart *et al.*, 1998 ; Braune *et al.*, 1999).

Ce type de poissons gras, ainsi que certains mammifères marins, étant la base de l'alimentation des populations locales, les taux de mercure sanguins mesurés chez eux sont souvent excessivement élevés : 51,2 nmol L<sup>-1</sup> en moyenne en 2004, soit près de 14 fois plus au Nunavik que dans la population générale québécoise (3,7 nmol L<sup>-1</sup>) (Fontaine *et al.*, 2008 ; Leblanc *et al.*, 2004).

Chez certains individus, des taux records ( $1200 \text{ nmol L}^{-1}$ ) étaient encore mesurés en 2004 (12 fois le seuil maximal recommandé au Québec) (Fontaine *et al.*, 2008).

A la suite de nombreuses études sur des populations affectées, des normes ont été fixées quant à la dose maximale de mercure qui peut être ingérée sans risques sanitaires ( $0,23 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de masse corporelle  $\text{j}^{-1}$ ) par le *Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants*, une instance internationale sous l'égide de la Food and Agriculture Organization et de l'Organisation Mondiale de la Santé.

A l'heure actuelle, même si des décisions sont prises pour éviter d'aggraver la situation (limiter les émissions de polluants à l'échelle internationale, traiter les contaminations existantes, mieux comprendre le devenir de ces contaminants) certains auteurs considèrent qu'il faudrait des dizaines d'années pour redescendre à une concentration équivalente au bruit de fond géologique régulée par la dégradation et l'enfouissement dans les sédiments (Evans *et al.*, 2005a). Une amélioration est toutefois observée au niveau de l'exposition des populations locales. Les teneurs en mercure sanguin ont baissé de 32 % entre 1992 (Jette, 1994) et 2004, atteignant  $51,2 \text{ nmol}$  de mercure par litre de sang soit inférieur au seuil de  $99,7 \text{ nmol L}^{-1}$  établie par Santé Canada pour la population générale adulte (Health Canada Mercury Issues Task Group, 2004 ; Fontaine *et al.*, 2008). Ceci est dû au changement d'habitudes alimentaires chez les nouvelles générations qui se traduit par une plus faible consommation de produits traditionnels, c'est-à-dire de poissons et de viande potentiellement contaminés. Il en va de même pour d'autres polluants métalliques comme le plomb et le cadmium depuis l'interdiction des carburants au plomb, la législation sur les munitions de chasse et de la diminution du contenu en cadmium dans les cigarettes (premier facteur d'exposition) (Fontaine *et al.*, 2008).

### III. La méthylation du mercure

Le monométhylmercure constitue l'espèce mercurielle organique la plus étudiée car elle est considérée comme la plus toxique. Depuis l'arrêt de son utilisation par l'Homme comme fongicide, myxobactéricide et dans la catalyse chimique, les dépôts de mercure se font exclusivement sous la forme élémentaire  $\text{Hg}^0$  ou ionisée  $\text{Hg}^{\text{II}}$  (Craig, 1986). Les réactions environnementales jouent donc un rôle déterminant sur la spéciation et la toxicité de l'élément mercure. En eau douce, l'espèce organique prévalente est  $\text{CH}_3\text{HgOH}$  alors qu'en milieu marin où la concentration en chlorure peut aller jusqu'à 0,56 M (correspondant à 3,5 % de salinité) la forme  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  prédomine (Stumm et Morgan, 1996). Tout comme pour le mercure inorganique (Benoit *et al.*, 2001c), une grande majorité du MeHg (72 à 97 % selon Hudson *et al.*, 1994) est en réalité complexée avec la matière organique dissoute comme les acides humiques et fulviques en eau douce où le mercure a tendance à se lier à des groupements thiols (-RSH) (Lindqvist *et al.*, 1991) mais aussi à des colloïdes organiques (Guentzel *et al.*, 1996) en condition aérobie.

On trouve le MeHg à des concentrations généralement plus élevées en eau douce qu'en milieu marin (respectivement jusqu'à 30 % *versus* < 5 % du Hg total) (Kudo *et al.*, 1986 ; Mason et Sullivan, 1999). De même, la quantité de MeHg par rapport au Hg total est en général plus élevée dans la colonne d'eau que dans le sédiment où il représente en moyenne jusqu'à 1 % de la concentration en Hg total (Gagnon *et al.*, 1996 ; Benoit *et al.*, 1998). Le MeHg présentant moins d'affinité que le Hg inorganique pour les substances humiques et minérales, il est plus facilement transféré à la phase eau depuis le sédiment (Bloom et Lasorsa., 1999). Ce relargage peut être accentué avec l'augmentation de la température (Wright et Hamilton, 1982) ou une chute de pH (Miller et Akagi, 1979 ; Hintelmann *et al.*, 1995). Cet effet du pH peut en partie expliquer les fortes concentrations en MeHg retrouvées dans la chair de poissons vivant dans des eaux légèrement acides (Linqvist *et al.*, 1984).

La quantité de méthylmercure présente dans un environnement donné est considérée comme la résultante de la méthylation et de la déméthylation (soit la méthylation nette) (Pak et Bartha, 1998a). Ces deux processus sont majoritairement dus à l'activité biologique et plus précisément bactérienne (Jensen et Jernelöv, 1969 ; Compeau et Bartha, 1985) bien que certaines réactions abiotiques soient impliquées (Weber, 1993 ; Seller *et al.*, 1996).

C'est très majoritairement en milieu aquatique, et plus particulièrement dans les sédiments qu'a lieu la méthylation du fait des fortes concentrations en mercure qu'on peut y trouver (Robinson et Tuovinen, 1984) mais aussi dans la colonne d'eau résultant de l'activité des microorganismes planctoniques ou sous forme de biofilms se développant sur les surfaces immergées (Mauro *et al.*, 1999 ; Guimarães *et al.*, 2000). Dans une moindre mesure, le méthylmercure peut provenir de l'atmosphère, par photodégradation du diméthylmercure ou par l'activité des microorganismes méthylyants portés par les aérosols et enfin de la neige, par méthylation des dépôts atmosphériques de Hg<sup>II</sup>.

La contribution relative de la méthylation due au sédiment et de la méthylation attribuée aux cellules planctoniques/biofilm à la quantité de MeHg retrouvé dans la colonne d'eau est encore mal connue. Cette incompréhension vient de la difficulté à quantifier clairement la part provenant des microorganismes en suspensions sachant que des phénomènes de diffusion entre le sédiment et la phase eau peuvent intervenir.

### **1) Voies d'entrée du mercure dans la cellule et principaux substrats à la méthylation**

La méthylation est un mécanisme intracellulaire (Berman *et al.*, 1990 ; Choi *et al.*, 1994 ; Gilmour *et al.*, 2011), l'entrée du mercure dans l'espace intracellulaire est donc une étape clé dans la formation de MeHg.

Plusieurs hypothèses quant aux voies impliquées ont été décrites chez les bactéries à coloration de Gram négative (Figure 6) qui représentent l'essentiel des méthylateurs isolés de l'environnement alors que peu de bactéries à coloration de Gram positive ont été identifiées comme méthylyants (Ranchou-Peyruse *et al.*, 2009 ; Gilmour *et al.*, 2011). D'après les auteurs, les mêmes mécanismes d'entrée du Hg dans la cellule peuvent être attendus chez les bactéries à coloration de Gram positive.

Brièvement, il existe deux grands types de voies de transport d'un composé au travers des membranes plasmiques : le transport passif et le transport actif. Le transport passif, dont le moteur est la différence de concentration de la molécule considérée de part et d'autre de la membrane à traverser, ne nécessite pas l'utilisation d'énergie cellulaire et peut impliquer des structures protéiques membranaires dédiées (diffusion facilitée) ou non (diffusion simple). Le transport actif, quant à lui, nécessite la consommation d'énergie cellulaire (ATP ou gradient électrochimique d'un

autre composé) par des protéines de membrane (pompes) afin de déplacer une molécule contre son gradient de concentration.

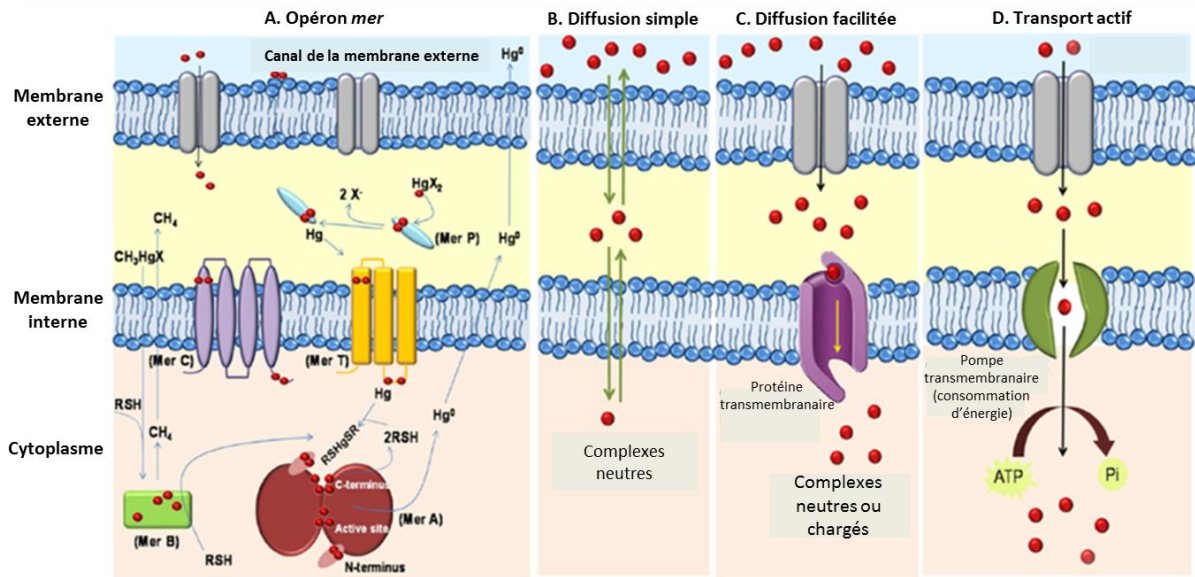


Figure 6. Voies possibles d'absorption du mercure inorganique par les bactéries à coloration de Gram négative (représentatif de la plupart des bactéries méthyliantes de l'environnement ; Ranchou-Peyruse *et al.*, 2009 ; Gilmour *et al.*, 2011). (A) Transport par l'intermédiaire des enzymes codées par l'opéron *mer*. Le  $Hg^{II}$  est lié à MerP dans le périplasm puis il est transféré à MerT qui le fait traverser la membrane interne et le cède à MerA qui va alors le réduire en  $Hg^0$  (adapté de Barkay *et al.*, 2003). (B) Diffusion passive de complexes neutres hydrophobes (e.g.  $HgCl_2$ ,  $HgS^0_{aq}$ ,  $Hg(SH)_2$ ). (C) Diffusion facilitée d'espèces neutres ou non par le biais de canaux protéiques transmembranaires. (D) Transport actif via une pompe protéique transmembranaire ATP-dépendante. Pour chaque cas, le  $Hg^{II}$  inorganique (représenté par les boules rouges) peut être sous forme de complexes en fonction des conditions physico chimiques du milieu extracellulaire, périplasmique et intracellulaire (d'après Hsu-Kim *et al.*, 2013).

Avant tout, le transport des espèces hydrophobes du Hg vers le périplasm des bactéries à coloration de Gram négative se fait vraisemblablement par diffusion passive à travers la membrane externe ou par diffusion facilitée d'espèces hydrophiles et autres complexes (e.g. Hg-thiols) par le biais de canaux. Le passage de l'espace périplasmique vers l'espace intracellulaire peut alors avoir lieu.

a) Transport basé sur les protéines codées par l'opéron *mer*

L'opéron *mer* est un ensemble de gènes sous le contrôle d'un signal régulateur codant pour des protéines dédiées au transport et à la détoxification du mercure (voir section A. III. 5). Chez les organismes le possédant, le transport de Hg peut se faire par le biais de différentes protéines de transport comme MerP qui peut se lier au mercure dans l'espace périplasmique et MerT qui catalyse le passage de la membrane interne. Bien sûr ce mécanisme n'est effectif qu'à des concentrations déclenchant l'activation de l'opéron). Certaines bactéries méthylantes ne possèdent pas la séquence de l'opéron *mer* (Lin *et al.*, 2012), d'autres mécanismes d'entrée existent donc, ce qui explique alors la formation de MeHg dans des environnements trop peu contaminés pour déclencher son activation.

b) Diffusion simple d'espèces neutres dissoutes

Longtemps considérés comme indisponibles pour la méthylation compte tenu des faibles quantités de MeHg retrouvées dans les zones riches en sulfure, les complexes neutres solubles (*e.g.*  $\text{HgCl}_2^0$ ,  $\text{HgS}_{\text{aq}}^0$  et  $\text{Hg}(\text{SH})_2^0_{\text{aq}}$ ) sont aujourd'hui décrits comme les substrats majeurs de la méthylation (Compeau et Bartha, 1985 ; Gilmour *et al.*, 1992 ; Benoit *et al.*, 1999a ; Drott *et al.*, 2007). Leur charge neutre favorise leur diffusion passive à travers les membranes. Les premiers travaux sur le sujet montrent que l'absorption de Hg par des diatomées (Mason *et al.*, 1995 ; Mason *et al.*, 1996) et la diffusion simple au travers de membranes artificielles (Guknecht, 1981) sont fonction de la concentration en  $\text{HgCl}_2^0$ . Plus récemment, le modèle d'équilibres chimiques entre sulfure, Hg dissous et MeHg mis au point par Benoit *et al.* en 1999a donne l'espèce  $\text{HgS}_{\text{aq}}^0$  comme le complexe le plus biodisponible pour la méthylation. Les tests que cette équipe a ensuite effectués sur la bactérie méthylante *Desulfobulbus propionicus* ont confirmé ces hypothèses (taux de méthylation proportionnel à la concentration de  $\text{HgS}_{\text{aq}}^0$ ) (Benoit *et al.*, 2001a). La capacité de ce complexe à traverser les membranes par diffusion simple est due à son caractère lipophile qui peut être déterminé par son coefficient de partage octanol-eau ( $K_{\text{ow}}$ ). Cette valeur, proportionnelle à la perméabilité membranaire, peut être un bon indicateur de la biodisponibilité du Hg (Mason *et al.*, 1996).



c) Diffusion facilitée et transport actif

D'autres auteurs ayant travaillé directement avec des souches méthylantes suggèrent aussi un mécanisme de diffusion facilitée voir de transport actif (Eckley et Hintelmann, 2006 ; Acha *et al.*, 2011). L'hypothèse que ces mécanismes peuvent être impliqués dans l'absorption du mercure est soutenue par les résultats de Schaefer et Morel (2009 ; 2011). Ces auteurs ont travaillé sur la méthylation du mercure par *Geobacter sulfurreducens* en présence de concentrations croissantes de thiols de faible poids moléculaire comme la cystéine. En présence de 10  $\mu\text{M}$  de cystéine, la vitesse de méthylation augmente d'un facteur cinquante et diminue en présence d'autres ligands compétiteurs pour le Hg comme les chlorures ou le sulfure. La cystéine ayant une forte affinité pour le Hg, le complexe Hg-cys formé favorise à la fois l'assimilation et la méthylation du Hg. Un autre composé testé, le dithioerythritol (DTE) ne favorise la méthylation que par les extraits cellulaires et non avec les cellules intègres, le complexe Hg-cys est donc plus efficacement assimilé par les cellules que le complexe Hg-DTE. Enfin, aucun effet n'est observé avec d'autres thiols comme la penicillamine suggérant que la nature du complexe formé impacte fortement la réactivité. En conclusion, les auteurs suggèrent un mécanisme de transport actif spécifique de cet acide aminé via une protéine « *cystine transporter* » (décrite par Bridges et Zalups, 2004) ce qui rejoint les résultats de Golding *et al.* (2002) avec un autre acide aminé, l'histidine. La méthylation du mercure par les bactéries reposerait donc sur des mécanismes moins aléatoires que ce qui était décrit jusqu'alors. Ces résultats ont ensuite été étendus aux SRB par l'étude de *Desulfovibrio desulfuricans* (Schaefer *et al.*, 2011).

Si le mercure peut être mobilisé par diffusion facilitée ou par transport actif, c'est dû au fait que les protéines membranaires impliquées peuvent se révéler peu spécifiques et permettent l'assimilation de métaux traces sans distinction (Moberly *et al.*, 1993 ; Schaefer *et al.*, 2011).

Ainsi les espèces qui peuvent être mobilisées pour la méthylation dépendent du mode de transport et de leur affinité vis-à-vis des récepteurs membranaires.

d)  $\text{Hg}^0$  comme substrat de la méthylation

Si les principaux substrats de la méthylation décrits ci-dessus sont constitués exclusivement d'espèces mercuriques  $\text{Hg}^{\text{II}}$  c'est parce que  $\text{Hg}^0$  est considéré comme une forme relativement inerte (Siciliano *et al.*, 2002 ; Wiatrowsky *et al.*, 2006). Or, de récentes études sur des souches pures ont montré que  $\text{Hg}^0$  dissous pouvait être oxydé puis méthylé. Ainsi, *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 est capable de former du méthylmercure à partir de  $\text{Hg}^0$  à une vitesse équivalente à un tiers de celle observée avec du  $\text{Hg}^{\text{II}}$  (Colombo *et al.*, 2013 ; Hu *et al.*, 2013). *Desulfovibrio alaskensis* est capable d'oxyder  $\text{Hg}^0$  mais pas de méthyler directement  $\text{Hg}^0$  et *Geobacter sulfurreducens* PCA (ATCC 51573) qui est un méthylateur bien connu, est capable d'oxyder  $\text{Hg}^0$  en présence de cystéine (Hu *et al.*, 2013). Ces travaux nuancent donc les hypothèses selon lesquelles la réduction du  $\text{Hg}^{\text{II}}$  en  $\text{Hg}^0$  empêcherait la biométhylation (Mason *et al.*, 1994) même si l'utilisation de  $\text{Hg}^0$  comme substrat est associé à une cinétique de méthylation plus faible (Hu *et al.*, 2013).

## 2) Transformations biologiques et microorganismes impliqués

La méthylation du mercure est très majoritairement due à l'activité de microorganismes anaérobies présents dans les zones anoxiques de la colonne d'eau d'environnements marins (Monperrus *et al.*, 2007 ; Lehnherr *et al.*, 2011) ou dulcicoles (Furutani et Rudd, 1980 ; Siciliano *et al.*, 2005 ; Huguet *et al.*, 2010 ; Avramescu *et al.*, 2011) ou de sédiment (Gilmour *et al.*, 1998 ; Marvin-DiPasquale *et al.*, 2003 ; Gray *et al.*, 2004 ; Heyes *et al.*, 2006 ; Drott *et al.*, 2008 ; Duran *et al.*, 2008). Le rôle des microorganismes peut être direct (méthylation/déméthylation) ou indirect en alimentant le pool de  $\text{Hg}^{\text{II}}$  (et donc en  $\text{HgS}_{\text{aq}}^0$  par réaction avec des sulfures) qui représentent les principaux substrats pour la méthylation (Benoit *et al.*, 2001a).

Les SRB ont été les premières mises en évidence pour avoir une implication dans la méthylation (Compeau et Bartha, 1985) par l'utilisation de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , un inhibiteur de la réduction enzymatique du sulfate (Taylor et Oremland, 1977). Ces résultats furent confirmés en isolant, à partir d'échantillons de sédiment, la souche *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 présentant une forte activité méthylante. Les auteurs observent une méthylation beaucoup plus importante en conditions fermentatives c'est-à-dire en absence de sulfate dans le milieu de culture. Ceci peut s'expliquer par le fait que le sulfure, produit de la réduction du sulfate, peut se complexer avec  $\text{Hg}^{2+}$  pour précipiter en  $\text{HgS}_s$ . A ce stade, la méthylation du mercure est décrite paradoxalement comme étant liée à l'activité de bactéries sulfatoréductrices mais dans des conditions de croissances dissociées d'une

activité sulfatoréductrice. De nombreux autres travaux ont depuis confirmé l'implication des SRB d'environnements variés dans la méthylation du mercure (Compeau et Bartha, 1987 ; Gilmour *et al.*, 1992 ; Pak et Bartha, 1998a ; King *et al.*, 2000).

En parallèle, l'implication des archées méthanogènes dans la méthylation et la déméthylation est largement documentée (Wood *et al.*, 1968 ; Oremland *et al.*, 1991 ; Pak et Bartha, 1998b ; Avramescu *et al.*, 2011 ; Hamelin *et al.*, 2011). Ces dernières semblent jouer un rôle complexe dans le processus de méthylation. La majorité des études s'accordent à les décrire comme déméthylantes (Oremland *et al.*, 1991 ; Pak et Bartha, 1998a ; Avramescu *et al.*, 2011) alors que d'autres décrivent une activité indirectement (Wood *et al.*, 1968 ; Pak et Bartha, 1998b) ou directement (Hamelin *et al.*, 2011) méthylante.

Plus récemment, la présence de méthylmercure dans des sédiments où le fer représente le principal accepteur final d'électrons a suggéré l'implication d'autres groupes métaboliques anaérobies tel que les bactéries ferriréductrices (Warner *et al.*, 2003). Le genre *Geobacter*, et plus généralement le groupe des deltaprotéobactéries a été identifié comme ayant une activité méthylante à des niveaux comparables à ceux observés chez les sulfatoréductrices très méthylantes comme *Desulfobulbus propionicus* (Fleming *et al.*, 2006 ; Kerin *et al.*, 2006). A l'inverse, les bactéries du genre *Shewanella* ( $\gamma$ -protéobactérie) ne présentent aucune activité méthylante, la capacité à méthyler le mercure ne serait donc pas spécifiques des bactéries ferriréductrices (Kerin *et al.*, 2006). D'autres travaux montrent au contraire une baisse de la méthylation nette en présence de fer qui peut être due, selon les auteurs, à la formation de complexes FeS (Mehrotra *et al.*, 2005). En effet, il semble que le fer puisse jouer un rôle à la fois sur l'activité des bactéries ferriréductrices et sur la complexation et donc la biodisponibilité du mercure.

Les différentes souches méthylantes identifiées ont en commun d'appartenir principalement à des groupes métaboliques anaérobies (sulfatoréductrices, ferriréductrices, méthanogènes), elles sont donc couramment associées dans l'environnement notamment dans les sédiments et au sein de biofilms. Pour bien comprendre les enjeux de la méthylation biotique du mercure, il convient donc de tenir compte des interactions entre ces groupes. Par exemple, une baisse de l'activité sulfatoréductrice peut se traduire par une baisse de la méthylation nette, d'une part en causant une réduction de l'activité méthylante de celles-ci, et d'autre part, en favorisant la croissance de méthanogènes connue pour déméthylar le mercure (Avramescu *et al.*, 2011).

### 3) Génétique et mécanisme enzymatique de la méthylation

En 1994, les travaux de Choi et Bartha ont montré que la méthylation faisait intervenir des intermédiaires de la voie de synthèse de l'acétyl-CoA et notamment la méthylcobalamine (Figure 7 c) une enzyme capable de transférer un groupe méthyl au mercure à partir du méthyltétrahydrofolate (méthyl originaire du métabolisme de la sérine ou du formiate). La voie de synthèse de l'acétyl-CoA, aussi appelée voie de Wood-Ljungdahl (Figure 8), est la voie métabolique de l'acétogénèse, qui convertit le CO et le CO<sub>2</sub> en carbone organique cellulaire, commune à certains microorganismes anaérobies notamment les acétogènes et les méthanogènes (Figure 8). Généralement, ces organismes sont aussi capables d'exprimer le processus inverse c'est-à-dire utiliser l'acétate comme substrat aussi bien en l'oxydant en CO<sub>2</sub> (énergie cellulaire) qu'en le convertissant en acétyl-CoA (synthèse de carbone cellulaire). D'autres voies métaboliques ont été suspectées comme la voie de synthèse du diméthylsulfure ou encore la voie de synthèse de la méthionine (Landner, 1971) chez le mycète *Neurospora crassa* mais les résultats contradictoires obtenus avec les différents organismes étudiés n'ont pas permis d'arriver à un consensus.

En 2003, Ekstrom *et al.* ont comparé les vitesses de méthylation de microorganismes utilisant ou non la voie de Wood-Ljungdahl comme voie principale de l'oxydation du carbone. Deux groupes de SRB ont été étudiés, i) les SRB dites « *incomplete oxidizers* » c'est-à-dire qui oxydent les substrats carbonés donneurs d'électrons de façon incomplète (majoritairement en acétate plutôt qu'en CO<sub>2</sub>) et chez qui la voie de l'acétyl-CoA n'est pas utilisée de façon significative mais plutôt pour des réactions de biosynthèse ou dans le cas d'utilisation de substrats inhabituels (Choi et Bartha 1994). A l'inverse, ii) les SRB dites « *complete oxidizers* » oxydent intégralement les substrats carbonés en CO<sub>2</sub> en utilisant principalement la voie de l'acétyl-CoA ou le cycle de l'acide citrique (Ghambeer *et al.*, 1971 ; Shauder *et al.*, 1986).

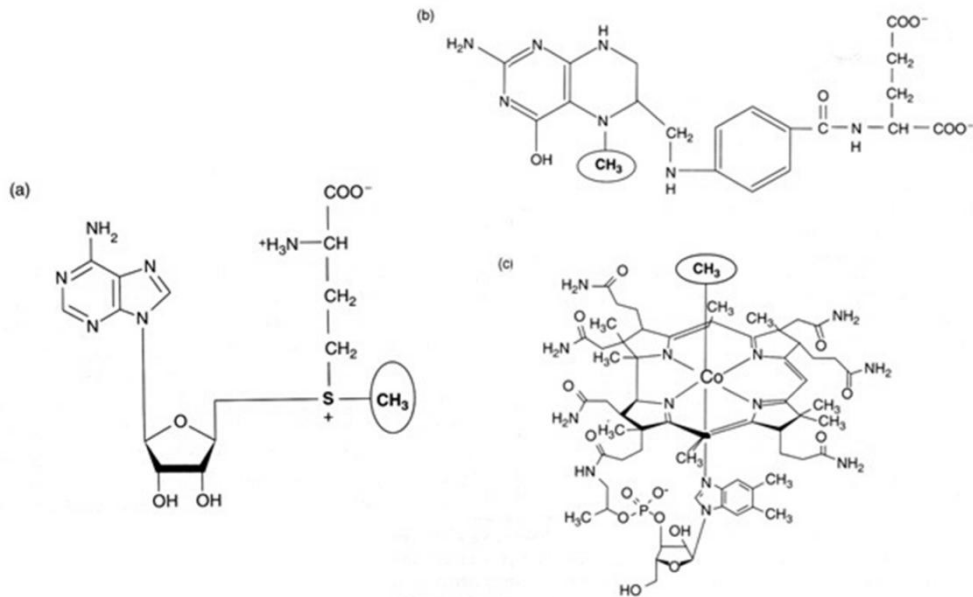


Figure 7. Principaux co-facteurs impliqués dans le transfert d'un groupe méthyle aux éléments métalliques a) S-adenosylméthionine, b) tétrahydrofolate et c) méthylcobalamine (Mason, 2013).

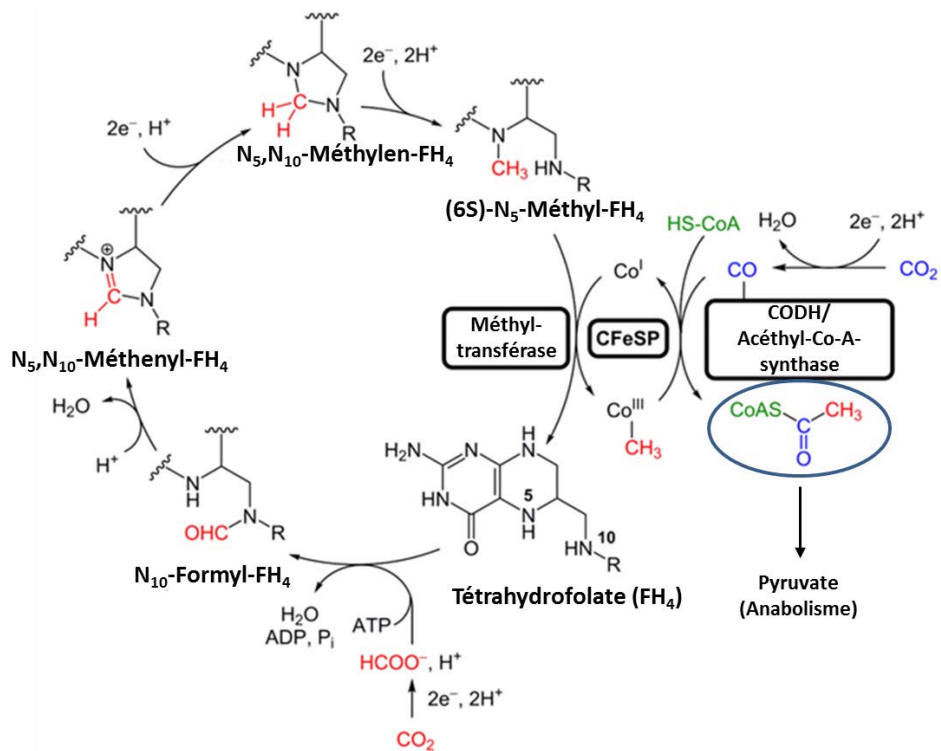


Figure 8. La voie de Wood-Ljungdahl ou voie de synthèse de l'acétyl-CoA dans l'acétogénèse. La branche du méthyle, à gauche (correspondant à la voie métabolique à un carbone), et la branche du carbonyle, à droite, s'articulent autour de la méthyltransférase, la protéine fer-soufre à corrinnoïde (CFeSP), la CO déshydrogénase (CODH) et l'acétyl-CoA synthase (d'après fr.wikipedia.org).

Leurs résultats montrent que sur quatre souches capables de méthyler le mercure, une seule présente une activité enzymatique caractéristique de la voie de l'acétyl-CoA. De plus, l'addition de chloroforme, une substance préalablement testée pour inhiber la voie de l'acétyl-CoA, fait chuter la méthylation chez les organismes où elle est impliquée (*complete oxydizers*), mais chez les autres (*incomplete oxydizers*), aucun effet n'est observé sur la méthylation du mercure. Le fait de méthyler le mercure n'est donc pas formellement corrélé à l'utilisation de la voie de Wood-Ljungdahl comme voie métabolique majoritaire. Ces résultats suggèrent que d'autres voies métaboliques sont impliquées dans la méthylation du mercure.

En multipliant les expériences avec des souches de différents groupes métaboliques et différents substrats (Landner 1971 ; Choi et Bartha, 1994 ; Siciliano et Lean, 2002), l'origine du groupe méthyle transféré au mercure a pu être mis en évidence et, par là même, les enzymes impliquées dans ce processus.

Le groupe méthyle que porte l'acétyl-CoA (en rouge sur la Figure 8) provient de la réduction du CO<sub>2</sub>, d'abord en formiate, qui lui-même subit encore deux transformations pour aboutir au méthyltétrahydrofolate (Figure 8 et 9). Le groupe méthyle est ensuite lié par l'action de la méthyltransférase au cobalt du cofacteur (domaine cobalamine) d'une protéine corrinoïde Fe-S (CPFeS-Co<sup>I</sup>), ce qui forme un intermédiaire (CPFeS-Co<sup>III</sup>-CH<sub>3</sub>) (Ragsdale 2008) (Figure 8). C'est ce groupe méthyle qui est utilisé dans la synthèse de l'acétyl-CoA, or si une espèce mercurique est présente, le groupe méthyle peut lui être transféré fortuitement du fait de sa ressemblance avec d'autres substrats métalliques (cluster NiFeS) de l'enzyme. Le complexe protéine-cofacteur, une fois déméthylé (CPFeS-Co<sup>III</sup>), doit être réduit par une enzyme de type ferrédoxine afin d'être régénéré (CPFeS-Co<sup>I</sup>) avant de refaire une liaison avec un groupe méthyle provenant du tétrahydrofolate (Figure 9).

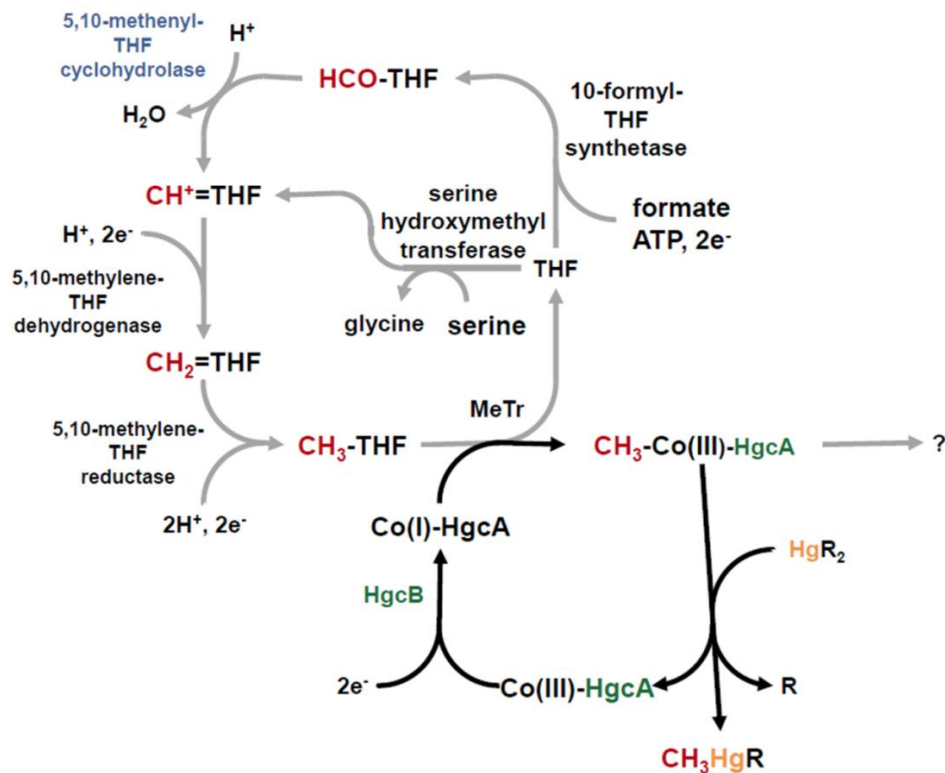


Figure 9. Voie métabolique de méthylation du mercure proposée par Parks *et al.*, 2013. (THF : tétrahydrofolate ; MeTr : méthyltransférase ; R : radical). Le groupe méthyle provenant du méthyltétrahydrofolate est transféré de façon fortuite au  $Hg^{II}$  par la protéine de type corrinoïde Fe-S identifiée comme HgcA. La protéine HgcB, quant à elle, régénère le pouvoir méthyloxydant d'HgcA en réduisant le  $Co^{III}$  du domaine cobalamine qui peut de nouveau fixer un groupe méthyle (<http://science.energy.gov>).

Les récents travaux de Parks *et al.* (2013) ont eu pour but de rechercher les gènes codant pour des protéines de type CPFes (responsables de la méthylation du mercure) dans les génomes d'organismes méthyloxydants ou non. Les résultats montrent chez tous les organismes méthyloxydants étudiés, la présence de deux séquences *hgcA* et *hgcB* (séparées par seulement 14 paires de bases chez *Desulfovibrio desulfuricans*) comportant des régions très conservées (notamment des régions codant pour des domaines ferrédoxines ainsi que des résidus cystéines) et qui semblent être co-exprimées. Ce cluster est présent de façon hétérogène aussi bien chez les Deltaprotéobactéries (*Geobacter*, *Desulfovibrionales* et *Desulfbacterales*) que chez des Firmicutes, *Clostridia* ou des *Archaea*, de plus, ces séquences sont absentes des génomes de tous les organismes non méthyloxydants testés. Ainsi, *hgcA* et *hgcB* coderaient respectivement pour la protéine corrinoïde qui transfère le groupe méthyle au mercure de façon aspécifique (HgcA) et la protéine type ferrédoxine (HgcB)

capable de réduire la première et ainsi permettre à la réaction de recommencer (Figure 9). Afin de confirmer le rôle de ces gènes dans la méthylation du mercure, des expériences de délétion/complémentation ont été menées et montrent que pour avoir une activité méthylante comparable à celle du contrôle non délété, les deux gènes doivent être présents. Si leur délétion ne semble pas impacter la croissance des souches testées (Parks *et al.*, 2013), elle affecte certains mécanismes comme l'oxydation et la réduction du mercure, ainsi que sa sorption et son assimilation par les cellules bactériennes (Lin *et al.*, 2015). Ainsi, les auteurs suggèrent que la méthylation puisse être, à l'origine, un système de détoxification du mercure.

Dans tous les cas, l'identification de ce cluster ouvre des perspectives intéressantes comme l'identification d'organismes méthylants dans divers environnements donnés (Gilmour *et al.*, 2013) et éventuellement la quantification d'un potentiel de méthylation par rapport à son niveau d'expression. A titre d'exemple, la présence de ces deux gènes chez *Methanomassiliicoccus luminyensis*, une souche méthanogène isolée de fèces humains suggère que la méthylation pourrait se faire au sein même du tractus intestinal. Ce phénomène de méthylation par la biomasse intestinale a déjà été observé chez le rat et le poisson mais pas encore chez les primates (Wireman *et al.*, 2006).

Au vue de ces récentes observations, il apparaît donc que, contrairement à ce qui était suspecté par le passé, la méthylation du mercure n'est pas affiliée à une ou des voies métaboliques particulières mais plutôt le fait d'une protéine, HgcA, qui transfère un groupe méthyle au mercure de façon aspécifique et que l'on peut retrouver de façon très dispersée au sein du règne bactérien sans lien phylogénétique évident (Figures 10 et 11) mis à part le caractère anaérobie de toutes les souches identifiées.



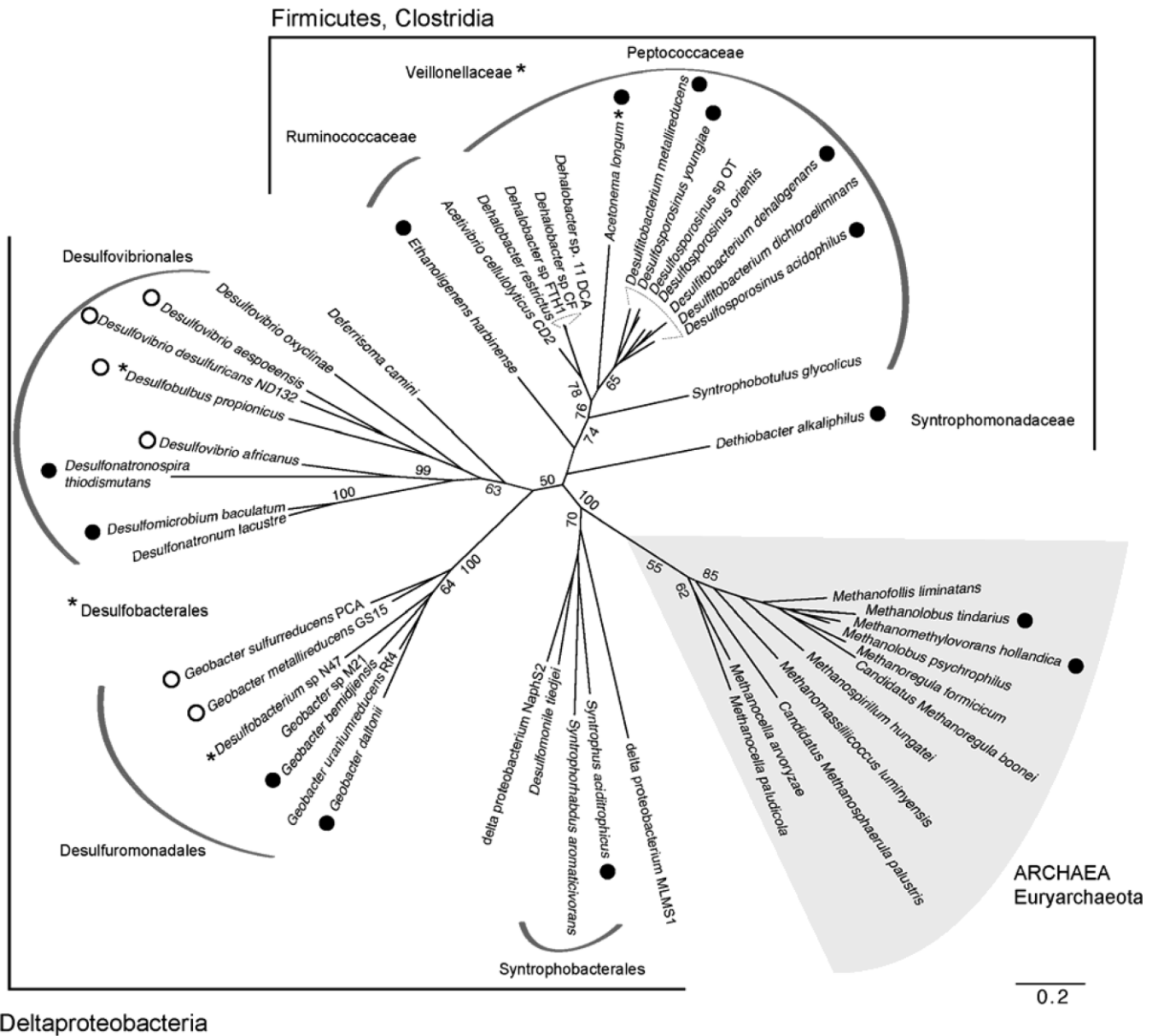


Figure 10. Arbre phylogénétique des organismes porteurs du gène *hgA*. Les organismes dont le nom est associé à un disque noir sont des méthylateurs du mercure connus (d'après Gilmour *et al.*, 2013).

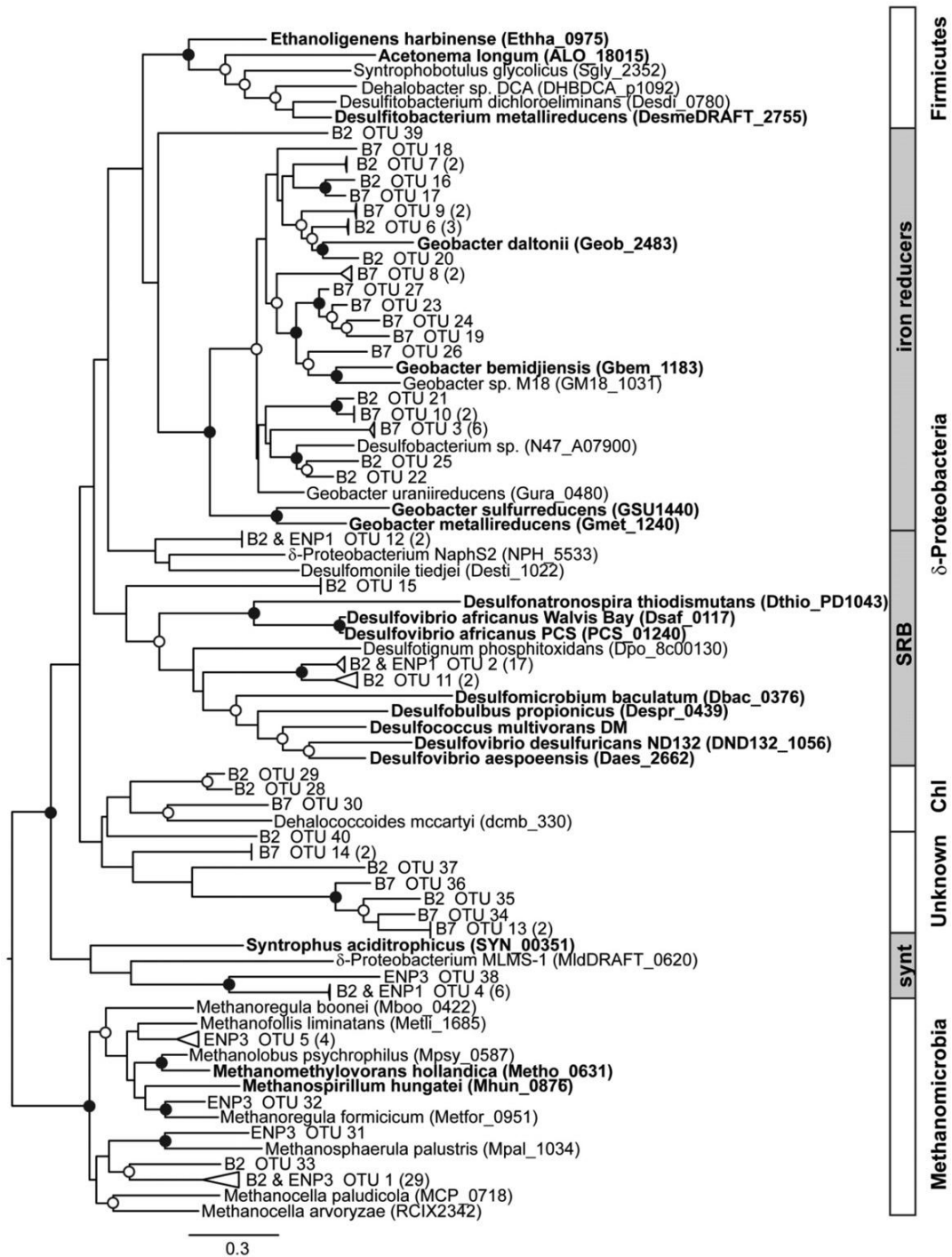


Figure 11. Arbre phylogénétique des organismes porteurs du gène *hgA*. Les organismes dont le nom est écrit en gras sont des méthylateurs connus du Hg (Scheaefer *et al.*, 2014).

#### 4) Méthylation abiotique

La thèse d'une méthylation principalement abiotique a été dans un premier temps défendue par plusieurs auteurs dans les années 80 (Larock et Hershberger, 1981 ; Nagase *et al.*, 1982 ; Woggon *et al.*, 1984 ; Bellama *et al.*, 1988). La plupart de ces travaux ont été compilés par Weber (1993) qui a considéré que : 1) si la méthylation est due à l'activité de bactéries sulfatoréductrices cela suppose une méthylation uniquement dans des environnements riches en sulfates ce qui va à l'encontre du caractère ubiquitaire de la méthylation ; 2) au vu des teneurs en mercure ajoutées dans les expériences de méthylation, les auteurs auraient sélectionné des bactéries résistantes au mercure et auraient donc travaillé avec des échantillons peu représentatifs des communautés bactériennes des sites échantillonnés, et enfin ; 3) les méthodes de « stérilisation » des échantillons (traitement thermique, ajout d'acide concentré ou d'azide de sodium) affecteraient aussi bien les processus biologiques que chimiques entraînant donc un biais (faux négatifs). Ces auteurs décrivent de nombreux mécanismes chimiques pour expliquer la méthylation comme la réaction avec la méthylcobalamine, des composés organométalliques (Pb, Sn, As) (Ebinghaus *et al.*, 1994) des organosiloxanes (Watanabe *et al.*, 1986) mais surtout par la matière organique du sol et notamment les acides humiques et fulviques (Nagase *et al.*, 1982).

A l'heure actuelle, même si ces mécanismes n'ont pas été remis en question, il semble peu probable qu'ils contribuent d'une manière significative à la méthylation du mercure dans l'environnement. En effet, de nombreuses études ont confirmé le rôle prépondérant de l'activité biologique sur la méthylation amenant un consensus (Compeau et Bartha, 1985 ; Berman et Bartha, 1986 ; King *et al.*, 2001). A titre d'exemple, les travaux de Choi *et al.* en 1994 ont montré des vitesses de méthylation 600 fois supérieures en présence de cellules bactériennes qu'avec la méthylcobalamine seule.

#### 5) Déméthylation

Contrairement à la méthylation qui est un mécanisme majoritairement biologique, la déméthylation est décrite dans la littérature comme un processus à la fois biotique (Compeau et Bartha, 1984 ; Oremland *et al.*, 1991 ; 1995) et abiotique notamment par le biais de la photodégradation (Inoko, 1981 ; Suda *et al.*, 1993). Ce mécanisme est d'ailleurs décrit par Sellers (1996) comme étant proportionnel à l'intensité lumineuse. Dans cette étude, plus de 80 % du méthylmercure présent est déméthylé par cette voie. De récentes études ont confirmé ces résultats par différentes approches notamment en étudiant le fractionnement isotopique au cours de la

photodégradation (Bergquist et Blum, 2007) précisant que le mercure photodéméthylé se retrouve sous forme de  $\text{Hg}^0$  et donc passe du milieu aquatique à l'atmosphère (Chen *et al.*, 2003 ; Hammerschmidt et Fitzgerald, 2006 ; Li *et al.*, 2010). La réaction du méthylmercure avec des acides séléno-aminés peut aboutir à la déméthylation du mercure par formation de complexes solide  $\text{HgSe}$  mais aussi du diméthylmercure gazeux bien que ce dernier mécanisme n'ait été décrit qu'en laboratoire (Khan et Wang, 2010 ; Asaduzzaman et Schreckenbach, 2011).

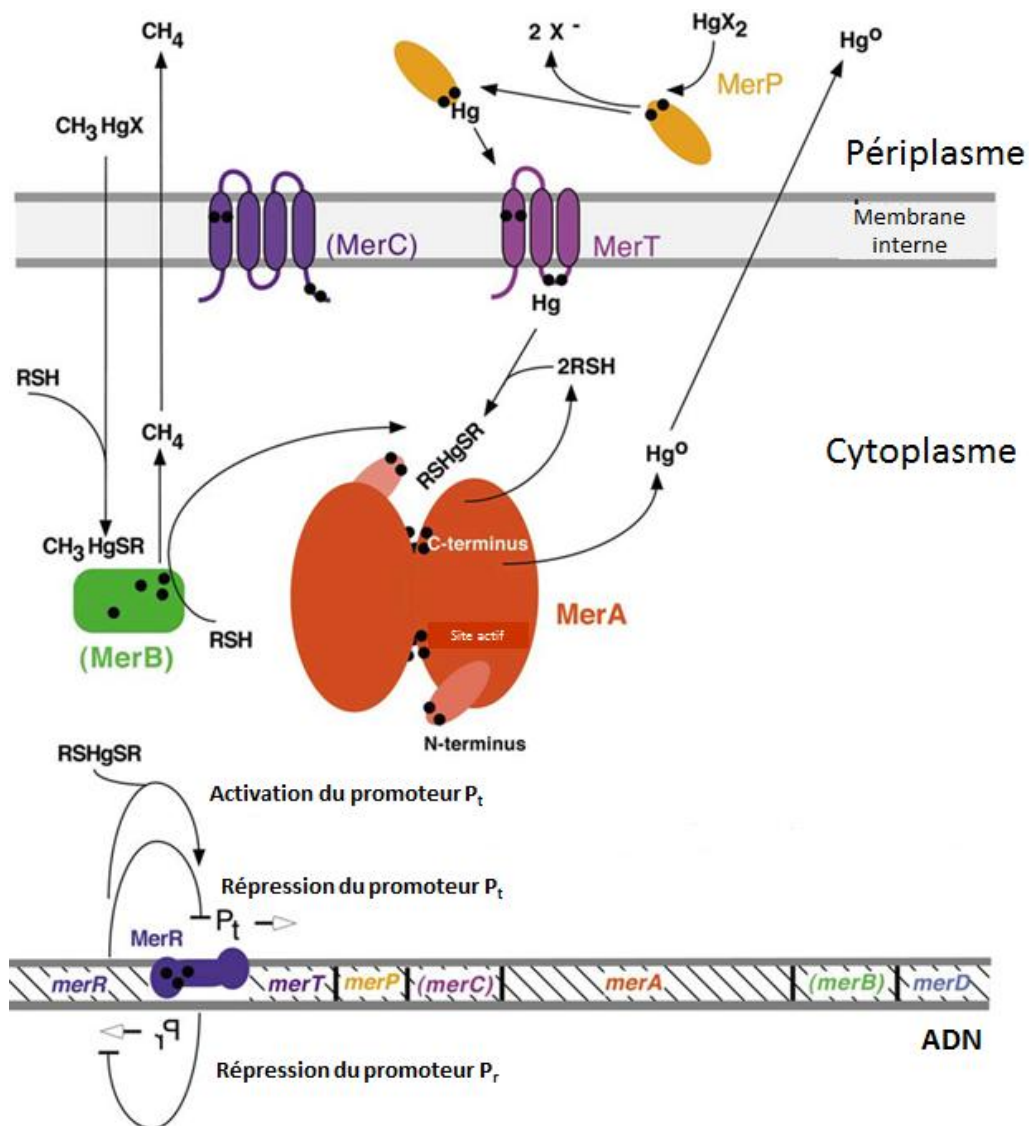
Pour ce qui est de la part biologique de la déméthylation, de nombreuses souches aérobies et anaérobies ont été identifiées (Robinson et Tuovinen, 1984 ; Oremland *et al.*, 1991). Les méthanogènes semblent ainsi être impliquées (Oremland *et al.*, 1991 ; Marvin-Dipasquale et Oremland, 1998) de même que les sulfatoréductrices d'après une étude plus récente (Hamelin *et al.*, 2011).

La dégradation du méthylmercure par voie biologique peut se faire par deux mécanismes, la déméthylation réductive et la déméthylation oxydative.

La dégradation réductive domine dans les zones très contaminées aussi bien en condition aérobie qu'anaérobie (Marvin-DiPasquale *et al.*, 2000, Shaefer *et al.*, 2004). Cette voie est catalysée par un couple d'enzyme, l'organomercuriale lyase (MerB) et la mercure réductase (MerA) codées par l'opéron *mer* (Furukawa *et al.*, 1969 ; Spangler *et al.*, 1973). MerB clive la liaison C-Hg formant du  $\text{CH}_4$  et du  $\text{Hg}^{2+}$ . Ce dernier est ensuite réduit en  $\text{Hg}^0$  gazeux par MerA (Figure 12). L'expression des gènes codant pour ces protéines est régulée directement par la concentration en  $\text{Hg}^{\text{II}}$  (activation à partir d'une concentration équivalente à 1 pM soit 200  $\text{pg L}^{-1}$ ) via le répresseur MerR qui s'y lie lorsque la concentration dépasse un seuil ce qui aboutit à l'induction de la transcription (Brown *et al.*, 2003) et ce, proportionnellement à la concentration de Hg dans le milieu (Ralston *et al.*, 1990 ; Rasmussen *et al.*, 1997). Les gènes et les séquences régulatrices responsables de la résistance au mercure  $\text{Hg}^{\text{II}}$  sont portés par l'opéron *mer*. Cette séquence génétique est largement répandue dans le règne bactérien (Barkay *et al.*, 2003) et chez certaines archées (Simbahan *et al.*, 2005). Très peu de différences sont observées entre les bactéries à coloration de Gram positive et négative. De plus, il est situé sur une séquence transposon donc facilement échangé au sein de communautés bactériennes vivant dans un même environnement. Il est en général porté par des plasmides regroupant d'autres gènes de résistances aux métaux lourds (cadmium, arsenic, argent, ...) et aux antibiotiques (Robinson et Tuovinen, 1984). En réduisant le

mercure cationique en mercure élémentaire volatil, cette voie enzymatique permet l'élimination du mercure du milieu de vie des microorganismes qui l'expriment (Barkay *et al.*, 2003).

La dégradation oxydative a été mise en évidence par Oremland *et al.* (1991), en conditions anaérobies. Elle implique les méthanogènes et certaines SRB (Oremland *et al.*, 1991 ; 1995 ; Pak et Bartha, 1998a) et produit principalement du  $\text{Hg}^{2+}$  et du  $\text{CO}_2$  (et du méthane dans une moindre mesure), le MeHg pouvant potentiellement servir comme analogue d'un substrat à un carbone la monométhylamine (Marvin-DiPasquale et Oremland, 1998). Ce mécanisme se produit aussi bien dans des environnements fortement impactés par une pollution au mercure (couplé à la dégradation réductive) que dans des environnements peu ou pas contaminés (qui ne déclenchent pas une réponse de l'opéron *mer*) où il est le principal moteur de la déméthylation biologique (Marvin-DiPasquale *et al.*, 2000).



**Figure 12.** Mécanismes d'action de l'opéron (*mer*) de résistance au mercure chez les bactéries à coloration de Gram négative. Le symbole • représente un résidu cystéine ; X : solvant nucléophile ; RSH : thiol de faible poids moléculaire présent dans le cytosol (e.g. glutathion) ; les gènes/protéines entre parenthèses ne sont pas forcément induits selon les cas (d'après Barkay *et al.*, 2003).

## IV. Facteurs biogéochimiques impactant la méthylation

La formation de méthylmercure dans l'environnement aquatique, bien que vraisemblablement fortuite, dépend d'un grand nombre de facteurs biogéochimiques locaux. En effet, de nombreux paramètres sont susceptibles d'influer sur la méthylation nette notamment ceux impactant l'activité bactérienne (présence de donneurs et d'accepteurs d'électrons, température) mais aussi ceux affectant la biodisponibilité du mercure pour le passage dans le milieu intracellulaire et l'interaction avec l'enzyme qui lui transfère le groupe méthyle.

### 1) Facteurs impactant l'activité bactérienne

#### a) Etat physiologique des bactéries

Les premiers travaux sur le sujet montrent que la méthylation est liée à la croissance des souches testées (Compeau et Bartha, 1985 ; Pak et Bartha, 1998a). En outre, il semble que l'état physiologique des bactéries ait un impact sur la méthylation du mercure. Ainsi, Ebinghaus *et al.* (1994) ont observé une forte méthylation durant la phase exponentielle de croissance de bactéries issues de sédiment, alors que la déméthylation devenait dominante lors de la phase de déclin de la culture. La souche *Desulfobulbus propionicus* par exemple, présente un rendement de méthylation en baisse lors de la phase stationnaire (Benoit *et al.*, 2001a) et l'apparition d'une activité déméthylante au début de cette phase (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2009). Ainsi, la méthylation est communément décrite comme très élevée pendant les premiers jours d'incubation, jusqu'à 8 jours pour Compeau et Bartha (1998), puis un équilibre semble être atteint où la teneur en MeHg n'évolue plus, et même commence à décliner (Ikingura et Akagi, 1999 ; Furutani et Rudd, 1980). Au contraire, Pongratz et Heumann (1999), et plus récemment Biswas *et al.* (2011), ont mesuré un taux de méthylation plus élevé (jusqu'à trois fois supérieur) en phase stationnaire avancée qu'en phase exponentielle. Ces derniers résultats remettent en question le lien méthylation-croissance et suggèrent que les conditions environnementales, où la densité bactérienne est très élevée et où les éléments nutritifs sont limités, donc où les cellules ne sont pas en phase de croissance exponentielle, ne seraient pas un frein à la méthylation mais au contraire pourraient la favoriser.

#### b) Concentration en sulfate et sulfure

Depuis l'identification des bactéries sulfatoréductrices comme principaux acteurs de la méthylation, l'impact de la concentration en sulfate du milieu sur la méthylation a été étudié. Bien

que des concentrations inférieures à  $10 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0,1 \text{ mM}$ ) commencent à être limitantes pour l'activité sulfatoréductrice (Lovley et Klug, 1983), les SRB peuvent rester actives même dans l'eau douce où la concentration en sulfate descend jusqu'à  $3 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0,03 \text{ mM}$ ) notamment en concurrençant les méthanogènes pour des substrats comme l'hydrogène et l'acétate (Matilainen, 1995). Ainsi, comme l'ont rapporté de nombreux auteurs, il semble que la méthylation par les bactéries sulfatoréductrices soit, paradoxalement, exacerbée dans des conditions limitantes en sulfate en présence d'autres substrats organiques (Compeau et Bartha, 1985 ; Gilmour *et al.*, 1992). De même, si les bactéries ferriréductrices peuvent présenter une activité méthylyante (Fleming *et al.*, 2006 ; Kerin *et al.*, 2006), il a été décrit qu'en présence d'une quantité de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  dans le milieu d'incubation à une concentration équivalente à celle de sulfure, une baisse de la méthylyation est observée. Ceci est dû à la précipitation de  $\text{FeS}$  qui entre en compétition avec la formation de complexes solubles neutres du type  $\text{Hg}(\text{SH})_2^0$  ou  $\text{HgS}^0$  (Mehrotra *et al.*, 2005). La concentration optimale en sulfate décrite par Gilmour et Henry (1991) serait comprise entre  $0,2$  et  $0,5 \text{ mM}$  pour permettre à la fois une activité SRB méthylyante sans avoir une inhibition par le sulfure. Les fortes concentrations en sulfate rencontrées dans l'eau de mer ( $\approx 28 \text{ mM}$ , Ingvorsen *et al.*, 1981) pourraient donc expliquer les faibles teneurs en  $\text{MeHg}$  qui y sont observées. Ceci est dû au fait qu'en présence d'une activité sulfatoréductrice soutenue en milieu anoxique, riche en matière organique dégradable, le sulfure, et notamment le sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ), est produit. On peut aussi le retrouver dans les eaux de surfaces comme rejet des activités industrielles et domestiques. Au sein de sédiments, de nombreux travaux ont montré la corrélation inverse entre la concentration en sulfure dissous et le taux de  $\text{MeHg}$  formé, même si elle n'inhibe pas entièrement sa formation (Compeau et Bartha, 1987 ; Gilmour *et al.*, 1998 ; Benoit *et al.*, 1999b). En conditions anaérobies, le sulfure réagit avec  $\text{Hg}^{2+}$  pour former du  $\text{HgS}$  qui précipite, mais aussi des complexes  $\text{Hg-S}$  non neutres et ainsi limite la mobilisation et la méthylyation du mercure (Yamada et Tonomura, 1972 ; Compeau et Bartha, 1985 ; Benoit *et al.*, 2001b ; Lin et Jay, 2007 ; Truong *et al.*, 2013). En présence d'oxygène en revanche, le sulfure est rapidement oxydé en sulfate rendant ainsi le  $\text{Hg}^{2+}$  disponible même si la méthylyation en milieu aérobie reste anecdotique. Dans leurs études, Benoit *et al.* (1999 ; 2001) montrent que la biodisponibilité du mercure dépendrait principalement de la formation de complexes neutres solubles comme  $\text{HgS}^0$  qui se forme préférentiellement à des faibles concentrations en sulfure alors qu'à forte concentration ( $> 50 \mu\text{M}$ ), l'équilibre est déplacé vers des espèces chargées ( $\text{HgSH}^{2-}$ ) peu propices à diffuser à travers des membranes bactériennes. En parallèle, le sulfure, étant ici un déchet métabolique, peut impacter à de fortes concentrations ( $> 250 \text{ mg L}^{-1}$ ) la croissance de certaines SRB, comme cela a été montré avec *Desulfovibrio desulfuricans* (Okabe *et al.*, 1995). A cette concentration, le rendement de croissance est divisé par deux du fait



d'une inhibition de l'activité anabolique (production de biomasse et multiplication cellulaire) alors que l'activité catabolique (production d'énergie) ne semble pas perturbée.

c) Rôle de la matière organique

La présence de matière organique peut affecter indirectement la méthylation du mercure en impactant l'activité bactérienne. En effet, la méthylation abiotique par la matière organique (substances humiques et fulviques) étant décrite comme négligeable (Compeau et Bartha, 1985 ; Berman et Bartha, 1986 ; King *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2012), celle-ci contribue majoritairement à la méthylation de façon indirecte (Ullrich *et al.*, 2001). Étant donné que la disponibilité en matière organique accentue l'activité microbienne hétérotrophe, de nombreux travaux ont montré une corrélation entre la quantité de matière organique disponible et la méthylation nette (Choi et Bartha, 1994 ; Pak et Bartha, 1998a). Ainsi l'enneigement de sols végétalisés comme dans le cas des retenues de barrages hydroélectriques, peut considérablement accroître le taux de méthylation (Kelly *et al.*, 1997 ; Montgomery *et al.*, 2000 ; Boudou *et al.*, 2005) du fait de la grande quantité de matière organique disponible ainsi que des conditions anaérobies qui s'y développent.

d) Température

De même, l'effet de la température sur la méthylation peut être direct mais plus probablement indirect en lien avec l'augmentation de la production primaire et de l'activité microbienne. A 4 °C la quantité de méthylmercure formé peut chuter de 50 % par rapport à ce qui peut être observé à 25 °C ce qui suggère que la production de méthylmercure chute de façon importante en hiver lorsque l'activité métabolique bactérienne est ralentie (Wright et Hamilton, 1982). Ainsi, en milieu aquatique, c'est en période estivale que sont communément observés les pics de méthylation (Hintelmann et Wilken, 1995 ; Watras *et al.*, 1995).

**2) Biodisponibilité du substrat**

Un substrat, ici le mercure inorganique, est considéré comme biodisponible si son état lui permet d'être métabolisé (ici méthylé). C'est-à-dire que son état physico-chimique (état physique, degré d'oxydation, spéciation) lui permet, d'une part, de pénétrer dans l'espace intracellulaire et, d'autre part, de réagir avec la protéine responsable de sa méthylation. Seuls les facteurs influençant le passage de la membrane cellulaire seront exposés ici ; du fait de la très récente découverte de la protéine responsable de la méthylation du mercure ainsi que des gènes qui codent pour son expression, aucune étude à notre connaissance ne s'est encore penchée sur les paramètres qui régissent sa réactivité vis-à-vis du mercure.

a) Passage dans le milieu intracellulaire

Une étape cruciale dans le processus de méthylation étant le franchissement de la membrane plasmique par le mercure (voir section III. 1)), la biodisponibilité du mercure dépend donc largement de sa capacité à diffuser à travers les membranes bactériennes ou d'être sous une forme compatible vis-à-vis des protéines de transport. La biodisponibilité du mercure est donc variable selon qu'il se présente sous forme de complexes neutres (comme  $\text{HgCl}_2$  en aérobie ou  $\text{HgS}^0$  et  $\text{Hg}(\text{SH})_2^0$  en anaérobie) auxquels les membranes sont perméables (Gutknecht, 1981 ; Benoit *et al.*, 1999a ; Jay *et al.*, 2000 ; Drott *et al.*, 2007), de complexes reconnus par des protéines membranaires (Hg-cystéine) ou encore de nanoparticules d'HgS qui, si elles sont suffisamment petites, peuvent franchir librement les barrières cellulaires (Zhang *et al.*, 2011).

Les nanoparticules d'HgS constituent, dans les environnements riches en sulfure, des intermédiaires de la précipitation en cinabre. Au-delà des simples effets dus à un rapport surface

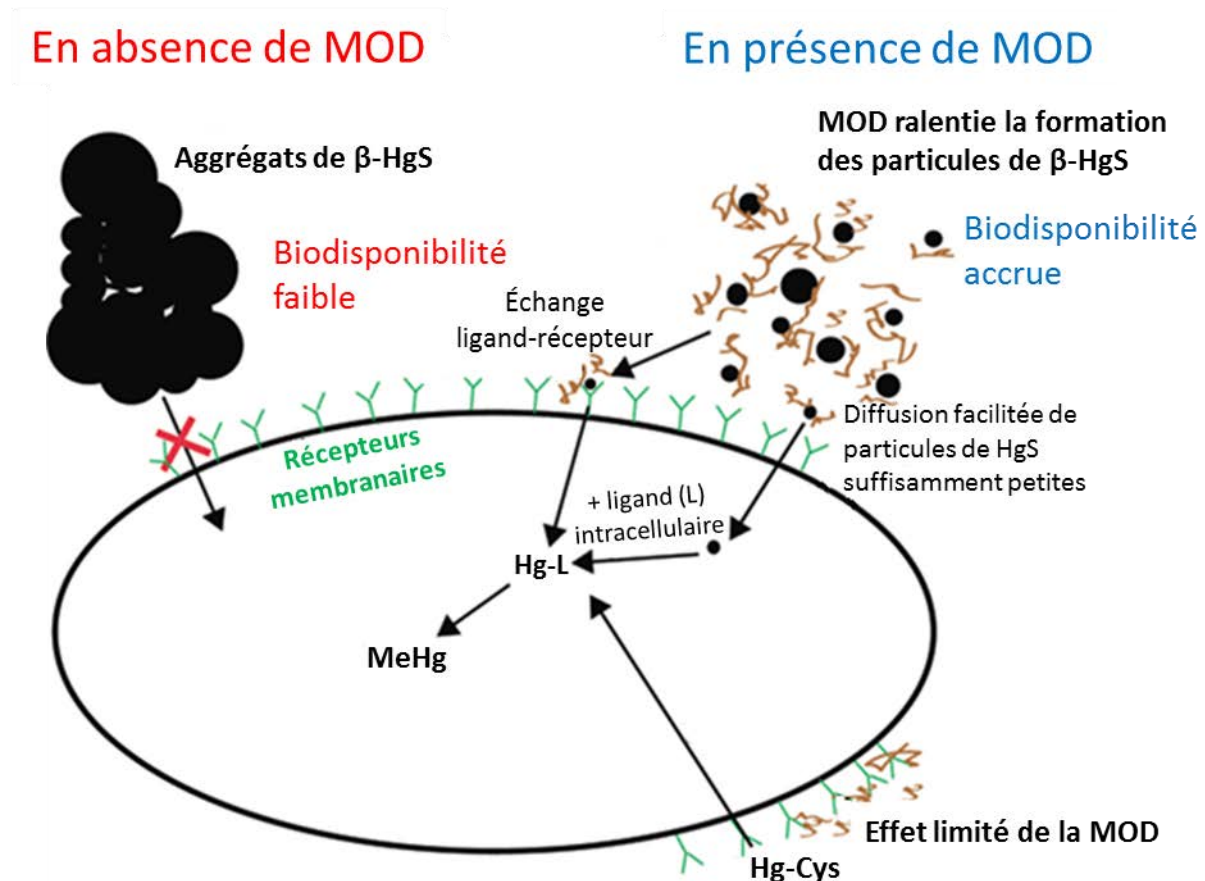
d'échange sur volume plus important, la taille de la nanoparticule influence beaucoup sa solubilité (Gilbert et Banfield, 2005), sa réactivité (Liu *et al.*, 2009) et sa biodisponibilité (Li *et al.*, 2010). Ceci est dû aux propriétés intrinsèques de la matière nanoparticulaire comme par exemple le fait qu'une grande fraction des atomes constituant la particule se trouve à sa surface. De plus, la faible organisation de leur structure facilite un relargage de mercure en solution. Ainsi, plus les particules de HgS sont de petite taille, plus la méthylation est importante. À l'inverse, au-delà d'une certaine taille, les complexes HgS-matière organique deviennent réfractaires à l'entrée dans le milieu intracellulaire ce qui est illustré dans l'étude de Benoit *et al.* (2001a) par la baisse de biodisponibilité du Hg inorganique ajouté au cours de l'incubation. Ceci peut être dû à la formation de précipités mais aussi au fait qu'en début d'incubation, le Hg pourrait être très lié aux membranes bactériennes entraînant un fort gradient qui favorise l'entrée dans l'espace intracellulaire.

Enfin, il semble qu'au-delà d'une certaine concentration en mercure inorganique dans le milieu ( $\approx 15 \mu\text{g g}^{-1}$  de matière sèche de sédiment incubé), l'activité méthylyante tend à décliner (Chen *et al.*, 1996). De plus, les sédiments issus de zones contaminées au mercure présentent généralement de plus faibles taux de méthylation nette que les sédiments non impactés (Gilmour et Henry, 1991 ; Oremland *et al.*, 1995). Ces résultats indiquent que de fortes concentrations en Hg inorganique diminuent le potentiel de méthylation brut et/ou favorisent la déméthylation ce qui est corrélé avec le fait qu'on ne retrouve, dans les sédiments impactés par une pollution au mercure, généralement pas plus de 1 % de  $\text{MeHg}/\text{Hg}^{\text{total}}$ . Dans la colonne d'eau, en revanche, le phénomène inverse est observé : une forte disponibilité en Hg inorganique entraîne une forte méthylation nette (Xun *et al.*, 1987).

#### b) Effet de la matière organique

Des concentrations en matière organique et notamment en carbone organique dissous de l'ordre de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  semblent accroître la solubilité de HgS et en inhiber la précipitation rendant ainsi plus de substrat disponible pour la méthylation (Ravichandran *et al.*, 1998). Les travaux de Graham et collaborateurs (2012) sur le sujet montrent que la méthylation augmente de façon linéaire avec la quantité de matière organique ajoutée. La présence de matière organique augmente la biodisponibilité du mercure en ralentissant l'agrégation des nanoparticules de HgS, une forme intermédiaire de la précipitation en métacinabre ce qui favorise le passage dans l'espace intracellulaire (Figure 13). Les auteurs concluent que, dans des conditions environnementales peu

propices à la méthylation (c'est-à-dire où la formation de cinabre est plutôt favorisée), la présence de matière organique peut inverser la tendance. De plus, comme il est décrit plus haut, (section III. 1)) le complexe formé par  $Hg^{II}$  et la cystéine peut entraîner une augmentation de l'absorption et donc de la vitesse de méthylation (Schaefer et Morel, 2009).



**Figure 13.** Effet de la matière organique dissoute (MOD) sur l'agrégation des particules de métacinabre ( $\beta$ -HgS) et sur la biodisponibilité du Hg. Les sphères noires représentent des particules de cinabre (de différentes tailles), les traits marrons représente la MOD associée au solide et les Y verts représentent les récepteurs présents à la surface des cellules bactériennes (d'après Graham *et al.*, 2012). En présence de MOD, l'agrégation des particules de HgS<sub>s</sub> est ralentie, ce qui permet leur entrée dans la cellule soit via les récepteurs membranaires, soit par diffusion pour les particules de petite taille.

D'un autre côté, une forte concentration en carbone organique dissous ( $90 \text{ mg L}^{-1}$ ) peut avoir un effet négatif sur la méthylation, probablement par le biais de la formation de complexes Hg-matière organique (Miskimmin *et al.*, 1992 ; Barkay *et al.*, 1997) qui, selon leur taille, peuvent présenter une perméabilité membranaire moindre.

c) Effet du pH

La bioaccumulation de méthylmercure dans les poissons de milieux en cours d'acidification est largement documentée (Wren et MacCrimmon, 1983 ; Lindqvist *et al.*, 1984 ; Spry et Wiener, 1991). En effet, les métaux lourds comme le mercure peuvent être plus facilement mis en solution à de faibles valeurs de pH et donc être relargués depuis le sédiment vers la colonne d'eau. D'autre part, il semble que la solubilité du MeHg soit accrue à des pH acides ce qui pourrait expliquer les importantes teneurs mesurées dans ce type de milieu (Xun *et al.*, 1987). De plus, les valeurs de pH élevées favorisent la volatilisation du  $Hg^0$  ce qui contribue également à réduire le taux de méthylation du fait de la baisse de concentration en Hg inorganique disponible (Watras *et al.*, 1995 ; Fitzgerald *et al.*, 1991).

Le pH peut aussi avoir un effet sur l'absorption cellulaire du mercure. Outre les mécanismes de diffusion passive, Golding *et al.* (2002) ont montré que le mercure, complexé par des ligands organiques chargés ou non chargés, pouvait pénétrer dans les cellules bactériennes par diffusion facilitée. Le pH est, lors de cette étape, un paramètre décisif comme cela a déjà été établi pour l'absorption cellulaire (chez l'algue verte *Scenedesmus quadricauda*) d'autres métaux comme le cadmium (Peterson *et al.*, 1984). Les travaux de Kelly *et al.* (2003) confirment ces résultats en montrant qu'en présence de matière organique dissoute, plus le pH est élevé, plus le  $Hg^{II}$  est susceptible de former des complexes avec celle-ci, par exemple avec des groupes sulfhydryles. Les auteurs suggèrent que les complexes formés seraient trop encombrants pour traverser la membrane cellulaire. L'absorption du  $Hg^{II}$  est donc, dans leur étude, plus forte proportionnellement à une baisse du pH entre 7,3 et 6,3. Étant donné que l'équilibre des espèces en solution ne change pas significativement entre ces deux valeurs, les auteurs suggèrent que la mobilisation du mercure par la cellule ne repose pas uniquement sur un mécanisme de diffusion simple des espèces neutres mais plutôt sur un mécanisme actif, affecté par la variation de pH.

Ces résultats rejoignent ceux de Barkay *et al.*, (1997) qui montraient une désorption du  $Hg^{II}$  de la matière organique à de faibles valeurs de pH (les  $H^+$  pouvant protoner les groupes sulfhydryles liant le  $Hg^{II}$  à la matière organique ou en remplaçant le  $Hg^{II}$  fixé sur les particules d'argile). La méthylation ayant lieu dans le milieu intracellulaire (pour lequel le pH est légèrement basique) et donc indépendamment du pH du milieu extérieur, seule l'absorption du substrat, le  $Hg^{II}$ , peut expliquer l'augmentation de la méthylation du mercure observée dans les lacs subissant une acidification (Xun *et al.*, 1987 ; Winfrey et Rudd, 1990).

Il semble donc que des conditions plutôt acides favorisent la méthylation dans l'eau et les sédiments, en revanche en anaérobie c'est la tendance inverse qui est observée peut être du fait d'une plus forte déméthylation à pH acide (Ramlal *et al.*, 1985 ; Steffan *et al.*, 1988).

d) Potentiel redox

Il est communément admis que la méthylation du mercure prend place dans les environnements anaérobies en lien avec l'activité sulfatoréductrice (Compeau et Bartha, 1985). Ces conditions, corrélées avec de faibles valeurs de potentiel redox (-220 mV), semblent favoriser à la fois le processus de méthylation mais aussi la solubilité du méthylmercure formé (Regnell *et al.*, 1996). De surcroît, les conditions aérobies (donc à fort potentiel redox) sont propices à la dégradation du MeHg (Oremland *et al.*, 1991 ; Ebinghaus *et al.*, 1994).

Les différents facteurs exposés dans ce chapitre et leur influence sur la méthylation du mercure sont résumés dans le Tableau 1. En bref, il semble que les conditions optimales pour la méthylation soient : un bas potentiel redox ( $< -200$  mV), la présence d'espèces dissoutes ou colloïdales du mercure susceptibles de pénétrer l'espace intracellulaire (complexes neutres dissous par diffusion simple ou complexes reconnus par les protéines membranaires par transports actif), une concentration relativement faible en sulfure ( $< 50$   $\mu$ M) afin d'éviter la précipitation en cinabre, une haute concentration en matière organique dissoute (autour de  $10$  mg L<sup>-1</sup>), une température élevée ( $\approx 25$  °C) ainsi qu'un pH légèrement inférieur à la neutralité.



Tableau 1. Paramètres influençant de façon positive ou négative la méthylation nette du mercure. [**Hg<sub>inorg</sub>**] : concentration en Hg inorganique ; [**SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>**] : concentration en sulfate ; [**S<sup>2-</sup>**] : concentration en sulfure ; [**MOD**] : concentration en matière organique dissoute.

Paramètre	Effet positif sur la méthylation	Effet négatif sur la méthylation
<b>Activité biotique</b>	Compeau et Bartha, 1985 Pak et Bartha, 1998a	Compeau et Bartha, 1984 Oremland <i>et al.</i> , 1991 ; 1995
<b>Phase de croissance des bactéries</b>	Phase exponentielle ( <i>D. propionicus</i> Benoit <i>et al.</i> , 2001) Phase stationnaire ( <i>D. desulfuricans</i> Biswas <i>et al.</i> , 2011)	
<b>[Hg<sub>inorg</sub>]</b>	[Hg] <sub>inorganique</sub> < 15 µg g <sup>-1</sup> (sédiment Chen <i>et al.</i> , 1996) [Hg] <sub>inorganique</sub> (colonne d'eau Xun <i>et al.</i> , 1987)	[Hg] <sub>inorganique</sub> > 15 µg g <sup>-1</sup> dans le sédiment (Oremland <i>et al.</i> , 1995 ; Chen <i>et al.</i> , 1996)
<b>Nature des complexes de Hg inorganique (substrat)</b>	HgS <sup>0</sup> <sub>aq</sub> et Hg(SH) <sub>2</sub> <sup>0</sup> <sub>aq</sub> ; Hg-cystéine ; nanoparticules de HgS <sub>s</sub> (Benoit <i>et al.</i> , 1999a, Jay <i>et al.</i> , 2000 ; Schaefer et Morel, 2009 ; Zhang <i>et al.</i> , 2011)	Complexes chargés et précipitation en cinabre HgS <sub>s</sub> (Benoit <i>et al.</i> , 2001a et b ; Lin et Jay, 2007)
<b>[SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>]</b>	0,2 à 0,5 mM (Compeau et Bartha, 1985 ; Gilmour et Henry, 1991 ; Gilmour <i>et al.</i> , 1992)	> 28 mM ( <i>e.g.</i> eau de mer) (Ingvorsen <i>et al.</i> , 1981)
<b>[S<sup>2-</sup>]</b>		Par précipitation en cinabre et formation de complexes chargés (Compeau et Bartha, 1987 ; Gilmour <i>et al.</i> , 1998 ; Benoit <i>et al.</i> , 1999a)



<b>[MOD]</b>	Effet indirect en favorisant l'activité bactérienne (Pak et Bartha, 1998a ; Choi <i>et al.</i> , 1994)  MOD $\approx$ 20 mg L <sup>-1</sup> , augmente la solubilité du complexe HgS (Ravichandran <i>et al.</i> , 1998)	Peut favoriser la formation de complexes chargés MOD > 50 mg L <sup>-1</sup> (Miskimmin <i>et al.</i> , 1992 ; Barkay <i>et al.</i> , 1997)
<b>Température</b>	Effet indirect en favorisant l'activité bactérienne (Wright et Hamilton, 1982)	
<b>pH</b>	En conditions légèrement acides (6 à 7) favorise le passage de la membrane (Kelly <i>et al.</i> , 2003) et augmente la solubilité du mercure (Xun <i>et al.</i> , 1987)	En condition légèrement basique, formation de Hg <sup>0</sup> volatile (Watras <i>et al.</i> , 1995)
<b>Eh</b>	Conditions réductrices favorables à la méthylation (-220 mV) (Regnell <i>et al.</i> , 1996)	Conditions oxydantes limitent l'activité de bactéries méthylantes et favorisent la dégradation du MeHg (Oremland <i>et al.</i> , 1991 ; Ebinghaus <i>et al.</i> , 1994)

---

## **B. Le biofilm microbien et ses interactions avec le mercure**

Cette partie vise à définir ce qu'est le biofilm microbien et comment ses caractéristiques (proximité entre différents groupes métaboliques, présence d'EPS ainsi que de minéraux réactifs, ...) peuvent impacter le devenir du Hg inorganique et donc influencer sur sa méthylation.

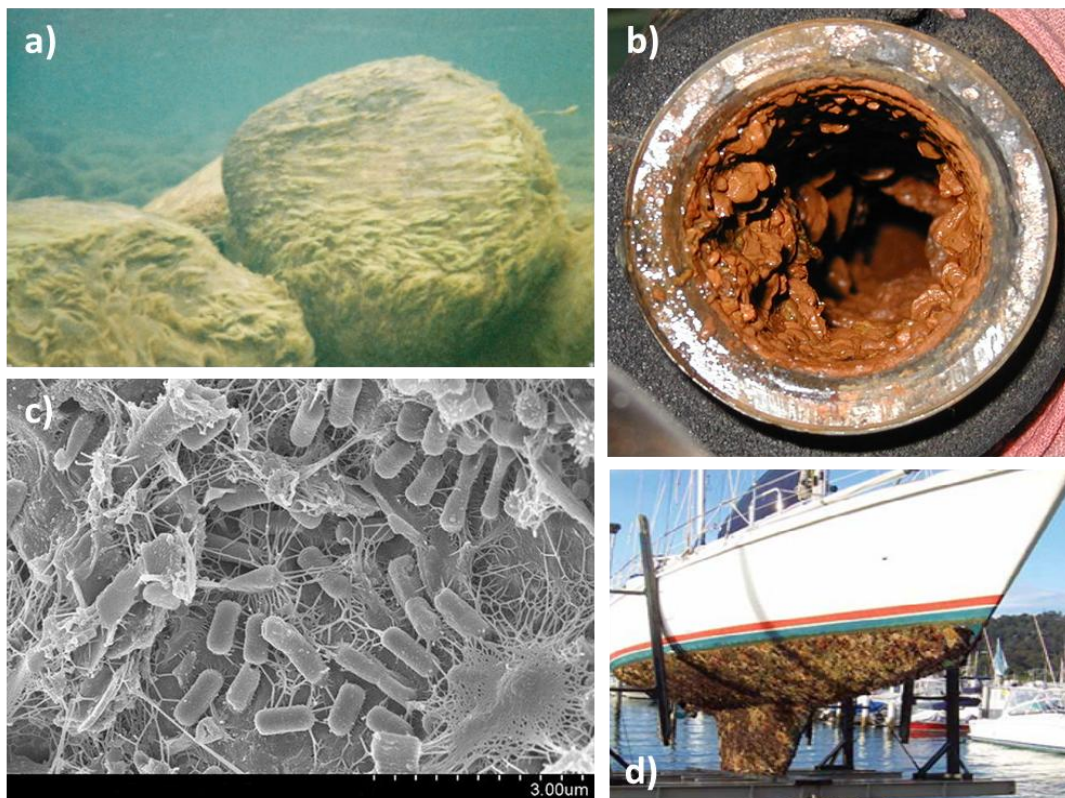
### **I. Le biofilm microbien**

#### **1) Définition et organisation du biofilm**

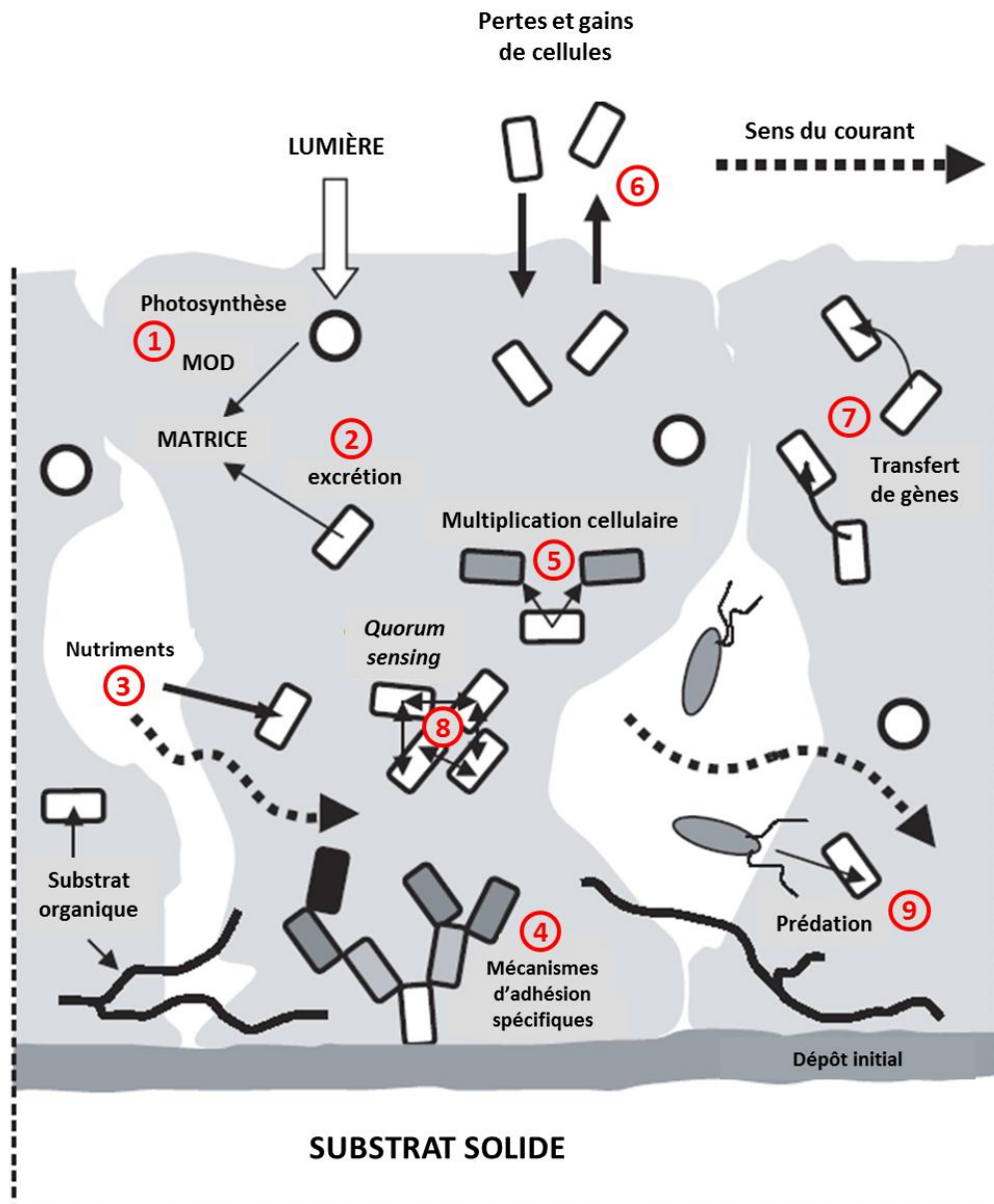
Les microorganismes du biofilm microbien appartiennent au benthos, c'est à dire à la faune vivant en profondeur, que ce soit en milieu marin ou dulcicole et plus particulièrement à la catégorie des organismes épibenthiques fixés au substrat en opposition aux microorganismes planctoniques c'est-à-dire flottant librement dans la colonne d'eau. Le biofilm peut être défini comme un micro écosystème (de l'ordre de quelques micromètres à plusieurs millimètres d'épaisseur), constitué d'une communauté de microorganismes variés (bactéries, algues unicellulaires, protozoaires, virus, mycètes) enrobés dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) autoproduites d'aspect généralement gélatineuse (Figure 14) (Stoodley *et al.*, 2002 ; Kolter et Greenberg, 2006 ; Flemming et Wingender, 2010). Il est présent sur les surfaces immergées (naturelles ou artificielles Figure 14 b et d) et il est appelé épiphyton lorsque le substrat d'adhésion est végétal ou épilython s'il est minéral (Figure 14 a). Le terme « périphyton » est aussi utilisé pour définir de manière générale le biofilm des environnements aquatiques naturels.

La composition du biofilm en microorganismes varie en fonction du substrat sur lequel il se développe et des conditions physico chimiques du milieu. Ainsi, un biofilm immergé à une profondeur telle que la lumière ne peut l'atteindre ne contiendra pas d'organismes phototrophes actifs. Sur la Figure 14, la photosynthèse permise par l'apport de lumière permet le développement d'organismes phototrophes qui vont jouer le rôle de producteurs primaires et apporter leur contribution à la formation de la matrice par l'excrétion de matière organique (① Figure 15) (Sigeo, 2005). La matrice du biofilm est formée de substances polymériques extracellulaires, ou EPS (Figure 14 c), synthétisées et excrétées par les bactéries ainsi que leurs déchets métaboliques (②




Figure 15). Ces molécules sont principalement des polysaccharides (peptidoglycane, cellulose, ...) ainsi que des protéines et acides nucléiques (Flemming et Wingender, 2010). La présence de pores et de canaux dans la structure de la matrice permet d'irriguer l'intérieur du biofilm en substances nutritives (© Figure 15) (Zhang et Bishop, 1994 ; Stewart, 2003). Une variété de composés inorganiques et de minéraux peut être présente selon les biofilms comme des particules d'argile, des oxydes de fer ou de manganèse, *etc.*





**Figure 14.** a) Biofilm riche en algues développé sur des roches immergées (épilithon) ; b) Exemple de biofilm se développant dans une canalisation d'eau douce industrielle et induisant un phénomène de biocorrosion (la couleur brun-rouge témoigne de la présence d'oxydes ferriques) ; c) Vue en microscopie électronique à balayage de l'organisation d'un biofilm bactérien (le réseau d'EPS reliant les cellules entre elles est visible) ; d) Phénomène de « *biofouling* » ou « bio-encrassement » sur la partie immergée de la coque d'un bateau en milieu marin (Sources des images : a) [www.uky.edu](http://www.uky.edu) ; b) [www.phoenixenvirotech.com](http://www.phoenixenvirotech.com) ; c) [www.jpboeret.eu](http://www.jpboeret.eu) ; d) [www.agriculture.gov.au](http://www.agriculture.gov.au)).



**Figure 15.** Interactions entre les différents constituants d'un biofilm. ① Photosynthèse par les organismes phototrophes et formation de MOD : matière organique dissoute ; ② Formation de la matrice du biofilm par excrétion de substances extra-polymériques et des déchets cellulaires par les microorganismes ; ③ Présence de pores et de canaux dans la matrice du biofilm permettant des flux d'eau et de nutriments ; ④ Phénomène d'adhésion de souches bactériennes variées au cours de la colonisation du biofilm ; ⑤ Multiplication cellulaire au sein du biofilm ; ⑥ Phénomène de détachement ou de dispersion de certaines cellules du biofilm ; ⑦ Transfert de gènes (échange d'information génétique) entre les cellules du biofilm ; ⑧ *Quorum sensing* (détection du *quorum*) Ensemble de mécanismes permettant de contrôler l'expression de gènes en fonction de la densité de population bactérienne ; ⑨ Interactions trophiques via la consommation du biofilm par des organismes brouteurs.

-  : bactéries
-  : algues
-  : protozoaires

-  : mycètes
-  : flux d'eau

## 2) Etapes de la formation d'un biofilm en milieu naturel

Brièvement, la formation d'un biofilm peut être décrite en trois étapes clés :

- L'adhésion initiale de microorganismes mobiles (Figure 16 d et e) à une surface présentant ou non une première couche de dépôt organique ou minéral (précipités de carbonate de calcium, de particules exopolymériques transparentes provenant de la phase aqueuse (PET) (Figure 16 a, b et c). Cette première adhésion est réversible et met en jeu des forces relativement faibles de type van der Waals ou électrostatiques entre les cellules bactériennes et la surface.

- L'adhésion devient ensuite permanente (« irréversible ») par la mise en place de structures bactériennes spécifiques comme les *pili* ou la synthèse de ligands protéiques qui fournissent à la bactérie plus de points d'ancrage avec la surface en cours de colonisation. Les premiers organismes solidement fixés peuvent ensuite eux-mêmes servir d'attaches à d'autres espèces incapables de synthétiser les structures d'adhésion seules ce qui crée une première diversité au sein du biofilm naissant (⊕ Figure 15). Parallèlement, la synthèse de ces structures protéiques liant les microorganismes les uns aux autres contribue au développement de la matrice extracellulaire.

- La maturation du biofilm continue avec le développement de la matrice et la division des microorganismes présents (⊙ Figure 15) formant un réseau de colonies tandis que de nouvelles bactéries viennent s'agréger formant les couches superficielles et isolant peu à peu les premiers microorganismes fixés sur la surface du milieu extérieur (Figure 16 f).

Une quatrième étape est communément ajoutée à la description du cycle de vie d'un biofilm, il s'agit de l'étape de détachement ou dispersion (⊗ Figure 15). Pendant cette phase certains microorganismes se détachent activement du biofilm pour retrouver un état planctonique et éventuellement coloniser une autre surface.

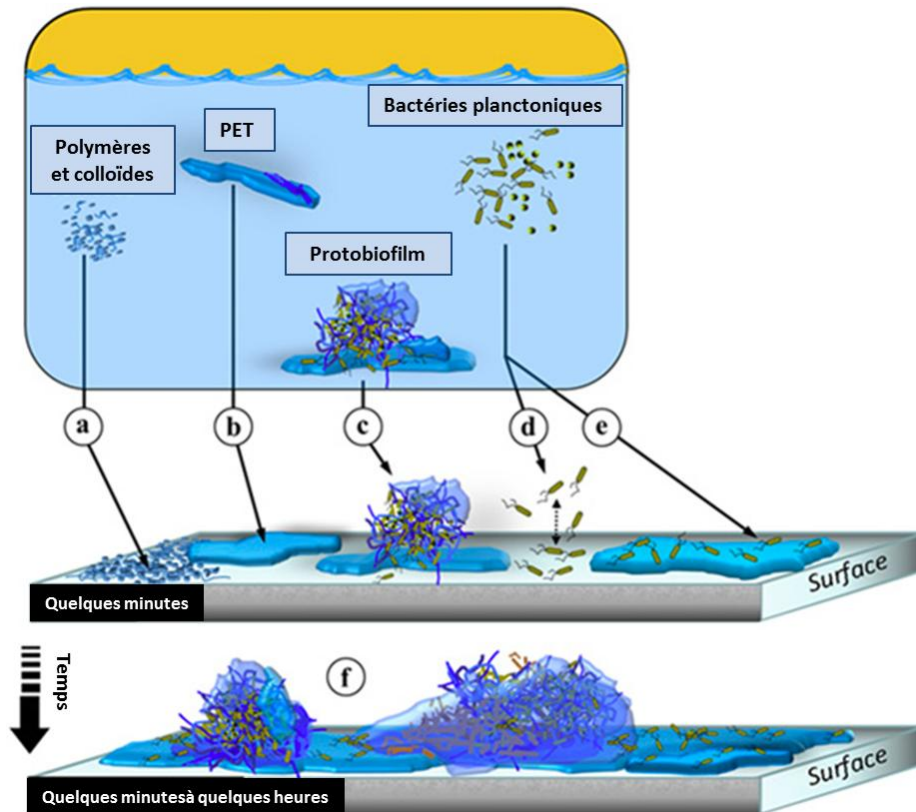


Figure 16. Rôle de la matière organique, des colloïdes et des particules exopolymériques transparentes (PET) dans les premières étapes de la formation d'un biofilm du milieu naturel. Dépôts de (a) substances organiques et colloïdales, (b) de PET ou (c) de protobiofilm c'est-à-dire de substances organiques déjà colonisées par des bactéries avant leur adhésion sur le substrat. Ces étapes conditionnent la surface et sont suivies par l'attachement réversible (d) ou non (e) de cellules planctoniques. Après maturation et adhésion de nouvelles espèces le biofilm devient continu et gagne en épaisseur (f) (d'après Bar-Zeev *et al.*, 2012).

### 3) Interactions des communautés microbiennes au sein du biofilm

A son échelle, le biofilm peut être considéré comme un écosystème à part entière puisqu'il en présente tous les aspects : interactions entre les organismes qui le composent mais aussi avec le milieu extérieur, formation et transfert de biomasse et homéostasie (Stoodley *et al.*, 2002 ; Sigge, 2005 ; Kolter et Greenberg, 2006).

Les interactions entre microorganismes occupent une place prépondérante dans la dynamique et l'évolution de la communauté microbienne et donc du biofilm.

Le transfert de gènes (⑦ Figure 15) qui est un formidable moteur d'évolution et d'adaptation est connu pour avoir majoritairement lieu au sein de biofilms du fait de la grande proximité des microorganismes concernés. Il peut apporter des avantages sélectifs aux organismes qui en

bénéficient comme la capacité à dégrader tel substrat ou à résister aux stress générés par les métaux lourds ou les antibiotiques (Bale *et al.*, 1988 ; Sørensen *et al.*, 2005 ; Baker-Austin *et al.*, 2006).

Au sein d'environnements confinés comme la matrice du biofilm, la densité bactérienne peut très vite atteindre le seuil de détection du *quorum* (*quorum sensing*) qui constitue le principal moyen de communication entre bactéries d'une même espèce ou non (© Figure 15). En effet, certains microorganismes ont la capacité de synchroniser l'expression de gènes leur permettant de coordonner une action et ce en fonction de la densité de population au sein de la communauté qu'ils forment (Fuqua et Greenberg, 2002).

Le biofilm est aussi le lieu d'interactions trophiques de par la présence de protozoaires ou d'amibes qui consomment certains microorganismes du biofilm (© Figure 15) (Parry, 2004). Des organismes supérieurs, dits « brouteurs », comme des larves d'arthropodes (famille des *Leptophlebiidae*, Dominique *et al.*, 2007) quant à eux extérieurs au biofilm, participent à la consommation du biofilm et à faire le lien avec le réseau trophique global de l'environnement aquatique.

En contrepartie d'une relative protection contre le milieu extérieur, la matrice du biofilm va limiter l'accès des microorganismes aux substrats nécessaires à leur croissance et présents principalement en solution dans la phase eau. Dans le cas d'un flux d'eau très faible voire nul au sein du biofilm (matrice imperméable), c'est majoritairement un mécanisme de diffusion qui va entrer en jeu créant ainsi un gradient en fonction de la profondeur du biofilm (De Beer *et al.*, 1996 ; Stewart, 2003). Dans le cas contraire, l'advection sera le mécanisme prépondérant. La répartition des substrats mais aussi de l'oxygène au sein de la matrice du biofilm dépend donc grandement de sa perméabilité. Il en résulte l'apparition de gradients depuis la « surface » jusqu'aux couches les plus profondes du biofilm. Au fur et à mesure de la chute d'O<sub>2</sub> dissous, d'autres accepteurs d'électrons peuvent être mobilisés par les bactéries (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Mn<sup>IV</sup>, Fe<sup>III</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et CO<sub>2</sub>) déterminant ainsi la place occupée par chaque groupe métabolique (Stewart et Franklin, 2008). La matière organique exogène provenant de la diffusion ou issue de l'activité photosynthétique peut subir des fermentations et donner des substrats de petite taille (acides gras, hydrogène) servant de donneurs d'électrons pour la respiration anaérobie. De ce phénomène résulte le couplage de certains métabolismes qui indépendamment ne pourraient pas se développer. Une expérience menée par Pak et Bartha en 1998b illustre parfaitement cette idée. Les auteurs cultivent en coculture une souche de bactérie sulfatoréductrice (*Desulfovibrio desulfuricans* LS) et une souche d'archée méthanogène (*Methanococcus maripaludis* ATCC 43000) dans un milieu contenant un donneur d'électrons (lactate) uniquement utilisable par la souche SRB et un accepteur d'électron (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) uniquement



utilisable par la MPA. La souche méthanogène fait alors office d'accepteur final d'électrons pour la SRB en consommant les équivalents 2H produits ce qui autorise la croissance. Dans cette expérience, la croissance des bactéries est mise en relation avec la capacité à méthyler le mercure par la souche SRB. Dans ces conditions, l'interaction des deux métabolismes permet la méthylation du mercure par les SRB dans un environnement qui n'y est, a priori, pas favorable.

#### 4) La matrice d'EPS, une barrière diffusive

La matrice qui enrobe les cellules bactériennes peut représenter jusqu'à 90 % de la matière sèche totale du biofilm. Elle est responsable de la structure tridimensionnelle ainsi que de l'adhésion et la cohésion du biofilm. Elle est constituée de substances polymériques extracellulaires de nature variée selon le biofilm étudié est reste relativement complexe à analyser. Les EPS peuvent comprendre des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques ainsi que des molécules amphiphiles et parfois des substances humiques. Ils peuvent contribuer selon leur nature à différentes fonctions au sein de la matrice comme l'adhésion à une surface, l'agrégation des cellules entre elles, la cohésion du biofilm, la rétention de l'eau, la sorption de composés organiques ou minéraux, l'apport de nutriments, l'échange d'informations génétiques, ou le transfert des électrons (Flemming et Wingender, 2010).

La méthylation du mercure par les cellules d'un biofilm implique que le substrat,  $Hg^{II}$  inorganique, puisse atteindre librement les microorganismes, eux même étant dans l'incapacité de se déplacer jusqu'à lui. Parmi les propriétés des EPS, il semble que leur rôle dans la diffusion d'espèces métalliques soit ici un facteur primordial. En effet, la matrice possède un faible pouvoir de pénétration et la diffusion s'en trouve donc rapidement limitée du fait de la réduction du flux et de la grande distance à traverser, si l'on compare à la diffusion au niveau d'une membrane cellulaire (Stewart *et al.*, 2003). Ainsi, les couches situées en profondeur sont généralement moins exposées aux antibiotiques que les couches superficielles (Harrison *et al.*, 2004). D'après Lewis *et al.* (2001) cela vient du fait que les polymères chargés négativement ont tendance à se fixer aux antibiotiques chargés positivement. Les métaux lourds semblent être eux aussi sensibles à ce phénomène. Les travaux de Kaplan *et al.* (1987) qui portaient sur le  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  montrent une sorption plus efficace en fonction de la richesse du polysaccharide testé en charges négatives, principalement apportées par l'acide uronique et le sulfate mais aussi par l'acétate et le pyruvate (Kim *et al.*, 1996). Ces résultats sont confortés par d'autres travaux montrant une



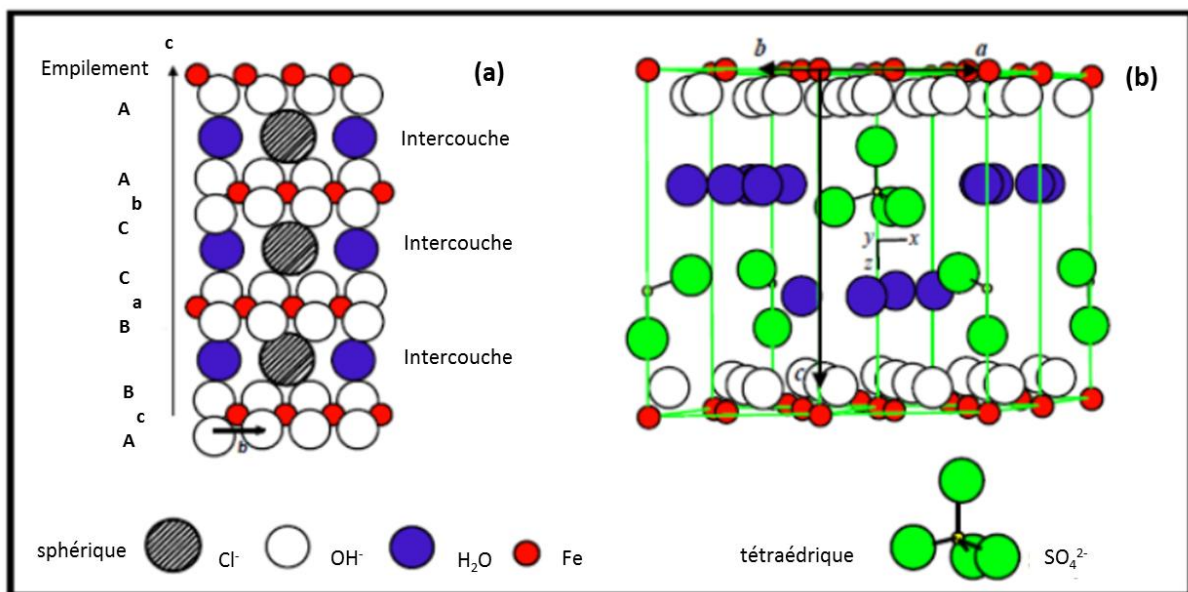
séquestration dans le biofilm de  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  plus efficace à des valeurs de pH proches de la neutralité qu'en condition acide. A de faibles valeurs de pH, les sites chargés négativement comme les groupes carboxylates et phosphates sont moins nombreux et les métaux sont donc moins fixés (Ferris *et al.*, 1989). La pénétration des cations métalliques dans le biofilm est donc limitée par la présence de polymères portant des charges négatives. Il en va de même pour le mercure comme le montrent les résultats de Hintelmann *et al.* (1993) sur l'adsorption de  $Hg^{2+}$  et  $CH_3Hg^+$  sur des biofilms artificiels. Ceci peut éventuellement apporter un avantage aux cellules situées en « profondeur » dans le biofilm puisqu'elles sont exposées à des concentrations inférieures en métaux lourds et antibiotiques (Teitzel et Parsek, 2003).

La matrice du biofilm, en fonction de sa composition et notamment de la présence de polysaccharides chargés négativement, pourrait donc fonctionner comme un puit à mercure inorganique qui, une fois complexé, serait moins disponible pour la méthylation.

## II. Le biofilm : siège potentiel de la formation de minéraux $\text{Fe}^{\text{II}}$ réactifs (rouille verte) vis-à-vis du mercure

Au sein du biofilm, l'activité métabolique bactérienne couplée aux conditions particulières de ce milieu (détaillées ci-dessus) peut conduire à la formation de minéraux. En présence d'oxydes ferriques et de donneurs organiques d'électrons, les bactéries ferriréductrices (IRB) couplent la réduction du  $\text{Fe}^{\text{III}}$  à l'oxydation de la matière organique. Cette bioréduction conduit à la formation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  qui peut précipiter en divers minéraux ferreux.

Certains de ces minéraux sont exclusivement ferreux comme la vivianite, la sidérite ou la chukanovite, d'autres sont constitués de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  comme la rouille verte et la magnétite et sont dits « à valence mixte  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$  ».



## 1) Les rouilles vertes

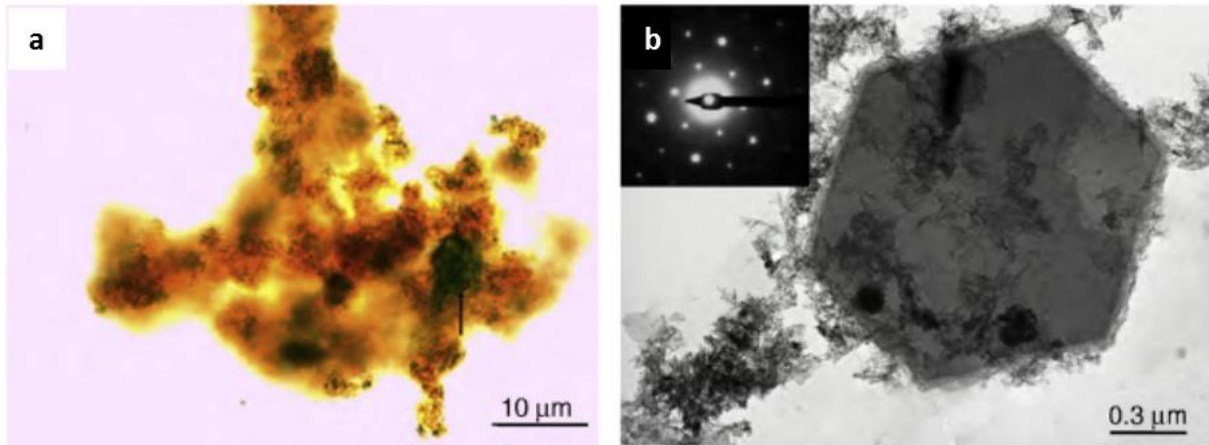
Les rouilles vertes sont des hydroxydes double lamellaires (HDL) mixtes Fe<sup>II</sup>-Fe<sup>III</sup> de formule générale  $\{\text{Fe}^{\text{II}}_{(1-x)}\text{Fe}^{\text{III}}_x(\text{OH})_2\}^{x+} \cdot \{(x/n)\text{A}^{n-}(\text{p}/n)\text{H}_2\text{O}\}^{x-}$  (Taylor, 1973). La première découverte hors laboratoire est attribuée à Stampfl en 1969, comme produit de corrosion d'un réseau de distribution d'eau potable puis, plus tard, comme produit de corrosion de l'acier par des bactéries sulfatoréductrices en milieu marin (Olowe *et al.*, 1992 ; Refait *et al.*, 2003). En milieu naturel, son équivalent est la fougérite nommée d'après le lieu de sa découverte, la forêt de Fougères en Bretagne (Trolard *et al.* 1996). Les conditions naturelles de formation ne sont pas encore clairement établies même si les mesures effectuées sur le terrain indiquent un pH compris entre 5,2 et 6,3, un potentiel redox de -250 mV et la présence de bactéries ferriréductrices (Berthelin *et al.*, 2006). Sa structure s'organise en feuillets portant les ions hydroxyles et les atomes de Fe<sup>II</sup> et de Fe<sup>III</sup>, la neutralité étant apportée par les anions insérés dans les interfeuillets à proximité de molécules d'eau. Selon la géométrie de ces anions, sphérique, plane ou tétraédrique, on aboutit à respectivement des rouilles vertes dites de type 1 ou de type 2 (Figure 17). Le groupe des fougérites correspondrait à la rouille verte 1 carbonatée, la rouille verte 2 sulfatée serait majoritaire en milieu marin (Génin *et al.*, 1998 ; Mills *et al.*, 2012).

Une oxydation lente de RV1 et RV2 conduit à la formation de magnétite (Misawa *et al.*, 1974) ce qui leur vaut d'être qualifiées de « métastables » c'est-à-dire qu'une très faible énergie d'activation peut faire basculer le système vers un état thermodynamiquement plus stable, tel que celui de la magnétite. Les rouilles vertes sont aussi très réactives vis-à-vis de l'oxygène moléculaire et s'oxydent en différents oxyhydroxydes ferriques. Ainsi, la rouille verte peut être considérée comme une phase transitoire de la formation d'autres oxydes de fer comme la magnétite, la lépidocrocite ou la goéthite (Jorand *et al.*, 2013 ; Etique *et al.*, 2014a).

## 2) Stabilité et réactivité des RVs

Si la biominéralisation de la rouille verte est largement décrite dans la littérature, les paramètres qui entrent en jeu dans sa stabilité sont actuellement toujours sujet à débat. Différents facteurs ont été étudiés pour comprendre leur rôle dans cette problématique. La vitesse de réaction a notamment été suggérée comme un facteur influençant la nature du minéral formé (Ona-Nguema *et al.*, 2004). Cependant d'autres travaux ont infirmé ces hypothèses, ainsi, Zegeye *et al.* (2007) ont montré que la formation de rouille verte ou de magnétite était considérablement influencée par la densité bactérienne. En effet, les corps bactériens et les EPS influencent favorablement la formation de la rouille verte et non de la magnétite. L'effet d'oxyanions comme l'arséniate, le phosphate, le silicate ou le tungstate ainsi que du quartz et de certains polymères organiques sur la biominéralisation et la stabilisation des cristaux de rouille verte ont été rapportés (O'Loughlin *et al.*, 2010 ; Zegeye *et al.*, 2010 ; Sergent *et al.*, 2011 ; Jorand *et al.*, 2013). Parmi les hypothèses retenues, la fixation de ces molécules sur les particules de lépidocrocite permettrait de bloquer l'accès des sites ferriques aux bactéries. La réaction s'en trouverait freinée ce qui favoriserait la formation de rouille verte.

Les conditions permettant la biominéralisation et la stabilisation de la rouille verte (densité bactérienne élevée, présence de microorganismes ferriréducteurs, disponibilité en Fe<sup>III</sup> et donneurs d'électrons, conditions anoxiques, présence de polymères, d'anions ou de quartz) peuvent être réunies au sein d'un biofilm environnemental comme le montrent les travaux de Jorand *et al.*, (2011). Dans cette étude, les auteurs ont collecté du biofilm se développant sur des éléments immergés dans l'estuaire de la rivière Sinnamary (Guyane Française). Les analyses faites sur ce biofilm ont montré la présence d'oxydes ferriques (lépidocrocite et ferrhydrite) ainsi qu'une forte densité cellulaire ( $10^{11}$  cellules g<sup>-1</sup> de matière sèche) dont des organismes ferriréducteurs. Ce biofilm, amendé en donneurs d'électrons, a été incubé en anoxie et la bioréduction des espèces ferriques a abouti à la formation de rouille verte comme seul minéral secondaire (Figure 18). De plus, cette rouille verte s'est montrée stable dans le temps (plusieurs années) tant que les conditions réductrices étaient maintenues. Ces résultats suggèrent que le biofilm peut réunir les conditions nécessaires à la formation de ce type de minéral, sans doute par la présence d'EPS stabilisant les cristaux formés.



**Figure 18.** a) Image en microscopie optique et b) en microscopie à transmission après incubation (180 j) de lépidocrocite ( $\gamma$ -FeOOH) synthétique avec un échantillon de biofilm environnemental. La présence de rouille verte suspectée par le cristal de couleur verte au sein d'un agrégat d'oxydes ferriques en microscopie optique a) est confirmée en microscopie électronique b) par l'observation d'un cristal hexagonal dont le motif de diffraction des électrons (encadré) correspond à celui de la rouille verte carbonatée (Jorand *et al.*, 2011).

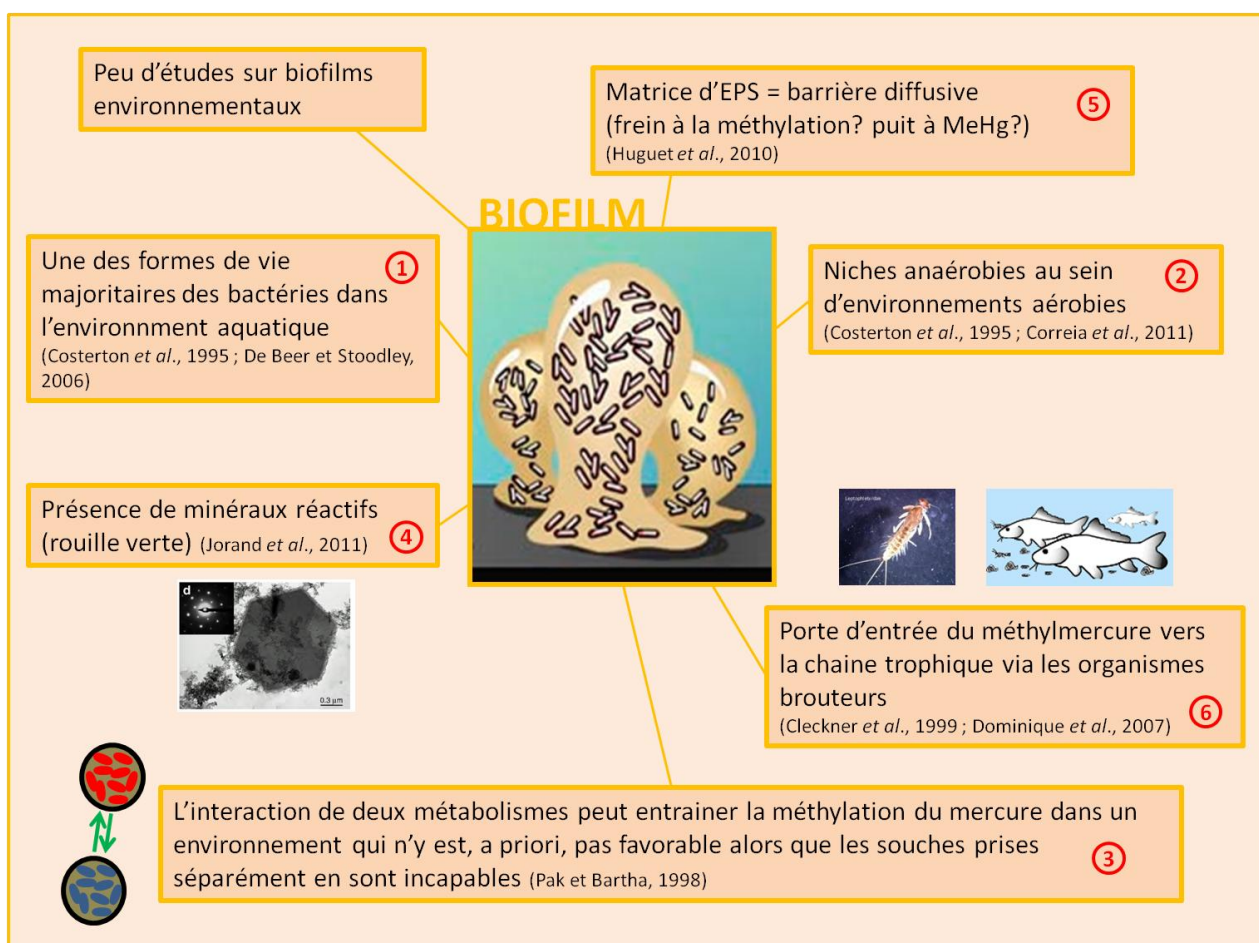
Du fait de leur caractère relativement instable, les rouilles vertes sont connues pour présenter une réactivité intéressante vis-à-vis de polluants aussi bien organiques qu'inorganiques. La réactivité des rouilles vertes s'appuie sur deux propriétés liées à leur structure : d'une part, par sorption des polluants dans les interfeuillettes permettant des échanges d'anions et de molécules polaires, et d'autre part, par réduction des polluants grâce au  $\text{Fe}^{\text{II}}$  structural très réactif.

Le caractère très réactif de ces hydroxydes de fer n'est plus à démontrer. En effet, les travaux de Hansen *et al.* (1996) ont montré que la rouille verte sulfatée est capable de réduire les nitrates ou nitrites en ammonium. Il semble qu'en conditions anoxiques, ce soit une voie majeure de la réduction des nitrates permettant la conservation de l'azote dans le milieu, c'est-à-dire en évitant la dénitrification par formation de  $\text{N}_2$  gazeux. Loyaux-Lawniczak *et al.*, (2000) se sont intéressés au chrome, un polluant très spécifique des friches industrielles et d'effluents provenant d'industries lourdes comme la métallurgie et la galvanoplastie. Les rouilles vertes sulfatée et chlorurée ont été utilisées afin de réduire du  $\text{Cr}^{\text{VI}}$ , un puissant agent cancérigène facilement soluble et donc très mobile dans l'environnement, en  $\text{Cr}^{\text{III}}$  une forme insoluble beaucoup moins toxique (Williams and Scherer, 2001). D'autres recherches portant sur le sélénium (Myneni *et al.*, 1997) ou plus récemment sur l'uranium (O'Loughlin *et al.*, 2003b) montrent leur réduction par les rouilles vertes. En parallèle, certains polluants organiques ont eux aussi été testés tels que le tétrachlorométhane  $\text{CCl}_4$ , un solvant incolore, très volatil, dont les vapeurs sont toxiques et qui affecte la couche d'ozone ou le trichloroéthylène (Lee and Batchelor, 2002). La réaction, qui entraîne la

déchloration de ces composés, a pour effet d'oxyder intégralement la rouille verte en magnétite (Erbs *et al.*, 1999). Enfin, une étude portant sur la réactivité de la rouille verte sulfatée obtenue par synthèse chimique montre sa capacité à réduire le mercure cationique  $\text{Hg}^{\text{II}}$  en mercure élémentaire  $\text{Hg}^0$  (O'Loughlin *et al.*, 2003a). La rouille verte peut donc indirectement impacter la méthylation du mercure en réduisant la quantité de  $\text{Hg}^{\text{II}}$  disponible dans un environnement donné.

Si ces travaux ont déjà montré que la rouille verte (carbonatée ou sulfatée) issue d'une synthèse chimique pouvait être efficace pour réduire de nombreux composés, aucune donnée ne concerne la réactivité de la rouille verte biogénérée (par exemple au sein de biofilms) vis-à-vis du mercure. En effet, celle-ci est attendue pour être plus stable du fait de la présence de corps et de polymères bactériens et ainsi moins réactive, comme c'est le cas envers les nitrates (Zegeye *et al.*, 2014). Il est donc intéressant de comparer la réactivité de la rouille verte biotique et abiotique afin de mieux comprendre si la voie de synthèse (biologique ou chimique) ainsi que la nature des agents stabilisants (polymères, phosphates, silicates) impactent la réactivité de ce minéral vis-à-vis du mercure.

### III. Le biofilm et la méthylation du mercure



**Figure 19.** Récapitulatif des éléments montrant l'intérêt d'étudier la méthylation du mercure par le biofilm microbien.

De par les propriétés décrites plus haut, le biofilm est un mode de vie bactérien propice à la colonisation de la majorité des écosystèmes aquatiques, il est d'ailleurs largement admis qu'il représente une des formes de vie majoritaire des microorganismes en milieu aquatique (① Figure 19). Sa structure favorise l'apparition de niches anoxiques pouvant abriter des organismes méthylants (② Figure 19) ainsi que l'interaction de différents métabolismes, pouvant entraîner des phénomènes de synergie (③ Figure 19). De plus, le biofilm présente des conditions potentiellement favorables à la formation de minéraux réactifs comme la rouille verte (④ Figure 19). D'après les recherches menées sur l'adsorption des métaux lourds par les EPS, la matrice du biofilm pourrait limiter l'interaction entre les bactéries et le mercure inorganique (⑤ Figure 19). Enfin, il est particulièrement pertinent de s'intéresser au rôle du biofilm dans la formation du méthylmercure

étant donné qu'il est décrit comme une des principales voies d'entrée de ce dernier au sein de la chaîne trophique via les organismes brouteurs (© Figure 19) (Dominique *et al.*, 2007).

De ces différents constats découle l'intérêt de mieux comprendre l'impact de la forme de vie biofilm sur la méthylation du mercure.

De récentes études se sont ainsi focalisées sur la méthylation au sein de biofilm et les résultats, parfois contradictoires, rendent compte des obstacles inhérents à l'étude de systèmes aussi hétérogènes et variés (selon le site de prélèvement, la méthode de prélèvement, la méthode d'analyse, *etc*).

Pour certains auteurs, la méthylation nette des cellules planctoniques semble supérieure à celle engendrée par les cellules du biofilm (Huguet *et al.*, 2010). Les auteurs de cette étude suggèrent un rôle du biofilm minime dans la méthylation, le décrivant plutôt comme un « piège » où serait concentré le MeHg produit dans la colonne d'eau par les cellules planctoniques. D'autres travaux réalisés sur des souches pures ont montré des résultats contradictoires. L'équipe de Lin et Jay a étudié à deux reprises l'impact de la forme de vie biofilm sur la méthylation du mercure par la bactérie sulfatoréductrice *Desulfovibrio desulfuricans*. En 2007, leurs travaux ont montré une vitesse de méthylation environ dix fois plus élevée pour les cellules cultivées en biofilm que celles cultivées en suspension suggérant un rôle important du biofilm sur la méthylation du mercure dans l'environnement (Lin et Jay, 2007). Ce résultat peut être nuancé par le fait que les auteurs n'observent qu'une méthylation pendant les premières 24 h de l'incubation puis la concentration en MeHg chute indiquant une déméthylation entre 1 et 2 jours. Comme pour la méthylation, la déméthylation est environ dix fois plus forte en condition biofilm ce qui entraîne une concentration en MeHg finale identique dans les deux conditions. Une plus récente étude (Lin *et al.*, 2013) montre une forte mobilisation de la voie de synthèse de l'acétyl-CoA chez les bactéries cultivées en biofilm par rapport aux bactéries planctoniques (4 fois plus d'expression du gène de la CO deshydrogénase). S'appuyant sur le fait que les cellules de biofilm sont en général plus résistantes aux stress générés par les métaux, les auteurs suggèrent même que la méthylation pourrait être héritée d'un mécanisme de résistance afin de détoxifier le milieu.

D'autres études montrent à quel point il est indispensable d'étudier le système « biofilm » dans son ensemble en montrant par exemple que les algues et champignons présents dans du périphyton peuvent être impliqués en permettant, par les substances qu'ils produisent, l'activité des bactéries auxquelles ils sont associés (Correia *et al.*, 2012) voire en méthygrant directement le



mercure (Hamelin *et al.*, 2011). Afin de cibler les activités métaboliques en lien avec la méthylation, des inhibiteurs spécifiques sont couramment utilisés au cours des expérimentations comme le molybdate de sodium, le bromoéthane sulfonate (BES), le 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée (DCMU) et le cyclohexamide qui ciblent respectivement l'activité sulfatoréductrice, l'activité méthanogène, l'activité photosynthétique et la synthèse protéique chez les champignons (Compeau et Bartha, 1985 ; Desrosiers *et al.*, 2006 ; Hamelin *et al.*, 2011 ; Avramescu *et al.*, 2011 ; Correia *et al.*, 2012).

Il est important de tenir compte, dans ce genre d'approche, qu'au sein des consortiums bactériens visés on trouvera toujours des souches résistantes responsables de faux positifs. Par exemple, certaines souches de bactéries sulfatoréductrices sont insensibles au chloramphénicol, un bactériostatique à large spectre qui inhibe la synthèse protéique (Tee *et al.*, 1996). D'autre part, la faible accessibilité des bactéricides pour les bactéries situées au cœur du biofilm peut expliquer les variations entre différents essais (Correia *et al.*, 2012) et notamment entre des biofilms intacts et des biofilms déstructurés. Enfin, un composé inhibiteur d'un métabolisme peut interférer avec d'autres microorganismes. Par exemple, l'arrêt de l'activité SRB par le  $\text{MoO}_4^{2-}$  peut entraîner une accumulation d'acides gras, d' $\text{H}_2$ , d'acétate, de propionate ou de butyrate et certaines de ces substances peuvent être utilisées par d'autres bactéries (Sorensen, 1981). Le BESA (acide 2-bromoéthanesulfonique) quant à lui peut, en plus de son rôle d'inhibiteur des MPA, servir d'accepteur d'électron pour les SRB via le groupe sulfonate (Lie *et al.*, 1996 ; Lie *et al.*, 1998 ; Ye *et al.*, 1999). Les interprétations qui résultent de l'utilisation de ces composés doivent donc en tenir compte et nécessitent d'être couplées à d'autres approches.

Il est indispensable de souligner la grande hétérogénéité des études sur la méthylation du mercure par les biofilms. Par exemple, parmi les auteurs qui ont comparé les potentiels de méthylation de biofilms et de cellules planctoniques, certains ont travaillé sur des souches pures cultivées en laboratoire comme *Desulfovibrio desulfuricans* (Lin et Jay, 2007 ; Lin *et al.*, 2013) alors que d'autres ont comparé des cellules planctoniques et de biofilms issus d'environnements aquatiques naturels (Huguet *et al.*, 2010). Chez les auteurs ayant collecté des échantillons de biofilms environnementaux, les méthodes de prélèvements varient également. Certains récupèrent et incubent le biofilm avec son support naturel (plantes immergées, Hamelin *et al.*, 2011) ou artificiel (supports PTFE, Desrosiers *et al.*, 2006), alors que d'autres extraient le biofilm du support (Korthals et Winfrey, 1987 ; Mauro *et al.*, 2002 ; Huguet *et al.*, 2010). Dans une étude de 2013, Lin *et al.* soulevaient la question de l'effet de la déstructuration du biofilm. Est-ce que le fait de

disperser le biofilm lors du prélèvement et de réaliser les expériences de méthylation avec la suspension obtenue n'induirait pas un biais ? Pour Hamelin *et al.* (2011) il est indispensable de conserver intacte la structure du biofilm car l'épaisse matrice d'EPS engendre un gradient de potentiel redox et ainsi favorise la présence de niches propices au développement de bactéries méthylantes. La formation de microenvironnements anaérobies au sein de biofilm pourrait expliquer la méthylation du mercure observée dans des zones aérobies de la colonne d'eau (Costerton *et al.*, 1995 ; Correia *et al.*, 2012).

Les objectifs de cette thèse (Figure 20) visent à répondre à ces questions et plus particulièrement :

- i) Quel compartiment microbien (eau brute, biofilm et sédiment de surface) au sein des environnements aquatiques testés, présente une activité méthylante ?
- ii) La capacité de méthylation du biofilm est-elle spécifique de ses propriétés (structure complexe formé d'EPS favorisant une grande proximité entre les microorganismes) ?
- iii) L'activité méthylante est-elle corrélée à la présence du gène *hgcA* ?
- iv) Quels métabolismes bactériens parmi ceux identifiés au sein du biofilm sont impliqués dans la méthylation ?
- v) Et enfin, quel est l'impact de la présence de minéraux réactifs qui pourraient concurrencer la méthylation en réduisant le  $\text{Hg}^{\text{II}}$  en  $\text{Hg}^0$  ?

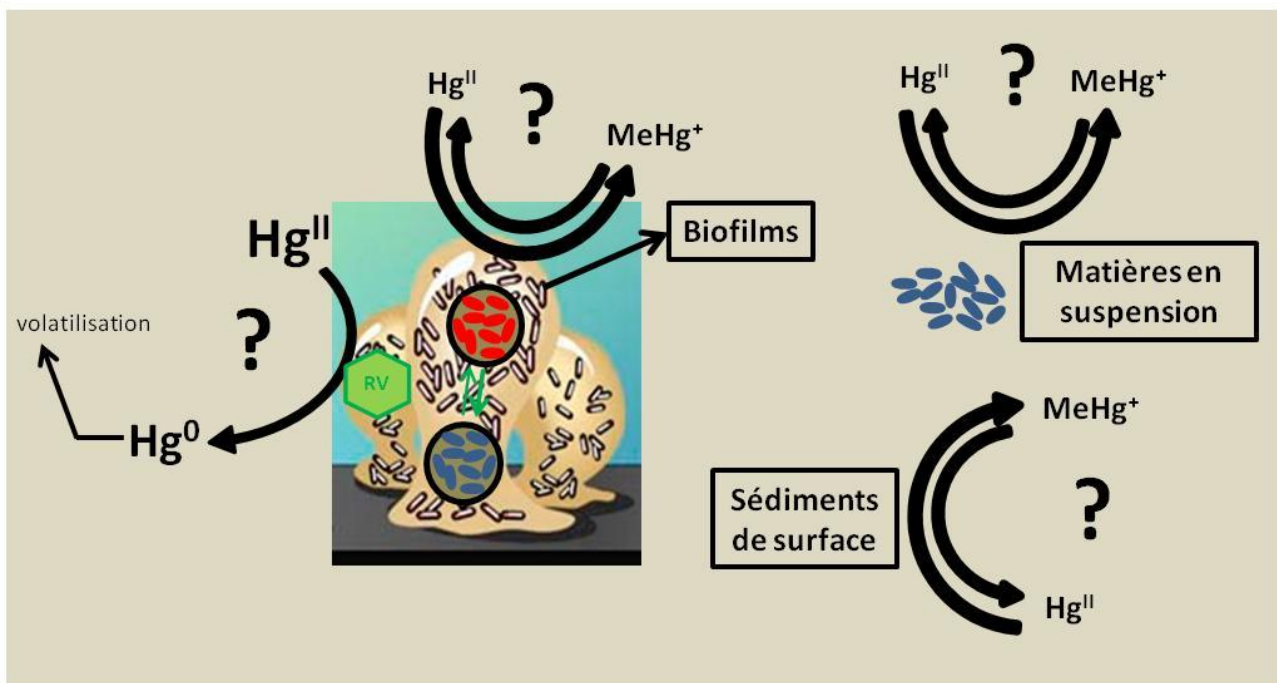


Figure 20. Synthèse des objectifs de cette étude. RV : rouille verte, les cellules rouges et bleues représentent deux métabolismes bactériens distincts et les flèches vertes, les interactions entre eux.



---

**CHAPITRE 2 : Potentiels de méthylation de différents compartiments microbiens (eau brute, biofilm, sédiment de surface) au sein de mares dulcicoles tempérées et de mares thermokarstiques subarctiques et spécificité de la méthylation du mercure par le biofilm.**



## I. Introduction

Dans la littérature, le biofilm est décrit comme une des voies d'entrée majeure du méthylmercure vers la chaîne trophique et ce par le biais des organismes détritiques et brouteurs qui le consomment (Dominique *et al.*, 2007 ; Molina *et al.*, 2010). Cependant, à ce jour, le rôle du biofilm dans la méthylation du mercure n'est pas clairement établi. Ses propriétés pourraient favoriser le développement de microorganismes méthylants et/ou impacter leur activité méthylante. En effet, la présence de niches anoxiques au sein du biofilm (Costerton *et al.*, 1995 ; Correia *et al.*, 2012), propices au développement de microorganismes anaérobies, pourrait causer une méthylation du mercure même en milieu aérobie. De même, la « collaboration » de groupes métaboliques peut engendrer une activité méthylante dans des environnements qui, a priori, n'y sont pas favorables (Pak et Bartha, 1998b). Or, la proximité physique entre les différentes souches composant le biofilm favorise les relations trophiques et pourrait donc conduire à une activité méthylante qui, dans le cas de cellules isolées, serait négligeable voire impossible. En revanche, la matrice d'EPS qui constitue la structure du biofilm pourrait agir comme une barrière diffusive, freinant ainsi la diffusion du mercure inorganique jusqu'aux microorganismes méthylants. De plus, du fait du caractère hydrophobe des EPS (Jorand *et al.*, 1998), le MeHg formé dans la colonne d'eau ou dans le sédiment aurait tendance à s'y accumuler transformant le biofilm en puits de MeHg plutôt qu'en compartiment actif de la méthylation (Huguet *et al.*, 2010). D'autres travaux, au contraire, montrent une méthylation du mercure dix fois plus importante par les biofilms que par les cellules planctoniques, par exemple, pour la souche *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 (Lin et Jay, 2007). Ces résultats contradictoires soulèvent par ailleurs la question de la représentativité d'un biofilm de l'environnement naturel. Dans le cas où les biofilms sont prélevés dans l'environnement, celle-ci peut être affectée par la procédure d'échantillonnage et d'analyse qui varie entre les études (Korthals et Winfrey, 1987 ; Mauro *et al.*, 2002 ; Desrosiers *et al.*, 2006 ; Huguet *et al.*, 2010 ; Hamelin *et al.*, 2011). Par ailleurs, un biofilm mono-espèce cultivé en milieu riche sur supports artificiels (Lin et Jay, 2007 ; Lin *et al.*, 2013) peut-il être représentatif des biofilms multi-espèces environnementaux dont les propriétés dépendent des caractéristiques biogéochimiques du milieu (et donc de leur origine géographique) ?

Les travaux présentés dans ce chapitre visent tout d'abord à évaluer la vitesse de méthylation de différents compartiments microbiens issus d'écosystèmes aquatiques : le biofilm microbien, l'eau brute (contenant des cellules planctoniques ou agrégées aux MES) ainsi que le sédiment de surface, bien connu pour présenter une activité méthylante. Afin de conserver intacte la structure

des biofilms au cours de l'échantillonnage, ceux-ci ont été récoltés après avoir colonisé des supports artificiels préalablement placés sur les sept sites d'étude situés en Lorraine ou en région subarctique canadienne.

L'étude des sites subarctique canadiens s'inscrit dans un projet plus large (ANR CESA « Arctic Metals ») concernant le devenir (apports et transformations) de certains métaux traces comme le mercure, le sélénium et le cadmium en milieu arctique et subarctique. Les métaux lourds présents dans le grand Nord peuvent être d'origine naturelle ou anthropique, notamment par le biais de l'exploitation minière ou d'activités industrielles locales (raffineries, centrales énergétiques). De plus, les milieux arctiques et subarctiques sont particulièrement impactés par des dépôts de contaminants du fait de mécanismes atmosphériques entraînant des pollutions dans des zones éloignées des lieux d'émission (Evans *et al.*, 2000 ; Ariya *et al.*, 2002). Ainsi, les flux de dépôt atmosphérique de mercure dans le système hydrique de la Baie d'Hudson sont passés de 0,1 t an<sup>-1</sup> avant l'ère industrielle à 1,5 t an<sup>-1</sup> après cette période (Hare *et al.*, 2008). Cette augmentation des flux de dépôts atmosphériques, accompagnée d'une plus forte mobilisation des métaux du sol en lien avec le changement climatique actuel, se traduit par une augmentation des flux au sein des réseaux hydrographiques. Une période de dégel accrue du sol a aussi pour conséquence de favoriser la formation de mares thermokarstiques (Bowden *et al.*, 2008). Ces formations résultent de l'affaissement du sol dû à l'alternance de gel et de dégel que connaît le permafrost (Calmels et Allard, 2004 ; Breton *et al.*, 2009) et peuvent être responsables d'apports soudains de matière organique (mais aussi d'ammonium, nitrate, phosphate) jusque-là emprisonnée et propice au développement de microorganismes. Dans ce contexte, une activité microbienne plus soutenue une partie de l'année et la présence de matière organique disponible pourrait potentiellement impacter le devenir du mercure notamment par le biais de la méthylation et contaminer la chaîne trophique jusqu'aux populations humaines locales.

Pour cette étude, cinq mares thermokarstiques présentant des caractéristiques biogéochimiques différentes ont été échantillonnées autour de la station de recherche du Centre d'Etude Nordique (CEN) (un centre d'excellence interuniversitaire entre l'Université Laval, l'Université du Québec à Rimouski et le Centre Eau, Terre et Environnement de l'Institut National de la Recherche Scientifique) situé sur le village de Whapmagoostui-Kuujuarapik (Territoire Nunavik, Province de Québec, CANADA).

En parallèle, deux sites d'étude en région tempérée (Lorraine, FRANCE) ont été échantillonnés, l'un situé sur la commune de Veney (Meurthe et Moselle) fait l'objet d'une contamination au mercure avec des concentrations pouvant atteindre jusqu'à 18 µg L<sup>-1</sup> (données



ARS 54), l'autre, situé sur la commune de Domèvre-sur-Durbion (Vosges), ne présente pas de contamination particulière.

Après une étape de caractérisation, les vitesses de méthylation d'échantillons des sept sites ont été évaluées pour les trois compartiments bactériens : eau brute, biofilm et sédiment de surface. Pour cela, des incubations ont été menées en ajoutant aux échantillons une solution monoisotopique de mercure inorganique. Le potentiel de méthylation, correspondant au pourcentage de l'ajout monoisotopique méthylé, a été suivi au cours du temps ce qui a permis de calculer les vitesses de méthylation. Un site présentant des vitesses de méthylation mesurables a été retenu afin de déterminer si l'organisation des cellules bactériennes en biofilm influence la vitesse de méthylation par rapport aux communautés bactériennes en suspension dans l'eau brute ou du sédiment de surface. Pour cela, les vitesses de méthylation de biofilms décrochés de leurs supports (déstructurés) ont été comparées à ceux de biofilms « intacts » (non décroché des supports). De même, une expérience a été menée sur la souche méthylante *Desulfobulbus propionicus* 1pr3 cultivée sous forme de biofilm ou sous forme planctonique en présence ou absence d'EPS afin de comparer les vitesses de méthylation obtenues et déterminer l'impact des bactéries associées en biofilm sur l'activité méthylante. L'effet de la température d'incubation sur la vitesse de méthylation a aussi été testé.

Afin de pouvoir comparer l'activité méthylante d'échantillons de nature différente, les potentiels et vitesses de méthylation ont été normalisés par la densité cellulaire ou par la masse de matière sèche incubée.

## II. Matériels et Méthodes

### 1) Sites d'étude : localisations et caractéristiques

Les échantillons ont été collectés dans sept mares d'eau douce dont les localisations géographiques sont indiquées dans le Tableau 2.

L'aspect ainsi que la localisation géographique des sites de prélèvements lorrains et subarctiques, sont respectivement indiquées dans les Figures 21 à 23.

Le site d'étude lorrain CAB (Figure 21) est une mare artificielle privée située sur la commune de Domèvre-sur-Durbion (Vosges, France). La source alimentant la mare étant en cours d'assèchement, celle-ci est constituée d'eau stagnante ce qui entraîne une stratification de la colonne d'eau et donc une zone anoxique propice au développement de bactéries anaérobies.

Le deuxième site lorrain (ANT) (Figure 22) se situe sur la commune de Veney (Meurthe-et-Moselle, France) et présentait des teneurs inhabituelles en mercure. Il s'agit d'un étang de pêche privé alimenté par une source d'origine identique à celle utilisée pour l'approvisionnement en eau potable de la commune. Depuis la moitié des années 2000, des contrôles de la qualité des eaux souterraines pratiqués à Veney, ainsi que sur la commune voisine de Vacqueville, mettent en évidence l'existence d'une contamination au mercure. Les concentrations en mercure total déterminées dans les échantillons d'eau brute dépassent constamment la limite de qualité des eaux destinées à la consommation humaine (fixée en France pour le mercure total à  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). La médiane de la concentration en mercure total y est de  $5,6 \mu\text{g L}^{-1}$ , avec un minimum de  $3,4 \mu\text{g L}^{-1}$  et un maximum de  $18,0 \mu\text{g L}^{-1}$  entre 2007 et 2012. Malgré plusieurs études menées par un hydrogéologue ainsi que par le Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM), la source de la contamination reste, à ce jour, inconnue (Revol, 2007 ; Revol, 2008 ; Nguyen-Thé, 2010, ARS-54 communication personnelle).

Les sites canadiens sont des mares thermokarstiques naturelles localisées le long du littoral Est de la Baie d'Hudson, dans le Territoire du Nunavik (Province de Québec) (Figure 23 a). Elles se sont formées suite à la fragilisation du sol découlant de l'alternance entre les périodes de gel et dégel. Elles sont constituées d'eau stagnante provenant du dégel du pergélisol et des précipitations et ne sont reliées entre elles par aucun réseau hydrographique connu.

Les sites KWK-1 (Figure 23 b) et KWK-12 (Figure 23 c) reposent sur des roches (granite et gneiss) précambriennes érodées lors des glaciations du Pléistocène (la dernière datant de 8000 ans)

(Dyke et Prest, 1987). Le climat subarctique domine avec une moyenne de températures annuelle de  $-4,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (de  $-23,4$  à  $+11,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) avec une moyenne de 126 jours de dégel (de mi-mai à fin-septembre). Les précipitations atteignent  $650\text{ mm an}^{-1}$  dont 35 % de neige (Environnement Canada, 2012 ; Bouchard *et al.*, 2014). L'environnement est fortement végétalisé par des arbustes (*Betula glandulosa*, *Salix sp.*, *Alnus sp.*, *Myrica gale*) ainsi que de rares arbres (*Picea mariana*, *Picea glauca*, *Larix laricina*), des mousses (*Sphagnum spp.*) et des herbacées (*Carex aquatilis*) (Laurion *et al.*, 2010 ; Bouchard *et al.*, 2014).

Les sites NAS-1A (Figure 23 d) et BGR-1 (Figure 23 e) reposent sur les roches du bouclier canadien, le sol autour des mares se compose de monticules (palses/lithalses) formés d'argiles et de limons faiblement chargés en matière organique. Cependant, certains de ces monticules sont entourés de tourbe et sont végétalisés. La plupart sont en cours d'effondrement et d'autres sont en train de fondre, ce qui crée une mare entourée d'une bordure surélevée (Figure 23 e). Les sites sont couverts de glace, de fin novembre à fin avril, sous laquelle l'eau conserve une température entre  $0,5$  et  $3,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Calmels et Allard, 2004 ; Breton *et al.*, 2009).

A SAS-1A (Figure 23 f), le sol est formé de monticules de tourbe en cours d'effondrement entre lesquels s'est formé un réseau de mares. La végétation est semblable à celle rencontrée sur les sites KWK-1 et KWK-12.

**Tableau 2.** Nom, code et localisation géographique des sept sites d'échantillonnage. Dans la suite du manuscrit, les sites seront nommés par leur code respectif.

<b>Nom du site</b>	<b>Code</b>	<b>Localisation</b>	<b>Coordonnées GPS</b>
<b>D. / Durbion, Cabane</b>	CAB	Domèvre-sur-Durbion (88), Lorraine (FRANCE)	N 48° 17' E 6° 27'
<b>Veney, Antoine</b>	ANT	Veney (54), Lorraine (FRANCE)	N 48° 28' E 6° 48'
<b>Kwakwatanikapistikw #1</b>	KWK-1	Territoire du Nunavik, Province de Québec (CANADA)	N 55° 20' O 77° 30'
<b>Kwakwatanikapistikw #12</b>	KWK-12	Territoire du Nunavik, Province de Québec (CANADA)	N 55° 20' O 77° 30'
<b>Nastapoka</b>	NAS-1A	Territoire du Nunavik, Province de Québec (CANADA)	N 56° 55' O 76° 22'
<b>Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe</b>	BGR-1	Territoire du Nunavik, Province de Québec (CANADA)	N 56° 36' O 76° 12'
<b>Sasapimakwananisikw</b>	SAS-1A	Territoire du Nunavik, Province de Québec (CANADA)	N 55° 13' O 77° 42'

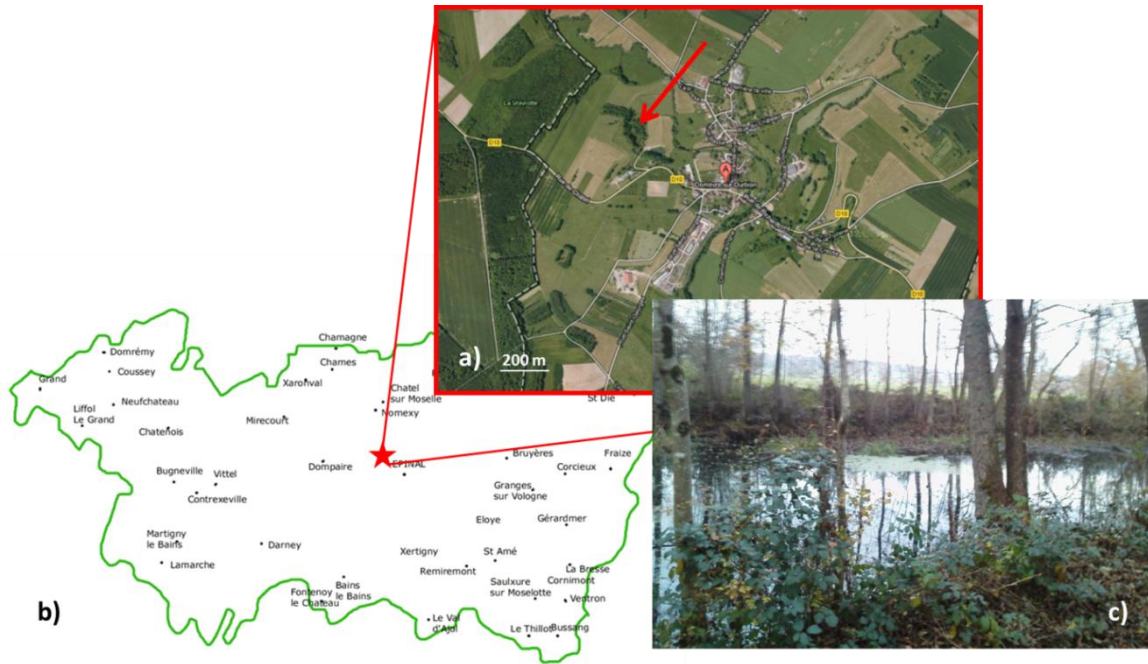


Figure 21. Localisation du site lorrain CAB par rapport à a) la commune de Domèvre-sur-Durbion et b) au département des Vosges (Lorraine, FRANCE). Le cadre c) représente une vue de la mare depuis la berge.

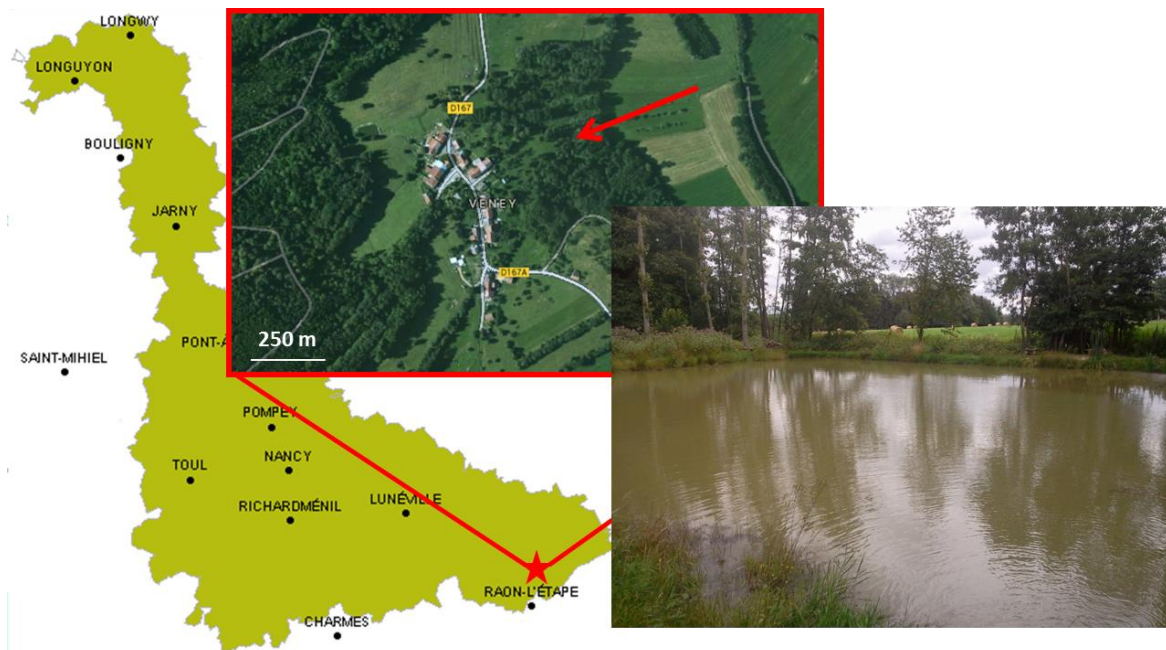
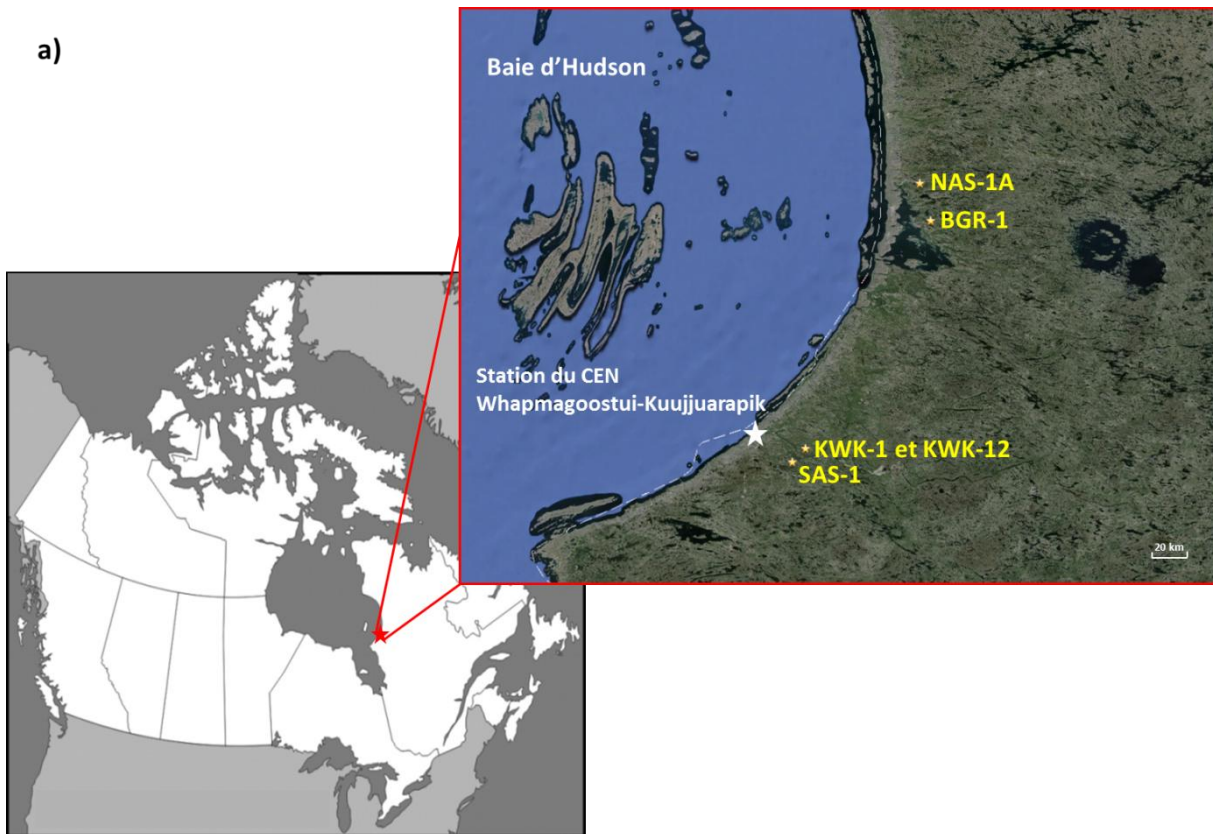


Figure 22. Localisation du site lorrain ANT par rapport à a) la commune de Veney et b) au département de Meurthe-et-Moselle (Lorraine, FRANCE). Le cadre c) représente une vue de la mare depuis la berge.











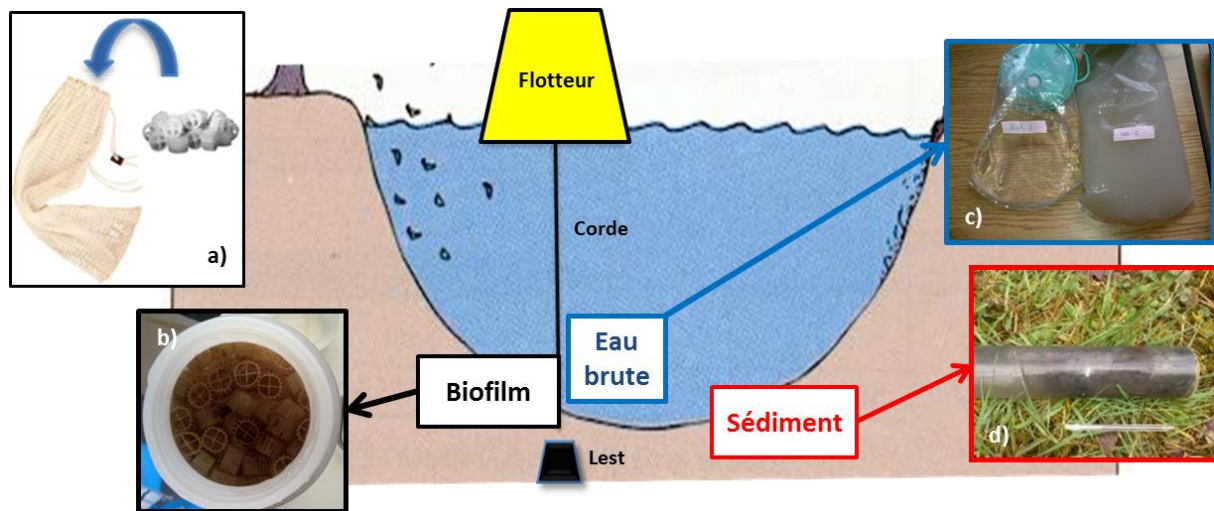
**Figure 23.** a) Localisation des sites subarctiques KWK-1, KWK-12, NAS-1A, BGR-1 et SAS-1 dans le Territoire du Nunavik (Province de Québec, CANADA) et par rapport à la station du CEN ; b) Vue du site KWK-1 depuis la berge lors d'un échantillonnage ; c) Vue du site KWK-12 depuis la berge lors d'un échantillonnage ; d) Vue aérienne du site NAS-1A ; e) Vue du site BGR-1 depuis la berge (à gauche) et depuis l'hélicoptère (à droite). La faible végétalisation permet d'observer la structure en monticule ou « lithalase » caractéristique des mares thermokarstiques ; f) Vue du site SAS-1 depuis la berge (à gauche) et des abords du site (à droite). Le tapis de sphaignes et un monticule de tourbe ou « palse » en cours d'effondrement sont visibles. Sur chaque site, on distingue les flotteurs auxquels sont reliés les supports immergés (voir Figure 24).



## 2) Echantillonnage

En Lorraine, les échantillons ont été prélevés en avril 2013 depuis les berges et au Canada, en août 2013 à l'aide d'une embarcation (Figure 23 b).

Sur chaque site d'étude, trois types d'échantillons correspondant aux compartiments bactériens d'intérêt ont été prélevés : **i) du biofilm** ayant colonisé des supports artificiels, **ii) de l'eau brute** contenant les matières en suspension (MES) dont les cellules planctoniques et **iii) du sédiment de surface** (environ 5 cm de profondeur) (Figure 24).



**Figure 24.** Schéma d'une mare vue en coupe récapitulant les trois compartiments bactériens d'intérêt : **i)** le biofilm ayant colonisé des supports artificiels (encadré a)) placés un an auparavant dans une nasse lestée et reliée par une corde à un flotteur en surface, l'encadré b) montre le changement de teinte des supports une fois colonisés ; **ii)** l'eau brute contenant les cellules en suspension (planctoniques) ou agrégées aux MES, l'encadré c) montre des poches de prélèvement remplies d'eau des sites BGR-1 et NAS-1A ; **iii)** le sédiment de surface (5 cm de profondeur), l'encadré d) montre une carotte de sédiment prélevée sur le site CAB.

Notre objectif était de prélever du biofilm sans avoir à gratter des supports naturels (minéraux ou végétaux immergés) et ainsi éviter d'abimer la structure du biofilm. Pour cela, des supports artificiels ont été immergés dans des nasses lestées au fond des mares un an avant l'échantillonnage. Les nasses étaient reliées par une corde à un flotteur en surface afin de facilement les localiser et les récupérer lors de l'échantillonnage (Figure 24). Les dispositifs utilisés étaient des supports Kaldnes® modèle K1 (AnoxKaldnes, Veolia Water Technology, Suède) en polyéthylène haute densité (HDPE) (Figure 25). Ils sont principalement utilisés dans les procédés de traitement biologique des eaux usées, des eaux potables ainsi qu'en aquaculture (Rusten *et al.*, 2005).

L'utilisation de ces supports artificiels de dimensions connues permet aussi de pouvoir exprimer la quantité de biofilm récolté par unité de surface.

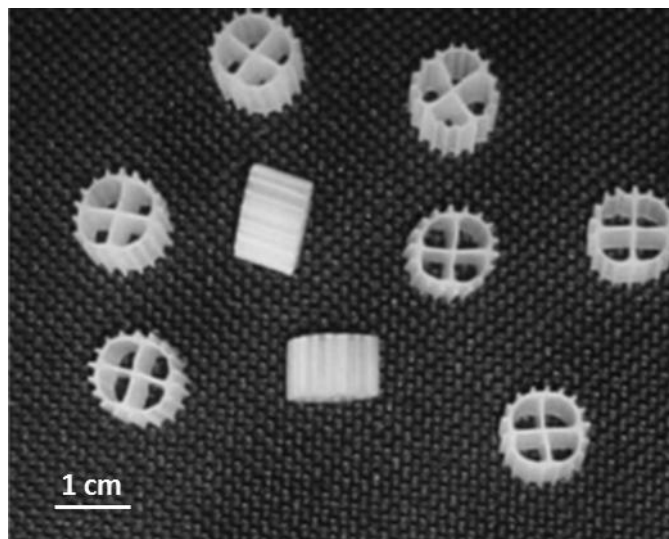


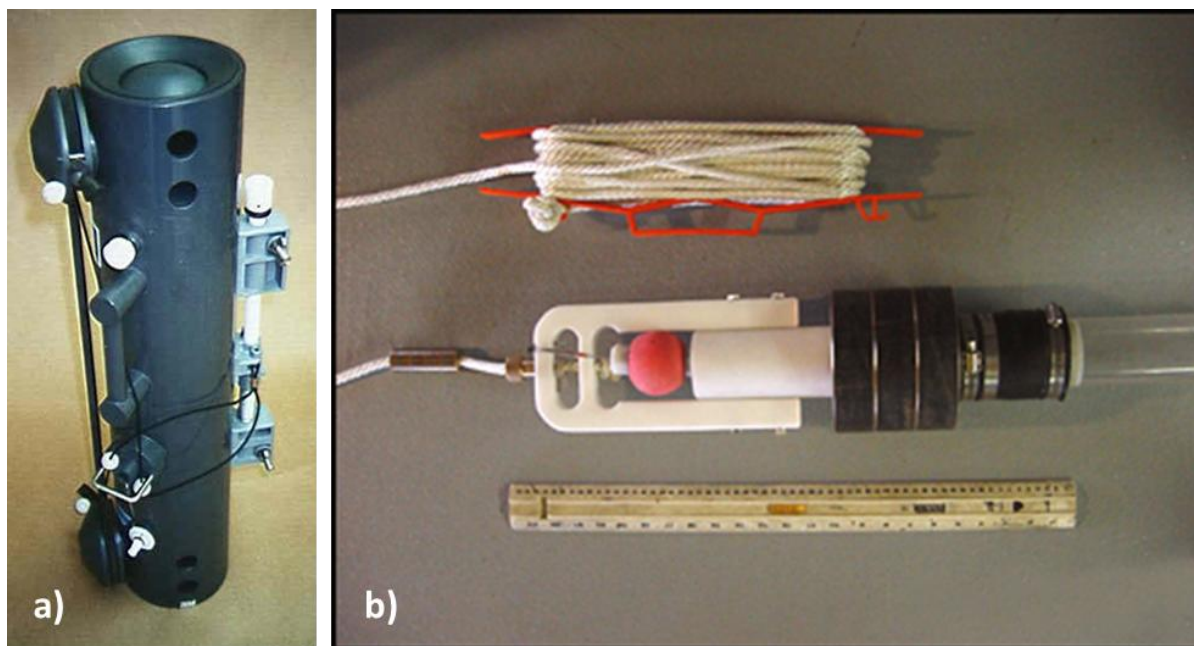
Figure 25. Photographie de supports Kaldnes<sup>®</sup> (AnoxKaldnes, Veolia Water Technology, Suède) modèle K1.

Une fois les supports K1 récoltés dans des flacons PTFE, ces derniers ont été remplis d'eau brute du site jusqu'au débordement pour maintenir au maximum des conditions anoxiques (et limiter le stress oxydant pour les microorganismes du biofilm).

Lors de l'échantillonnage, les nasses des sites ANT et KWK-12, n'ont pas été retrouvées, vraisemblablement suite à une rupture de la corde. Seuls les compartiments « eau brute » et « sédiment de surface » seront donc traités dans la suite de ce manuscrit pour ces deux sites d'étude.

Au moment du prélèvement, un profil de sonde a été effectué (tous les 50 cm) afin de relever différents paramètres en fonction de la profondeur : température, O<sub>2</sub> dissous (concentration et pourcentage de saturation), pH et conductivité (Appareil numérique de mesure multiple HACH-LANGE, modèle HQ40D).

Les échantillons d'eau brute ont été prélevés à l'aide d'une bouteille GO-FLO (General Oceanics, Floride, USA) (Figure 26 a) de 5 L en PVC rincée abondamment avec l'eau du site. Ce dispositif permet de récupérer une portion de la colonne d'eau à une profondeur donnée sans la contaminer avec l'eau de surface au cours de la remontée. Le contenu de la bouteille est ensuite récupéré dans une poche d'aspiration de 3 L en LDPE (Serres Oy, Finlande) (Figure 24 c) préalablement mise sous vide afin de maintenir au maximum des conditions anoxiques.



**Figure 26.** a) Bouteille GO-FLO (General Oceanics, Floride, USA) d'un volume de 5 L servant à l'échantillonnage d'eau brute à une profondeur donnée ; b) Carottier à gravité (Aquatic Research Instruments, USA) muni d'un tube en polypropylène de 1 m de longueur et de 6 cm de diamètre utilisé pour l'échantillonnage du sédiment de surface.

Le prélèvement du sédiment de surface (0 à 5 cm de profondeur) a été effectué à l'aide d'un carottier à gravité (Aquatic Research Instruments, USA) (Figure 26 b) muni d'un tube en polypropylène de 1 m de longueur et de 6 cm de diamètre. L'ensemble est lâché depuis l'embarcation, une fois enfoncé dans le sédiment, un mécanisme permet de fermer hermétiquement l'ouverture supérieure du tube. La carotte ainsi obtenue est récupérée à l'aide d'un piston et conditionnée dans un sachet (double épaisseur de LDPE) en évacuant l'air au maximum lors de la fermeture.

L'ensemble du flaconnage et du matériel de prélèvement utilisé a été préalablement lavé (72 h dans HNO<sub>3</sub>/HCl (1/2) TraceMetal Grade, Fisher Chemical ; 10 %, 72 h dans HCl TraceMetal Grade, Fisher Chemical ; 10 %), rincé abondamment à l'eau ultrapure (Purelab Option-Q, Elga LabWater, Antony, France) et séché sous hotte à flux laminaire puis autoclavé à 121 °C pendant 15 min.

Les prélèvements destinés au comptage des cellules, à la mesure de la matière sèche et aux incubations avec le mercure ont été collectés dans des flacons en HDPE (Nalgene, 1 L). Les échantillons destinés à la mesure du carbone organique total (COT) ont été collectés dans des

flacons en verre borosilicaté préalablement décontaminés dans un four (550 °C, 4 h). Enfin, les échantillons destinés aux analyses élémentaires ont été prélevés dans des flacons en PTFE (Nalgene, 100 mL). Pour le dosage du mercure, les prélèvements ont été acidifiés (5 mL pour 1 L, HCL, TraceMetal Grade, Fisher Chemical, 37 %).

Les échantillons lorrains ont été transportés au laboratoire une heure après le prélèvement. Dans le cas des échantillons subarctiques, le délai de transport jusqu'au laboratoire du CEN était de quelques heures. Les incubations avec le mercure ainsi que les filtrations et acidifications préalables à l'analyse des éléments traces ont été faites sur place. Le reste des expérimentations a été poursuivi en France, environ une semaine après l'échantillonnage. Dans tous les cas, les échantillons ont été transportés à l'aide d'une glacière (à l'obscurité) garnie de blocs réfrigérants.

### 3) Caractérisation des échantillons

Les échantillons d'eaux brutes, de biofilms et de sédiments de surface ont été analysés pour déterminer la densité cellulaire, la matière sèche, la concentration en carbone organique total (COT), en certains ions (chlorure, nitrate, phosphate, sulfate, ...), en mercure inorganique ( $Hg_{inorg}$ ) et méthylmercure (MeHg).

#### a) Détermination de la densité bactérienne

Le nombre total de bactéries a été déterminé par marquage des cellules à l'aide d'un fluorochrome selon un protocole adapté de la méthode décrite par Lunau *et al.*, (2005). Tout d'abord, les échantillons ont été traités aux ultrasons (VibraCell ; 20 kHz équipé d'une sonde plongée à 1 cm dans la suspension) afin de disperser les cellules (2 fois 30 s à 25 W). Dans le cas des échantillons solides, biofilms et sédiments de surface, 10 supports K1 colonisés ou 200 mg de sédiment de surface préalablement centrifugés ( $5000 \times g$ , 10 min) ont été traités aux ultrasons dans 100 mL d'eau ultrapure (Purelab Option-Q, Elga LabWater, Antony, France) stérilisée. Pour les échantillons d'eau brute, la sonde a été directement plongée dans un volume de 100 mL. Dix microlitres de SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) ont été ajoutés à 1 mL des suspensions obtenues précédemment (dilution par cent par rapport à la concentration commerciale) et les échantillons ont été placés à l'obscurité et à 22 °C pendant 15 min. Après filtration sur une membrane de polycarbonate (GTBP, Isopore Millipore, 0,22  $\mu m$  de porosité), et montage entre lame et lamelle, les observations microscopiques et comptages ont été effectuées avec un microscope à épifluorescence (BX40, Olympus) équipé d'un objectif à immersion (grossissement final  $\times 1000$ ), d'un filtre d'excitation de 450 à 480 nm et d'un filtre d'émission de 500 nm. Pour chaque échantillon, 40 champs aléatoires (10 champs sur 4 préparations indépendantes) ont été dénombrés, les résultats sont exprimés en  $cell\ mL^{-1}$  pour l'eau brute,  $cell\ cm^{-2}$  pour le biofilm et  $cell\ g^{-1}\ MS$  pour le sédiment de surface (MS = matière sèche).

b) Concentration en COT et matière sèche

La concentration en carbone organique total (COT) a été déterminée grâce à un analyseur de COT (O.I. Analytical modèle 1030 Dual, associé au logiciel Aurora 1030) par le Laboratoire d'Hydrologie de l'ANSES (Nancy, France). Brièvement, après élimination du carbone inorganique à  $\text{pH} < 2$ , le carbone organique est oxydé (par du persulfate de sodium à  $98\text{ }^\circ\text{C}$ ) en  $\text{CO}_2$  qui est quantifié par infrarouge. La détermination des concentrations se fait grâce à une droite d'étalonnage avec respectivement une limite de détection et de quantification de  $0,067$  et de  $0,2\text{ mg L}^{-1}$ .

La masse de matière sèche (MS) et de matière sèche sans cendres (MSSC) a été déterminée par des pesées après avoir traité l'échantillon respectivement 1 h à  $105\text{ }^\circ\text{C}$  et 15 min à  $500\text{ }^\circ\text{C}$ . Le sédiment de surface a été pesé directement alors que la suspension de biofilm (obtenue comme décrit précédemment) ou l'eau brute ont dû être préalablement filtrées sur une membrane en fibre de verre (GF/C, Whatman). Les résultats sont exprimés en  $\text{mg L}^{-1}$  pour l'eau brute,  $\text{mg cm}^{-2}$  pour le biofilm et  $\text{mg g}^{-1}\text{ MH}$  pour le sédiment de surface.

Les mesures de MSSC sur l'eau brute n'ont pas pu être effectuées sur les sites subarctiques en raison de l'impossibilité de chauffer les échantillons à  $500\text{ }^\circ\text{C}$  à la station du CEN et de ramener en France les volumes d'eau nécessaires à cette analyse.

c) Analyses élémentaires

La composition en différentes espèces chimiques de l'eau brute des différents sites a été analysée par dosage spectrophotométrique à la Ferrozine pour le Fe total (voir Chapitre 3.II.1.b.), et par HPLC pour le sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^{2-}$ ), phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), fluorure ( $\text{F}^-$ ), chlorure ( $\text{Cl}^-$ ), bromure ( $\text{Br}^-$ ) (voir Chapitre 3.II.1.a.). Dans le cas du site CAB, les concentrations en sodium ( $\text{Na}^{2+}$ ), calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) et manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) ont été déterminées par ICP-OES par le Service d'Analyse des Roches et des Minéraux (SARM) (Vandœuvre-lès-Nancy, France).

d) Concentrations en  $\text{Hg}_{\text{inorg}}$  et MeHg

i) En phase dissoute : eau brute

Dans les échantillons d'eau brute des différents sites, la concentration en  $\text{Hg}_{\text{Dinorg}}$  et MeHg<sub>D</sub> a été déterminée par la méthode de la dilution isotopique suivie d'un dosage par GC-ICP-MS (couplage chromatographe en phase gazeuse (Thermo Finnigan, GC Focus) et spectromètre de masse à plasma couplé induit (Thermo Electron, X7). Les dosages de mercure, les analyses de spéciation ainsi que les expériences de méthylation des ajouts monoisotopique ont été effectués en collaboration avec l'équipe TGM du laboratoire EPOC (UMR 5805, Bordeaux, J. Schäfer et L. Dutruch).

La dilution isotopique est basée sur le dopage de l'échantillon par une quantité connue de l'élément à analyser sous forme d'une espèce de cet élément enrichie isotopiquement. L'espèce mono-isotopique ajoutée est alors utilisée comme un étalon interne car elle aura subi les mêmes effets de matrice et les éventuelles transformations physico-chimiques que l'élément naturel à analyser lors des phases d'extraction-dérivatisation et lors du passage dans le GC-ICP-MS (dilution, évaporation, dégradation, rendement d'extraction, ionisation). Brièvement, les échantillons d'eau brute filtrés et acidifiés sont pesés précisément dans des flacons de 20 mL en borosilicate fermés par des bouchons revêtus de PTFE (RESTEK) et l'ajout monoisotopique est effectué : 500  $\mu\text{L}$  d'une solution monoisotopique de  $^{199}\text{Hg}_{\text{inorg}}$  (84,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , IES-Hg199 ; ISC Science) et 50  $\mu\text{L}$  d'une solution monoisotopique de  $\text{Me}^{201}\text{Hg}$  (4,39  $\mu\text{g L}^{-1}$ , IES-MMHg201 ; ISC Science). Après une période de 2 h d'équilibration à 4 °C, 3 mL de tampon acétate (acétate de sodium/acide acétique 0,1 M, Sigma-Aldrich/Merck Suprapur) sont ajoutés et le pH est ajusté à 3,9 avec HCl (37 % TraceMetal Grade, Fisher Chemical) avant l'étape de propylation par 0,5 mL de tétrapropylborate de sodium (1 % m/v, Galab). Finalement, 0,5 mL d'iso-octane (J.T. Baker, baker HPLC-analyzed) est ajouté et les tubes sont vigoureusement agités à la main pendant 5 min avant d'être placés à 4 °C pendant 12 h. Une fois séparée de la phase aqueuse, la phase organique (contenant les espèces propylées du mercure) est prélevée et analysée par GC-ICP-MS.

Le dosage repose sur la séparation des deux espèces ( $\text{Hg}_{\text{inorg}}$  et MeHg) par chromatographie en phase gazeuse, elles sont ensuite ionisées dans un plasma d'argon et détectées par le spectromètre de masse. La GC permet de séparer les espèces de l'élément à analyser en fonction de leur point d'ébullition et de leur affinité avec la phase stationnaire (le  $\text{Hg}_{\text{inorg}}$  pouvant se lier à deux groupes propyles contre un seul pour le  $\text{MeHg}^+$ , son point d'ébullition étant plus élevé). Dans le cas du Hg, la colonne utilisée est un capillaire en métal (30 m, MXT-1 Restek, diamètre interne 0,53

mm, 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de la phase stationnaire) dont la phase stationnaire est une phase apolaire 100% diméthylpolysiloxane (Rodriguez Martin-Doimeadios *et al.*, 2003 ; Monperrus *et al.*, 2004 ; Monperrus *et al.*, 2005) et dont la phase mobile (gaz vecteur) est constituée d'hélium (débit 25 mL  $\text{min}^{-1}$ ). Un gradient de température est appliqué pour faciliter la séparation des espèces. Celles-ci sont ensuite conduites, via une ligne de transfert de même diamètre que la colonne et chauffée à 280 °C (afin d'éviter une éventuelle condensation et adsorption de Hg sur les parois), au spectromètre de masse.

Celui-ci permet de quantifier quasi-simultanément les différents isotopes de l'élément à analyser (ici le mercure). Pour cela, l'échantillon (sous forme gazeuse) est introduit dans la chambre de vaporisation (nébuliseur) avant d'être envoyé dans un plasma d'argon maintenu dans une torche en quartz à une température de 6000 à 10000 °C. A cette température, les espèces à analyser sont ionisées puis traversent différentes fentes (« *sampler* » et « *skimmer* »), les ions chargés positivement sont alors extraits par un ensemble de lentilles et sont acheminés vers le spectromètre quadripolaire. En fonction des réglages du champ magnétique appliqué au quadripôle, seuls les ions présentant un certain rapport masse/charge sont sélectionnés. Enfin, ils sont détectés et le signal est traduit en nombre d'impulsions (ou coups par seconde).



La concentration de l'analyte dans l'échantillon est déterminée grâce à deux isotopes : l'isotope « traceur » présent dans la solution monoisotopique ajoutée et un isotope qui présente une abondance naturelle suffisante pour être bien détecté. Ici, dans le cas du dosage du Hg<sub>inorg</sub>, l'isotope ajouté est le <sup>199</sup>Hg (isotope X) et l'isotope « naturel » de référence est le <sup>202</sup>Hg (isotope Y). L'analyse par GC-ICP-MS permet de déterminer le rapport R correspondant à l'air du pic de l'isotope <sup>199</sup>Hg divisé par l'aire du pic de l'isotope <sup>202</sup>Hg : R(isotope X/isotope Y). Connaissant ce rapport R on peut alors résoudre l'équation [1] de dilution isotopique permettant de retrouver la concentration en Hg de l'échantillon, tous les autres termes de l'équation étant connus (Rodriguez Martin-Doimeadios *et al.*, 2003).

$$C = \frac{c'w'A_r(RY'-X')}{wA_r'(X-RY)} \quad [1]$$

*c* : concentration en Hg<sub>inorg</sub> (ou MeHg) de l'échantillon (*e.g.* ng L<sup>-1</sup>)

*c'* : concentration en Hg<sub>inorg</sub> (ou MeHg) de la solution monoisotopique ajoutée

*w* : masse ou volume de la prise d'essai de l'échantillon (L)

*w'* : masse ou volume de l'ajout mono-isotopique (L)

*A<sub>r</sub>* : masse atomique relative de Hg naturelle (200,6 g mol<sup>-1</sup>)

*A<sub>r</sub>'* : masse atomique relative de Hg dans la solution mono-isotopique (199,0423 g mol<sup>-1</sup>)

*X* : abondance de l'isotope X dans l'échantillon (abondance naturelle ; %)

*X'* : abondance de l'isotope X dans la solution monoisotopique (%)

*Y* : abondance de l'isotope Y dans l'échantillon (abondance naturelle ; %)

*Y'* : abondance de l'isotope Y dans la solution monoisotopique (%)

*R* : rapport isotopique entre les isotopes X et Y mesuré par GC-ICP-MS dans le mélange

ii) En phase particulière : biofilms et sédiment de surface

En premier lieu, la teneur en Hg total au sein des échantillons de biofilms et de sédiments de surface environnementaux est mesurée par AAS (spectrométrie d'absorption atomique) à l'aide d'un DMA-80 (Direct Mercury Analyser, Milestone GmbH, Allemagne) (SARM, Vandœuvre-lès-Nancy, France). Les échantillons (200 mg de matière sèche de sédiment de surface ou 2 mL d'une suspension obtenue par sonication de 25 supports K1 dans 50 mL d'eau ultrapure puis concentrée 16 fois par des centrifugations successives 5 min à 14000 × g) sont traités à 160 °C sous flux d'O<sub>2</sub> dans un premier four puis dans un second à 850 °C où les gaz provenant de la combustion sont décomposés dans un tube catalytique et où le mercure est réduit sous forme de Hg<sup>0</sup>. Le mercure

élémentaire formé est fixé sur un piège d'or puis thermo-désorbé avant d'être envoyé vers un détecteur. La quantité de mercure est déterminée par la quantité d'énergie absorbée par les atomes de Hg lors de leur excitation. Une calibration est préalablement effectuée à l'aide de matériaux certifiés (standards géochimiques GH, granite et FK-N414, feldspar ; CRPG). Une limite de quantification de 0,5 ppb est déterminée dans nos conditions expérimentales par l'analyse de blancs (eau ultrapure ou HNO<sub>3</sub> TraceMetal Grade, Fisher Chemical. ; 2,5 N).

Une fois la concentration en Hg total déterminée, les teneurs en Hg<sub>P<sub>inorg</sub></sub> et en MeHg<sub>P</sub> ont été mesurées au laboratoire LCABIE (UMR 5254, Pau, E. Tessier) par la méthode de la dilution isotopique décrite précédemment. Les analyses ont été effectuées après filtration des suspensions de biofilm (25 supports) (membrane Millipore PTFE, 0,45 µm de porosité) ou sur 250 mg de sédiment de surface. Ici, dans le cas du dosage de mercure particulaire (échantillons solides), une étape intermédiaire d'extraction (12 h d'agitation dans 10 mL d'HNO<sub>3</sub> TraceMetal Grade, Fisher Chemical ; 6 N) intervient entre l'étape d'équilibration avec les ajouts monoisotopiques et l'étape de propylation.

#### 4) Méthylation du mercure

##### a) Incubations avec le mercure

##### i) Echantillons environnementaux

Des incubations ont été menées pour évaluer la vitesse de méthylation des différents compartiments microbiens. L'eau brute (contenant les MES dont les cellules planctoniques) a été comparée au biofilm et au sédiment de surface. Afin d'identifier un potentiel effet synergique, le biofilm et le sédiment de surface ont été incubés en présence d'eau brute ou en présence d'eau brute autoclavée afin d'éliminer l'activité des cellules planctoniques ou présentes sur les MES. Les différentes configurations sont récapitulées ci-dessous :

- eau brute non filtrée, non autoclavée ;
- biofilm : supports colonisés dans un volume d'eau brute non filtrée, autoclavée (EBA = eau brute autoclavée) ;
- biofilm + eau brute : supports colonisés dans un volume d'eau brute non filtrée, non autoclavée (EB = eau brute) ;
- sédiment de surface : sédiment de surface dans un volume d'eau brute non filtrée, autoclavée ;

- sédiment de surface + eau brute : sédiment de surface dans un volume d'eau brute non filtrée, non autoclavée.

L'eau brute (autoclavée ou non) utilisée comme milieu d'incubation a été prélevée en même temps et à la même profondeur que le biofilm et le sédiment de surface afin d'étudier la méthylation du mercure dans des conditions aussi représentatives que possible des conditions environnementales. Dans le cas des échantillons solides, biofilm et sédiment de surface, 10 supports K1 colonisés ou  $\approx 2$  g de sédiment de surface centrifugé ( $5000 \times g$ , 10 min) ont été transférés dans des flacons de 130 mL en polypropylène (4 oz High Profile Vial, Capitol Europe) contenant 100 mL d'eau brute, autoclavée ou non et préalablement dégazée stérilement (barbotage d'un flux de  $N_2$  99 %). La composition détaillée des flacons d'incubation pour chaque condition est décrite en Annexes, Tableau A1.

Afin d'évaluer l'importance de l'intégrité du biofilm, des incubations ont été menées sur des biofilms dispersés par traitement aux ultrasons dans les mêmes conditions que pour le comptage des cellules. Brièvement, 10 support K1 colonisés (provenant du site CAB) ont été traités aux ultrasons dans un volume de 100 mL d'eau brute directement dans le flacon d'incubation (VibraCell ; puissance 250 W, 20 kHz) à l'aide d'une sonde plongée d'environ 1 cm dans le volume (2 fois 30 s à 25 W).

## ii) Souche pure méthylante

L'effet de la forme sessile des cellules (biofilm) *versus* planctoniques sur la méthylation du mercure a été étudié à l'aide d'une souche pure décrite dans la littérature pour présenter une activité méthylante : la souche sulfatoréductrice *Desulfobulbus propionicus* 1pr3 (Benoit *et al.*, 2001 a et b) qui est la souche type de cette espèce bactérienne appartenant à la famille des *Desulfobulbaceae* (Phylum des *Proteobacteria*, Classe *Deltaproteobacteria*, Ordre *Desulfobacterales*). Ses cellules se présentent sous forme d'ellipsoïdes citrifformes (aux extrémités pointues) à coloration de Gram négative et de dimensions comprises entre  $1 \times 1,5$  et  $1,3 \times 2$   $\mu\text{m}$ . Elles sont non mobiles, possèdent de nombreux *fimbriae*, et peuvent être observées isolées les unes des autres, en paires ou en chaînes. *D. propionicus* peut utiliser le sulfate, sulfite, thiosulfate et nitrate comme accepteur final d'électrons. Les donneurs d'électrons pouvant être utilisés sont : le propionate, le pyruvate, l'éthanol, le 1-propanol, le glycolate, le glyoxylate, le lactate, ou le succinate. Enfin, la croissance peut être supportée par un mélange d' $H_2$  et de  $CO_2$  en présence d'acétate. Cette souche est aussi capable, en absence d'accepteur d'électrons, de fermenter des substrats comme le lactate, le

pyruvate ou l'éthanol. Sa température optimale de croissance est de 39 °C à un pH compris entre 6,0 et 8,6 (Widdel et Pfennig, 1982 ; Laanbroek *et al.*, 1982).

Afin d'éviter la formation de sulfure consécutive à la réduction du sulfate (qui peut, selon sa concentration, défavoriser la méthylation), la souche est cultivée dans le milieu décrit par Benoit *et al.* (2001a) et qui est basé sur la fermentation du pyruvate. Sa composition précise est détaillée en Annexes, Tableau A2.

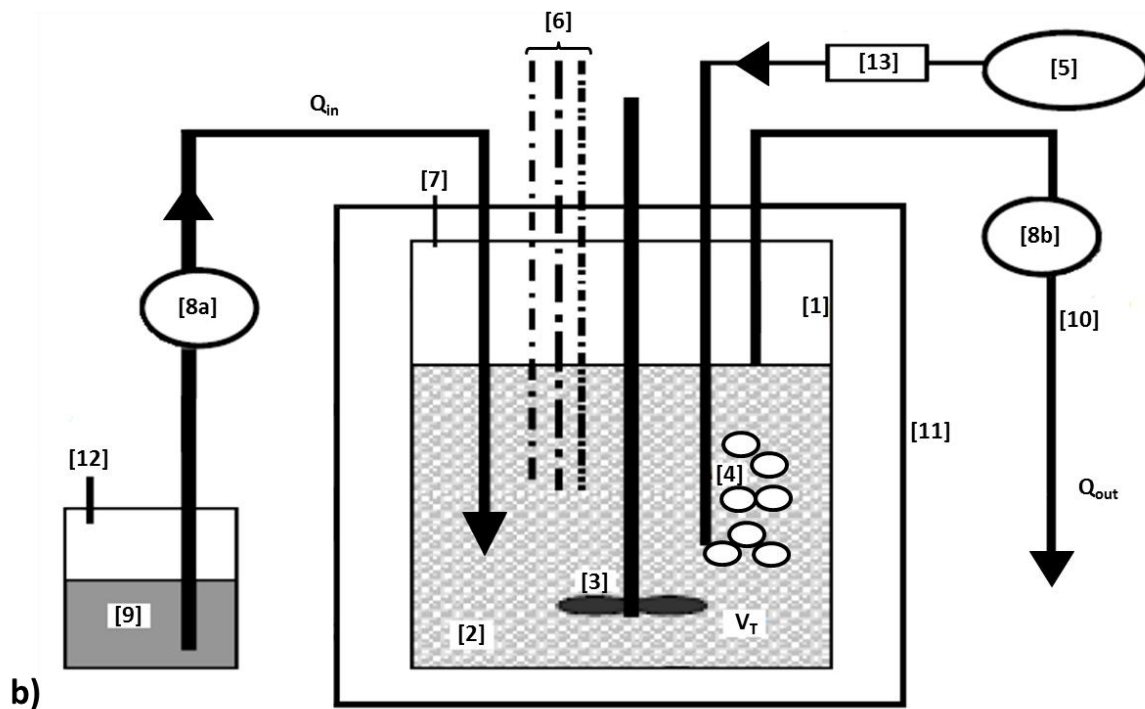
Pour la condition « planctonique », la souche est cultivée dans des flacons de 100 mL contenant 80 mL de milieu liquideensemencé par 2 mL de préculture. L'incubation se déroule sur 7 jours, à 37 °C, à l'obscurité et en anaérobie. L'évolution de la population bactérienne au cours du temps est suivie par mesure de la DO à 600 nm (spectrophotomètre Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) ainsi que par numération directe (voir Chapitre 2.II.3.a.). La vitesse de méthylation de cellules planctoniques de cette souche étant décrite dans la littérature (Benoit *et al.*, 2001a) cette expérience a aussi servi de contrôle positif.

L'impact de la présence d'EPS sur la vitesse de méthylation de *D. propionicus* sous forme planctonique a été aussi évalué. Pour cela, une suspension d'EPS a été ajoutée lors des incubations pour une concentration finale de 200 µg L<sup>-1</sup> (correspondant à la masse de matière sèche apportée par 10 supports colonisés). Les EPS utilisés pour préparer la suspension mère ont été extraits de boues activées de station d'épuration puis lyophilisés et dialysés selon le protocole décrit par Martin-Cereceda *et al.* (2001).

Dans le cas de la culture sous forme de biofilm, des supports K1 sont incubés pendant un mois dans un bioréacteur (ou chémostat) (Biolaffite) d'un volume de 2 L, thermostaté à 37 °C et continuellement dégazé au N<sub>2</sub> (99 %) afin de conserver des conditions anaérobies (Figure 27). Le réacteur est continuellement alimenté par le milieu de culture décrit ci-dessus avec un débit suffisant ( $Q_{in} = 150 \text{ mL h}^{-1}$ ) pour avoir un taux de dilution ( $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ ) supérieur à la vitesse spécifique de croissance des bactéries ( $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ ). Ainsi, la croissance de bactéries planctoniques est limitée car leur vitesse de division ne permet pas de compenser le lessivage et seules les cellules ayant adhéré aux supports pourraient se multiplier. A l'issue de l'incubation, la colonisation des supports est caractérisée de la même façon que pour les supports colonisés par les biofilms environnementaux (voir Chapitre 2.II.3.).



a)



b)

Figure 27. a) Montage des bioréacteurs, les supports K1 en suspension dans le milieu de culture sont visibles dans l'encadré ; b) Schéma du fonctionnement d'un bioréacteur [1] enceinte interne, [2] suspension cellulaire, [3] hélice d'agitation, [4] diffuseur de gaz ( $N_2$  99 %), [5] surpresseur, [6] capteurs divers ( $T^\circ C$ , pH,  $O_2$  dissous, ...), [7] évacuation des gaz, [8a) et [8b) pompes péristaltiques, [9] milieu de culture stérile, [10] évacuation de l'excès de milieu de culture, [11] enceinte externe thermostatée, [12] bouchon poreux stérilisant, [13] débitmètre.  $Q_{in}$  et  $Q_{out}$  sont respectivement les débits d'entrée et de sortie (avec  $Q_{out} \gg Q_{in}$ ) et  $V_T$  le volume total utile (2 L).

Enfin, pour avoir une idée de l'impact de la température d'incubation sur la méthylation du mercure par le biofilm, une expérience à 10 °C est effectuée sur un échantillon ayant montré une vitesse de méthylation significative à 25 °C (biofilm du site CAB)

Des contrôles abiotiques ont été réalisés en incubant de l'eau ultrapure, de l'eau brute, des supports K1 colonisés par le biofilm, des supports K1 vierges, du sédiment de surface ou des EPS préalablement stérilisés par un double autoclavage à 6 h d'intervalle (121 °C pendant 15 min à une pression de 1 bar) (Annexes, Tableau A3).

b) Ajout monoisotopique et détermination des vitesses de méthylation

Le suivi des incubations démarre dès l'ajout de chlorure de  $^{199}\text{Hg}^{\text{II}}$  monoisotopique (ISC Science, IES-Hg199 isotopic purity 91,71%) à chaque échantillon pour atteindre une concentration finale de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . L'ensemble des incubations se déroule en conditions anoxiques (à l'intérieur d'une chambre anaérobie sous atmosphère  $\text{N}_2 : \text{H}_2$ , 95 : 5 (Coy Laboratory Products Inc.), à l'obscurité, sans agitation et à une température constante de 25 °C. Afin de déterminer la quantité de  $^{199}\text{Hg}_{\text{inorg}}$  méthyliée au cours du temps, des prélèvements de 5 mL sont effectués à 2, 4 et 5 ou 7 jours, filtrés (membrane Millipore PTFE, 0,22  $\mu\text{m}$  de porosité) et acidifiés par 20  $\mu\text{L}$  d'HCl (37% TraceMetal Grade, Fisher Chemical).

A partir des chromatogrammes obtenus par GC-ICP-MS (Figure 28), les aires des pics correspondants au  $\text{Hg}_{\text{inorg}}$  et MeHg ont été déterminées par intégration, à l'aide du logiciel Plasmalab, permettant ainsi une analyse quantitative.

Le **potentiel de méthylation « brut »** au temps  $t$  a été calculé par rapport à l'excès de  $\text{Me}^{199}\text{Hg}$  (c.-à-d. le  $\text{Me}^{199}\text{Hg}$  produit) dans l'échantillon au temps  $t$  par rapport à la valeur initiale (à  $t_0$ ) et à un isotope naturel (e.g.  $\text{Me}^{200}\text{Hg}$ ) selon l'équation [2].

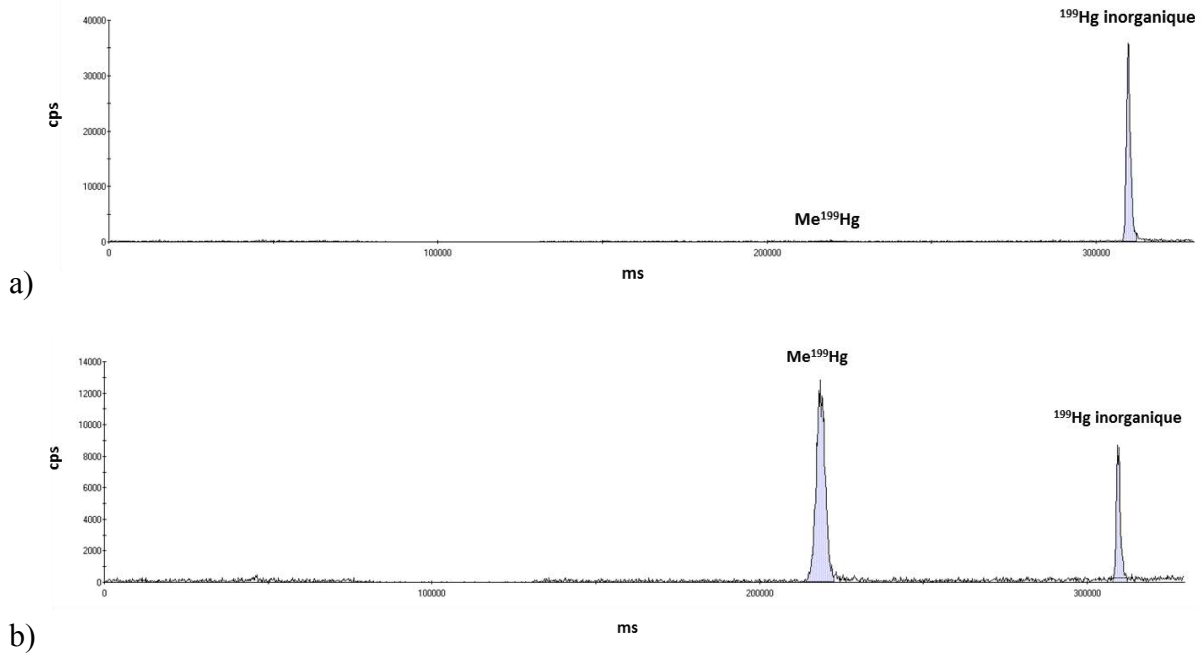


Figure 28. Exemples de chromatogrammes obtenus en GC-ICP-MS. Le signal représente le nombre d’impulsions détectées par le spectromètre de masse (coups par seconde « cps » en ordonnée) au cours du temps d’acquisition (millisecondes « ms » en abscisse) pour chaque isotope. L’exemple a) représente un échantillon où un seul pic est détecté correspondant au  $^{199}\text{Hg}_{\text{inorg}}$  (qui correspond à l’ajout fait au début de l’incubation) traduisant une méthylation négligeable au cours de l’incubation. L’exemple b) montre, en amont du pic correspondant au  $^{199}\text{Hg}_{\text{inorg}}$ , un pic correspondant au  $\text{Me}^{199}\text{Hg}$  ce qui traduit une méthylation de l’ajout monoisotopique au cours de l’incubation.

$$\sigma = \frac{\left(\frac{\text{Me}^{199}\text{Hg}}{\text{Me}^{202}\text{Hg}}\right)_t \times [\text{Me}^{202}\text{Hg}]_0 - [\text{Me}^{199}\text{Hg}]_0}{[^{199}\text{Hg}]_0 - \left(\frac{\text{Me}^{199}\text{Hg}}{\text{Me}^{202}\text{Hg}}\right)_t \times [^{202}\text{Hg}]_0} \quad [2]$$

Avec :

- $\sigma$  : le potentiel de méthylation brut au temps  $t$  (% $\text{Me}^{199}\text{Hg}$ )
- $\left(\frac{\text{Me}^{199}\text{Hg}}{\text{Me}^{202}\text{Hg}}\right)_t$  : le rapport isotopique du  $\text{Me}^{199}\text{Hg}$  par rapport au  $\text{Me}^{202}\text{Hg}$  au temps  $t$  (correspondant au rapport des nombres de coups associés)
- $[\text{Me}^{202}\text{Hg}]_0$  : la concentration initiale en  $\text{Me}^{202}\text{Hg}$
- $[\text{Me}^{199}\text{Hg}]_0$  : la concentration initiale en  $\text{Me}^{199}\text{Hg}$
- $[^{199}\text{Hg}]_0$  : la concentration initiale en  $^{199}\text{Hg}_{\text{inorg}}$
- $[^{202}\text{Hg}]_0$  : la concentration initiale en  $^{202}\text{Hg}_{\text{inorg}}$

L'intervalle de confiance a été défini comme la moyenne des blancs 0,074 %MeHg plus 3 fois la valeur de l'écart moyen (0,053 %MeHg) soit 0,232 %MeHg (Annexes, Tableau A3). Une fois la moyenne des blancs soustraite, seules les valeurs supérieures à l'intervalle de confiance ont été traitées, les autres n'étant pas considérées comme significativement différentes du « bruit de fond ».

La moyenne des écarts moyens entre duplicatas (15 % ; 22 % ; 30 % selon la série analysée) a été utilisée pour définir l'erreur relative dans chaque série. Deux valeurs sont donc considérées comme significativement différentes si elles diffèrent de plus de 15 ; 22 ou 30 % l'une de l'autre, selon la série considérée.

Afin d'obtenir une **vitesse de méthylation** (%MeHg j<sup>-1</sup>), le potentiel de méthylation maximum (à l'issue de l'incubation) est normalisé par la durée de l'incubation (en jours) selon l'équation [3] :

$$\alpha = \frac{\sigma_t}{t} \quad [3]$$

Avec :

- $\alpha$  : la vitesse de méthylation (%Me<sup>199</sup>Hg j<sup>-1</sup>)
- $\sigma_t$  : le potentiel de méthylation au temps t (%Me<sup>199</sup>Hg)
- $t$  : durée de l'incubation (j)

Afin de comparer efficacement l'activité méthylyante des différents compartiments, il nous est apparu indispensable de normaliser les potentiels et vitesses de méthylation. Etant donné que ce sont les bactéries qui sont majoritairement responsables de la méthylation du mercure nous avons choisis de normaliser les potentiels et vitesses de méthylation par la densité cellulaire pour comparer l'activité méthylyante des différents compartiments (%Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup> ou (%Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>). Nous avons également normalisé par la masse de matière sèche de sédiment de surface (%Me<sup>199</sup>Hg g<sup>-1</sup> MS ou %Me<sup>199</sup>Hg g<sup>-1</sup> MS j<sup>-1</sup>) afin de faciliter la comparaison de nos données avec la littérature.

La normalisation par la densité cellulaire repose sur l'approximation que toutes les bactéries présentes au sein de l'échantillon participent de façon identique à l'activité méthylyante. En réalité, ce n'est pas le cas puisque toutes les bactéries ne méthylyent pas le mercure et celles qui le méthylyent peuvent le faire à des degrés différents. Ainsi, l'activité méthylyante d'un échantillon dépend à la fois du nombre de microorganismes méthylyants et de leur vitesse de méthylation. Par exemple, deux



sédiments peuvent présenter une vitesse de méthylation qui est identique lorsqu'elle est normalisée par la matière sèche alors que la densité bactérienne est dix fois plus élevée dans l'un deux. Normalisée par la densité cellulaire, elle sera dix fois plus faible pour l'échantillon présentant la plus forte densité bactérienne.

Si les vitesses de déméthylation n'ont pas été directement mesurées, il est néanmoins possible d'en calculer une approximation. En effet, dans un système environnemental où les teneurs en  $Hg_{inorg}$  et MeHg se trouvent à l'équilibre, le ratio  $MeHg/Hg_{inorg}$  est directement lié au ratio  $\%MeHg/\%DeMeHg$ . Cette relation peut être illustrée par une simulation itérative montrant que, peu importe les concentrations initiales en  $Hg_{inorg}$  et MeHg, le système tend vers un équilibre où le ratio  $MeHg/Hg_{inorg}$  est égal au ratio  $\%MeHg/\%DeMeHg$  (Annexes, Tableau A4 et Figure A1). Ainsi, à partir de la vitesse de méthylation, ainsi que des concentrations en  $Hg_{inorg}$  et MeHg naturelles au sein des différents compartiments (et en considérant que, dans le système environnemental d'où proviennent les échantillons, les concentrations en  $Hg_{inorg}$  et MeHg sont à l'équilibre), la vitesse de déméthylation peut être calculée selon l'équation [4] :

$$\delta = \frac{[Hg_{inorg}]}{[MeHg]} \times \alpha \quad [4]$$

Avec :

- $\delta$  : la vitesse de déméthylation ( $\% MeHg j^{-1}$ )
- $\alpha$  : la vitesse de méthylation ( $\% DeMeHg j^{-1}$ )
- $[Hg_{inorg}]$  : la concentration naturelle en  $Hg_{inorg}$
- $[MeHg]$  : la concentration naturelle en MeHg

### III. Résultats

#### 1) Caractérisation des échantillons

##### a) Sites d'étude

Les caractéristiques physico-chimiques mesurées lors de l'échantillonnage dans les différents sites d'étude sont détaillées dans le Tableau 3.

Une stratification de la colonne d'eau est observée avec un gradient d'oxygène dissous passant de 61 à 91 % en surface de 3 à 20 % de saturation au fond. Le site NAS-1A est celui qui présente la plus forte teneur en O<sub>2</sub> au fond avec 20 % de saturation. Le site BGR-1 présente, contrairement aux autres, une stratification très faible avec une saturation en O<sub>2</sub> variant de 91 % en surface à 74 % en profondeur. En ce qui concerne le pH, il a tendance à légèrement baisser en fonction de la profondeur pour les sites KWK-1, KWK-12 et SAS-1, alors que pour les sites CAB et ANT, il reste stable (ce qui peut s'expliquer par la faible profondeur). NAS-1A et BGR-1 sont, quant à eux, plus alcalins en profondeur qu'en surface. De manière générale, la conductivité est constante au sein de la colonne d'eau et augmente brusquement en profondeur, mis à part pour NAS-1A et BGR-1, où cette augmentation est plus discrète.

Pour résumer, trois profils de stratification apparaissent ; les sites CAB, ANT, KWK-1, KWK-12 et SAS-1 d'un côté, le site BGR-1 qui présente une stratification beaucoup moins marquée que les précédents et enfin le site NAS-1A avec une stratification intermédiaire.

b) Echantillons

Les autres caractéristiques physico-chimiques des eaux brutes, des biofilms et des sédiments de surface sont indiquées dans les Tableaux 4 et 5.

i) Eau brute

La matière sèche en suspension dans l'eau brute varie de 5 mg L<sup>-1</sup> (BGR-1) à 600 mg L<sup>-1</sup> (NAS-1A) (Tableau 4). La forte charge de MES sur le site NAS-1A donne un aspect opaque (laiteux) à l'eau (Figure 23 d et 24 c). Sur les sites CAB et ANT, la MSSC correspond à ≈ 50 % de la matière en suspension dans l'eau brute. Les mesures de MSSC sur l'eau brute n'ont pas pu être effectuées sur les sites subarctiques.

Sur les sept sites, les valeurs de COT varient de 7 à 38 mg L<sup>-1</sup> ce qui coïncide avec la fourchette de 1 à 30 mg L<sup>-1</sup> décrite par Sedell et Dahm (1990).

Les concentrations en Hg<sub>inorg</sub> dissous (Hg<sub>Dinorg</sub>) varient entre 1,87 et 4,03 ng L<sup>-1</sup> pour les cinq sites subarctique, le site lorrain CAB présente quant à lui une teneur dans l'eau brute plus élevée (9,71 ng L<sup>-1</sup>) (Tableau 4). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il se situe, contrairement aux sites subarctiques, au sein d'un environnement plus urbanisé. Du fait de leur situation géographique, les sites canadiens sont quant à eux moins exposés à l'activité anthropique. Ces concentrations restent tout de même négligeables lorsqu'on sait qu'elles peuvent atteindre jusqu'à 1 µg L<sup>-1</sup> dans les environnements impactés (Ullrich *et al.*, 2001). Dans le cas du site ANT, la concentration est de 15,5 ng L<sup>-1</sup>, soit ≈ 500 fois moins que la concentration mesurée dans un bac de trop-plein de la source l'alimentant (7,4 µg L<sup>-1</sup>). Cet abattement peut s'expliquer par des phénomènes physico-chimiques se produisant dans la mare comme la photoréduction associée à une sorption d'une partie du mercure dissous sur les MES de l'eau suivie d'une sédimentation et ainsi d'un piégeage du mercure au sein du sédiment. Les teneurs élevées mesurées dans le sédiment de surface (267 µg Kg<sup>-1</sup>) vont dans ce sens.

Tableau 3. Paramètres physique (température) et chimiques (O<sub>2</sub> dissous, pH et conductivité) de l'eau mesurés lors de l'échantillonnage selon la profondeur. Les données en caractères gras correspondent aux caractéristiques de l'eau à la profondeur où les supports artificiels ont été installés.

Code du site	Profondeur (m)	Température (°C)	O <sub>2</sub> dissous (mg L <sup>-1</sup> ) (% de saturation)	pH	Conductivité (mS cm <sup>-1</sup> )
CAB	0,1 (surface)	9,8	8,6 (75%)	7,9	-
	0,50	9,6	3,7 (32%)	7,8	-
	<b>1,1 (fond)</b>	<b>9,5</b>	<b>0,8 (7%)</b>	<b>7,8</b>	-
ANT	0,1 (surface)	11,6	9,4 (82 %)	7,1	-
	<b>1,2 (fond)</b>	<b>11,2</b>	<b>1,3 (11 %)</b>	<b>7,0</b>	-
KWK-1	0,1 (surface)	11,35	7,2 (67%)	6,1	0,062
	1,0	11,03	7,0 (63%)	6,1	0,062
	<b>1,5</b>	<b>10,7</b>	<b>6,6 (61%)</b>	<b>6,0</b>	<b>0,063</b>
	2,0 (fond)	8,0	1,0 (9%)	5,8	0,166
KWK-12	0,1 (surface)	12,0	6,6 (61%)	6,6	0,060
	1,0	12,0	6,5 (61%)	6,5	0,060
	1,5	11,9	6,4 (60%)	6,5	0,060
	<b>2,0</b>	<b>10,9</b>	<b>0,6 (6%)</b>	<b>6,2</b>	<b>0,089</b>
	2,5 (fond)	8,2	0,4 (3%)	5,8	0,260
NAS-1A	0,1 (surface)	10,2	10,0 (89%)	6,7	0,321
	1,0	10,0	9,8 (87%)	6,7	0,321
	1,5	9,9	9,8 (87%)	6,8	0,320
	2,0	9,9	9,7 (86%)	6,8	0,322
	2,5	9,9	9,6 (85%)	6,8	0,326
	3,0	9,8	9,5 (84%)	6,9	0,329
	<b>3,5</b>	<b>8,7</b>	<b>6,3 (55%)</b>	<b>6,9</b>	<b>0,364</b>
	4,0	7,3	2,7 (23%)	6,9	0,385
4,2 (fond)	7,3	2,4 (20%)	6,9	0,384	
BGR-1	0,1 (surface)	12,9	9,7 (91%)	7,1	0,171
	1,0	12,2	9,3 (87%)	7,1	0,171

## Chapitre 2

---

	1,5	12,0	9,2 (85%)	7,1	0,171
	2,0	11,9	9,1 (84%)	7,1	0,167
	<b>2,5</b>	<b>11,9</b>	<b>9,0 (84%)</b>	<b>7,1</b>	<b>0,171</b>
	3,0	11,8	8,9 (82%)	7,1	0,171
	3,5 (fond)	11,7	7,8 (74%)	7,1	0,173
<b>SAS-1</b>	0,1 (surface)	19,7	7,8 (85%)	7,6	0,110
	1,0	12,7	0,4 (4%)	7,2	0,161
	<b>1,5</b>	<b>11,6</b>	<b>0,5 (5%)</b>	<b>6,7</b>	<b>0,196</b>
	2,0 (fond)	11,3	0,3 (3%)	6,6	0,211

---

En ce qui concerne les teneurs en MeHg dissous (MeHg<sub>D</sub>), les sites CAB, KWK-1, KWK-12, BGR-1 et SAS-1 présentent des valeurs relativement proches de 0,18 à 0,35 ng L<sup>-1</sup> soit 1,8 à 13,2 % de la concentration en Hg<sub>D</sub> total (Tableau 4). Ces sites abritent donc une activité méthylyante qui est vraisemblablement en équilibre avec un phénomène de déméthylation, dans le cas contraire, l'intégralité du substrat inorganique pourrait être méthylyé. Le site NAS-1A, quant à lui, présente une plus forte concentration en MeHg<sub>D</sub> (2,42 ng L<sup>-1</sup>) qu'en Hg<sub>Dinorg</sub> (soit une proportion de 56 % par rapport au Hg<sub>D</sub> total). Une forte concentration en MeHg peut éventuellement traduire un déséquilibre entre la méthylation et la déméthylation. Dans le cas présent, la concentration élevée en matière sèche en suspension (600 mg L<sup>-1</sup>) et l'opacité de l'eau (Figure 23 d et 24 c) qui en résulte (un objet immergé à plus de 5 cm sous la surface n'était pas visible) pourraient limiter la photodéméthylation, le MeHg produit par l'activité bactérienne est donc moins dégradé et s'accumule. Au contraire, l'eau brute du site « contaminé » ANT, présente la plus faible concentration en MeHg<sub>D</sub> (0,039 ng L<sup>-1</sup>) soit une proportion de 0,25 % par rapport au Hg<sub>inorg</sub> ce qui suggère une très faible méthylation nette du mercure dans ce site (faible méthylation brute et/ou forte déméthylation brute).

Enfin, l'énumération des cellules en suspension par marquage au SYBR Green (Tableau 4) donne des valeurs relativement proches, comprises entre  $2,5 \times 10^6$  à  $1,4 \times 10^7$  cell mL<sup>-1</sup>. Ces valeurs sont en accord avec celles rapportées dans la littérature où la densité bactérienne pour différentes mares thermokarstiques (dont KWK-1 et BGR-1) est, en moyenne, comprise entre  $1 \times 10^6$  et  $3 \times 10^7$  cell mL<sup>-1</sup> (Breton *et al.*, 2009 ; Laurion *et al.*, 2010). A titre d'exemple, la densité bactérienne dans les eaux douces de surface en milieu tempéré varie de  $10^4$  et  $10^7$  cell mL<sup>-1</sup> avec une moyenne à  $10^6$  cell mL<sup>-1</sup> (Fry *et al.*, 1988 ; Whitman *et al.*, 1998).

Les plus fortes densités bactériennes ne sont pas forcément rencontrées dans les eaux les plus chargées en MES, ce qui indique que la composition de ces MES peut être de nature plutôt minérale. Aucune relation n'est observée entre la concentration en COT et la densité bactérienne ce qui sous-entend que cette matière organique n'est pas forcément disponible pour être utilisée par les microorganismes présents.

ii) Sédiment de surface

Au même titre que le biofilm, le sédiment de surface, selon son origine, peut être composé d'une fraction variable de matière organique. Dans le cas du site SAS-1 par exemple, où le sédiment de surface se compose de matière végétale (type sphaignes) en décomposition, la MSSC atteint 87,8 % de la matière sèche (Tableau 5). Au contraire, les sédiments de surface des sites KWK-12 et BGR-1 sont de nature quasi-exclusivement minérale. Les autres sites se situent à des valeurs intermédiaires 8 % ; 18 % ; 56 % et 57 % pour respectivement KWK-1, NAS-1A, CAB et ANT. Une composition différente d'un sédiment de surface à l'autre peut entraîner une colonisation par des microorganismes variés (en nature, diversité et densité).

La teneur en COT du sédiment de surface représente environ 1,3 à 9 % de la MS (Tableau 5) ce qui est dans la fourchette des valeurs obtenues par d'autres auteurs (7,7 à 9,2 %, Avramescu *et al.*, 2011) mis à part pour le site SAS-1 où elle atteint 38,7 % ce qui est associé à la forte charge en MSSC. Sur les cinq sites subarctiques, la concentration en COT représente en moyenne  $43 \pm 4$  % de la MSSC (soit une matière organique composée à moitié de carbone). En revanche la matière organique des sédiments de surface des sites lorrains CAB et ANT se révèle moins riche en carbone (respectivement 17 et 22 % de la MSSC).

La concentration en Hg<sub>inorg</sub> particulaire (Hg<sub>P<sub>inorg</sub></sub>) au sein des sédiments de surface des six sites non impactés varie de 14 à 200 ng g<sup>-1</sup> MS (Tableau 5). Pour les cinq sites subarctiques, les concentrations se situent autour de la concentration moyenne dans la croûte terrestre superficielle de 56 µg Kg<sup>-1</sup> (Wedepohl, 1995). Dans le cas du site CAB, la valeur est 4 fois plus élevée que cette moyenne mais reste comprise dans la fourchette de 20 à 500 µg Kg<sup>-1</sup> décrite pour les sédiments ou les sols non contaminés (Ullrich *et al.*, 2001 ; Craig, 1986). En ce qui concerne le sédiment de surface du site contaminé ANT, la concentration en Hg<sub>P<sub>inorg</sub></sub> atteint 267 ng g<sup>-1</sup>. Bien que cette valeur soit la plus élevée, elle reste relativement proche de celle du site CAB. Une mesure effectuée sur la couche de sédiment inférieure (5 à 10 cm de profondeur) donne une concentration de  $33 \pm 4$  µg Kg<sup>-1</sup>, ce qui suggère la présence d'un gradient au fur et à mesure de la profondeur du sédiment. Ainsi, le mercure du sédiment viendrait principalement de la colonne d'eau lors de la sédimentation des MES et de la sorption de Hg dissous sur la phase particulaire.

Tableau 4. Caractérisations physico-chimiques des eaux brutes des sites d'étude. MS : matière sèche ; MSSC : matière sèche sans cendres, COT : concentration en carbone organique total ; les autres concentrations sont exprimées entre crochets ; MH : matière humide (après centrifugation : 5000 × g, 10 min) ; ND : non déterminé ; <LD : inférieur à la limite de détection. La teneur en MeHg<sub>D</sub> est exprimée en % du Hg<sub>D</sub> total entre parenthèses.

	MS mg L <sup>-1</sup>	MSSC mg L <sup>-1</sup> (%)	COT mg L <sup>-1</sup>	[Fe] mg L <sup>-1</sup>	[SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] mg L <sup>-1</sup>	[Cl] mg L <sup>-1</sup>	[NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ] mg L <sup>-1</sup>	[Ca] mg L <sup>-1</sup>	[Mg] mg L <sup>-1</sup>	[Mn] mg L <sup>-1</sup>	[Na] mg L <sup>-1</sup>	[Hg <sub>Dinorg</sub> ] ng L <sup>-1</sup>	[MeHg <sub>D</sub> ] ng L <sup>-1</sup> (%)	Densité cellulaire cell mL <sup>-1</sup>
<b>CAB</b>	75±4	38±3 (50,5%)	6,7	0,27±0,07	4,01	5,95	0,05	41,91	23,25	<LD	4,39	9,71	0,18 (1,8 %)	2,5±0,5×10 <sup>6</sup>
<b>ANT</b>	64±11	27±7 (41,6%)	12	0,31±0,05	3,45	4,78	0,11	ND	ND	ND	ND	15,5	0,039 (0,25 %)	2,9±0,7×10 <sup>6</sup>
<b>KWK-1</b>	42	ND	31	0,59±0,01	2,09	3,79	1,69	ND	ND	ND	ND	4,03	0,22 (5,2 %)	1,4±0,3×10 <sup>7</sup>
<b>KWK-12</b>	15	ND	16	0,71±0,02	2,01	3,58	0,07	ND	ND	ND	ND	2,27	0,35 (13,2 %)	1,3±0,2×10 <sup>7</sup>
<b>NAS-1A</b>	600	ND	13	0,32±0,02	10,05	3,78	0,03	ND	ND	ND	ND	1,87	2,42 (56,0 %)	8,1±1,7×10 <sup>6</sup>
<b>BGR-1</b>	5	ND	38	0,28±0,02	2,58	7,80	0,14	ND	ND	ND	ND	2,34	0,22 (8,7 %)	3,7±0,7×10 <sup>6</sup>
<b>SAS-1</b>	7	ND	9	2,35±0,01	2,70	5,03	5,73	ND	ND	ND	ND	2,85	0,21 (6,7 %)	3,8±1,3×10 <sup>6</sup>





Tableau 5. Caractérisations physico-chimiques des échantillons de biofilm et sédiment de surface pour les sites d'étude. MS : matière sèche ; MSSC : matière sèche sans cendres, COT : concentration en carbone organique total ; les autres concentrations sont exprimées entre crochets ; MH : matière humide (après centrifugation :  $5000 \times g$ , 10 min) ; ND : non déterminé ; <LD : inférieur à la limite de détection. La teneur en MeHg est exprimée en % du Hg total entre parenthèses.

		MS	MSSC	COT	[Hg <sub>inorg</sub> ]	[MeHg]	Densité cellulaire
<b>CAB</b>	Biofilm	$2,6 \pm 0,1 \times 10^{-1} \text{ mg cm}^{-2}$	$1,3 \pm 0,4 \times 10^{-1} \text{ mg cm}^{-2}$ (49 %)	<LD	$4,91 \pm 0,07$ pg cm <sup>-2</sup>	$0,255 \pm 0,011$ pg cm <sup>-2</sup> (4,9 %)	$3,9 \pm 0,5 \times 10^7 \text{ cell cm}^{-2}$
	Sédiment	$505 \pm 5 \text{ mg g}^{-1} \text{ MH}$	$281 \pm 67,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ MH}$ (56 %)	92,5 mg g <sup>-1</sup> MS	$198 \pm 2$ ng g <sup>-1</sup> MS	$4,87 \pm 0,24$ ng g <sup>-1</sup> MS (2,4 %)	$4,5 \pm 0,5 \times 10^{10} \text{ cell g}^{-1} \text{ MS}$
<b>ANT</b>	Sédiment	$476 \pm 20 \text{ mg g}^{-1} \text{ MH}$	$272 \pm 14 \text{ g}^{-1} \text{ MH}$ (57 %)	123,7 mg g <sup>-1</sup> MS	$276 \pm 4$ ng g <sup>-1</sup> MS	$0,36 \pm 0,02$ ng g <sup>-1</sup> MS (0,1 %)	$3,3 \pm 1,2 \times 10^8 \text{ cell g}^{-1} \text{ MS}$
<b>KWK-1</b>	Biofilm	$1,3 \pm 0,1 \times 10^{-1} \text{ mg cm}^{-2}$	$2,6 \pm 0,4 \times 10^{-2} \text{ mg cm}^{-2}$ (20 %)	<LD	$10,3 \pm 0,1$ pg cm <sup>-2</sup>	$0,303 \pm 0,002$ pg cm <sup>-2</sup> (2,8 %)	$6,3 \pm 1,8 \times 10^9 \text{ cell cm}^{-2}$
	Sédiment	$265 \pm 8 \text{ mg g}^{-1} \text{ MH}$	$22 \pm 2 \text{ mg g}^{-1} \text{ MH}$ (8 %)	36,5 mg g <sup>-1</sup> MS	$32,8 \pm 0,2$ ng g <sup>-1</sup> MS	$0,21 \pm 0,01$ ng g <sup>-1</sup> MS (0,6 %)	$2,2 \pm 0,5 \times 10^{10} \text{ cell g}^{-1} \text{ MS}$
<b>KWK-12</b>	Sédiment	$727 \pm 7 \text{ mg g}^{-1} \text{ MH}$	$29 \pm 3 \text{ mg g}^{-1} \text{ MH}$ (4 %)	13,2 mg g <sup>-1</sup> MS	$45,0 \pm 1,4$ ng g <sup>-1</sup> MS	$0,28 \pm 0,00$ ng g <sup>-1</sup> MS (0,6 %)	$3,7 \pm 1,1 \times 10^9 \text{ cell g}^{-1} \text{ MS}$
<b>NAS-1A</b>	Biofilm	$1,7 \pm 0,1 \times 10^{-1} \text{ mg cm}^{-2}$	$7,0 \pm 4,0 \times 10^{-3} \text{ mg cm}^{-2}$ (4 %)	<LD	$2,63 \pm 0,10$ pg cm <sup>-2</sup>	$0,055 \pm 0,004$ pg cm <sup>-2</sup> (2,0 %)	$3,4 \pm 1,2 \times 10^9 \text{ cell cm}^{-2}$

Chapitre 2

	Sédiment	461±62 mg g <sup>-1</sup> MH	83±34 mg g <sup>-1</sup> MH (17 %)	78,6 mg g <sup>-1</sup> MS	14,2±0,3 ng g <sup>-1</sup> MS	0,79±0,03 ng g <sup>-1</sup> MS (5,3 %)	8,3±2,2×10 <sup>9</sup> cell g <sup>-1</sup> MS
<b>BGR-1</b>	Biofilm	1,1±0,1×10 <sup>-1</sup> mg cm <sup>-2</sup>	2,0±0,6×10 <sup>-1</sup> mg cm <sup>-2</sup> (18 %)	<LD	7,86±0,14 pg cm <sup>-2</sup>	0,132±0,003 pg cm <sup>-2</sup> (1,7 %)	2,8±0,8×10 <sup>8</sup> cell cm <sup>-2</sup>
	Sédiment	717±3 mg g <sup>-1</sup> MH	22±1 mg g <sup>-1</sup> MH (3 %)	14,9 mg g <sup>-1</sup> MS	4,1±0,2 ng g <sup>-1</sup> MS	0,08±0,00 ng g <sup>-1</sup> MS (1,9 %)	5,4±1,5×10 <sup>9</sup> cell g <sup>-1</sup> MS
<b>SAS-1</b>	Biofilm	2,8±0,2×10 <sup>-2</sup> mg cm <sup>-2</sup>	1,3±0,2×10 <sup>-2</sup> mg cm <sup>-2</sup> (47 %)	<LD	2,66±0,17 pg cm <sup>-2</sup>	0,075±0,006 pg cm <sup>-2</sup> (2,7 %)	6,5±1,1×10 <sup>7</sup> cell cm <sup>-2</sup>
	Sédiment	99±5 mg g <sup>-1</sup> MH	87±5 mg g <sup>-1</sup> MH (88 %)	387 mg g <sup>-1</sup> MS	47,8±0,8 ng g <sup>-1</sup> MS	1,45±0,08 ng g <sup>-1</sup> MS (2,9 %)	1,4±0,4×10 <sup>10</sup> cell g <sup>-1</sup> MS

La concentration en MeHg<sub>p</sub> au sein des sédiments de surface des sites subarctiques est comprise entre 0,08 et 1,45 ng g<sup>-1</sup> MS (Tableau 5). Cela représente un ratio MeHg<sub>p</sub>/Hg<sub>P<sub>inorg</sub></sub> de 0,64 et 0,62 % respectivement pour les sites KWK-1 et KWK-12 et de 5,59 ; 2,06 et 3,03 % respectivement pour les sites NAS-1A, BGR-1 et SAS-1. Au vu de ces concentrations, on peut donc s'attendre à mettre en évidence une activité méthylante globale plus forte au sein de ces trois derniers sites. La similitude des profils en MeHg<sub>p</sub> des sites KWK-1 et KWK-12 peut s'expliquer par la proximité géographique des deux sites (distants d'une cinquantaine de mètres).

Un nombre plus important de valeurs ainsi qu'une meilleure dispersion sont nécessaires pour établir un lien statistique solide entre les concentrations en Hg<sub>D<sub>inorg</sub></sub> et MeHg<sub>D</sub> dans les eaux brutes avec les concentrations en Hg<sub>P<sub>inorg</sub></sub> et MeHg<sub>p</sub> des sédiments de surface et des biofilms. Toutefois, une corrélation (au seuil de 99 %) a été établie entre les concentrations en Hg<sub>D<sub>inorg</sub></sub> des eaux brutes et les concentrations en Hg<sub>P<sub>inorg</sub></sub> dans les sédiments de surface. En revanche aucun lien significatif n'a pu être mis en évidence entre les concentrations en Hg<sub>D<sub>inorg</sub></sub> avec celles en Hg<sub>P<sub>inorg</sub></sub> des biofilms, ni pour les concentrations en MeHg<sub>D</sub> et MeHg<sub>p</sub>.

Enfin, la densité bactérienne au sein des sédiments de surface varie de 3,7×10<sup>9</sup> à 4,5×10<sup>10</sup> cell g<sup>-1</sup> MS (Tableau 5) et semble corrélée à la richesse du sédiment en matière organique. A titre d'exemple, le sédiment de surface du site CAB composé à 55 % de matière organique présente une densité cellulaire de 4,5×10<sup>10</sup> cell g<sup>-1</sup> MS alors qu'un site comme BGR-1 dont le sédiment de surface ne contient que 3,1% de matière organique présente une densité 10 fois inférieure (5,4×10<sup>9</sup> cell g<sup>-1</sup> MS).

Il est difficile de comparer ces données avec la littérature où la densité cellulaire dans le sédiment est généralement exprimée par unité de volume de sédiment (cell cm<sup>-3</sup>). Pour cela, il aurait fallu déterminer les masses volumiques des sédiments de surface des différents sites.

iii) Biofilm

Les masses de matière sèche par centimètre carré de biofilm sont relativement proches entre les échantillons des différents sites d'étude allant de  $2,8 \times 10^{-2}$  à  $2,6 \times 10^{-1}$  mg cm<sup>-2</sup> (Tableau 5). En comparaison, Huguet *et al.* (2010) rapportaient des valeurs de l'ordre de  $5 \times 10^{-2}$  mg cm<sup>-2</sup> (soit 2 fois plus de MS par unité de surface) pour des biofilms issus du milieu tropical.

Le pourcentage de « matière organique » (MSSC) est très variable selon les sites, il est de 4 % pour le site NAS-1A à 47 et 49 % pour respectivement les sites SAS-1 et CAB. Les sites BGR-1 et KWK-1 présentent des valeurs intermédiaires de 18 et 20 % (Tableau 5). Ces variations peuvent provenir de la sédimentation de particules minérales en suspension dans l'eau (cas du site NAS-1A particulièrement chargée en matière en suspension) ou de la précipitation de sels dissous au contact du biofilm. Une faible proportion de matières organiques au sein du biofilm peut aussi témoigner d'une forte minéralisation de cette matière organique par l'activité bactérienne.

La concentration en COT au sein des biofilms n'est pas suffisamment importante pour être mesurable avec les quantités analysées (soit  $< 0,12$  µg cm<sup>-2</sup>) (Tableau 5). Il aurait fallu, pour dépasser le seuil de détection, utiliser un plus grand nombre de supports.

La concentration en Hg<sub>P<sub>inorg</sub></sub> au sein des biofilms est comprise entre 2,6 pg cm<sup>-2</sup> pour le site NAS-1A et 10,3 pg cm<sup>-2</sup> pour KWK-1 (Tableau 5). Ces valeurs sont relativement faibles comparées à celles d'autres études portant sur des environnements impactés comme la retenue du barrage de Petit Saut en Guyane (Huguet *et al.*, 2010) (teneurs 1000 fois supérieures). En ce qui concerne le site CAB, la teneur en Hg<sub>P<sub>inorg</sub></sub> du biofilm (19 ng g<sup>-1</sup> MS) est dix fois inférieure à celle du sédiment de surface (198 ng g<sup>-1</sup> MS) alors que pour les sites subarctiques, les teneurs en Hg<sub>P<sub>inorg</sub></sub> sont équivalentes entre les biofilms (17 à 70 ng g<sup>-1</sup> MS) et les sédiments de surface (4 à 50 ng g<sup>-1</sup> MS), ce qui signifie que sur ces sites, le mercure inorganique ne se fixe pas préférentiellement dans les biofilms ou dans les sédiments.

Le MeHg<sub>P</sub> a été trouvé dans les biofilms à des teneurs allant de 0,055 à 0,303 pg cm<sup>-2</sup> et à des proportions de 1,7 à 4,9 % du Hg<sub>P</sub> total (Tableau 5). Dans l'ensemble, la proportion MeHg<sub>P</sub>/Hg<sub>P<sub>total</sub></sub> est relativement proche entre le biofilm et le sédiment de surface. Les biofilms étudiés ici n'apparaissent donc pas comme un compartiment microbien où le MeHg s'accumule particulièrement par rapport au sédiment de surface. Cela peut traduire une faible proportion, au sein du biofilm, d'EPS hydrophobes susceptibles de complexer le MeHg ou que la nature des biofilms et des sédiments de surface sont relativement similaires.

Enfin, en ce qui concerne la densité cellulaire au sein de ces biofilms, les valeurs varient entre  $3,9 \times 10^7$  et  $6,3 \times 10^9$  cell cm<sup>-2</sup> (Tableau 5). A titre d'exemple, la densité cellulaire au sein de biofilms de réseaux d'eau potable peut atteindre  $10^4$  à  $10^7$  cell cm<sup>-2</sup>, selon la durée de développement du biofilm, du matériau utilisé et de la méthode de comptage des bactéries (Boe-Hansen *et al.*, 2002 ; Batté *et al.*, 2003 ; Langmark *et al.*, 2005 ; Percival *et al.*, 1998 ; Sibille *et al.*, 1998). Il est attendu que dans une eau brute chargée en matière organique (contrairement à l'eau potable), la densité au sein de biofilms puisse atteindre 100 fois celles de biofilms d'eau potable.

## **2) Vitesses de méthylation du mercure des trois compartiments microbiens (eaux brutes, biofilms, sédiments de surface)**

Les potentiels de méthylation mesurés au cours des incubations des différents compartiments microbiens sont détaillés dans le Tableau 6. L'évolution des potentiels de méthylation des échantillons au cours du temps est présentée dans la Figure 29 pour les sites subarctiques et dans la Figure 30 pour le site lorrain CAB.

Avant de déterminer les vitesses de méthylation des différents échantillons, on peut noter que, dans la majorité des cas où une activité méthylante est observée, une phase de plateau apparaît (*e.g.* CAB ; biofilm + EBA à partir du quatrième jour, Figure 30). La limitation en éléments nutritifs pourrait entraîner une baisse de l'activité cellulaire et ainsi un arrêt de la méthylation. Bien que ni les substrats carbonés, ni les couples donneurs/accepteurs d'électrons n'aient été identifiés dans les milieux d'incubation, cette hypothèse peut être appuyée en se basant sur la quantité de COT consommée par cellule et par jour. En considérant la densité bactérienne incubée, la teneur en COT et la durée d'incubation, les quantités de COT consommé par cellule et par jour varient entre  $\approx 10$  et  $\approx 100$  fmol COT cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> selon les échantillons (détail du calcul en Annexes, Note A1). Selon la littérature (Ploug *et al.*, 1999), les valeurs peuvent varier de  $\approx 7$  à  $\approx 70$  fmol COT cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Il est donc tout à fait vraisemblable que l'arrêt de la méthylation soit dû à la limitation en substances nutritives. Pour le confirmer, il serait intéressant de suivre la concentration en COT dans le milieu réactionnel au cours des incubations.

Les vitesses de méthylation correspondent au coefficient directeur de la droite de régression linéaire appliquée à la variation des potentiels de méthylation en fonction du temps. Dans le cas où un plateau est atteint, la vitesse de méthylation n'est calculée que sur la partie linéaire de la courbe

en amont du plateau. A titre d'exemple, la vitesse de méthylation de l'échantillon « biofilm + EBA » du site CAB (Figure 30) correspond au potentiel de méthylation à 4 jours (premier point du plateau) soit  $5,9 \times 10^{-9}$  %MeHg cell<sup>-1</sup> divisé par la durée d'incubation correspondante (4 j et non 7 j ce qui conduirait à sous-estimer la vitesse) soit  $1,5 \times 10^{-9}$  %MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>.

Ainsi, ces résultats confirment la nécessité de suivre la méthylation par des prélèvements réguliers plutôt que de ne faire qu'une seule mesure du potentiel à un temps donné et ce afin d'éviter de sous-estimer la vitesse dans le cas d'un arrêt de la méthylation avant la fin de l'incubation. Ceci montre aussi la limite des incubations en batch (système fermé) par rapport au milieu naturel ouvert (où il est peu probable que le COT soit limitant aussi rapidement). La vitesse de méthylation telle que nous l'avons déterminée ici correspond à la situation où le COT n'est pas limitant ce qui est plus représentatif du milieu environnemental.

Les valeurs des vitesses de méthylation des différents échantillons sont détaillées dans le Tableau 7 et représentés dans la Figure 31. Le Tableau 7 présente aussi les vitesses de déméthylation associés aux différents échantillons, calculés selon l'équation [4] d'après les teneurs en MeHg et Hg<sub>inorg</sub> naturelles mesurées au sein des échantillons environnementaux.

Tableau 6. Potentiels de méthylation des différents compartiments (eau brute, biofilm et sédiment de surface) normalisés par la masse de matière sèche (%Me<sup>199</sup>Hg g<sup>-1</sup>MS) ou par la densité bactérienne (%Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup>) incubées. Les incubations ont été effectuées dans l'eau brute du site, non filtrée, stérilisée par la chaleur (eau brute autoclavée = EBA) ou non (eau brute = EB) et dégazée par barbotage de N<sub>2</sub> (99 %). Le temps d'incubation final varie entre 5 (pour les sites subarctiques) et 7 j (pour les sites lorrains). L'erreur relative moyenne est de 15 % pour les sites CAB et ANT et de 30 % pour les sites subarctiques.

Site d'étude	Compartiment incubé	Bactéries (cell)	MS (mg)	2 j		4 j		5 ou 7 j	
				%Me <sup>199</sup> Hg mg <sup>-1</sup> MS	%Me <sup>199</sup> Hg cell <sup>-1</sup>	%Me <sup>199</sup> Hg mg <sup>-1</sup> MS	%Me <sup>199</sup> Hg cell <sup>-1</sup>	%Me <sup>199</sup> Hg mg <sup>-1</sup> MS	%Me <sup>199</sup> Hg cell <sup>-1</sup>
CAB	Eau brute	2,5×10 <sup>8</sup>	7,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Biofilm + EBA	2,1×10 <sup>9</sup>	21,4	2,7×10 <sup>-1</sup>	2,8×10 <sup>-9</sup>	5,7×10 <sup>-1</sup>	5,9×10 <sup>-9</sup>	6,3×10 <sup>-1</sup>	6,5×10 <sup>-9</sup>
	Biofilm + eau brute	2,3×10 <sup>9</sup>	21,4	7,8×10 <sup>-2</sup>	7,2×10 <sup>-10</sup>	1,1×10 <sup>-1</sup>	1,0×10 <sup>-9</sup>	2,6×10 <sup>-1</sup>	1,4×10 <sup>-9</sup>
	Sédiment + EBA	4,6×10 <sup>10</sup>	1016	2,0×10 <sup>-2</sup>	4,4×10 <sup>-10</sup>	3,8×10 <sup>-2</sup>	8,5×10 <sup>-10</sup>	3,5×10 <sup>-2</sup>	7,7×10 <sup>-10</sup>
	Sédiment + eau brute	4,6×10 <sup>10</sup>	1016,	3,0×10 <sup>-2</sup>	6,8×10 <sup>-10</sup>	5,6×10 <sup>-21</sup>	1,2×10 <sup>-9</sup>	4,1×10 <sup>-2</sup>	9,2×10 <sup>-10</sup>
ANT	Sédiment + EBA	1×10 <sup>10</sup>	1428	ND	ND	ND	ND	4,9×10 <sup>-1</sup>	5,0×10 <sup>-10</sup>
KWK-1	Eau brute	1,42×10 <sup>9</sup>	ND	NA	ND	NA	ND	NA	<LD
	Biofilm + EBA	6,29×10 <sup>10</sup>	7,2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Biofilm + eau brute	6,43×10 <sup>10</sup>	7,2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Sédiment + EBA	1,08×10 <sup>10</sup>	501	4,0×10 <sup>-3</sup>	1,9×10 <sup>-10</sup>	3,5×10 <sup>-3</sup>	1,6×10 <sup>-10</sup>	1,4×10 <sup>-3</sup>	2,5×10 <sup>-10</sup>
	Sédiment + eau brute	1,26×10 <sup>10</sup>	517	ND	ND	4,3×10 <sup>-4</sup>	1,8×10 <sup>-11</sup>	9,0×10 <sup>-4</sup>	3,8×10 <sup>-11</sup>
KWK-12	Eau brute	1,27×10 <sup>9</sup>	ND	NA	ND	NA	<LD	NA	<LD
	Sédiment + EBA	6,0×10 <sup>9</sup>	1591	4,8×10 <sup>-5</sup>	1,3×10 <sup>-11</sup>	1,2×10 <sup>-4</sup>	3,2×10 <sup>-11</sup>	2,8×10 <sup>-4</sup>	7,4×10 <sup>-11</sup>
	Sédiment + eau brute	7,33×10 <sup>9</sup>	1605	8,8×10 <sup>-5</sup>	1,9×10 <sup>-11</sup>	8,6×10 <sup>-5</sup>	1,9×10 <sup>-11</sup>	1,8×10 <sup>-4</sup>	3,9×10 <sup>-11</sup>
NAS-1A	Eau brute	8,07×10 <sup>8</sup>	ND	NA	ND	NA	<LD	NA	<LD
	Biofilm + EBA	3,43×10 <sup>10</sup>	9,3	ND	ND	ND	ND	<LD	<LD
	Biofilm + eau brute	3,51×10 <sup>10</sup>	9,3	ND	ND	ND	ND	<LD	<LD
	Sédiment + EBA	7,82×10 <sup>9</sup>	940	ND	ND	1,7×10 <sup>-2</sup>	2,1×10 <sup>-9</sup>	1,7×10 <sup>-2</sup>	2,1×10 <sup>-9</sup>
	Sédiment + eau brute	8,74×10 <sup>9</sup>	954	4,0×10 <sup>-4</sup>	4,3×10 <sup>-11</sup>	1,5×10 <sup>-2</sup>	1,6×10 <sup>-9</sup>	1,6×10 <sup>-2</sup>	1,7×10 <sup>-9</sup>
BGR-1	Eau brute	3,75×10 <sup>8</sup>	ND	NA	ND	NA	6,8×10 <sup>-10</sup>	NA	1,9×10 <sup>-10</sup>



Chapitre 2

	Biofilm + EBA	$2,75 \times 10^9$	6,1	ND	<b>ND</b>	ND	<b>ND</b>	$3,0 \times 10^{-2}$	<b><math>6,9 \times 10^{-11}</math></b>
	Biofilm + eau brute	$3,13 \times 10^9$	6,1	ND	<b>ND</b>	ND	<b>ND</b>	$2,7 \times 10^{-2}$	<b><math>5,4 \times 10^{-11}</math></b>
	Sédiment + EBA	$8,23 \times 10^9$	1520	$2,8 \times 10^{-3}$	<b><math>5,3 \times 10^{-10}</math></b>	ND	<b>ND</b>	$1,5 \times 10^{-2}$	<b><math>2,8 \times 10^{-9}</math></b>
	Sédiment + eau brute	$8,2 \times 10^9$	1446	$1,5 \times 10^{-3}$	<b><math>2,7 \times 10^{-10}</math></b>	$1,5 \times 10^{-2}$	<b><math>2,7 \times 10^{-9}</math></b>	$1,4 \times 10^{-2}$	<b><math>2,4 \times 10^{-9}</math></b>
<b>SAS-1</b>	Eau brute	$3,76 \times 10^8$	ND	NA	<b>ND</b>	NA	<b>&lt;LD</b>	NA	<b>&lt;LD</b>
	Biofilm + EBA	$6,45 \times 10^8$	1,5	ND	<b>ND</b>	<LD	<b>&lt;LD</b>	<LD	<b>&lt;LD</b>
	Biofilm + eau brute	$1,02 \times 10^9$	1,5	ND	<b>ND</b>	<LD	<b>&lt;LD</b>	<LD	<b>&lt;LD</b>
	Sédiment + EBA	$2,82 \times 10^9$	196	$8,5 \times 10^{-3}$	<b><math>5,9 \times 10^{-10}</math></b>	$3,3 \times 10^{-2}$	<b><math>2,2 \times 10^{-9}</math></b>	$3,5 \times 10^{-2}$	<b><math>2,4 \times 10^{-9}</math></b>
	Sédiment + eau brute	$3,29 \times 10^9$	202	$5,3 \times 10^{-3}$	<b><math>3,3 \times 10^{-10}</math></b>	$2,1 \times 10^{-2}$	<b><math>1,3 \times 10^{-9}</math></b>	$2,3 \times 10^{-2}$	<b><math>1,4 \times 10^{-9}</math></b>

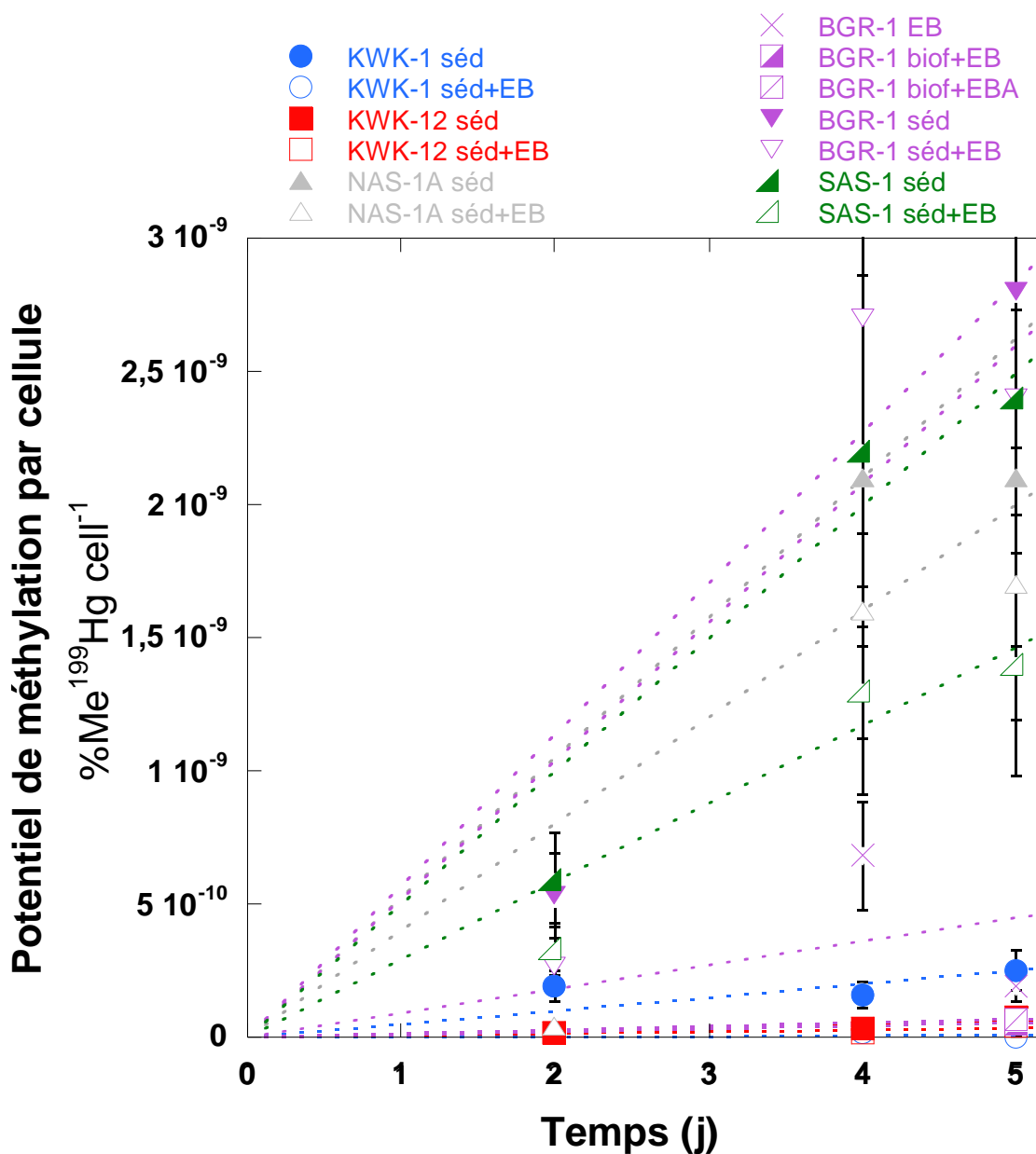


Figure 29. Evolution du potentiel de méthylation (%Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup>) au cours des incubations des échantillons des différents sites subarctiques (KWK-1, KWK-12, NAS-1A, BGR-1 et SAS-1). Les incubations ont été réalisées en présence de <sup>199</sup>Hg<sub>inorg</sub>, à 25 °C, à l'obscurité et en anoxie. Des régressions linéaires (en pointillés) ont été utilisées sur les 3 à 4 premiers points (en incluant le point à t<sub>0</sub>) pour estimer les vitesses de méthylation. EB : eau brute ; EBA : eau brute autoclavée ; séd : sédiment de surface ; biof : biofilm.

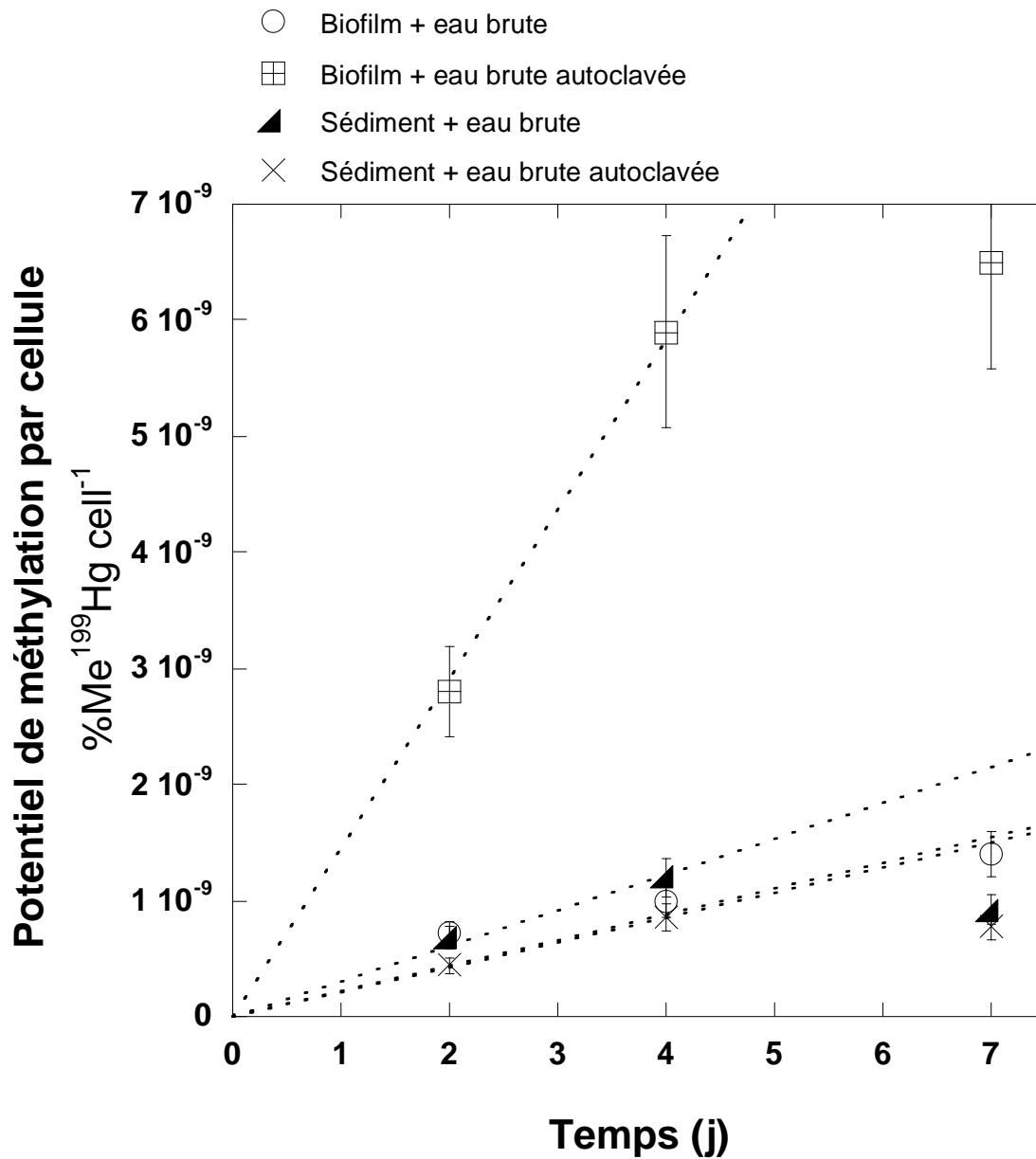


Figure 30. Evolution du potentiel de méthylation ( $\%Me^{199}Hg\ cell^{-1}$ ) au cours des incubations des échantillons du site lorrain CAB. Les incubations ont été réalisées en présence de  $^{199}Hg_{inorg}$ , à 25 °C, à l'obscurité et en anoxie. Des régressions linéaires (en pointillés) ont été utilisées sur les 3 à 4 premiers points (en incluant le point à  $t_0$ ) pour estimer les vitesses de méthylation.

Tableau 7. Vitesses de méthylation du mercure des différents compartiments (présentant une activité méthylante détectable *i.e.* >LD) normalisées par la densité bactérienne incubée (%MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>), calculés d'après l'équation [3] avec une erreur relative de ± 16 % pour les sites CAB et ANT et de ± 30 % pour les sites subarctiques. Les vitesses de déméthylation (%DeMeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>), calculées d'après l'équation [4] (considérant les concentrations naturelles en Hg<sub>inorg</sub> et MeHg dans les échantillons à l'équilibre), ainsi que les ratios déméthylation/méthylation sont aussi présentés. On considère que deux ratios sont significativement différents s'ils diffèrent de plus de 30 %.

Site d'étude	Compartiment incubé	%MeHg cell <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>	%DeMeHg cell <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>	$\frac{(\%DeMeHg\ cell^{-1}\ j^{-1})}{(\%MeHg\ cell^{-1}\ j^{-1})}$
<b>CAB</b>	Biofilm + EB	2,0×10 <sup>-10</sup>	3,9×10 <sup>-9</sup>	19±6
	Biofilm + EBA	1,5×10 <sup>-9</sup>	2,9×10 <sup>-8</sup>	
	Sédiment + EB	3,1×10 <sup>-10</sup>	1,3×10 <sup>-8</sup>	41±12
	Sédiment + EBA	2,1×10 <sup>-10</sup>	8,6×10 <sup>-9</sup>	
<b>ANT</b>	Sédiment + EBA	7,1×10 <sup>-11</sup>	5,5×10 <sup>-8</sup>	767±230
<b>KWK-1</b>	Sédiment + EB	8,0×10 <sup>-12</sup>	1,2×10 <sup>-9</sup>	156±47
	Sédiment + EBA	5,0×10 <sup>-11</sup>	7,8×10 <sup>-9</sup>	
<b>KWK-12</b>	Sédiment + EB	8,0×10 <sup>-12</sup>	1,3×10 <sup>-9</sup>	161±48
	Sédiment + EBA	1,5×10 <sup>-11</sup>	2,4×10 <sup>-9</sup>	
<b>NAS-1A</b>	Sédiment + EB	4,0×10 <sup>-10</sup>	7,2×10 <sup>-9</sup>	18±5
	Sédiment + EBA	5,3×10 <sup>-10</sup>	9,5×10 <sup>-9</sup>	
<b>BGR-1</b>	Eau brute	3,8×10 <sup>-11</sup>	4,1×10 <sup>-10</sup>	11±3
	Biofilm + EB	1,1×10 <sup>-11</sup>	6,4×10 <sup>-10</sup>	59±18
	Biofilm + EBA	1,4×10 <sup>-11</sup>	8,1×10 <sup>-10</sup>	
	Sédiment + EB	6,8×10 <sup>-10</sup>	3,5×10 <sup>-8</sup>	51±15
	Sédiment + EBA	5,6×10 <sup>-10</sup>	3,6×10 <sup>-8</sup>	
<b>SAS-1</b>	Sédiment + EB	3,3×10 <sup>-10</sup>	1,1×10 <sup>-8</sup>	33±10
	Sédiment + EBA	5,5×10 <sup>-10</sup>	1,8×10 <sup>-8</sup>	

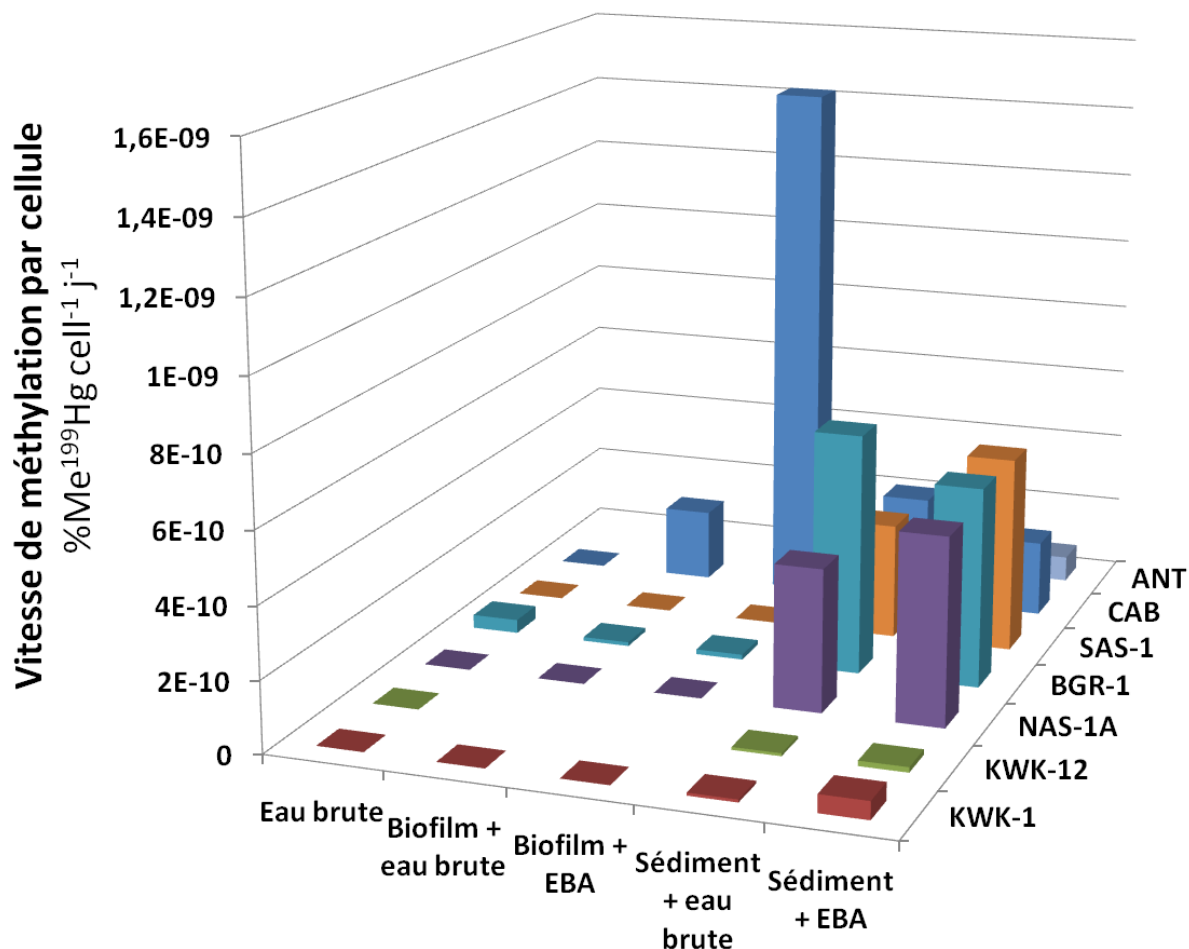


Figure 31. Vitesses de méthylation ( $\%Me^{199}Hg \text{ cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) des différents compartiments microbiens des sept sites d'étude. EBA : eau brute autoclavée. Un emplacement vide signifie que la vitesse n'a pas été déterminée.

a) Eau brute

L'eau brute ne présente pas d'activité de méthylation détectable excepté pour le site BGR-1 où la valeur reste relativement faible (environ 20 fois inférieur à celui du sédiment de surface) (Tableau 6). Pour l'ensemble des sites étudiés, la contribution de l'eau brute (comprenant les MES dont des cellules en suspension) à la méthylation du Hg reste donc très faible voire négligeable par rapport aux autres compartiments.

b) Biofilm

Concernant le biofilm, une activité méthylyante significative a été mesurée pour les sites CAB et BGR-1 uniquement (Tableau 6). Dans le cas de BGR-1, les vitesses de méthylyation sont quasiment les mêmes pour le biofilm qu'il soit incubé dans l'eau brute autoclavée (EBA) ou non (EB) (Tableau 7). Cependant, les valeurs obtenues pour le site BGR-1 approchent de la limite de détection contrairement au biofilm du site CAB qui présente des vitesses jusqu'à 100 fois supérieures. L'activité « méthylyante » du biofilm du site BGR-1 peut être considérée comme négligeable. De fait, seuls les biofilms du site CAB présentent une activité méthylyante significative. Celle-ci est environ dix fois supérieure lorsque le biofilm est incubé avec l'EBA qu'avec l'EB. Ce résultat a été confirmé par la suite lors de l'incubation de biofilms déstructurés (Chapitre 2 III.2.c). L'eau brute autoclavée influence donc positivement la vitesse de méthylyation du biofilm du site CAB mais pas celles des sédiments de surface.

Une hypothèse peut être évoquée pour expliquer cet effet de l'eau brute : dans le cas où l'eau brute n'est pas autoclavée, les cellules qu'elle apporte peuvent consommer le COT mais sans participer pour autant à la méthylyation. La quantité de substrat utilisable pour les cellules méthylyantes du biofilm s'en trouverait donc réduite, diminuant ainsi l'activité cellulaire (probablement déjà inférieure pour les cellules du biofilm par rapport à celle des cellules planctoniques) et, par là même, l'activité méthylyante. Si l'on considère une quantité de COT consommée par cellules et par jour moyenne de 50 fmol (comme expliqué précédemment), on peut estimer que l'activité respiratoire des cellules apportées par l'eau brute peut être responsable de la consommation de seulement  $\approx 9\%$  du COT initial. Cette hypothèse est donc peu plausible.

A l'inverse, dans le cas où l'eau brute a été stérilisée, les cellules mortes stérilisées peuvent servir de source de nutriments et contribuer à l'activité métabolique des cellules du biofilm. La quantité de cellules dans 100 mL d'eau brute du site CAB représente  $2,5 \times 10^8$  cellules ; si l'on considère une masse moyenne de  $0,3 \text{ fg cell}^{-1}$  (Ingraham *et al.*, 1983) et qu'une cellule contient environ 50 % de carbone, la stérilisation appliquée à l'eau brute peut apporter environ 40  $\mu\text{g}$  de C dans le flacon d'incubation. Seule une fraction ( $\approx 20\%$ , *e.g.* Servais *et al.*, 1987) de ce C est biodisponible, soit environ 8  $\mu\text{g}$ . Cette quantité ne représente que  $\approx 6\%$  de la quantité de COT disponible apporté par 100 mL d'eau brute ( $6,7 \text{ mg L}^{-1} \times 0,1 \text{ L} \times 0,2 = 134 \mu\text{g}$ ). La stérilisation de l'eau brute avant l'incubation contribue donc relativement peu à l'apport de substrats carbonés utilisables par les cellules du biofilm mais on ne peut pas exclure que cette quantité supplémentaire de COT disponible puisse suffire à exacerber une activité cellulaire méthylyante. Dans le cas des

incubations de sédiments, l'apport de l'eau brute autoclavée en COT disponible ne représente que 0,04 % du COT disponible initialement (soit  $\approx 100$  fois moins que dans les cas des incubations de biofilms) ce qui peut expliquer que, dans le cas des sédiments, l'incubation dans l'EBA n'ait aucun impact sur l'activité méthylyante.

Au sein des sites subarctiques, le biofilm ne contribue pas de façon prépondérante à la méthylyation du mercure. Dans le cas du site lorrain CAB, en revanche, le biofilm participe à la méthylyation du mercure à une vitesse au moins équivalente à celle du sédiment de surface (Tableau 7).

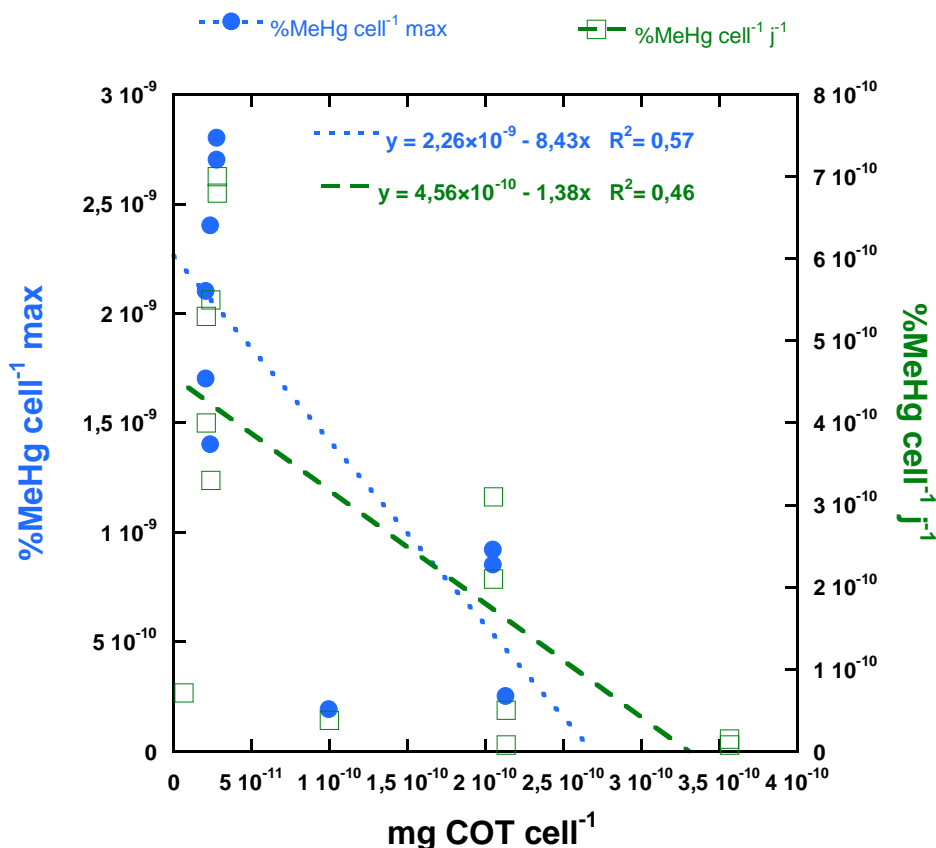
Cette variabilité dans l'activité méthylyante du biofilm selon le site peut s'expliquer par des différences de composition/diversité/densité bactérienne entre le biofilm et le sédiment de surface. Dans tous les cas, la colonisation des supports a été effective (Tableau 4), malgré cela, les biofilms des sites subarctiques ne semblent pas abriter de microorganismes méthylyants contrairement aux sédiments de surface. La capacité variable du biofilm à méthylyer le Hg peut être liée à l'environnement dans lequel il s'est développé. Les biofilms des supports placés en suspension dans la colonne d'eau ont peut être été colonisés par une plus grande proportion de bactéries aérobies que les supports placés au fond (dans le cas du site CAB). Ceux-ci se sont développés dans des conditions plus proches de celles qu'abrite le sédiment de surface ce qui pourrait expliquer leur capacité à méthylyer le mercure.

Il semble donc que la capacité du biofilm à méthylyer le mercure dépende plus des conditions dans lesquelles il s'est développé que d'une réelle spécificité de ce compartiment microbien.

### c) Sédiment de surface

Les sédiments de surface des sept sites d'étude, méthylyent le mercure à des vitesses comprises entre  $8,0 \times 10^{-12}$  et  $5,3 \times 10^{-10}$  %Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> et ce, de façon relativement équivalente qu'ils soient incubés dans l'eau brute ou dans l'eau brute autoclavée. Tout comme précédemment pour l'eau brute et le biofilm du site BGR-1, les sédiments des sites KWK-1 et KWK-12 présentent des potentiels de méthylyation non nuls mais très proches de la limite de détection. Les vitesses qui en découlent ( $8,0 \times 10^{-12}$  à  $5,0 \times 10^{-11}$  %Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) sont 1 à 2 ordres de grandeur inférieures à ceux des sites CAB, NAS-1A, BGR-1 et SAS-1 (entre  $3,3 \times 10^{-10}$  et  $7,0 \times 10^{-10}$  %Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>). Les résultats similaires observés sur les deux sites KWK-1 et KWK-12 peuvent aussi s'expliquer ici

par leur proximité géographique (Tableaux 3, 4 et 5). Les sites KWK-1 et KWK-12 se distinguent des trois autres sites subarctiques par des valeurs de conductivité et de pH inférieures (Tableau 3) ainsi qu'une plus forte densité bactérienne dans l'eau brute (supérieure d'un ordre de grandeur). Le sédiment de surface du site ANT, contaminé par une pollution au mercure, se situe quant à lui à niveau intermédiaire ( $7,1 \times 10^{-11}$  %Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>).



**Figure 32.** Variation du potentiel de méthylation maximal (%MeHg cell<sup>-1</sup> max en bleu) ou de la vitesse de méthylation (%MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en vert) en fonction de la quantité de COT par cellule incubée (mg COT cell<sup>-1</sup>). Les coefficients de détermination (R<sup>2</sup>) des droites de régression linéaire ont été utilisés afin de déterminer les coefficients de corrélation.

Une relation a été recherchée entre les vitesses des différents échantillons et les paramètres physico-chimiques des sites d'étude. Parmi les paramètres considérés (COT, densité bactérienne, [SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>], [Fe], pH), seule la quantité de COT normalisée par le nombre de cellules incubées (COT cell<sup>-1</sup>) semble être liée à l'activité méthylante. La quantité de COT cell<sup>-1</sup> est linéairement corrélée avec le potentiel de méthylation maximum (%MeHg cell<sup>-1</sup> max) (au seuil de 95 %) et avec la vitesse de méthylation (%MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) (au seuil de 99 %) (Figure 32). Ces résultats appuient l'hypothèse



selon laquelle l'arrêt de la méthylation (apparition du plateau) peut être relié à la limitation du milieu en substrat pour l'activité cellulaire.

En ce qui concerne le site ANT, si la contamination au mercure est confirmée par la teneur élevée en  $Hg_{inorg}$  ( $276 \text{ ng g}^{-1} \text{ MS}$ ) mesurée dans le sédiment de surface (Tableau 5), qu'en est-il de la capacité à méthyler le mercure ? L'exposition préalable au mercure des microorganismes du sédiment peut-elle avoir un impact sur leur vitesse de méthylation via, par exemple, une sélection de microorganismes méthylants/déméthylants ? La vitesse de méthylation du sédiment de surface du site ANT ( $7,1 \times 10^{-11} \% \text{Me}^{199}\text{Hg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) est 3 à 4 fois inférieure à celle du site CAB (2,1 à  $3,1 \times 10^{-10} \% \text{Me}^{199}\text{Hg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) et en moyenne 7 fois inférieure à celles des sédiments de surface de NAS-1A, BGR-1 et SAS-1 ( $\approx 5 \times 10^{-10} \% \text{Me}^{199}\text{Hg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ). D'après ces résultats, il semble que les microorganismes issus de ce sédiment contaminé au mercure présentent une vitesse de méthylation inférieure à celle de microorganismes provenant de zones non exposées. Cette observation est en accord avec les résultats de Gilmour et Henry (1991) ainsi que Oremland *et al.* (1995) qui décrivent une méthylation nette inférieure au sein de sédiments contaminés en Hg par rapport à des sédiments peu contaminés.

En effet, pour une densité bactérienne de l'ordre de  $10^7 \text{ cell mL}^{-1}$  ou plus (Rasmussen *et al.*, 1997), le seuil d'activation de l'opéron *mer* est de l'ordre de  $10^{-8} \text{ M}$  soit  $2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (Brown *et al.*, 2003 ; Yu *et al.*, 1996). Si dans le cas des sédiments non contaminés (autour de  $50 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$  de Hg), la concentration finale en Hg dans le flacon d'incubation ( $[\text{Hg}] \approx 1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  ; détail du calcul en Annexes, Note A2) reste inférieure à cette valeur, en ce qui concerne l'incubation du sédiment de surface du site ANT, la teneur en Hg total atteint  $4,9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  soit deux fois et demi le seuil d'activation de l'opéron *mer*. Ainsi, une fraction du mercure présent dans le flacon d'incubation serait réduite par ce mécanisme de détoxification et ne pourrait donc plus servir de substrat à la méthylation. Dans ce cas précis, la vitesse de méthylation pourrait donc baisser, du fait de la compétition avec la réduction du  $Hg_{inorg}$  par les enzymes de l'opéron *mer*. A titre d'exemple, le taux de réduction par ce mécanisme qui est décrit dans la littérature varie de 0,13 à  $14,4 \text{ pg Hg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$  (Summers et Silver, 1972 ; Clark *et al.*, 1977 ; Weiss *et al.*, 1977 ; Wagner-Döbler *et al.*, 2000), la valeur la plus représentative dans le cas présent étant celle obtenue à partir d'un consortium de souches du genre *Pseudomonas* ( $0,13 \text{ pg Hg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$  Wagner-Döbler *et al.*, 2000). Si l'on se place dans le cas extrême où toutes les bactéries présentes dans le flacon d'incubation possèdent et expriment l'opéron *mer*, dans nos conditions expérimentales ( $\approx 10^9$  bactéries incubées, 7 j d'incubation), la quantité théorique de Hg qui pourrait être réduite est d'environ  $900 \text{ } \mu\text{g}$  (soit

l'intégralité de 0,49  $\mu\text{g}$  de  $\text{Hg}_{\text{inorg}}$  disponible). Cette valeur est vraisemblablement surestimée étant donné qu'ici, seule une partie de la population bactérienne est métaboliquement active (le milieu d'incubation n'étant pas un milieu riche) et que parmi ces bactéries actives, seule une fraction possède et va exprimer les gènes de l'opéron *mer*.

De même, dans le cas du sédiment de surface du site CAB ( $[\text{Hg}] \approx 200 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) la concentration finale dans le flacon d'incubation atteint  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  ce qui est au-dessus du seuil d'activation de l'opéron *mer*. On peut donc s'attendre à ce qu'une partie des bactéries les plus sensibles commencent à exprimer les enzymes de détoxification. Ceci pourrait expliquer pourquoi sa vitesse de méthylation est inférieure (environ deux fois) à celles des sédiments de surface de NAS-1A, BGR-1 et SAS-1 ( $[\text{Hg}]$  dans le flacon d'incubation  $\approx 1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ainsi qu'à celui du biofilm du site CAB ( $[\text{Hg}]$  dans le flacon d'incubation  $\approx 1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Les concentrations en  $\text{Hg}_{\text{total}}$  au sein des flacons d'incubation ainsi que les vitesses de méthylation associées sont détaillés dans le Tableau 8. En ce qui concerne les cinq sédiments de surface concernés, la concentration en  $\text{Hg}_{\text{total}}$  dans le flacon d'incubation et la vitesse de méthylation par cellule sont linéairement corrélées au seuil de 95 % traduisant que, plus la quantité de Hg incubé est élevée, plus la vitesse de méthylation est faible.

**Tableau 8.** Concentrations en  $\text{Hg}_{\text{total}}$  dans les flacons d'incubation et vitesses de méthylation par cellules ( $\% \text{MeHg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$ , en présence d'eau brute autoclavée). Les concentrations en  $\text{Hg}_{\text{total}}$  supérieures au seuil d'activation de l'opéron *mer* ( $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) sont indiquées en caractères gras. Une corrélation linéaire au seuil de 95 % a été établie entre les concentrations en  $\text{Hg}_{\text{total}}$  dans les flacons d'incubation de sédiment de surface et la vitesse de méthylation. Les valeurs du biofilm du site CAB sont présentées à titre informatif mais n'ont pas été incluses dans le calcul de la corrélation.

Site d'étude	Compartment incubé	$[\text{Hg}_{\text{total}}]$ $\mu\text{g L}^{-1}$	$\% \text{MeHg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$
CAB	Biofilm	1,0	$1,5 \times 10^{-9}$
	Sédiment	<b>3,0</b>	$2,1 \times 10^{-10}$
ANT	Sédiment	<b>4,9</b>	$7,1 \times 10^{-11}$
NAS-1A	Sédiment	1,1	$5,3 \times 10^{-10}$
BGR-1	Sédiment	1,0	$7,0 \times 10^{-10}$
SAS-1	Sédiment	1,1	$5,5 \times 10^{-10}$

d) Vitesses de déméthylation

En ce qui concerne les vitesses de déméthylation (Tableau 7), leurs valeurs reposent uniquement sur le ratio  $\text{MeHg}/\text{Hg}_{\text{inorg}}$  mesurés dans les échantillons environnementaux (équation [3]) en considérant constante la concentration en  $\text{Hg}_{\text{total}}$  ( $\text{Hg}_{\text{inorg}} + \text{MeHg}$ ). En se basant sur l'équilibre entre  $\text{MeHg}$  et  $\text{Hg}_{\text{inorg}}$ , exprimé par le rapport  $\text{MeHg}/\text{Hg}_{\text{inorg}}$ , une simple simulation itérative permet de visualiser qu'un ajout de  $\text{MeHg}$  ou de  $\text{Hg}_{\text{inorg}}$  au système sera très vite rééquilibré (Annexes, Tableau A4 et Figure A1). Les vitesses de déméthylation ainsi obtenues sont systématiquement supérieures aux vitesses de méthylation pour tous les sites étudiés. Concernant les sites CAB, NAS-1A, BGR-1 et SAS-1, la déméthylation est 11 à 59 fois plus élevée que la méthylation, alors que pour les sites KWK-1 et KWK-12, ce ratio atteint  $\approx 160$  ce qui traduit une méthylation nette inférieure à celle des quatres sites précédents. Dans le cas du site impacté ANT, la déméthylation dans le sédiment de surface est 767 fois supérieure à la méthylation. Ceci peut éventuellement appuyer l'hypothèse de l'activation d'un système enzymatique de détoxification du milieu comme celui codé par l'opéron *mer*.

e) Effet de la température d'incubation sur la vitesse de méthylation

La majorité des incubations a été effectuée à 25 °C qui représente le meilleur compromis entre des températures réalistes du terrain et les contraintes expérimentales. Cependant, au sein des environnements échantillonnés et pour la saison où s'est déroulé l'échantillonnage, la température moyenne aux différentes profondeurs de prélèvement est plutôt de l'ordre d'une dizaine de degrés ( $10,6 \pm 0,9$  °C, Tableau 3). Il était donc nécessaire d'extrapoler les données obtenues à 25 °C vers des températures plus basses. Pour cela, un échantillon présentant un potentiel de méthylation significatif (biofilm du site CAB) a été choisi pour être incubé à 10 °C et le potentiel de méthylation a été déterminé à 7, 53 et 90 jours d'incubation. En admettant que la vitesse soit linéaire entre 0 et 53 jours, on obtient une vitesse de méthylation moyenne de  $3,4 \times 10^{-10}$  %Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> soit trois fois inférieure à la vitesse du même biofilm incubé à 25 °C.

Ces résultats rejoignent ceux décrits dans la littérature selon lesquelles, la température impacterait de façon indirecte la méthylation via son action sur l'activité microbienne générale ce qui se traduit par une plus forte activité méthylante en période estivale (Wright et Hamilton, 1982 ; Hintelmann et Wilken, 1995 ; Watras *et al.*, 1995).

En appliquant la loi d'Arrhenius, on peut modéliser l'effet de la température sur la variation de la vitesse de réaction (ici la vitesse de méthylation). Pour cela, le logarithme naturel de la vitesse de méthylation  $\ln(\%MeHg \text{ cell}^{-1} \text{ j}^{-1})$  a été exprimé en fonction de l'inverse de la température (1/T) (Figure 33) et la régression linéaire obtenue donne la relation [6] :

$$\ln(\%MeHg \text{ j}^{-1}) = -24,738 \times \frac{1}{T} - 19,328 \quad [6]$$

Grâce à cette relation il est possible de calculer les vitesses de méthylation attendues pour le biofilm du site CAB à des valeurs intermédiaires de température d'incubation. Ainsi, pour une température de 15 °C, par exemple, la vitesse de méthylation devrait être de  $7,7 \times 10^{-10}$  %Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>.

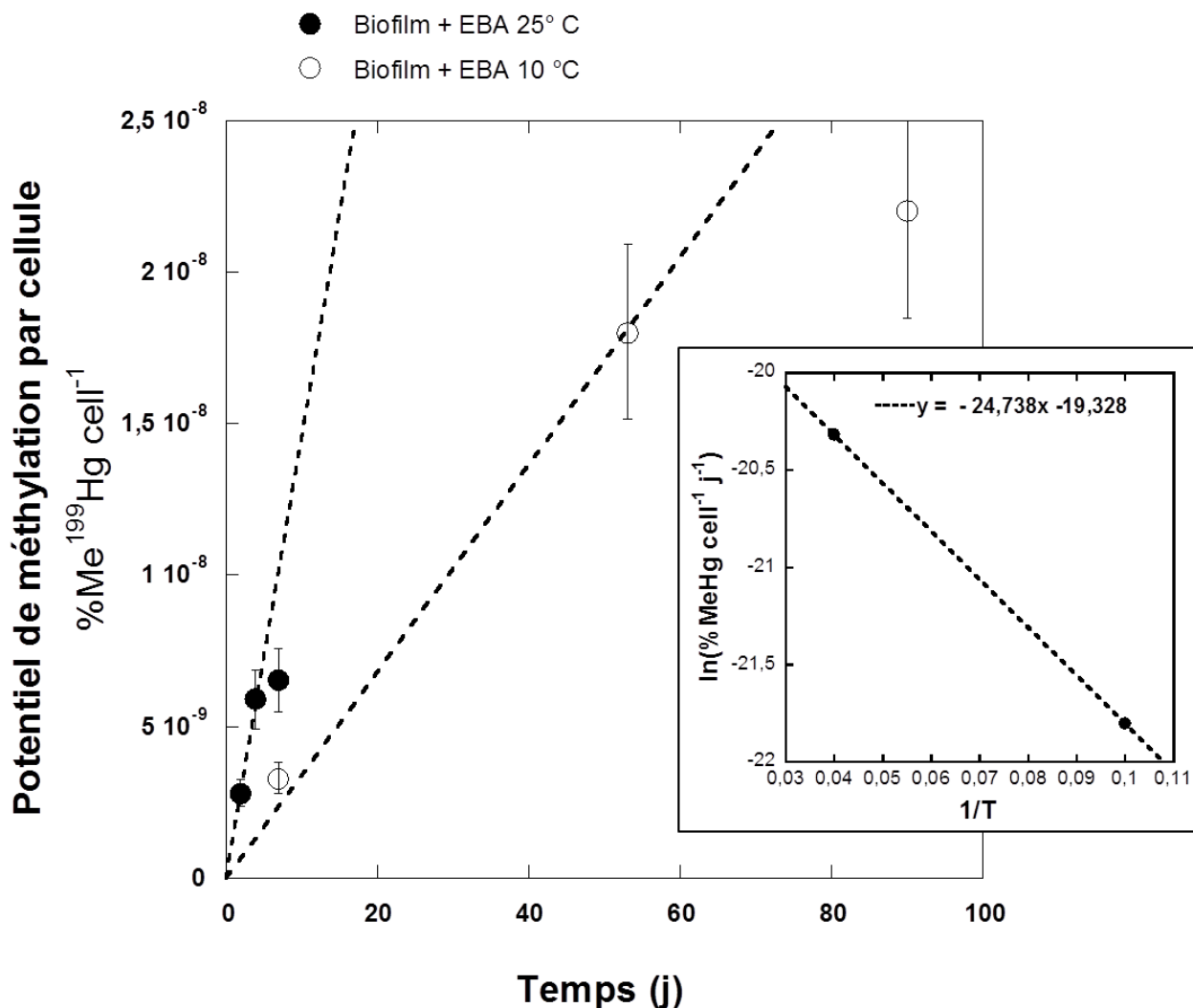


Figure 33. Evolution du potentiel de méthylation normalisé par cellule (%Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup>) au cours de l'incubation de biofilm en présence d'eau brute autoclavée du site CAB à 10 ou 25 °C. Les incubations ont été réalisées en présence de <sup>199</sup>Hg<sub>inorg</sub>, à 25 °C, à l'obscurité et en anoxie. Des régressions linéaires (en pointillés) ont été utilisées sur les premiers points (en incluant le point à t<sub>0</sub>) pour estimer les vitesses de méthylation. L'encadré représente l'évolution de ln(%MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) en fonction de 1/T selon la loi d'Arrhenius pour les deux températures considérées.

f) Extrapolation à une mare thermokarstique

A partir de nos résultats expérimentaux, il est possible d'évaluer la fraction d'un apport de Hg<sub>inorg</sub> qui peut être potentiellement méthyliée au sein d'une mare thermokarstique en fonction de la température de l'eau et de la durée de la période d'eau libre (période pendant laquelle l'eau de la mare n'est pas gelée).

Une mare thermokarstique classique est de forme circulaire et fait environ 4 à 30 mètres de diamètre et 1 à 3 mètres de profondeur (Breton *et al.*, 2009). Si l'on considère un diamètre moyen

de 15 m et une profondeur moyenne de 2 m, on peut construire un modèle de mare sous la forme d'un demi-ellipsoïde de révolution aplati de rayon polaire  $a = 15/2$  m et de rayon équatorial  $b = 2$  m (Figure 34).

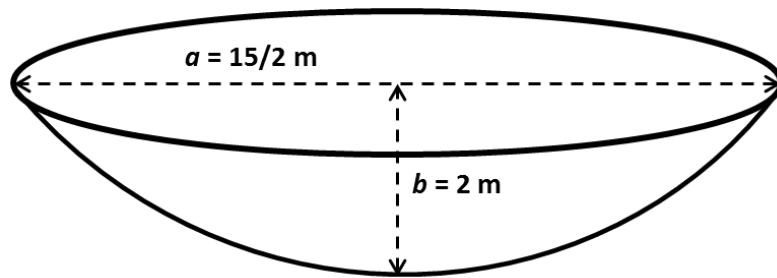


Figure 34. Représentation schématique d'une mare thermokarstique de 15 m de diamètre et de 2 m de profondeur sous la forme d'un demi-ellipsoïde de révolution aplati de rayon polaire  $a = 15/2$  m et de rayon équatorial  $b = 2$  m.

Le volume d'un demi-ellipsoïde de révolution aplati de rayon polaire  $a$  et de rayon équatorial  $b$  est donné par la formule :

$$V = \frac{4}{3} \frac{\pi a b^2}{2}$$

L'aire de la surface  $S$  d'un demi-ellipsoïde de révolution aplati de rayon polaire  $a$  et de rayon équatorial  $b$  est donné par la formule (avec  $e$ , l'ellipticité) :

$$S = \frac{2 \pi a^2 + \frac{\pi b^2}{e} \ln\left(\frac{1+e}{1-e}\right)}{2} \quad e \equiv \sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}}$$

Dans le cas du modèle de mare décrit ici, l'aire du fond, correspondant à l'interface eau/sédiment, représente donc 203 m<sup>2</sup> alors que l'aire de la surface, correspondant à l'interface eau/air, représente 177 m<sup>2</sup> ( $\pi \times a^2$ ). Si l'on considère que la méthylation se fait dans les 5 premiers centimètres de sédiment, pour une masse volumique du sédiment de 1 g cm<sup>-3</sup> et un rapport moyen de 0,5 g MS g<sup>-1</sup> MH, on peut estimer la masse de MS de sédiment de surface à  $\approx 5 \times 10^6$  g MS soit

environ 5 tonnes. Pour un volume d'eau brute d'environ 63000 L, le ratio masse de MS de sédiment de surface sur le volume d'eau est de 83 g MS L<sup>-1</sup>. Les incubations menées au cours de cette étude sur le sédiment ont été réalisées à 10 g MS L<sup>-1</sup>, on peut donc considérer que la vitesse non normalisée (% MeHg j<sup>-1</sup>) est la plus représentative de la vitesse de méthylation de la mare entière.

Une vitesse moyenne de méthylation nette (tenant compte de la déméthylation) a été retenue pour les sites présentant une faible activité méthylante (KWK-1 et KWK-12 :  $6 \times 10^{-4}$  %MeHg<sub>nette</sub> j<sup>-1</sup>) d'une part et les sites présentant une activité méthylante élevée (NAS-1A, BGR-1 et SAS-1 : 0,1 %MeHg<sub>nette</sub> j<sup>-1</sup>), d'autre part. Ces vitesses ont été déterminées à 25 °C, on peut donc s'attendre à ce que les vitesses des sites arctiques soient surestimées par rapport aux vitesses réels au sein des mares où la température moyenne de l'eau est de  $10,6 \pm 0,9$  °C (Tableau 3). En revanche, une augmentation de la température de l'eau au cours de la période d'eau libre pourra conduire à des vitesses de méthylation plus élevées. Afin d'évaluer précisément dans quelles proportions, il aurait été nécessaire de mener des expérimentations en faisant varier la température d'incubation. En attendant, on peut estimer l'effet qu'aurait une augmentation de la température sur la vitesse de méthylation en admettant qu'elle impacte de la même façon la vitesse sur le site CAB et sur les sites subarctiques.

En partant du principe que l'activité bactérienne est négligeable au cours de la période pendant laquelle la mare est prise dans la glace par rapport à la période d'eau libre, on peut s'attendre à ce que la durée de cette dernière impacte la quantité de Hg<sub>inorg</sub> méthylé au cours de l'année. D'après des observations faites sur le terrain par l'équipe du CEN (données non publiées), il apparaît que la période d'eau libre des mares thermokarstiques s'étend sur 80 à 110 jours au cours de l'année. A partir de ces valeurs et des vitesses de méthylation estimées par la modélisation, il est donc possible de simuler des taux de méthylation théoriques en fonction de la température de l'eau (10, 11, 12, 15 et 25 °C) ainsi que de l'allongement de la durée de la période d'eau libre (80, 90, 100, 110 et 150 j) prévisible pour le futur dans un contexte de changement climatique.

Ainsi, pour un site faiblement méthylant (KWK-1 ou KWK-12), si la durée de la période de dégel passait de 80 à 150 jours concomitamment à une élévation de la température de l'eau de 10 à 12 °C, le taux de MeHg produit par rapport à la quantité de substrat disponible pourrait passer de  $1 \times 10^{-2}$  % à  $3 \times 10^{-2}$  % (soit une d'augmentation d'un facteur 3).

Dans le cas d'un site présentant une activité méthylyante plus marquée, comme NAS-1A, BGR-1 et SAS-1, le taux de méthylyation pour une température de 10 °C et une période de 80 j est déjà de 1,8 %. Une simple élévation de 2 °C accompagné d'un allongement de 30 j de la durée de la période d'eau libre entraîne un doublement du taux de méthylmercure formé. Cette modélisation est représentée Figure 35.

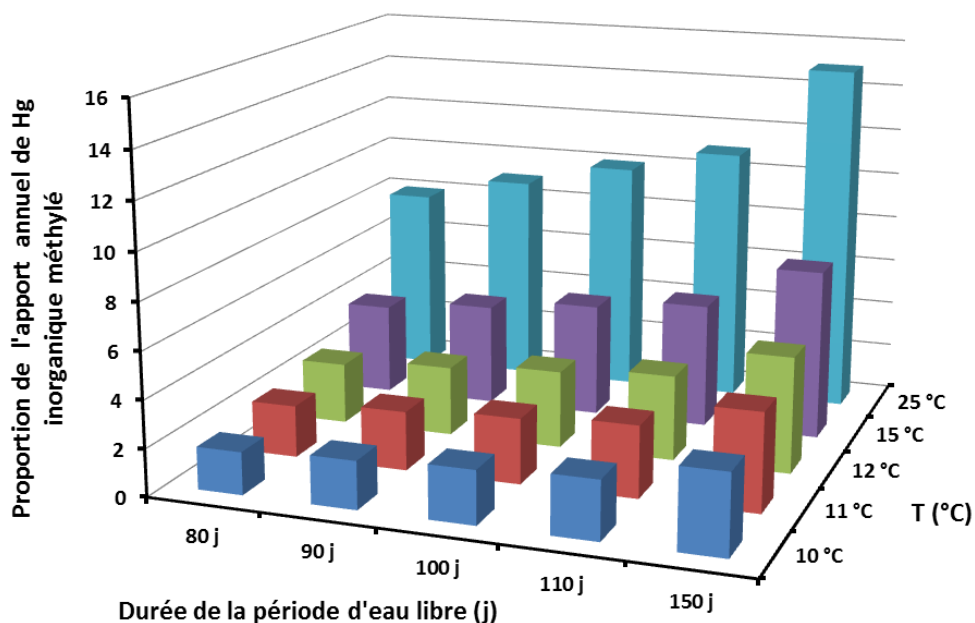


Figure 35. Proportion de l'apport annuel de  $Hg_{inorg}$  potentiellement méthylyé en fonction de la température de l'eau (en °C) et de la durée de la période d'eau libre (en j) pour des sites présentant une « forte » activité méthylyante (sur la base des mesures de l'activité méthylyante des sédiments de surface des sites NAS-1A, BGR-1 et SAS-1 à 25 °C et du modèle de l'effet de la température sur la vitesse de méthylyation du biofilm du site CAB).

Si l'on ne dispose pas encore, à l'heure actuelle, de données quant à l'évolution de la température de l'eau de ces mares thermokarstiques, l'allongement de la durée de la période d'eau libre est, quant à lui, documenté. En effet, selon Gough *et al.* (2004), la saison d'eau libre a gagné trois jours par décennie sur une période de trente ans (entre 1971 et 2003) dans le sud-est de la Baie d'Hudson.

Il faut aussi prendre en compte que la quantité de substrat carboné utilisable par les microorganismes va bien sûr impacter leur activité métabolique et donc leur activité méthylyante.

D'après les données recueillies dans la littérature, les apports atmosphériques actuels de Hg (c'est-à-dire ère post-industrielle) en région arctique et subarctique représentent 1,2 à 51,6  $\mu g m^{-2}$



an<sup>-1</sup> (Landers *et al.*, 1998 ; Schroeder *et al.*, 1998 ; Hare *et al.*, 2008). Parmi ces données, très différentes selon qu'elles se basent sur des mesures ou des modélisations mathématiques, la valeur la plus pertinente pour notre étude est l'estimation définie pour le système de la Baie d'Hudson par Hare *et al.* (2008) qui est de 1,2 µg m<sup>-2</sup> an<sup>-1</sup>. Si on considère que la méthylation ne se fait que pendant la période de dégel et que, le reste de l'année, le Hg issu du dépôt atmosphérique ne fait que s'accumuler, on peut calculer pour notre modèle de mare, d'une interface air/eau de 177 m<sup>2</sup>, que la quantité de Hg inorganique accumulée pendant l'année qui sera disponible au moment du dégel serait de ≈ 200 µg. Selon le modèle décrit par Mason et Sullivan en 1997, le Hg<sup>II</sup> inorganique qui entre dans un système dulcicole en sort par deux voies majoritaires : i) 45 % retournent dans l'atmosphère sous forme de Hg<sup>0</sup> après avoir été réduits par des processus chimiques et/ou biologiques ; ii) les 55 % restant accompagnent la matière en suspension au cours de la sédimentation et se retrouvent donc piégés dans le sédiment de surface. La méthylation faisant majoritairement intervenir des espèces dissoutes (Gilmour *et al.*, 1992 ; Benoit *et al.*, 1999a), on peut considérer que la fraction de Hg particulaire (liée au sédiment) ne constituera pas un substrat prépondérant. Il est possible d'estimer cette quantité de mercure à partir de la teneur en Hg du sédiment de surface et du taux d'accumulation du sédiment (ou vitesse de sédimentation). Les teneurs en Hg dans le sédiment de surface ont été mesurés dans cette étude et sont en moyenne de 40 ng g<sup>-1</sup> pour les sites KWK-1, KWK-12 et SAS-1 et de 10 ng g<sup>-1</sup> pour NAS-1A et BGR-1. En ce qui concerne le taux de sédimentation, la valeur moyenne de 300 g m<sup>-2</sup> an<sup>-1</sup> a été choisie à partir des données présentées dans la littérature pour des lacs arctiques et pour le système de la Baie d'Hudson (Outridge *et al.*, 2007 ; Hare *et al.*, 2008). La quantité de Hg qui sédimente dans une mare (pour une surface et un temps donnés) peut donc être calculée selon l'équation [5] :

$$m_{\text{Hg}} = \sigma \times [\text{Hg}]_{\text{sédiment}} \times S \times t \quad [5]$$

Avec :

- $m_{\text{Hg}}$  : la masse de Hg qui sédimente (ng)
- $\sigma$  : le taux d'accumulation du sédiment (0,82 g m<sup>-2</sup> j<sup>-1</sup>)
- $[\text{Hg}]_{\text{sédiment}}$  : la teneur en Hg du sédiment de surface (ng g<sup>-1</sup>)
- $S$  : l'aire de l'interface eau/sédiment (203 m<sup>2</sup> dans le cas de notre modèle)
- $t$  : la durée de la sédimentation (durée de la période de dégel) (j)

Ainsi, pour une période dégel moyenne de 100 j, la quantité maximale de mercure qui peut sédimenter au sein de sites comme KWK-1 ou KWK-12 (dont la teneur dans le sédiment de surface est de l'ordre de  $40 \text{ ng g}^{-1}$ ), est de  $660 \text{ }\mu\text{g}$  soit l'intégralité du dépôt atmosphérique. Dans le cas de sites comme BGR-1 ou NAS-1A dont la teneur moyenne en Hg dans le sédiment de surface est de  $10 \text{ ng g}^{-1}$ , on peut s'attendre à une sédimentation de  $167 \text{ }\mu\text{g}$  sur la même période de temps, soit 80 % par rapport aux  $200 \text{ }\mu\text{g}$  apportés par les dépôts atmosphériques. Dans le cas des premiers sites (KWK-1 et KWK-12), l'ensemble du Hg apporté par les dépôts atmosphériques peut donc se retrouver piégé sous forme particulaire dans le sédiment de surface alors que dans le deuxième cas (sites BGR-1 et NAS-1A) il reste environ 20 % du mercure dans la colonne d'eau et qui peut donc servir de substrat à la méthylation.

Enfin, il faut prendre en compte l'évasion du mercure sous forme de  $\text{Hg}^0$  (issu de l'oxydation de  $\text{Hg}^{\text{II}}$  par des processus chimiques et biologiques). D'après le modèle de Mason et Sullivan évoqué précédemment, 45 % du mercure qui sort du système emprunte cette voie contre 55 % pour la sédimentation. Le reste va donc rester sous forme dissoute et être disponible (selon sa spéciation et les paramètres physico chimiques du milieu) pour la méthylation ou s'accumuler dans la colonne d'eau.

### 3) Impact des caractéristiques du biofilm sur l'activité méthylante

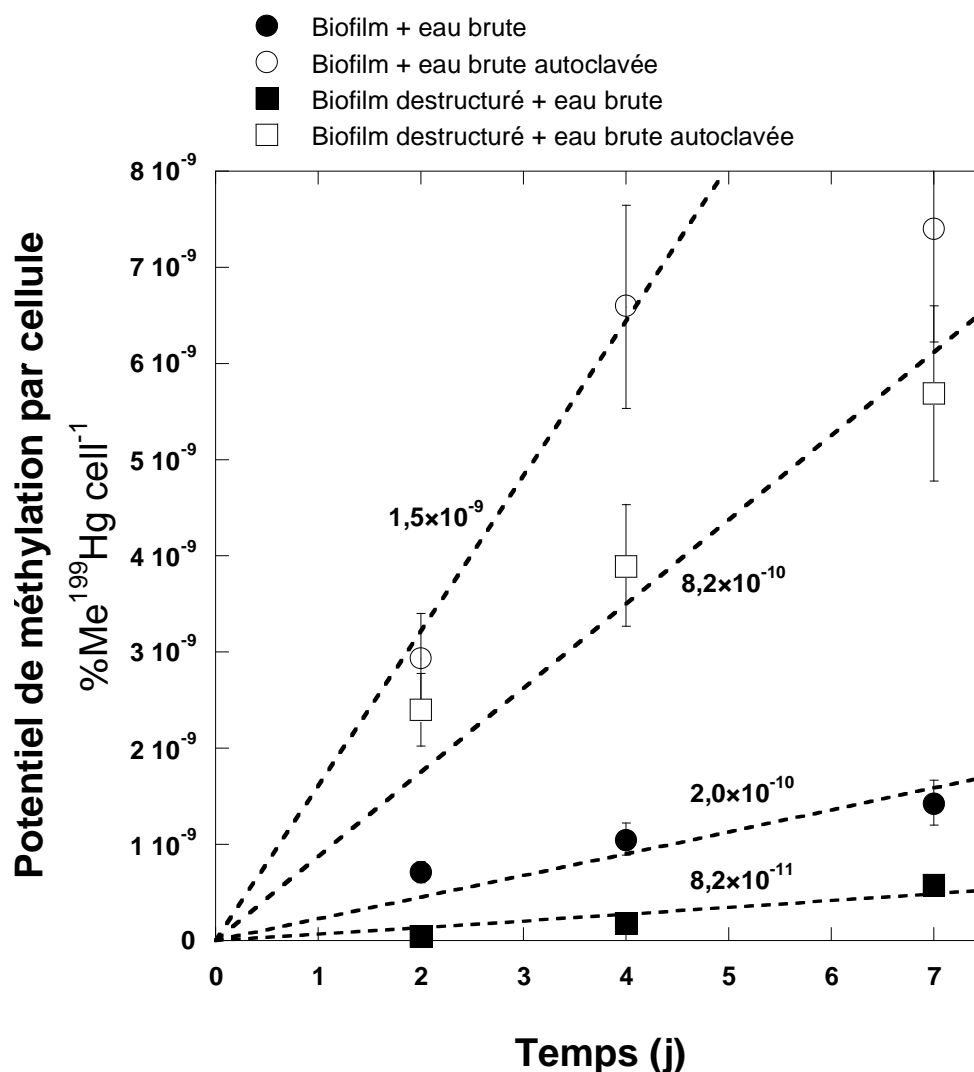
Trois expérimentations ont été menées afin de déterminer si le biofilm a une influence spécifique sur la méthylation du mercure. Dans un premier temps, afin d'évaluer l'impact de la structure du biofilm, le potentiel a été mesuré sur des biofilms décrochés de leur support et déstructurés par des traitements aux ultrasons et comparé aux biofilms intacts. En second lieu, une souche pure méthylante a été cultivée sous forme de biofilm et planctonique et les potentiels de méthylation du Hg des deux formes de culture ont été comparés. Enfin, des incubations de cette souche méthylante ont été menées en présence de substances polymériques extracellulaires (EPS), des composants prépondérant de la matrice du biofilm, afin d'évaluer si la vitesse de méthylation s'en trouve impactée.

#### a) Impact de la structure du biofilm sur la vitesse de méthylation

De même que pour les biofilms intacts (*i.e.* prélevés de leur milieu avec leur support et n'ayant subi aucun traitements déstructurant), les suspensions de biofilms détachés et dispersés par le traitement aux ultrasons, ont été incubées dans 100 mL d'eau brute (autoclavée ou non). Le Tableau 9 présente le potentiel de méthylation mesurés aux différents temps de prélèvement et la Figure 36, les cinétiques qui en découlent. Seuls les biofilms du site CAB ont été utilisés pour ces expérimentations.

Tableau 9. Potentiels de méthylation des biofilms déstructurés du site CAB normalisés par la masse de matière sèche (%Me<sup>199</sup>Hg g<sup>-1</sup> MS) ou par la densité bactérienne (%Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup>) incubées. Les incubations ont été effectuées dans l'eau brute du site, non filtrée, stérilisée par la chaleur (eau brute autoclavée = EBA) ou non (eau brute = EB) et dégazée par barbotage de N<sub>2</sub> (99 %). L'erreur relative moyenne est de 15 %.

	Nombre total de bactéries	Masse de MS (mg)	2 j		4 j		7 j	
			%Me <sup>199</sup> Hg g <sup>-1</sup> MS	%Me <sup>199</sup> Hg cell <sup>-1</sup>	%Me <sup>199</sup> Hg g <sup>-1</sup> MS	%Me <sup>199</sup> Hg cell <sup>-1</sup>	%Me <sup>199</sup> Hg g <sup>-1</sup> MS	%Me <sup>199</sup> Hg cell <sup>-1</sup>
Biofilm déstructuré + EB	2,1×10 <sup>9</sup>	21,43	4,7×10 <sup>-3</sup>	<b>4,4×10<sup>-11</sup></b>	2,0×10 <sup>-2</sup>	<b>1,8×10<sup>-10</sup></b>	6,2×10 <sup>-2</sup>	<b>5,7×10<sup>-10</sup></b>
Biofilm déstructuré + EBA	2,1×10 <sup>9</sup>	21,43	2,3×10 <sup>-1</sup>	<b>2,4×10<sup>-9</sup></b>	3,8×10 <sup>-1</sup>	<b>3,9×10<sup>-9</sup></b>	5,6×10 <sup>-1</sup>	<b>5,7×10<sup>-9</sup></b>



**Figure 36.** Evolution du potentiel de méthylation normalisé par cellule (%Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup>) au cours de l'incubation de biofilm intact (en présence d'eau brute, autoclavée ou non) et de biofilm déstructuré (en présence d'eau brute, autoclavée ou non). Les incubations ont été réalisées en présence de <sup>199</sup>Hg<sub>inorg</sub>, à 25 °C, à l'obscurité et en anoxie. Des régressions linéaires (en pointillés) ont été utilisées sur les 3 à 4 premiers points (en incluant le point à t<sub>0</sub>) pour estimer les vitesses de méthylation. Celles-ci sont exprimées en caractères gras (en %MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>).

Les biofilms déstructurés présentent des vitesses de méthylation de 8,2 × 10<sup>-11</sup> et 8,2 × 10<sup>-10</sup> %MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> respectivement pour des incubations dans l'eau brute et dans l'eau brute préalablement autoclavée (Figure 36). La vitesse de méthylation du biofilm déstructuré est 10 fois supérieure lorsqu'il est incubé avec l'eau brute autoclavée qu'avec l'eau brute (contenant des cellules en suspension ou adhérentes aux MES) confirmant les résultats obtenus précédemment avec les biofilms intacts (Figure 36).

Que les biofilms soient incubés en présence d'eau brute autoclavée ou non, le traitement aux ultrasons entraîne une baisse de la vitesse de méthylation d'environ un facteur 2. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que le traitement aux ultrasons est une technique relativement agressive envers les cellules. Ainsi, un biais peut être introduit par le traitement aux ultrasons ; si une partie des cellules est lysée, la vitesse de méthylation obtenue va être normalisée par une valeur surestimée de densité bactérienne ce qui conduit à une sous-estimation de la vitesse de méthylation par cellule. La déstructuration du biofilm a toutefois moins d'impact sur sa capacité à méthyler le mercure que le fait de l'incuber en présence d'eau brute non autoclavée.

Des tests de cultivabilité ont été tentés afin d'apprécier l'effet du traitement aux ultrasons sur la viabilité des cellules mais il s'est avéré très délicat d'évaluer la cultivabilité de biofilms adhérents aux supports K1. La détermination de la cultivabilité se fait par dénombrement des unités formant une colonie (UFC) sur un milieu nutritif solide. Or, pour obtenir des UFC distinctes et donc comptables, il convient de déposer et d'étaler de façon homogène sur le milieu nutritif solide un volume de suspension bactérienne ce qui implique de passer forcément par une étape de décrochage à partir des supports colonisés. De plus, il est probable que seul un faible pourcentage des souches présentes dans un biofilm environnemental soit cultivable sur un milieu artificiel (0,02 % en milieu R2A en anaérobiose par rapport au comptage SYBR, résultats non montrés). Afin d'évaluer précisément l'impact du traitement aux ultrasons sur les bactéries, il est nécessaire de faire des tests préalables sur la viabilité des bactéries d'une souche pure. Néanmoins, l'effet observé sur une souche pure peut se révéler peu représentatif d'un biofilm environnemental complexe.

Dans tous les cas, ces résultats confortent l'idée selon laquelle il est indispensable de traiter le biofilm comme un ensemble pour éviter tout biais (notamment avec des méthodes agressives pour une partie des cellules). Ainsi, incuber les supports colonisés intacts semble plus pertinent que d'incuber des extraits de biofilms comme il est couramment décrit dans la littérature (Korthals et Winfrey, 1987 ; Mauro *et al.*, 2002 ; Huguet *et al.*, 2010 ; Correia *et al.*, 2012) au risque de sous-estimer la vitesse de méthylation du biofilm.

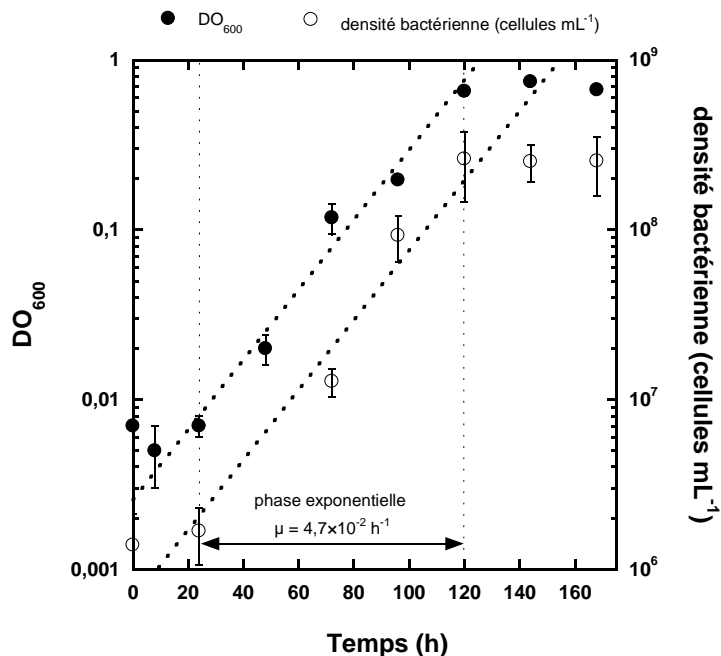
b) Effet du mode de croissance planctonique *versus* biofilm sur la vitesse de méthylation (*Desulfobulbus propionicus* 1pr3)

La souche *Desulfobulbus propionicus* 1pr3, un modèle de bactérie sulfatoréductrice méthylante, a été cultivée en milieu nutritif liquide sous forme planctonique et sous forme de biofilm (colonisation de supports K1 en fermenteur). Les vitesses de méthylation du Hg<sub>inorg</sub> ont été évaluées pour les deux modes de croissance.

i) Culture de la souche *Desulfobulbus propionicus* 1pr3

La culture de la souche en milieu liquide a été suivie au cours du temps par mesure de la densité optique (à 600 nm) et numération directe (par épifluorescence). Les résultats de ce suivi sont représentés dans la Figure 37 et ont permis d'établir qu'une unité de DO<sub>600</sub> correspondait à  $\approx 4 \times 10^8$  cellules mL<sup>-1</sup>.

Les supports K1 colonisés à l'issue de la culture en flux continu en fermenteur présentent une masse de matière sèche de  $4,2 \pm 0,7 \times 10^{-2}$  mg cm<sup>-2</sup> et une densité bactérienne de  $1,4 \pm 0,3 \times 10^6$  cell cm<sup>-2</sup>.

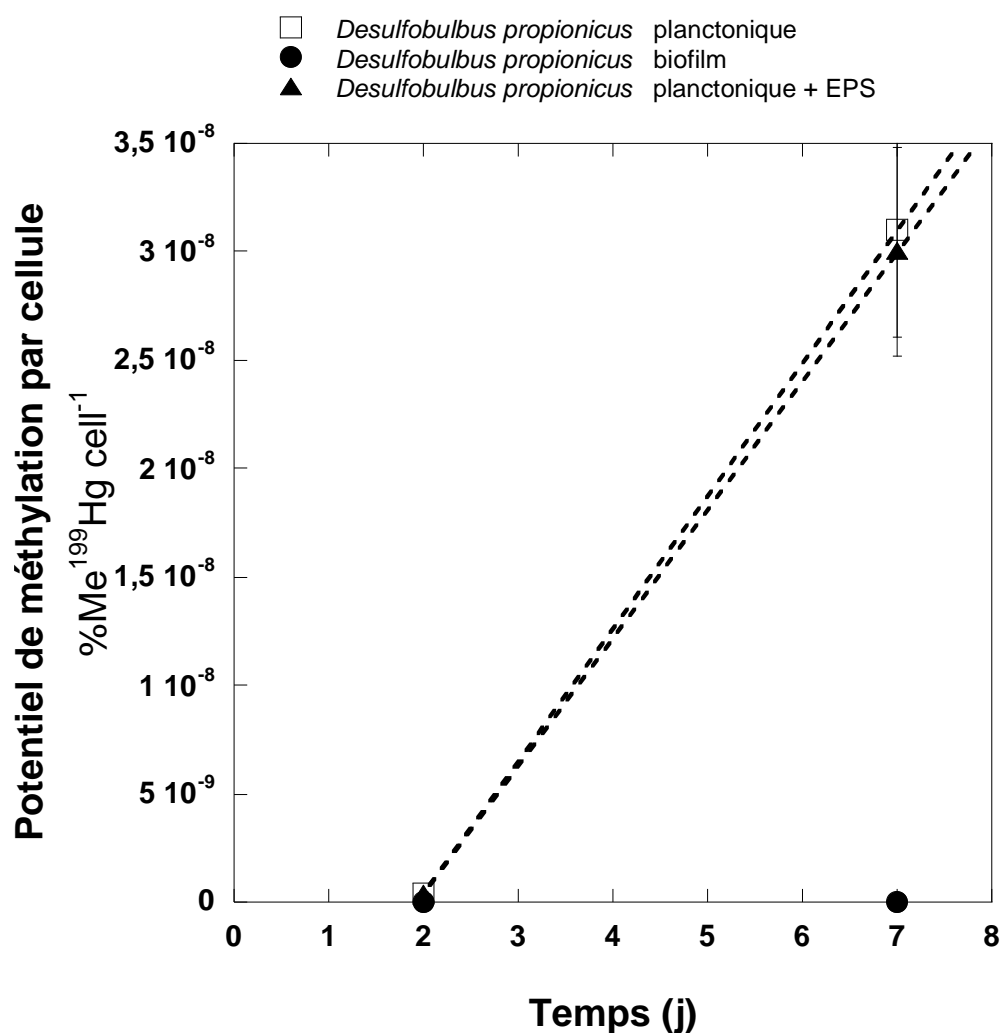


**Figure 37.** Suivi de croissance de la souche *Desulfobulbus propionicus* 1pr3 dans le milieu de culture décrit par Benoit *et al.* (2001a). Les symboles pleins représentent l'évolution de la densité optique (à 600 nm) et les symboles vides représentent l'évolution de la densité bactérienne (cellules mL<sup>-1</sup>). La phase exponentielle de croissance est matérialisée et la vitesse spécifique de croissance ( $\mu = 4,7 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) est indiquée.

ii) Vitesses de méthylation de la souche *Desulfobulbus propionicus* 1pr3

Le nombre de supports utilisés pour les incubations (10 supports) a été choisi afin que la densité bactérienne incubée soit la même que celle des cellules planctoniques ( $\approx 10^6$  cell mL<sup>-1</sup>). Les cellules planctoniques utilisées pour les incubations de méthylation sont récoltées lorsque la densité cellulaire atteint  $10^8$  cell mL<sup>-1</sup> (fin de phase exponentielle de croissance).

L'évolution des potentiels de méthylation normalisés par cellule à 2 et 7 j sont présentés dans la Figure 38.



**Figure 38.** Evolution du potentiel de méthylation normalisé par cellule (%Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup>) au cours de l'incubation de la souche pure *Desulfobulbus propionicus* 1pr3 sous forme planctonique, de biofilm ou planctonique en présence d'EPS (substances extra-polymériques) (200 µg L<sup>-1</sup>). Les incubations ont été réalisées en présence de <sup>199</sup>Hg<sub>inorg</sub>, à 25 °C, à l'obscurité et en anoxie. La pente des droites (en pointillés) entre 2 et 7 j a été utilisée pour estimer la vitesse de méthylation des cellules planctoniques, exprimée en caractères gras.



Aucune méthylation n'est observée à 2 j quelles que soient les conditions testées. Cela peut s'expliquer par le fait que les cellules ont été prélevées de la préculture en fin de phase exponentielle/début de phase stationnaire de croissance. Une phase de latence peut donc s'installer avant que la croissance ne reprenne, et par là même l'activité méthylante ; cette souche étant décrite pour présenter une activité méthylante maximale en phase exponentielle de croissance (Benoit *et al.*, 2001a ; Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2009). A l'issue des 7 j d'incubation, les cellules planctoniques présentent un potentiel de méthylation de  $\approx 3 \times 10^{-8}$  %Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup> correspondant à une vitesse de  $6,2 \times 10^{-9}$  %Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Avec la même souche cultivée dans des conditions similaires, Benoit *et al.* (2001a) obtiennent une vitesse comprise entre 0,10 et 1,07 attogrammes MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Afin de comparer nos données avec ces résultats, nous avons converti la vitesse de méthylation (%MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) en g MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> selon l'équation [6] :

$$\text{g MeHg cell}^{-1} \text{ j}^{-1} = (\% \text{MeHg cell}^{-1} \text{ j}^{-1} \times \frac{m_{\text{Hg}}}{100}) \quad [6]$$

Avec :

- g MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> : la vitesse de méthylation en g de Me<sup>199</sup>Hg produit par cellule et par jour.
- %MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> : la vitesse de méthylation en % de Me<sup>199</sup>Hg formé par rapport à la quantité de <sup>199</sup>Hg<sub>inorg</sub> par cellule et par jour.
- $m_{\text{Hg}}$  : la masse de <sup>199</sup>Hg<sub>inorg</sub> initiale en g (ici  $1 \times 10^{-7}$  g).

Dans notre cas, la conversion donne une vitesse de 6,2 ag MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, soit une valeur du même ordre de grandeur que Benoit *et al.* (2001a). L'incubation de cellules planctoniques de la souche méthylante *Desulfobulbus propionicus* 1pr3 peut donc être considérée comme un contrôle positif pour les autres expériences de méthylation.

Dans le cas du biofilm de *D. propionicus* en revanche, aucune méthylation n'est mesurée à 7 j alors que le nombre de cellules incubé est le même qu'en condition planctonique. Il semble donc que *Desulfobulbus propionicus* 1pr3 sous forme sessile (biofilm) ne soit pas capable de méthyler le mercure. Cela peut s'expliquer par un état physiologique différent, les cellules ayant un métabolisme différent sous forme de biofilm. Sans remettre en cause nos résultats, on peut souligner que *Desulfovibrio desulfuricans* ND132, quant à elle, présente une activité méthylante sous forme planctonique et à un potentiel 10 fois supérieur sous forme de biofilm (Lin *et al.*, 2013). Cette différence entre ces deux souches peut s'expliquer par le fait que *Desulfobulbus propionicus* méthyle préférentiellement le mercure pendant la phase exponentielle de croissance alors que pour *Desulfovibrio desulfuricans*, c'est pendant la phase stationnaire (Benoit *et al.*, 2001a ; Biswas *et al.*,

2011). Or, au sein d'un biofilm mature, il est attendu que les cellules soient dans un état physiologiques plus proche de la phase stationnaire que de la phase exponentielle de croissance.

Pour confirmer ces résultats, il serait intéressant de déstructurer ce biofilm de souche pure (selon la même méthode que les échantillons environnementaux) et de comparer sa vitesse à celui des cellules planctoniques. Le simple fait de décrocher les cellules au début de l'incubation ne devrait pas changer leur état physiologique au point qu'une activité méthylante soit mise en évidence. Dans le cas contraire (méthylation significative après le décrochage), cela confirmerait que c'est la structuration même sous forme de biofilm (interactions entre bactéries proches par exemple) qui serait défavorable à la méthylation.

### iii) Impact des EPS sur la vitesse de méthylation de *Desulfobulbus propionicus* 1pr3

La forme planctonique de *D. propionicus* a été incubée en présence de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'EPS extraits de boues activées ce qui équivaut à la masse de matière sèche apportée par 10 supports colonisés.

Que les cellules planctoniques soient incubées en absence ou en présence d'EPS, la vitesse de méthylation n'est pas significativement différente (Figure 38). On aurait pu s'attendre à une méthylation plus faible due à la sorption d'une fraction du  $\text{Hg}_{\text{inorg}}$  sur les EPS. Les EPS utilisés ici peuvent être pauvres en composants chargés négativement comme l'acide uronique, le sulfate mais aussi l'acide acétique et pyruvique connus pour fixer les métaux (Kaplan *et al.*, 1987). De plus, il se peut qu'en suspension, et non sous forme d'une structure compacte, leur capacité à former une barrière diffusive se trouve amoindrie. Il serait intéressant d'approfondir cet aspect en faisant varier la quantité d'EPS et de mercure cationique ajoutés mais aussi de tester des polymères portant des charges différentes, voire de former des biofilms artificiels en emprisonnant des bactéries planctoniques méthylantes au sein d'une matrice de ces polymères.

En résumé, nous pouvons retenir que : **(i)** la déstructuration du biofilm diminue de moitié la capacité à méthyler le mercure. Ceci peut être dû à un biais du fait qu'une partie des cellules serait lysée par le traitement aux ultrasons. Il convient donc d'incuber le biofilm intact pour éviter d'introduire ce biais ; **(ii)** En ce qui concerne la souche pure méthylante *Desulfobulbus propionicus* 1pr3, sa vitesse de méthylation sous forme planctonique correspond à ce qui est décrit dans la littérature. En revanche, sous forme de biofilm, aucune vitesse n'a été détectée, suggérant que dans cet état physiologique, les cellules n'expriment pas leur capacité de méthylation. Enfin, **(iii)** l'ajout

d'EPS à des cellules planctoniques de *D. propionicus* 1pr3 n'a pas affecté significativement la vitesse de méthylation indiquant que la différence de méthylation entre les bactéries planctoniques et sessiles n'est pas directement liée aux propriétés chimiques des EPS.

Le développement sous forme de biofilm peut donc impacter significativement la capacité des bactéries à méthyler le mercure sans que cela soit dû directement à la présence des EPS. Un état physiologique et une activité métabolique différents au sein du biofilm pourraient expliquer cette variabilité, mais on ne peut pas exclure un biais méthodologique.

## IV. Discussion et conclusion

Les problématiques de ce chapitre étaient d'évaluer les vitesses de méthylation de l'eau brute, du biofilm et du sédiment de surface de différents sites d'étude et de déterminer si l'activité méthylyante était spécifique du développement sous forme de biofilm.

- Tout d'abord, **(i)** à la densité cellulaire environnementale, les cellules planctoniques ou associées aux MES de l'eau brute ne participent pas de façon prépondérante à la méthylation du mercure ;
- **(ii)** les sédiments de surface présentent systématiquement une activité méthylyante avec des vitesses relativement comparables entre eux ;
- **(iii)** le biofilm, quant à lui, présente un profil moins tranché car cela dépend de la profondeur à laquelle ont été installés les supports. La capacité du biofilm à méthyler le mercure pourrait donc dépendre des conditions physico-chimiques dans lesquelles il se développe. Il apparaît que le compartiment majoritairement responsable de la méthylation du mercure au sein des sept sites d'étude soit le sédiment de surface.
- **(iv)** Parmi les conditions d'incubation et les paramètres physico-chimiques des sites d'étude, la quantité de COT par cellule incubée est positivement corrélée (corrélation linéaire au seuil de 99 %) à la vitesse de méthylation ainsi qu'à la quantité maximale de MeHg formé à l'issue de l'incubation (corrélation linéaire au seuil de 95 %).
- **(v)** Enfin, une éventuelle préexposition des microorganismes du sédiment au mercure (dans le cas d'une contamination comme sur le site ANT) ne favorise pas l'activité méthylyante des cellules, la vitesse reste inférieure à celle obtenue à partir des sédiments de surface des sites non contaminés. L'activation de l'opéron *mer* ( $\text{Hg} > 2 \mu\text{g L}^{-1}$ ), est proposée pour expliquer les faibles valeurs de vitesses de méthylation du site contaminé.

Sur les six sites où l'activité méthylyante de l'eau brute a été mesurée, un seul présente une activité méthylyante détectable (BGR-1 ;  $4 \times 10^{-11} \% \text{MeHg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) bien que cette valeur soit proche de la limite de détection et relativement faible au regard des valeurs obtenues pour les sédiments de surface. Certaines études montrent des résultats similaires sur l'eau brute : aucune activité méthylyante détectée (Coelho-Souza *et al.*, 2006) ou à des valeurs du même ordre de grandeur que les nôtres ( $\approx 1,5 \times 10^{-10} \% \text{MeHg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$  ; Huguet *et al.*, 2010). D'autres présentent des vitesses 25 à 75000 fois supérieures ( $\approx 1 \times 10^{-9}$  à  $3 \times 10^{-6} \% \text{MeHg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) (Guevara *et al.*, 2008 ; Huguet *et al.*,

2010). Ces différences témoignent de la capacité variable des cellules en suspension ou des MES à méthyler le mercure mais elles peuvent aussi être induites par des techniques de prélèvement et d'incubation différentes. A titre d'exemple, plus l'eau brute est prélevée en profondeur, proche du sédiment ( $\approx 10$  à  $25$  m Huguet *et al.*, 2010 ;  $\approx 30$  m Guevara *et al.*, 2008), plus les conditions peuvent être réductrices et favoriser le développement de communautés présentant une activité méthylyante. L'exposition de l'eau brute à la lumière au cours de l'incubation (Guevara *et al.*, 2008) peut entraîner une production primaire photosynthétique qui va supporter l'activité métabolique des microorganismes méthylants. Enfin, dans certains cas, il est impossible de comparer les vitesses de méthylation par cellule car la densité cellulaire de l'eau brute n'a pas été déterminée (Mauro *et al.*, 2002 ; Eckley et Hintelmann, 2006). Lorsqu'aucune activité méthylyante n'est détectée, il serait intéressant de concentrer les MES de l'eau brute (par filtration ou centrifugation de grands volumes) pour déterminer si un potentiel mesurable est atteint avec une plus grande densité bactérienne incubée.

En ce qui concerne le sédiment de surface, nos valeurs sont comprises entre  $3 \times 10^{-5}$  et  $1,2 \times 10^{-2}$  %MeHg  $g^{-1}$  MS  $j^{-1}$ . Les données présentées dans la littérature indiquent des vitesses variables comprises entre  $<10^{-3}$  et  $12,5$  %MeHg  $g^{-1}$  MS  $j^{-1}$  (Korthals et Winfrey 1987 ; Carmouze *et al.*, 2001 ; Martin-Doimeadios *et al.*, 2004 ; Heyes *et al.*, 2006 ; Monperrus *et al.*, 2007 ; Drott *et al.*, 2008 ; Schäfer *et al.*, 2010 ; Avramescu *et al.*, 2011 ; Correia *et al.*, 2012). Outre la méthodologie qui diffère entre les auteurs, la nature du sédiment, la profondeur à laquelle il a été prélevé et les conditions physico chimiques de l'eau interstitielle peuvent expliquer de telles variations.

Dans le cas du biofilm, les données présentées dans la littérature montrent aussi une grande variabilité, allant de  $4 \times 10^{-3}$  à  $63$  %MeHg  $g^{-1}$  MS  $j^{-1}$ , soit un facteur 10000 d'écart (Guimarães *et al.*, 1998 ; Mauro *et al.*, 2001 ; 2002 ; Achá *et al.*, 2005 ; 2011 ; Desrosiers *et al.*, 2006 ; Huguet *et al.*, 2010 ; Hamelin *et al.*, 2011 ; Correia *et al.*, 2012 ; 2013). Nos valeurs se situent dans la fourchette basse avec  $6 \times 10^{-3}$  %MeHg  $g^{-1}$  MS  $j^{-1}$  pour le biofilm du site BGR-1 et  $1,4 \times 10^{-1}$  %MeHg  $g^{-1}$  MS  $j^{-1}$  pour CAB, les vitesses de KWK-1, NAS-1A et SAS-1 étant indétectables. Comme pour l'eau brute et le sédiment, la grande variabilité entre ces valeurs peut s'expliquer par la différence de nature des biofilms étudiés, qui elle-même découle des conditions environnementales dans lesquelles il se sont formés (Hamelin *et al.*, 2015). Le biofilm peut être du périphyton associé à des racines de végétaux immergées (Achá *et al.*, 2005 ; 2011 ; Mauro *et al.*, 2001 ; 2002 ; Guimarães *et al.*, 1998 ; Hamelin *et al.*, 2011 ; Correia *et al.*, 2012 ; 2013), de l'épilithon développé sur des substrats artificiels (Desrosiers *et al.*, 2006 ; cette étude) ou de l'epixylon se développant sur du bois immergé (Huguet *et al.*, 2010). Or, la composition du biofilm en microorganismes peut varier selon la nature du

substrat colonisé (Sigeo, 2005) et ainsi influencer sa capacité à méthyler le mercure. La diversité des méthodes d'analyse peut aussi expliquer la variabilité des résultats obtenus. Dans la majorité des études, le biofilm est incubé dans un volume d'eau brute du site. Or, si celle-ci présente elle-même une activité méthylante, la vitesse de méthylation mesurée sera la résultante des activités (synergiques ou antagonistes) de ces deux compartiments. Il convient donc d'incuber en parallèle l'eau brute et le biofilm de façon indépendante ou en stérilisant l'eau brute au préalable afin d'éviter l'apparition de « faux positifs ». Notre étude sur le site CAB le confirme étant donné que la vitesse de méthylation du biofilm est dix fois plus faible lorsqu'il est incubé en présence d'eau brute non autoclavée.

Parmi les travaux cités ci-dessus, on peut aussi noter la grande variabilité des temps d'incubation, allant de 12 h (Achá *et al.*, 2011) à 17 j (Correia *et al.*, 2013) et qui rend indispensable la normalisation par unité de temps. Il apparaît aussi comme essentiel de faire plusieurs mesures au cours des incubations plutôt qu'une seule à la fin, afin de ne pas manquer un éventuel arrêt de la méthylation en cours d'incubation, ce qui conduirait à sous-estimer la vitesse de méthylation. Plus généralement, la complexité de comparer efficacement l'activité méthylante des échantillons étudiés dans la littérature repose sur un manque de normalisation. En effet, dans la majorité des études, l'activité méthylante est exprimée en % de MeHg formé par rapport à l'apport d'Hg<sub>inorg</sub> (Mauro *et al.*, 2002 ; Achá *et al.*, 2005 ; 2011 ; Correia *et al.*, 2013) ou en j<sup>-1</sup> (Hamelin *et al.*, 2011) alors que peu d'auteurs normalisent par la masse de matière sèche (Guimarães *et al.*, 1998 ; Desrosiers *et al.*, 2006 ; Correia *et al.*, 2012) ou par la densité cellulaire incubée (Huguet *et al.*, 2010). Or, sans normalisation par une grandeur commune aux différents échantillons (volume d'eau, masse de matière sèche ou densité bactérienne incubé) il paraît peu pertinent de comparer l'activité méthylante d'un prélèvement de sédiment et de biofilm par exemple. Sachant que les bactéries sont majoritairement responsables de la méthylation quel que soit le compartiment considéré, la normalisation de la vitesse de méthylation par cellule incubée apparaît particulièrement appropriée.

D'après les résultats obtenus pour les échantillons de sédiment de surface et notamment le sédiment contaminé du site ANT, une forte teneur en Hg<sub>inorg</sub> conduirait à une vitesse de méthylation faible. D'autres auteurs rapportent une baisse significative de la méthylation en augmentant les teneurs en Hg<sub>inorg</sub> (Ullrich *et al.*, 2001). A titre d'exemple, Chen *et al.* (1996) ont montré, lors d'incubation de sédiment d'eau douce, une corrélation positive entre la teneur en HgCl<sub>2</sub> ajouté et le potentiel de méthylation jusqu'à 15,3 µg de HgCl<sub>2</sub> par g MS de sédiment incubé. Au-delà de ce

seuil, la méthylation décroît, parallèlement à une chute de l'activité microbienne ce qui suggère qu'une quantité trop importante de mercure peut impacter l'activité cellulaire. Les concentrations maximales (biofilm du site CAB :  $4,7 \mu\text{g HgCl}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ ) utilisées dans notre étude demeurent trois fois inférieures à ce seuil, on peut donc considérer que la toxicité reste faible pour les bactéries et privilégier l'hypothèse de l'activation de l'opéron *mer*. Il convient donc de veiller, d'une part, à ne pas ajouter lors des incubations des doses de  $\text{Hg}_{\text{inorg}}$  potentiellement toxiques pour les bactéries incubées et, d'autre part, à ne pas dépasser le seuil d'activation de l'opéron *mer* afin d'éviter de sous-estimer la vitesse de méthylation *in situ*.

Dans le cas présent, on considère que c'est l'activation de l'opéron *mer* qui est responsable de la faible méthylation de certains échantillons. Pour appuyer cette hypothèse, on peut, à partir de la quantité de Hg concernée, évaluer le nombre de bactéries impliquées et comparer cette donnée à la littérature. Au cours de l'incubation du sédiment de surface du site ANT, 0,5 % du  $\text{Hg}_{\text{inorg}}$  a été méthylé ce qui représente ( $0,61 \mu\text{g} \times 0,005 =$ )  $3,05 \times 10^{-3} \mu\text{g}$  de Hg. Or, si la méthylation avait été aussi efficace que dans le cas de sites méthylants (CAB, NAS-1A, BGR-1 et SAS-1),  $\approx 20$  % du  $\text{Hg}_{\text{inorg}}$  aurait pu être méthylé soit  $1,2 \times 10^{-1} \mu\text{g}$  de Hg. La question est donc de savoir si l'action de l'opéron *mer* peut expliquer la réduction de ( $1,2 \times 10^{-1} - 3,05 \times 10^{-3} =$ )  $1,19 \times 10^{-1} \mu\text{g}$  de Hg. Sachant que le rendement de réduction du Hg par l'opéron *mer* peut être estimé à  $0,13 \text{ pgHg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$  (Wagner-Döbler *et al.*, 2000), la réduction de  $1,19 \times 10^{-1} \mu\text{g}$  de Hg sur 7 j nécessiterait l'implication de ( $\frac{1,19 \times 10^{-1} \times 10^{-6}}{7 \times 1,3 \times 10^{-13}} =$ )  $1,3 \times 10^5$  cellules soit par rapport aux  $10^9$  cellules incubées, 0,013 %. Pour vérifier si ce résultat est plausible, il faut évaluer la proportion de la population bactérienne incubée qui possède l'opéron *mer*. Ramond *et al.* (2009) ont montré qu'on pouvait trouver au minimum, 6 copies du gène *merA* par ng d'ADN total (au sein d'un sédiment d'estuaire pollué). La quantité d'ADN total a été estimée pour le sédiment de surface du site lorrain CAB à  $12,7 \text{ ng ADN total g}^{-1} \text{ MS}$  (voir Chapitre 3.II.2) ce qui correspondrait à  $7,6 \times 10^4$  copies de *merA* par  $\text{g}^{-1} \text{ MS}$ . Connaissant la densité cellulaire du sédiment de surface du site ANT ( $3,3 \times 10^8 \text{ cell g}^{-1} \text{ MS}$ ) et si l'on considère une seule copie de *merA* par bactérie, 0,02 % de la population bactérienne pourrait être porteur de l'opéron *mer*. Ce résultat est suffisamment proche de l'estimation faite à partir de la quantité de Hg non méthylée et du rendement de réduction de l'opéron *mer* (0,013 %) pour que cette hypothèse soit plausible. Des expériences de biologie moléculaire comme la q-PCR (nombre de copies d'un gène cible) et la qRT-PCR (niveau d'expression d'un gène cible), ciblant une séquence de l'opéron *mer*, pourraient confirmer cette hypothèse.

En ce qui concerne les sites subarctiques, nos résultats ainsi que des données recueillies dans la littérature ont permis d'extrapoler à l'échelle d'une mare thermokarstique l'influence de facteurs comme la température de l'eau et la durée de la période d'eau libre sur la quantité de Hg<sub>inorg</sub> potentiellement méthylée au cours d'une année. Pour des sites présentant une activité méthylante significative (comme NAS-1A, BGR-1 ou SAS-1), une élévation de 2 °C de la température de l'eau et un allongement de 30 j de la période d'eau libre pourraient entraîner un doublement de la proportion Hg<sub>inorg</sub> méthylée (passant de 1,8 % actuellement à 3,6 %).

Enfin, l'impact du biofilm sur la capacité des bactéries à métyler le mercure a aussi été testé par l'utilisation de traitements déstructurant ainsi qu'à l'aide d'un modèle de bactérie méthylante (*Desulfobulbus propionicus* 1pr3). Si la déstructuration du biofilm n'entraîne pas une inhibition totale de la méthylation, des vitesses inférieures ont été mesurées. Ceci peut s'expliquer par le fait que le traitement aux ultrasons utilisé est une méthode agressive qui peut avoir endommagé une partie des cellules. Ainsi, il est nécessaire d'incuber le biofilm intact pour éviter de sous-estimer sa vitesse de méthylation ou éventuellement de normaliser les vitesses de méthylation par un paramètre non affecté par le traitement aux ultrasons comme la teneur en protéines totales par exemple. L'incubation de cellules planctoniques de *Desulfobulbus propionicus* 1pr3 nous a permis de valider nos résultats par rapports à des données présentes dans la littérature. En revanche, sous forme de biofilm, aucune activité méthylante n'a été mise en évidence. De même, l'ajout d'EPS, un composant essentiel de la matrice du biofilm, n'a pas impacté la vitesse de méthylation des cellules planctoniques.







---

**CHAPITRE 3 : Groupes métaboliques bactériens impliqués  
dans la méthylation du mercure par le biofilm**



## I. Introduction

Les bactéries impliquées dans la méthylation du mercure appartiennent principalement à trois groupes métaboliques anaérobies dont les rôles restent, à l'heure actuelle, encore sujet à débat. Le premier à avoir été identifié est celui des sulfatoréductrices (SRB), qui longtemps a été considéré comme l'unique groupe avec des organismes méthylants (Compeau et Bartha, 1985 ; Compeau et Bartha, 1987 ; Gilmour *et al.*, 1992 ; Pak et Bartha, 1998a ; King *et al.*, 2000) même s'il peut aussi être impliqué dans la déméthylation (Oremland *et al.*, 1991 ; Hamelin *et al.*, 2011). Si les SRB sont bien impliquées dans la méthylation, l'activité sulfatoréductrice en elle-même est plutôt décrite pour être associée à une faible méthylation nette. Les sulfures se complexent en effet avec le mercure inorganique et le précipitent en HgS, ou forment des complexes chargés, réfractaires à l'entrée du mercure dans les cellules bactériennes (Gilmour *et al.*, 1998 ; Benoit *et al.*, 1999a). Ainsi, l'activité méthylante des SRB est en fait favorisée à de faibles concentrations en sulfate où lorsque la fermentation est privilégiée par rapport à la réduction du sulfate (Gilmour et Henry, 1991). Les méthanogènes (MPA) sont, quant à elles, plutôt décrites pour être impliquées dans la déméthylation (Oremland *et al.*, 1991 ; Pak et Bartha, 1998a ; Avramescu *et al.*, 2011) ainsi que, plus rarement, dans la méthylation, de façon directe (Hamelin *et al.*, 2011) ou indirecte, en favorisant l'activité d'organismes méthylants par syntrophie (Pak et Bartha, 1998b). Plus récemment, la capacité de certaines bactéries ferriréductrices à méthyler le mercure a été mise en évidence (Warner *et al.*, 2003 ; Fleming *et al.*, 2006 ; Kerin *et al.*, 2006 ; Si *et al.*, 2015).

L'identification de ces groupes métaboliques a été permise par l'isolement de souches bactériennes provenant d'échantillons environnementaux méthylants et par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ciblant tel ou tel groupe métabolique (Compeau et Bartha, 1985 ; Desrosiers *et al.*, 2006 ; Correia *et al.*, 2012 ; Hamelin *et al.*, 2011 ; Avramescu *et al.*, 2011). Ainsi, l'ion molybdate ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) est utilisé comme inhibiteur de l'activité sulfatoréductrice (Oremland et Capone, 1988). Comme le chromate ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ), le tungstate ( $\text{WO}_4^{2-}$ ) et le sélénate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ), qui sont des analogues de l'ion sulfate, le  $\text{MoO}_4^{2-}$  entre dans la cellule via un système de transport actif où il interfère avec la formation d'adénosine phosphosulfate (APS) par l'ATP sulfurylase en formant de l'adénosine phospho-molybdate bloquant ainsi la production d'ATP (Taylor et Oremland, 1979 ; Patidar et Tare, 2005). L'acide 2-bromoéthanesulfonique (BESA) est connu pour inhiber l'activité méthanogène en bloquant la méthyle co-enzyme M réductase (Gunsalus *et al.*, 1978). Le chloramphénicol est, quant à lui, un bactériostatique à large spectre qui agit en inhibant la synthèse protéique (Rendi et Ochoa, 1962).

Certaines bactéries peuvent ne pas être sensibles à ces inhibiteurs, soit parce qu'elles présentent des résistances intrinsèques, soit parce qu'elles sont physiquement protégées, par les EPS de la matrice des biofilms par exemple. De même, certains composés, peuvent à la fois inhiber la croissance d'une partie de la communauté bactérienne et en favoriser une autre. C'est le cas du BESA qui en plus d'inhiber les méthanogènes, peut servir d'accepteur d'électrons à certaines SRB via la respiration du groupe sulfonate (Oremland et Capone, 1988). Il convient donc d'être prudent quant à l'interprétation des résultats obtenus en utilisant ces composés et de les confirmer par d'autres approches comme par exemple en évaluant la diversité des gènes responsables de la méthylation au sein de la population bactérienne. Cette démarche a été rendue possible très récemment par la découverte de ces gènes par Parks *et al.* (2013). En recherchant chez des microorganismes méthylants des séquences codant pour des protéines capables de transférer un groupe méthyle à divers substrats métalliques, les auteurs ont mis en évidence deux séquences *hgcA* et *hgcB* qui semblent co-exprimées. Elles codent respectivement pour la protéine corrinoïde qui transfère le groupe méthyle au mercure de façon aspécifique et la protéine type ferrédoxine capable de réduire la première et ainsi permettre à la réaction de recommencer.

Dans ce chapitre, nous avons cherché à : **i)** identifier les métabolismes ferriréducteurs et sulfatoréducteurs au sein de nos échantillons ainsi que l'effet des inhibiteurs spécifiques  $\text{MoO}_4^{2-}$ , BESA et chloramphénicol sur ces deux groupes. En parallèle, **ii)** le gène *hgcA* a été recherché et la diversité des séquences mises en évidence a été analysée afin d'identifier les espèces (et par là même, les groupes métaboliques) auxquelles ces séquences sont associées. Enfin, **iii)** un biofilm méthylant a été choisi pour être incubé avec le  $\text{Hg}_{\text{inorg}}$  en présence d'inhibiteurs spécifiques et ainsi déterminer le rôle des SRB, MPA et IRB dans la méthylation du mercure au sein de cet échantillon.

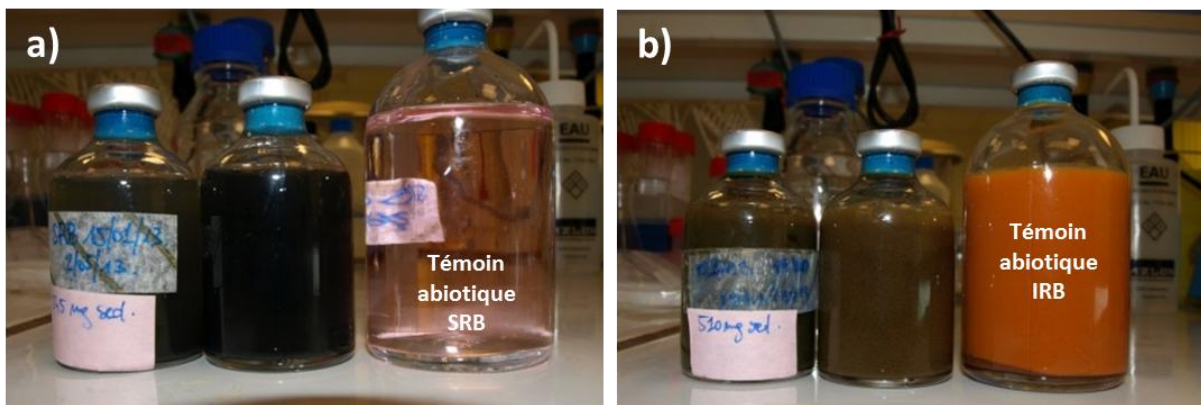
## II. Matériels et Méthodes

### 1) Enrichissement en groupes métaboliques SRB et IRB et validation des inhibiteurs spécifiques

Afin de vérifier la présence des activités métaboliques sulfatoréductrice et ferriréductrice, les échantillons de chaque site d'étude (eaux brutes, biofilms et sédiments de surface) ont été incubés dans des milieux de croissance spécifiques. Le milieu contenait comme accepteur final d'électrons uniquement du sulfate (et thiosulfate) et le milieu IRB du fer ferrique, soluble ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrate) ou solide (la lépidocrocite,  $\gamma\text{-FeOOH}$ ). La composition détaillée des milieux de culture est donnée en Annexes, Tableaux A5 et A6. Dix millilitres d'eau brute (non filtrée, non autoclavée), 10 supports K1 colonisés ou  $\approx 500$  mg de sédiment de surface ont été incubés dans 100 mL de milieu spécifique de croissance à 30 °C, à l'obscurité et en anaérobiose. L'efficacité des inhibiteurs spécifiques de croissance a été testée au cours des cultures aux concentrations suivantes : 5 mM de BESA (acide bromo-2-éthanesulfonique, sel de sodium  $\geq 98$  %, 8.18868.0025, Merck), 0,5 mM de  $\text{MoO}_4^{2-}$  (sodium molybdate dihydrate *BioChemica*  $\geq 99$  %, A2193.0100, AppliChem) 5 mM de BESA + 0,5 mM de  $\text{MoO}_4^{2-}$  et 0,2 mM de chloramphénicol ( $\geq 98$  %, C0378-5G, Sigma-Aldrich).

Dans un premier temps, l'activité des groupes métaboliques a été appréciée macroscopiquement par l'apparition d'un précipité noir de FeS pour le milieu SRB (Figure 39 a) et d'un verdissement du milieu IRB (Figure 39 b). En effet, l'activité sulfatoréductrice produit du sulfure qui précipite avec le Fe<sup>II</sup> présent dans le milieu SRB (Mehrotra et Sedlak, 2005). Dans le cas des IRB, l'oxyde de Fe<sup>III</sup> de couleur orange (lépidocrocite) est réduit en Fe<sup>II</sup> qui précipite pour former un minéral de couleur verte (rouille verte) ou noir (magnétite) (Ona-Nguema *et al.*, 2002).

Dans un second temps, l'efficacité, dans nos conditions expérimentales, des inhibiteurs spécifiques de croissance sur les activités SRB et IRB, a été validé au cours de l'incubation de biofilm du site CAB, en dosant respectivement la concentration en sulfate et les concentrations en Fe<sup>II</sup> et Fe<sup>total</sup>. Du fait de la quantité restreinte d'échantillons subarctiques et du site ANT, le suivi de la réduction du sulfate et du Fe<sup>III</sup> ainsi que la validation des inhibiteurs spécifiques de croissance ont été effectués uniquement sur les échantillons du site lorrain CAB.



**Figure 39.** Aspect des flacons de culture du milieu SRB (a) et IRB (b) inoculés à partir de sédiment de surface après un mois d'incubation à 30 °C. Le milieu SRB, initialement limpide et de couleur rosée, est devenu opaque et noir du fait de la formation de FeS<sub>s</sub>, et le milieu IRB, initialement orange est devenu vert, du fait de la formation d'espèces ferreuses.



a) Dosage du sulfate

La concentration en sulfate a été suivie par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Metrohm 882 Compact IC plus) équipée d'une double suppression (séquentielle (Metrohm CO<sub>2</sub> suppressor MCS) et chimique (Metrohm suppressor MSM II)) et d'un détecteur de conductivité. La séparation s'effectue dans une colonne (Metrosep A Supp 5-250 column) contenant des particules de polyvinyle dont la surface est fonctionnalisée par des groupements ammonium quaternaires (diamètre des particules : 5 µm). Deux colonnes de garde (Metrosep A supp 4/5 guard et RP 2 Guard column) sont placées en amont afin de supprimer les traces de matière organique. L'éluant est constitué d'une solution de 3,2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, 99,5 %) et 1 mM NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, 99,7 %) dans l'eau ultra pure (Purelab Option-Q, Elga LabWater, Antony, France) contenant 4 % d'acétone (grade technique). Le débit est de 0,6 mL min<sup>-1</sup> et le volume d'injection de 20 µL.

Lors du prélèvement, les échantillons ont été filtrés (membrane Millipore polyethersulfone, 0,22 µm de porosité) puis dilués directement dans l'éluant de chromatographie, préalablement dégazé à l'azote 99 %.

b) Dosage du Fe<sup>II</sup> et Fe<sup>total</sup> par spectrophotométrie

La méthode spectrophotométrique à la ferrozine a été utilisée pour doser le Fe<sup>II</sup> et le Fe<sup>total</sup> (d'après Viollier *et al.*, 2000). Après une étape d'extraction dans HCl (6 M), 20 µL d'échantillons sont mélangés à 80 µL d'HCl (1 M) dans le cas du dosage de Fe<sup>II</sup> ou à 80 µL d'HAHCl (hydroxylamine hydrochlorique) (10 % w/v dans HCl 1 M) dans le cas du Fe<sup>total</sup> puis placés à l'obscurité pendant 30 min. Un volume de 100 µL de ferrozine (Acros Organic, > 98 % pureté) (0,1% w/v dans une solution d'acétate de sodium 50% w/v) est alors ajouté avant de placer l'échantillon 5 min à l'obscurité. Les différents essais sont réalisés dans une plaque de 96 puits (PlateOne, Starlab France, S1837-9600) et les mesures d'absorbance sont effectuées par un lecteur de plaques (Tecan Infinite M200 PRO) à une longueur d'onde de 562 nm. En parallèle, des blancs sont réalisés en remplaçant l'échantillon par le même volume d'eau ultra pure.

## 2) Détection et diversité des séquences *hgcA*

La détection des séquences du gène *hgcA* ainsi que l'analyse de leur diversité se sont déroulées en collaboration avec le LIEC (UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy, P. Billard)

### a) Extraction de l'ADN

Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir de 0,5 mL d'eau brute ; 0,5 g de sédiment de surface ou du biofilm de 10 supports K1 préalablement dispersé et collecté sur une membrane (Omnipore PTFE, 0,2  $\mu\text{m}$  de porosité, Millipore). L'ADN total de chaque échantillon a été extrait à l'aide du kit FastDNA™ *spin kit for soil* (MP Biomedicals) couplé à l'utilisation d'un agitateur Fastprep (MP Biomedicals). Cette méthode allie un broyage physique grâce aux microbilles de silice contenues dans les tubes, à un traitement chimique par un mélange de détergents dans un tampon.

### b) Quantification d'ADN par spectrophotométrie

L'ADN a été dosé par spectrophotométrie (Shimadzu UV-1800) à partir de 3  $\mu\text{L}$  de la suspension d'extraction obtenue précédemment. La pureté en ADN de l'échantillon a été appréciée par le ratio  $A_{260}/A_{280}$ , un échantillon présentant un ratio proche de 2 est considéré comme « pur ». La relation entre l'absorbance à 260 nm ( $A_{260}$ ) et la concentration d'ADN est de : 1 unité  $A_{260}$  nm = 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Tous les échantillons ont été dilués de façon à obtenir une concentration en ADN de 10  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

### c) Amplification par PCR en point final

Tous les réactifs proviennent de Thermo Fisher Scientific et les amorces ont été synthétisées par la société Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne).

Le mélange réactionnel de PCR comprenait 10 ng d'ADN ; 5  $\mu\text{L}$  d'oligonucléotides « *forward* » (5  $\mu\text{M}$ ) ; 5  $\mu\text{L}$  d'oligonucléotides « *reverse* » (5  $\mu\text{M}$ ) ; 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (désoxyribonucléotide tri phosphate) 10 mM ; 5  $\mu\text{L}$  de tampon Taq (10X) ; 0,2  $\mu\text{L}$  de Dream Taq DNA polymerase ;  $\text{H}_2\text{O}$  qsp 50  $\mu\text{L}$ . Les oligonucléotides « *forward* » et « *reverse* » correspondent aux amorces PhgcA ciblant le gène *hgcA*, construites grâce à un alignement de séquences déjà connues et par l'utilisation du logiciel CODEHOP (Annexes, Figure A2). Les réactions de PCR ont été effectuées dans un thermocycleur MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad) selon le protocole décrit dans le Tableau 10.

Tableau 10. Paramètres appliqués lors des réactions de PCR.

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
1	95 °C	4 min	1
2	95 °C	20 s	35
3	54 à 60 °C	30 s	1
4	72 °C	40 s	1
5	72 °C	5 min	1

## d) Electrophorèse sur gel d'agarose et purification des produits de PCR

Un gel d'agarose à 0,8 % a été préparé dans 25 mL de tampon TAE 1X (40 mM Tris acétate, 1 mM EDTA). Cinq microlitres de produits de PCR ont été ajoutés à 2 µL de bleu de bromophénol et la migration a été effectuée dans un bain de tampon TAE 1X à une tension de 125 V pendant 15 min. Le gel a ensuite été placé dans du bromure d'éthidium (BET) pendant 10 min puis rincé et analysé sous UV. Les produits PCR ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Cleanup (Macherey Nagel) après découpage des produits de migration d'intérêt révélés sous lumière bleue (transilluminateur à LED).

## e) Clonage de produits PCR

Le clonage des produits de PCR purifiés a été réalisé dans le vecteur pGEM-T (Promega) (Annexes, Figure A3). Dix microlitres de tampon « *rapid ligation* » 2X ont été ajoutés à 1 µL de vecteur pGEM-T, 3 µL de produit PCR purifié, 1 µL de ligase et 5 µL d'eau pour obtenir un volume final de 20 µL. Le mélange a été homogénéisé puis incubé pendant 1h à 22 °C avant d'être utilisé pour transformer *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen).

f) Transformation d'*Escherichia coli*

La transformation des cellules d'*Escherichia coli* TOP10 avec le plasmide pGEM-T portant les produits de PCR s'est fait par la méthode du choc thermique de cellules rendues compétentes par traitement au CaCl<sub>2</sub> (Sambrook et Russel, 2001). Deux microlitres de produit de ligation ont été mis en présence de 50 µL de cellules compétentes pendant 20 min dans la glace puis à 42 °C pendant 1 min. Les cellules ont été ensuite cultivées dans 1 mL de milieu LB à 37 °C, sous agitation (150 rpm), pendant 1 h. Cette suspension a été ensuite utilisée pour ensemercer des milieux solides LB Agar supplémentés en ampicilline (100 µg mL<sup>-1</sup>) et en X-Gal (2 %). Les cultures ont été incubées à 37 °C durant 16 à 24 h, les colonies issues des cellules transformées par un plasmide ayant intégré l'insert sont reconnaissables par leur couleur blanche. Les autres, de couleur bleue, correspondent aux bactéries exprimant le gène lacZ du vecteur pGEM-T, ont donc été transformées par un plasmide sans insert.

g) Séquençage des produits PCR et traitement des données

Le vecteur n'étant pas spécifique de la séquence purifiée, une PCR utilisant des amorces M13 ciblant le vecteur pGEM-T a été effectuée directement sur les colonies blanches pour s'assurer de la présence et la taille de l'insert. Lorsque la taille attendue a été détectée, les produits PCR ont été purifiés pour être séquencés (Eurofins Genomics, Ebersberg, Allemagne). Les séquences brutes obtenues, ont été traitées manuellement afin d'éliminer les séquences relatives au vecteur pGEM-T puis traduites en séquences protéiques (portail bioinformatique ExPaSy, <http://www.expasy.org>). Celles-ci ont ensuite été alignées avec des séquences protéiques HgcA connues à l'aide du logiciel « Seaview » (Gouy *et al.*, 2010) et un arbre a été réalisé en utilisant la méthode de « Neighbor Joining ».

### 3) Méthylation du mercure

Pour identifier les groupes métaboliques impliqués dans la méthylation du mercure, les inhibiteurs spécifiques de croissance décrits précédemment : BESA (5 mM),  $\text{MoO}_4^{2-}$  (0,5 mM), BESA +  $\text{MoO}_4^{2-}$  (5 mM et 0,5 mM) et chloramphénicol (0,2 mM) ont été ajoutés aux incubations de biofilm des sites CAB et BGR-1. Il n'existe, à notre connaissance aucun inhibiteur spécifique de l'activité ferriréductrice. La composition détaillée des flacons d'incubation pour chaque condition est décrite en Annexes, Tableau A7.

Les vitesses de méthylation ont été obtenues selon la méthode décrite dans le chapitre précédent (Chapitre 2.III.2.a.). Brièvement, les incubations ont démarré avec l'ajout d'une solution enrichie isotopiquement en  $^{199}\text{Hg}_{\text{inorg}}$  ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) et se sont déroulées sur 7 j, à 25 °C, à l'obscurité et en anoxie. Des prélèvements ont été effectués à 2, 4 et 7 j et l'évolution du rapport isotopique entre l'ajout enrichi et un isotope naturel de référence au cours du temps a permis de déterminer les potentiels de méthylation de chaque échantillon.

Des contrôles ont aussi été réalisés en incubant 5 mM de BESA, 0,5 mM de  $\text{MoO}_4^{2-}$  ou 0,2 mM de chloramphénicol dans 100 mL d'eau brute stérilisée du site CAB afin de s'assurer que l'ajout de ces composés n'induisait pas un biais dans la mesure (Annexes, Tableau A3).

### **III. Résultats et discussion**

#### **1) Enrichissement en groupes métaboliques SRB et IRB et validation des inhibiteurs spécifiques**

Afin de mettre en évidence la présence des groupes métaboliques SRB et IRB, qui rappelons le, sont des groupes susceptibles de présenter une activité méthylante, les eaux brutes, les biofilms et les sédiments de surface des différents sites d'étude ont été incubés dans des milieux spécifiques à la sulfatoréduction ou à la ferriréduction afin de les enrichir en bactéries SRB et IRB.

Les résultats des observations macroscopiques des flacons d'enrichissement sont compilés dans le Tableau 11.

Aucune des incubations faites sur les eaux brutes n'ont donné de résultats positifs. Quel que soit le site considéré, les groupes SRB et IRB ne sont donc pas suffisamment représentés au sein de l'eau brute pour qu'une activité métabolique soit détectée avec un volume d'inoculum de 10 mL.

Dans 11 cas sur 12, les échantillons de biofilm et de sédiment de surface contiennent des microorganismes appartenant à au moins l'un des deux groupes métaboliques recherchés et dans 7 cas les deux groupes métaboliques ont été mis en évidence (Tableau 11). Seul le biofilm issu du site NAS-1A ne présente aucune activité SRB ou IRB détectable par cette méthode.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le sédiment de surface et le biofilm pouvaient présenter une activité méthylante contrairement à l'eau brute (Chapitre 2.III.2.a) or, au vu des résultats présentés ici, cette dernière est relativement pauvre en microorganismes SRB et IRB. Cette observation appuie l'hypothèse de l'implication de ces deux métabolismes dans l'activité méthylante des biofilms et des sédiments de surface étudiés ici.

Tableau 11. Résultats qualitatifs obtenus par observation macroscopique un mois après l'inoculation des milieux de croissance spécifiques par les biofilms et de sédiments de surface de chaque site d'étude. ND : non déterminé.

Site d'étude	Echantillon	Activité IRB	Activité SRB
<b>CAB</b>	Eau brute	Non	Non
	Biofilm	Oui	Oui
	Sédiment	Oui	Oui
<b>ANT</b>	Eau brute	Non	Non
	Biofilm	ND	ND
	Sédiment	Oui	Oui
<b>KWK-1</b>	Eau brute	Non	Non
	Biofilm	Oui	Oui
	Sédiment	Oui	Oui
<b>KWK-12</b>	Eau brute	Non	Non
	Biofilm	ND	ND
	Sédiment	Non	Oui
<b>NAS-1A</b>	Eau brute	Non	Non
	Biofilm	Non	Non
	Sédiment	Oui	Oui
<b>BGR-1</b>	Eau brute	Non	Non
	Biofilm	Non	Oui
	Sédiment	Non	Oui
<b>SAS-1</b>	Eau brute	Non	Non
	Biofilm	Oui	Oui
	Sédiment	Non	Oui

L'effet des inhibiteurs de croissance sur les activités SRB et IRB, dans nos conditions expérimentales, a été déterminé en suivant, au cours du temps, respectivement les concentrations en  $\text{SO}_4^{2-}$  (Figure 40) et en  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et  $\text{Fe}^{\text{total}}$  (Figure 41).

En absence d'inhibiteurs, le biofilm du site CAB réduit le sulfate à une vitesse équivalente à celle de la souche *Desulfovibrio desulfuricans*. L'ajout de BESA, un inhibiteur de croissance des microorganismes méthanogènes (Oremland, 1991), n'impacte pas l'activité sulfatoréductrice de l'échantillon. En revanche, le  $\text{MoO}_4^{2-}$ , qui est un inhibiteur de l'activité sulfatoréductrice (Oremland et Capone, 1988), associé ou non au BESA, et le chloramphénicol, inhibent totalement la réduction du sulfate (Figure 40). L'utilisation du  $\text{MoO}_4^{2-}$  afin d'évaluer l'implication des SRB dans la vitesse de méthylation lors des incubations avec le mercure est donc pertinente.

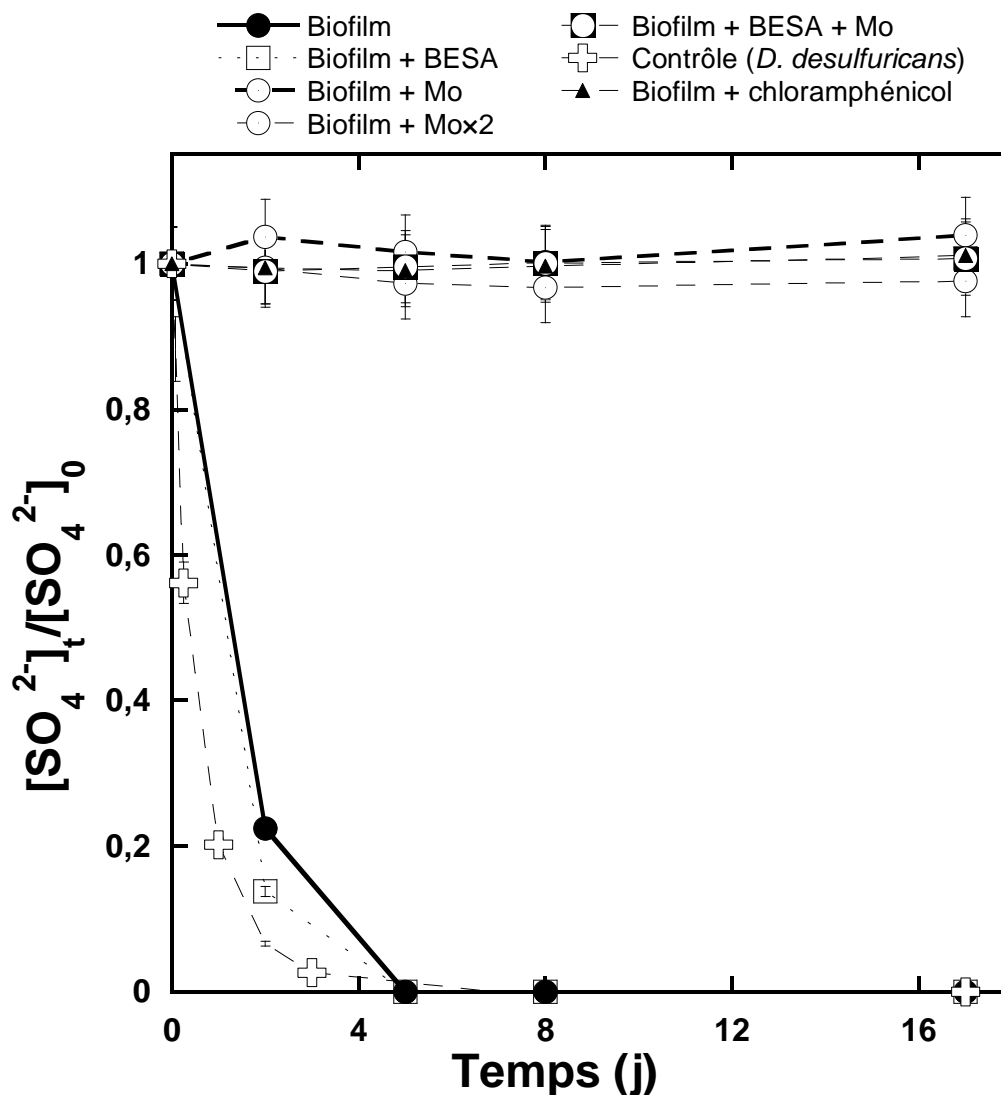
A ce jour, nous n'avons pas identifié d'inhibiteur spécifique de l'activité IRB. Néanmoins, il est nécessaire de s'assurer de l'effet des autres inhibiteurs (BESA,  $\text{MoO}_4^{2-}$  et chloramphénicol) sur cette activité.

Avec le contrôle « positif » (*Shewanella putrefaciens* CIP 80.40),  $\approx 70\%$  du  $\text{Fe}^{\text{III}}$  est réduit en deux semaines. Avec le biofilm du site CAB, un taux de  $80\%$  est atteint (Figure 41).

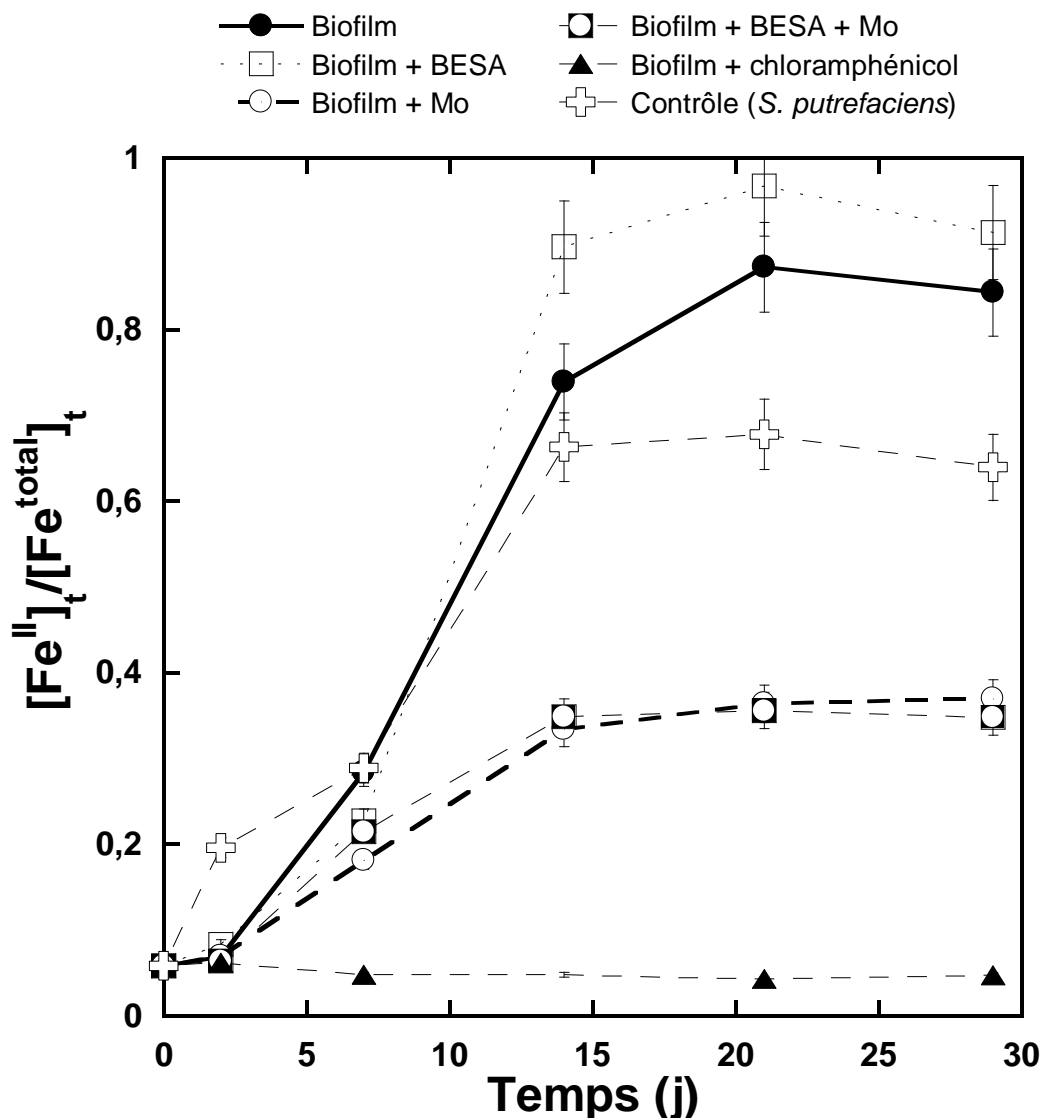
En présence de BESA,  $90\%$  du  $\text{Fe}^{\text{III}}$  initial est réduit (soit  $\approx 10\%$  en plus par rapport à l'essai sans inhibiteur). En présence de  $\text{MoO}_4^{2-}$ , seul ou accompagné de BESA, la réduction du  $\text{Fe}^{\text{III}}$  n'atteint que  $35\%$  (Figure 41). Ces résultats sont, a priori, inattendus étant donné que ni le BESA ni le  $\text{MoO}_4^{2-}$  ne sont censés impacter l'activité ferriréductrice. Toutefois, les SRB sont connues pour contribuer indirectement à la réduction du  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . En effet, le sulfure que produit l'activité sulfatoréductrice, réduit le  $\text{Fe}^{\text{III}}$  et contribue ainsi à accroître la quantité de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et à surestimer l'activité IRB. Sachant qu'un sulfure peut potentiellement réagir avec  $1,5$  à  $8 \text{ Fe}^{\text{III}}$  selon s'il s'oxyde en  $\text{S}^0$  ou en  $\text{SO}_4^{2-}$  (Peiffer *et al.*, 1992 ; Coleman *et al.*, 1993), la teneur en sulfate dans le milieu ( $1,4 \text{ mM}$ ) ne peut que contribuer partiellement à la réduction du  $\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $\approx 12 \text{ mM}$  sur les  $150 \text{ mM}$  de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  initiaux).

Le BESA, peut servir d'accepteur final d'électrons à certaines SRB et conduire aussi à la formation de sulfure lors de la réduction du groupe sulfonate qu'il porte (Ye *et al.*, 1999 ; Ettwig, 2006), l'activité SRB est alors perçue comme plus importante. Avec les  $5 \text{ mM}$  de BESA, on peut théoriquement s'attendre à la formation de  $7,5$  à  $40 \text{ mM}$  de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (en considérant qu'un sulfonate donne un sulfure qui va ensuite réagir avec  $1,5$  à  $8 \text{ Fe}^{\text{III}}$ , Lie *et al.*, 1998 ; Coleman *et al.*, 1993, Li *et al.*, 2006). Ici, l'ajout de BESA conduit à une augmentation de  $10$  à  $15 \text{ mM}$  de la concentration en  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , ce qui rend plausible l'hypothèse de la participation des SRB dans la réduction indirecte du  $\text{Fe}^{\text{III}}$  par le biais du sulfure biogénéré.





**Figure 40.** Evolution de la concentration relative en sulfate ( $[\text{SO}_4^{2-}]_t/[\text{SO}_4^{2-}]_0$ ) au cours du temps suite à l'incubation du biofilm du site CAB (10 supports K1 colonisés) dans 50 mL de milieu SRB à 30 °C (avec comme accepteur terminal d'électrons :  $[\text{SO}_4^{2-}]_0 = 28 \text{ mM}$  ; et comme donneurs d'électrons :  $[\text{acétate}]_0$ ,  $[\text{lactate}]_0$  et  $[\text{pyruvate}]_0 = 10 \text{ mM}$ ). Certaines incubations ont été conduites en présence de BESAs (5 mM), de  $\text{MoO}_4^{2-}$  (0,5 ou 1 mM), de BESAs et de  $\text{MoO}_4^{2-}$  (5 mM + 0,5 mM) ou de chloramphénicol (0,2 mM). Une incubation « contrôle » a été effectuée avec la souche pure SRB *Desulfovibrio desulfuricans* DSM63 ( $2 \times 10^7 \text{ cell mL}^{-1}$ ). Les barres verticales représentent l'erreur moyenne sur les mesures ( $\pm 6 \%$ ). La composition détaillée du milieu SRB se trouve en Annexes, Tableau A5.



**Figure 41.** Evolution du rapport  $[Fe^{II}]_t/[Fe^{total}]_t$  au cours du temps suite à l'incubation du biofilm du site CAB (10 supports K1 colonisés) dans 50 mL de milieu IRB ( $Fe^{III}$ -citrate) à 30 °C (avec comme accepteur terminal d'électrons :  $[Fe^{III}]_0 = 1,5 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$  ; et comme donneurs d'électrons :  $[acétate]_0$ ,  $[lactate]_0$  et  $[pyruvate]_0 = 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ). Certaines incubations ont été conduites en présence de BESA (5 mM), de  $MoO_4^{2-}$  (0,5 mM), de BESA et de  $MoO_4^{2-}$  (5 mM + 0,5 mM) ou de chloramphénicol (0,2 mM). Une incubation « contrôle » a été effectuée avec la souche pure IRB *Shewanella putrefaciens* CIP 80.40 ( $2 \times 10^8 \text{ cell ml}^{-1}$ ). Les barres verticales représentent l'erreur moyenne sur les mesures ( $\pm 6 \%$ ). La composition détaillée du milieu IRB se trouve en Annexes, Tableau A6.

En présence de  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\approx 37\%$  du  $\text{Fe}^{\text{III}}$  initial (soit  $\approx 70\text{ mM}$ ) est réduit, soit moitié moins qu'avec l'essai sans inhibiteurs (Figure 41). Il est peu probable que cette différence s'explique par l'inhibition directe du molybdate sur les IRB étant donné qu'il n'a jamais été décrit pour interagir avec l'activité enzymatique ferriréductrice, particulièrement dans des conditions où il est introduit en concentration inférieure ou égale à celle du sulfate comme c'est le cas ici ( $0,5\text{ mM}$  de  $\text{MoO}_4^{2-}$  pour  $1,4\text{ mM}$   $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Fleming *et al.*, 2006). Il est plus plausible que cette baisse d'activité IRB soit due, à la fois à l'inhibition de la réduction du  $\text{Fe}^{\text{III}}$  par le sulfure biogénéré ( $\approx 2$  à  $11\text{ mM}$  de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) et une possible action du molybdate sur des fonctions essentielles des SRB comme la voie assimilatrice du soufre. L'activité IRB en présence de  $\text{MoO}_4^{2-}$ , donc sans le concours des SRB, reste néanmoins conséquente (contrairement à l'essai en présence de chloramphénicol où la réduction est nulle) ce qui traduit bien la présence de bactéries ferriréductrices au sein du biofilm du site CAB.

Ces résultats montrent donc que l'activité SRB du biofilm du site CAB est totalement inhibée avec le  $\text{MoO}_4^{2-}$  et le chloramphénicol alors qu'en présence de BESA, aucune différence significative n'est observée par rapport au contrôle sans inhibiteurs ou à la souche *Desulfovibrio desulfuricans*.

Les résultats obtenus sur l'activité IRB ont pu mettre en évidence le rôle du BESA comme éventuel accepteur d'électron pour les SRB ainsi que l'implication de ces dernières dans la réduction du  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .

Il convient donc de garder à l'esprit que le BESA, en plus de son rôle d'inhibiteur de croissance des MPA, peut être responsable d'une hausse de l'activité SRB lorsque le sulfate est limitant.

## 2) Recherche du gène *hgcA* au sein des échantillons environnementaux et analyse de sa diversité.

Les gènes *hgcA* et *hgcB* codant des protéines responsables de la méthylation du mercure ont récemment été mis en évidence (Parks *et al.*, 2013). Le gène *hgcA* code une protéine corrinoïde capable de transférer un groupe méthyle à un substrat métallique. Cette protéine, une fois déméthylée, doit être réduite par une enzyme de type ferrédoxine codée par *hgcB* afin d'être régénérée. La présence de ces deux gènes a été confirmée chez de nombreux organismes méthylants alors qu'ils sont absents des génomes des organismes non méthylants étudiés. L'occurrence de ces séquences au sein du pool d'ADN issu de communautés microbiennes (métagénome) peut donc indiquer la présence d'organismes potentiellement méthylants.

Dans cette étude, la séquence *hgcA* a été recherchée au sein des différents échantillons. Les fragments PCR obtenus grâce à des amorces spécifiques ciblant un domaine conservé du gène ont été séquencés puis comparés à des bases de données afin d'en apprécier la diversité.

Les échantillons dans lesquels le gène *hgcA* a été recherché sont listés dans le Tableau 12. Les eaux brutes des sites canadiens n'ont pas pu être analysées en raison de la trop faible quantité d'échantillon disponible. Tout d'abord, l'ADN des échantillons a été extrait puis analysé par électrophorèse sur gel d'agarose afin d'évaluer l'efficacité de l'extraction et ainsi la quantité et la qualité de l'ADN extrait.

Tableau 12. Echantillons pour lesquels la recherche du gène *hgcA* a été effectuée.

Site d'étude	Echantillon testé
<b>CAB</b>	Eau brute
	Biofilm
	Sédiment
	Enrichissement SRB
	Enrichissement IRB
<b>KWK-1</b>	Biofilm
	Sédiment
<b>KWK-12</b>	Sédiment
<b>NAS-1A</b>	Biofilm
	Sédiment
<b>BGR-1</b>	Biofilm
	Sédiment
	Enrichissement SRB
	Enrichissement IRB
<b>SAS-1</b>	Biofilm
	Sédiment

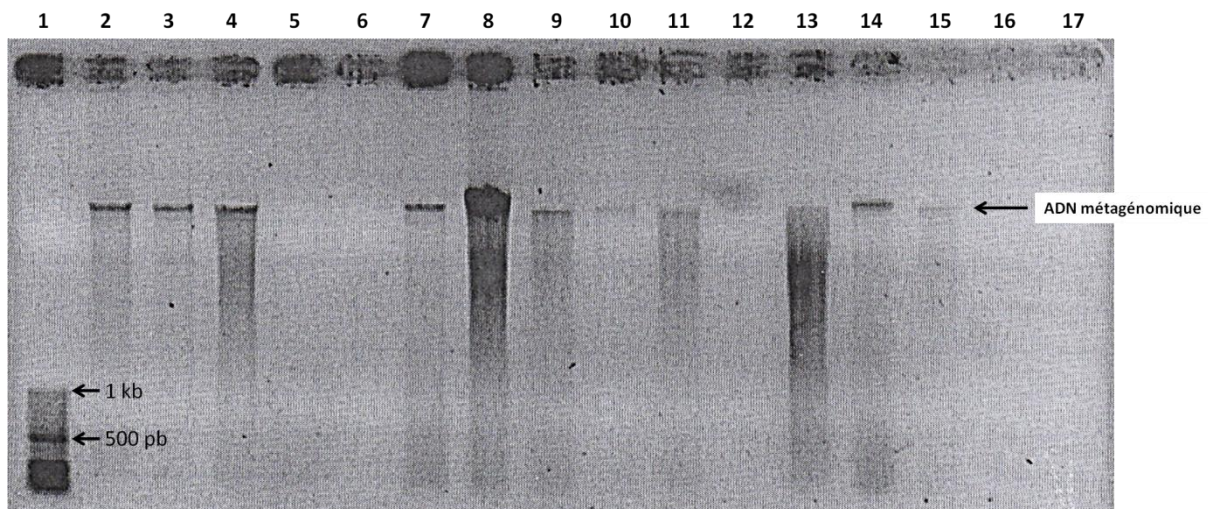


Figure 42. Photographie d'un gel d'électrophorèse montrant la présence d'ADN extrait des échantillons d'eau brute, de biofilm et de sédiment de surface. 1 : marqueur de taille ; 2 : CAB eau brute ; 3 : CAB biofilm ; 4 : CAB sédiment ; 5 : CAB SRB ; 6 : CAB IRB ; 7 : KWK-1 biofilm ; 8 : KWK-1 sédiment ; 9 : KWK-12 sédiment ; 10 : SAS-1 biofilm ; 11 : SAS-1 sédiment ; 12 : NAS-1A biofilm ; 13 : NAS-1A sédiment ; 14 : BGR-1 biofilm ; 15 : BGR-1 sédiment ; 16 : BGR-1 SRB ; 17 : BGR-1 IRB. Les essais « SRB » et « IRB » ont été effectués à partir des enrichissements dans des milieux favorisant respectivement l'activité sulfatoréductrice et ferriréductrice.

Le gel d'électrophorèse (Figure 42) met en évidence la présence d'ADN dans la majorité des échantillons testés (CAB eau brute ; CAB biofilm ; CAB sédiment ; KWK-1 biofilm ; KWK-1 sédiment ; KWK-12 sédiment ; SAS-1 biofilm ; SAS-1 sédiment ; NAS-1A sédiment ; BGR-1 biofilm ; BGR-1 sédiment). Pour les échantillons provenant d'enrichissements dans les milieux spécifiques, la faible quantité de bactéries récoltées ( $\approx 10^7$  cellules contre  $\approx 10^{10}$  cellules pour les autres échantillons, en moyenne) peut expliquer que les extractions d'ADN n'aient pas donné de résultats exploitables. La majorité de l'ADN extrait est localisée dans une bande de haut poids moléculaire, ce qui indique qu'il a été peu dégradé lors de l'extraction, mis à part l'échantillon NAS-1A sédiment (Figure 42, puits 13).

a) Validation de la méthode d'amplification du gène *hgcA* par PCR

Les amorces ont été testées au préalable pour s'assurer qu'elles permettaient bien une amplification spécifique du gène *hgcA*. Pour cela, trois essais ont été réalisés, un contrôle négatif (sans échantillon), une souche non méthylante *Desulfovibrio desulfuricans* DSM63 (Gilmour *et al.*, 2011) ainsi que de l'ADN extrait de sédiments contaminés par des métaux dont le mercure (échantillon BETH-72 : sédiment prélevé à 72 cm de profondeur dans la retenue du barrage de Beth sur l'Orne (57) dans le cadre du projet Quali-Orne). A ce moment de l'étude, nous ne disposions pas de la souche méthylante *Desulfobulbus propionicus* 1pr3 utilisée dans le Chapitre 2, l'échantillon BETH-72 sert donc ici de contrôle positif.

La PCR réalisée sur ces trois échantillons met en évidence l'amplification d'un fragment d'ADN à partir de BETH-72, alors que les contrôles négatifs ne donnent pas d'amplicon (Figure 43). De plus le fragment amplifié est unique et possède la taille attendue pour une amplification de *hgcA* (environ 650 pb) ce qui suggère que les amorces utilisées sont spécifiques. La présence de ce gène dans l'échantillon BETH-72 est cohérente dans la mesure où il s'agit d'un sédiment anaérobie, un habitat propice aux principaux acteurs de la méthylation du mercure (Pak et Bartha, 1998a ; Fleming *et al.*, 2006 ; Avramescu *et al.*, 2011).

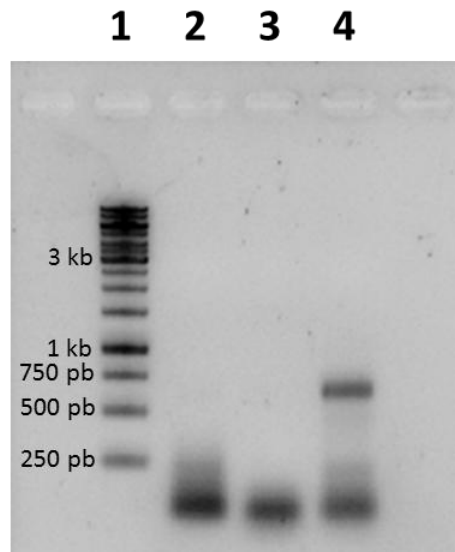
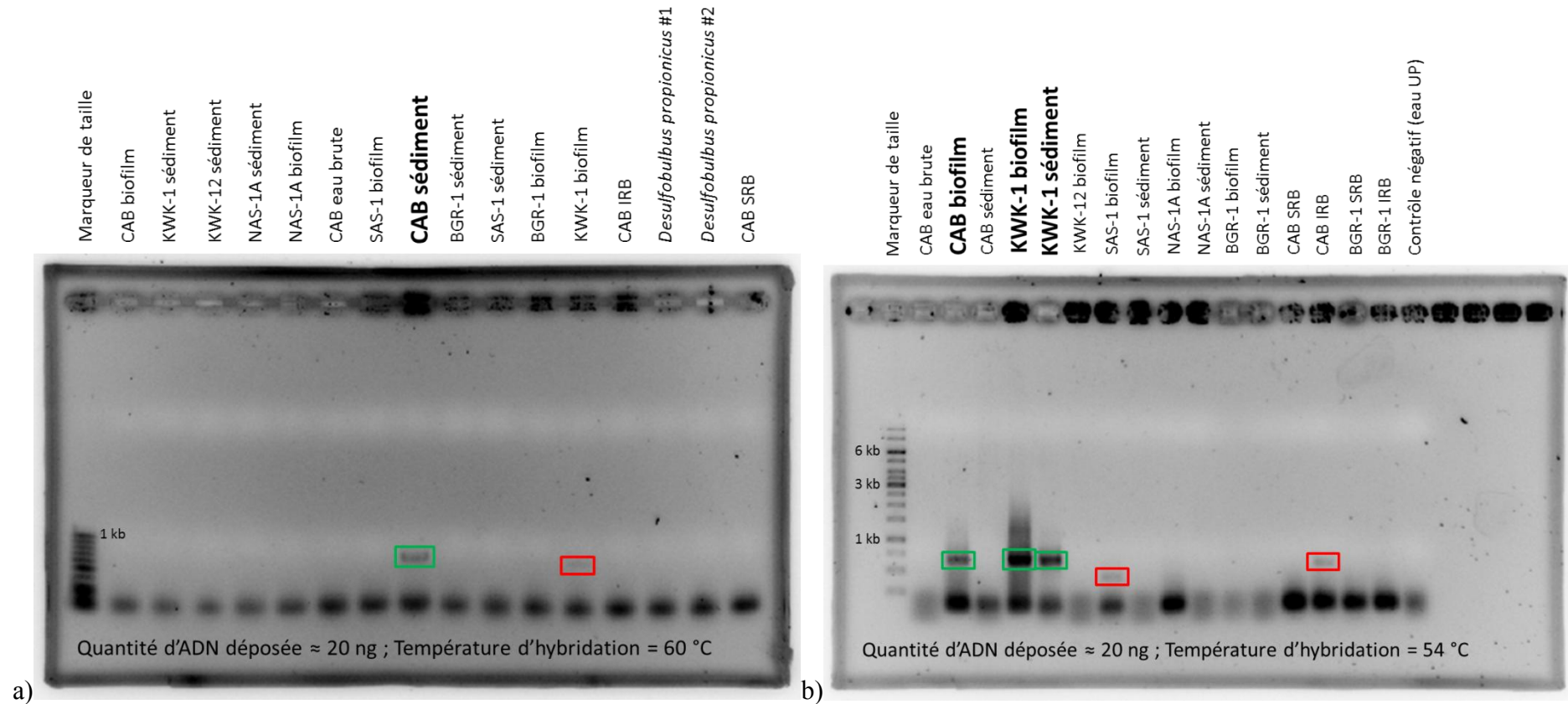


Figure 43. Photographie d'un gel d'électrophorèse présentant les résultats d'amplification des amorces de la séquence *hgcA*. 1 : marqueur de taille ; 2 : souche non méthylante *Desulfovibrio desulfuricans* DSM63 ; 3 : témoin négatif (eau ultrapure) ; 4 : sédiment anaérobie d'eau douce (BETH-72).

b) Recherche de séquences du gène *hgcA*

Les résultats de PCR mettent en évidence la présence de séquences du gène *hgcA* dans quatre échantillons sur les 18 testés : CAB sédiment, CAB biofilm, KWK-1 biofilm et KWK-1 sédiment (Figure 44). Il faut cependant noter que la température d'hybridation influe fortement sur l'amplification : à 60 °C, seul l'échantillon CAB sédiment montre une amplification (Figure 44 a) alors qu'à 54 °C, une amplification a été obtenue pour CAB biofilm, KWK-1 biofilm et KWK-1 sédiment (Figure 44 b). Il est donc indispensable d'optimiser les conditions d'amplification afin d'obtenir à l'avenir des résultats reproductibles. De plus, aux deux températures testées, des amplifications aspécifiques (taille différente de celle attendue et séquence différente de celle d'*hgcA*) ont été détectées.



**Figure 44.** Photographies de gels d'électrophorèse présentant les résultats d'amplification des amorces de la séquence *hgcA* à partir des échantillons d'eau brute, de biofilm et de sédiment de surface. Les bandes obtenues pour les échantillons CAB sédiment (a) CAB biofilm, KWK-1 biofilm et KWK-1 sédiment (b) (encadrées en vert) correspondent à la taille attendue pour la séquence *hgcA* (≈ 650 pb). Les bandes de faible intensité obtenues pour les échantillons KWK-1 biofilm (a) SAS-1 biofilm et CAB IRB (b) (encadrées en rouge) présentent des tailles inférieures à celle attendue pour la séquence *hgcA* et correspondent à des amplifications aspécifiques (confirmées par séquençage). Température d'hybridation de 60 °C (a) ou 54 °C (b).



Concernant le site CAB, le biofilm et le sédiment de surface abritent donc des microorganismes porteurs de séquences du gène *hgcA* contrairement à l'eau brute. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par la mesure de la vitesse de méthylation (Chapitre 2.III.2.), aucune activité méthylante n'ayant été observée en présence d'eau brute alors que le biofilm et le sédiment de surface montraient une vitesse de méthylation significative ( $9 \times 10^{-10}$  à  $7 \times 10^{-9}$  %Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup>).

Dans le cas du site KWK-1, les deux échantillons testés (biofilm et sédiment de surface) montrent la présence du gène *hgcA* alors que les résultats de méthylation décrits dans le chapitre précédent (Chapitre 2.III.2.) montrent une activité méthylante relativement faible (très proche des limites de détection). Ceci peut s'expliquer par le fait que notre approche est purement qualitative. La séquence du gène *hgcA* bien que présente, peut n'être portée que par une infime fraction de microorganismes, ce qui ne permet pas de méthyler significativement le mercure dans nos conditions. Par ailleurs, le gène peut ne pas être exprimé du tout.

La situation inverse est observée pour les sites NAS-1A, BGR-1 et SAS-1, dont les sédiments de surface méthylient le mercure, à un taux équivalent à celui du site CAB, mais où aucune séquence du gène *hgcA* n'a été mise en évidence. Les amorces utilisées ici ne permettent pas forcément de détecter toutes les séquences *hgcA*, on ne peut donc pas affirmer que ces échantillons ne contiennent pas de séquences *hgcA*. La présence de gènes codant d'autres protéines que HgcA et capables de transférer un groupe méthyle au Hg<sub>inorg</sub> peut être aussi envisagée.

La détection par PCR de *hgcA* reste une approche purement qualitative et ne renseigne pas sur l'abondance de la séquence au sein des échantillons. D'une part, le nombre de copies peut varier d'un échantillon à l'autre, il serait donc intéressant de poursuivre cette étude en quantifiant le nombre de séquences dans chaque échantillon par PCR en temps réel (Liu *et al.*, 2014). D'autre part, la séquence peut être présente mais non exprimée ce qui pourrait expliquer des activités méthylantes différentes. Pour le vérifier, il faudrait évaluer le niveau d'expression de ces séquences par RT-qPCR et les comparer aux vitesses de méthylation, tout en restant prudent vis-à-vis des résultats. En effet, selon la récente étude de Goñi-Urriza *et al.* (2015), aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre le niveau d'expression des gènes *hgcA/hgcB* et l'activité méthylante de la souche *Desulfovibrio dechloroacetivorans* BerOcl.

c) Clonage des produits de PCR

Afin de confirmer que les fragments d'ADN amplifiés correspondent bien à la séquence *hgcA*, les produits de PCR présentant la taille attendue ont été purifiés, clonés dans un plasmide (le vecteur pGEM-T) et introduits dans *E. coli* TOP10 par transformation. Les plasmides ayant intégré l'insert ont été sélectionnés et testés par PCR sur colonies en utilisant des amorces spécifiques du vecteur pGEM-T.

Cette PCR a permis d'amplifier le gène cible dans les échantillons de CAB biofilm (Annexes, Figure A4 a), CAB sédiment (Annexes, Figure A4 b), KWK-1 biofilm et KWK-1 sédiment. Ces produits PCR ont alors été purifiés puis séquencés. Les produits PCR ne présentant pas la bonne taille correspondent à l'insertion de fragments d'ADN non spécifiques.

Les séquences obtenues à partir des échantillons de CAB biofilm (11 séquences), CAB sédiment (19 séquences), KWK-1 biofilm (7 séquences) et KWK-1 sédiment (5 séquences) ont été traitées, traduites en séquences protéiques puis comparées aux bases de données GenBank à l'aide du programme BLASTP. Les résultats de cette analyse montrent que les séquences étudiées correspondent bien à HgcA, avec des degrés d'identités supérieurs à 60% par rapport aux séquences HgcA connues.

L'arbre de la Figure 45 montre que les séquences traduites à partir des gènes *hgcA* issus des quatre échantillons se répartissent dans quatre grands groupes procaryotes incluant des  $\delta$ -*Proteobacteria* (notamment des bactéries IRB et SRB), des *Firmicutes* (notamment des bactéries IRB et SRB), des *Archaea* méthanogènes (MPA) et des *Chloroflexi* (phototrophes). Leurs distributions relatives sont exposées dans les Figures 46 et 47. Pour le site CAB (Figure 46) les microorganismes porteurs du gène *hgcA* sont principalement représentés par les SRB, les MPA et les phototrophes (dans le cas du biofilm, Figure 46 a) et par les IRB et SRB (dans le cas du sédiment, Figure 46 b). En ce qui concerne le site KWK-1 (Figure 47), la grande majorité des séquences du gène *hgcA* provient de microorganismes IRB que ce soit au sein du biofilm ou du sédiment de surface, même si les SRB (dans le cas du sédiment, Figure 47 b) et les MPA (dans le cas du biofilm, Figure 47 a) sont aussi représentées. Ces résultats corroborent ceux obtenus lors des enrichissements en milieux spécifiques, puisqu'on retrouve bien des séquences *hgcA* affiliées aux SRB/IRB dans les échantillons qui présentaient une activité SRB/IRB.

Enfin, ces résultats confirment nos attentes selon lesquelles, au sein des compartiments microbiens tels que le biofilm ou le sédiment de surface, les microorganismes portant le gène *hgcA*

et ainsi potentiellement méthylants, appartiennent majoritairement aux groupes métaboliques des sulfatoréductrices, ferriréductrices et méthanogènes.

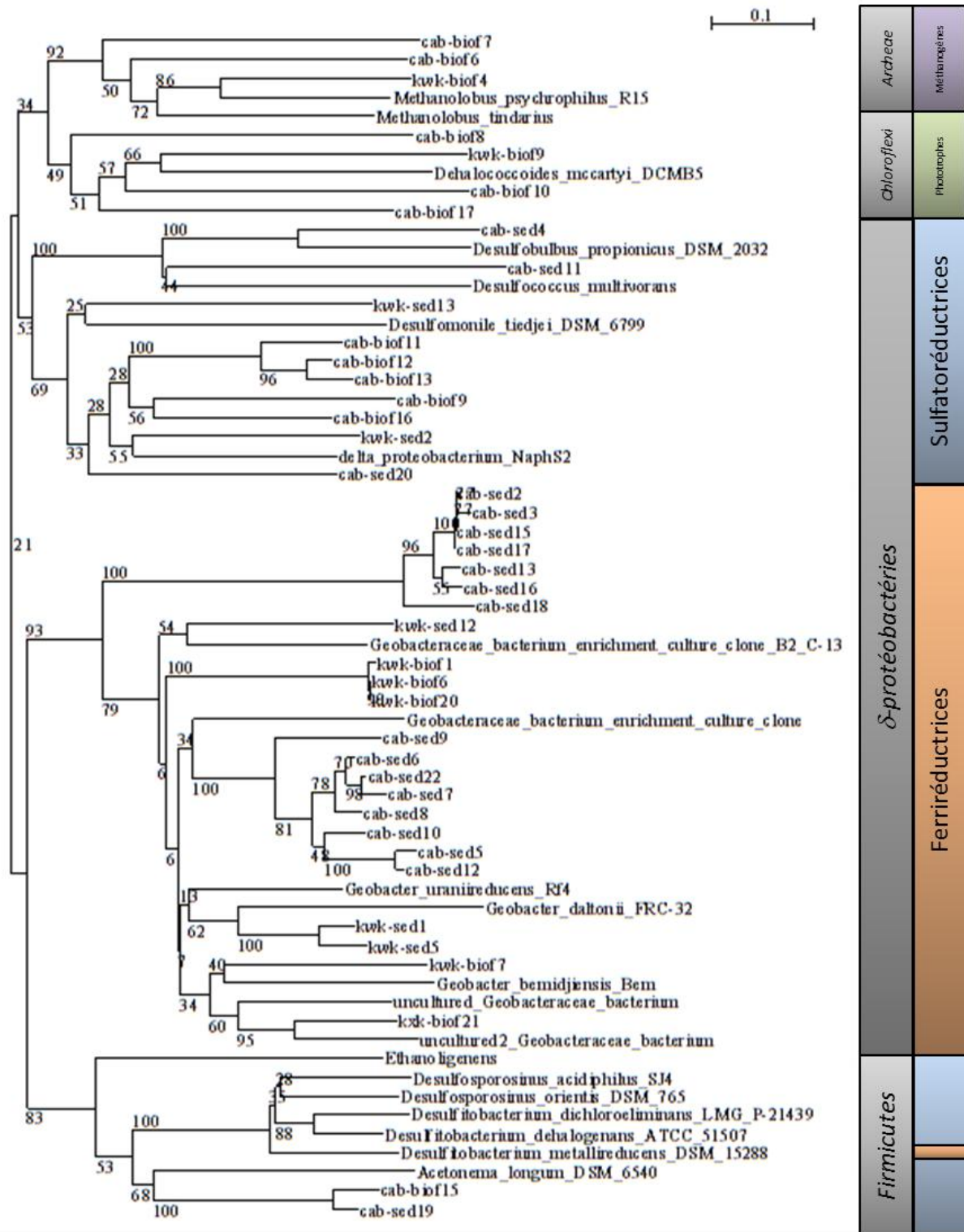


Figure 45. Arbre phylogénétique des séquences protéiques identifiées à partir des séquences *hgcA* issues des échantillons CAB biofilm (cab-biof), CAB sédiment (cab-sed), KWK-1 biofilm (kwk-biof) et KWK-1 sédiment (kwk-sed) après comparaison aux séquences des bases de données GenBank à l'aide du programme BLASTP. L'arbre a été construit grâce au logiciel Seaview selon la méthode du plus proche voisin « neighbour joining ». Les groupes taxonomiques (en gris) ainsi que les groupes métaboliques (SRB en bleu ; IRB en orange ; MPA en violet ; phototrophes en vert) auxquels les séquences sont affiliées sont représentés.

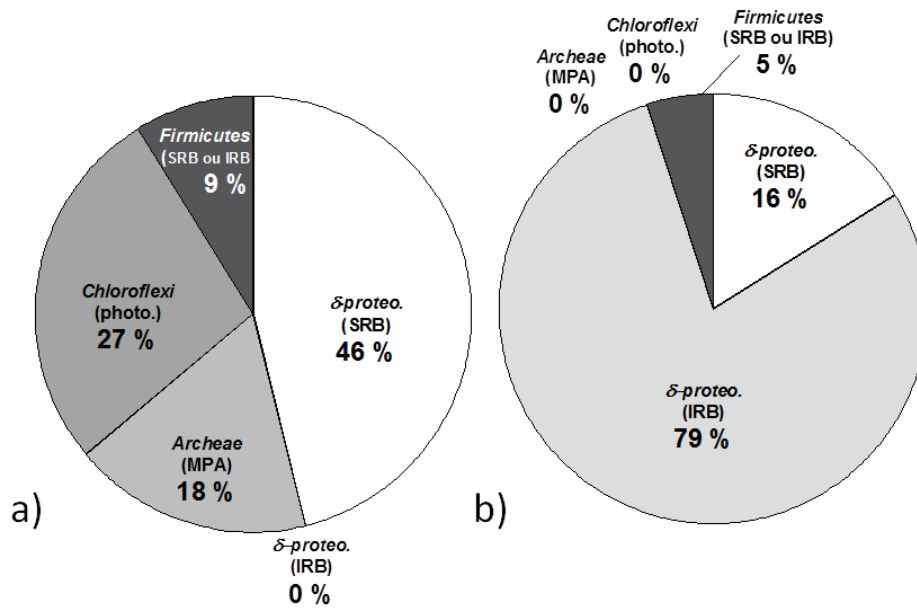


Figure 46. Répartition des séquences *hgcA* provenant (a) du biofilm (11 séquences) et (b) du sédiment de surface (19 séquences) du site CAB, au sein de différents groupes taxonomiques (en italique) et métaboliques (entre parenthèses) (*δ-proteo.* = *δ-proteobacteria* SRB = sulfatoréductrices, IRB = ferriréductrices, MPA = méthanogènes, photo. = phototrophes).

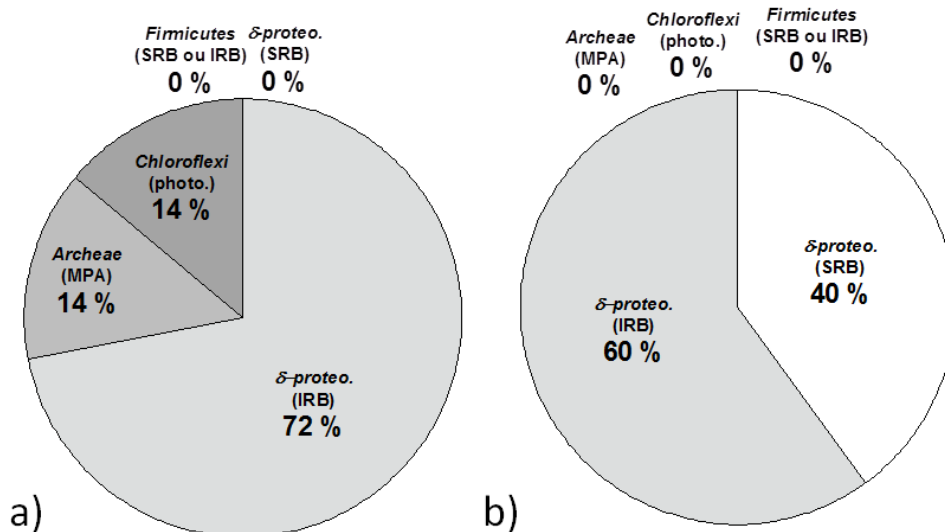


Figure 47. Répartition des séquences *hgcA* identifiées à partir (a) du biofilm (7 séquences) et (b) du sédiment de surface (5 séquences) du site KWK-1, au sein de différents groupes taxonomiques (en italique) et métaboliques (entre parenthèses) (*δ-proteo.* = *δ-proteobacteria* SRB = sulfatoréductrices, IRB = ferriréductrices, MPA = méthanogènes, photo. = phototrophes).

### 3) Vitesses de méthylation du mercure en présence d'inhibiteurs spécifiques de croissance

Les blancs, réalisés en incubant 100 mL d'eau brute stérilisée du site CAB avec 0,5 mM de  $\text{MoO}_4^{2-}$  et/ou 5 mM de BESA ou 0,2 mM de chloramphénicol présentent des taux de méthylation équivalents à ceux des contrôles stérilisés ou en présence d'eau ultrapure (Annexes, Tableau A3). L'ajout de ces composés lors des incubations n'induit donc aucun biais dans la détermination de la vitesse de méthylation.

Les taux de méthylation des biofilms de CAB ou BGR-1, avec ou sans les différents inhibiteurs spécifiques, obtenus à chaque temps de prélèvement, ont été normalisés par la masse de matière sèche ( $\% \text{Me}^{199}\text{Hg gMS}^{-1}$ ) ou par la densité bactérienne ( $\% \text{Me}^{199}\text{Hg cell}^{-1}$ ) afin de pouvoir mieux comparer les valeurs des différents essais entre (Tableau 13).

Dans le cas du site BGR-1, le biofilm seul (sans inhibiteurs) ne présentait qu'une faible activité méthylante proche de la limite de détection (voir Chapitre 2.III.2.b), en présence des inhibiteurs spécifiques, aucune activité méthylante n'a été détectée (Tableau 13).

Les cinétiques de méthylation obtenues pour le site CAB sont représentées dans la Figure 48 et ont permis de déterminer les vitesses de méthylation (Tableau 14).

Tableau 13. Potentiels de méthylation du biofilm des sites CAB et BGR-1 en absence ou en présence d'inhibiteurs spécifiques de croissance (BESA 5 mM,  $\text{MoO}_4^{2-}$  0,5 mM, BESA +  $\text{MoO}_4^{2-}$  ou chloramphénicol 0,2 mM) normalisés par la matière sèche ( $\% \text{Me}^{199}\text{Hg g}^{-1} \text{MS}$ ) ou par la densité bactérienne ( $\% \text{Me}^{199}\text{Hg cell}^{-1}$ ). Les incubations ont été effectuées dans l'eau brute de chaque site, non filtrée, stérilisée par la chaleur et dégazée par barbotage de  $\text{N}_2$  (99 %). L'erreur relative moyenne sur chaque valeur est de  $\pm 16\%$  pour CAB et  $\pm 30\%$  pour BGR-1. LD : limite de détection.

Site d'étude		Nombre total de bactéries	Masse de MS (mg)	2 j		4 j		5 ou 7 j	
				$\% \text{Me}^{199}\text{Hg}$ $\text{g}^{-1} \text{MS}$	$\% \text{Me}^{199}\text{Hg}$ $\text{cell}^{-1}$	$\% \text{Me}^{199}\text{Hg}$ $\text{g}^{-1} \text{MS}$	$\% \text{Me}^{199}\text{Hg}$ $\text{cell}^{-1}$	$\% \text{Me}^{199}\text{Hg}$ $\text{g}^{-1} \text{MS}$	$\% \text{Me}^{199}\text{Hg}$ $\text{cell}^{-1}$
<b>CAB</b>	Biofilm	$2,1 \times 10^9$	21,43	$2,7 \times 10^{-1}$	$2,8 \times 10^{-9}$	$5,7 \times 10^{-1}$	$5,9 \times 10^{-9}$	$6,3 \times 10^{-1}$	$6,5 \times 10^{-9}$
	Biofilm + BESA	$2,1 \times 10^9$	21,43	1,0	$1,0 \times 10^{-8}$	1,7	$1,8 \times 10^{-8}$	2,1	$2,2 \times 10^{-8}$
	Biofilm + $\text{MoO}_4^{2-}$	$2,1 \times 10^9$	21,43	$1,1 \times 10^{-1}$	$1,2 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-1}$	$2,5 \times 10^{-9}$	$6,5 \times 10^{-1}$	$6,7 \times 10^{-9}$
	Biofilm + BESA + $\text{MoO}_4^{2-}$	$2,1 \times 10^9$	21,43	$3,5 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^{-10}$	$2,2 \times 10^{-1}$	$2,3 \times 10^{-9}$	$7,1 \times 10^{-1}$	$7,3 \times 10^{-9}$
	Biofilm + chloramphénicol	$2,1 \times 10^9$	21,43	$3,4 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^{-10}$	$5,9 \times 10^{-2}$	$6,0 \times 10^{-10}$	$6,9 \times 10^{-2}$	$7,1 \times 10^{-10}$
<b>BGR-1</b>	Biofilm	$2,7 \times 10^9$	6,1	ND	ND	ND	ND	$3,0 \times 10^{-2}$	$6,9 \times 10^{-11}$
	Biofilm + BESA	$2,7 \times 10^9$	6,1	ND	ND	ND	ND	≤ LD	≤ LD
	Biofilm + $\text{MoO}_4^{2-}$	$2,7 \times 10^9$	6,1	ND	ND	ND	ND	≤ LD	≤ LD
	Biofilm + BESA + $\text{MoO}_4^{2-}$	$2,7 \times 10^9$	6,1	ND	ND	ND	ND	≤ LD	≤ LD
	Biofilm + chloramphénicol	$2,7 \times 10^9$	6,1	ND	ND	ND	ND	≤ LD	≤ LD

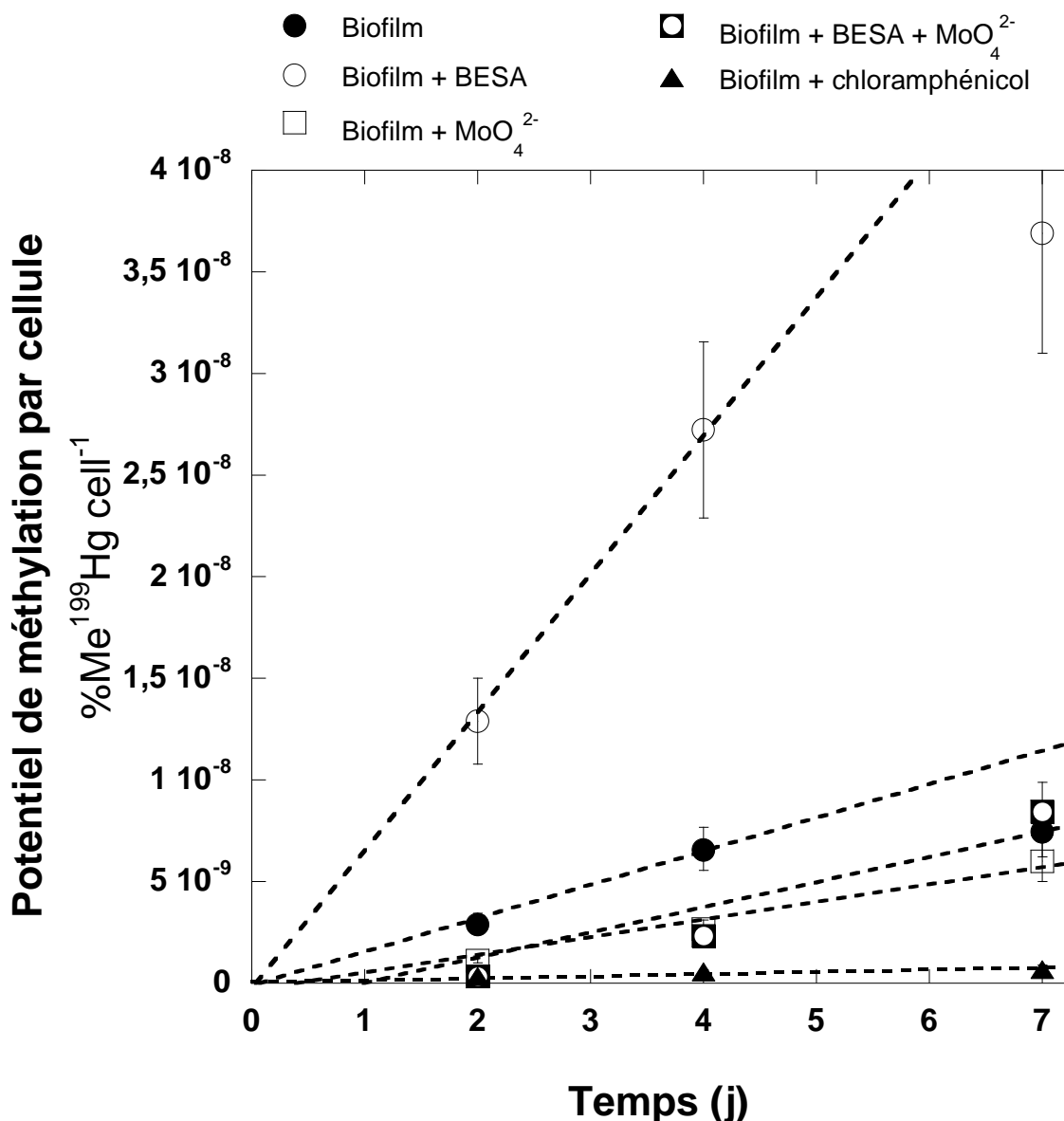


Figure 48. Evolution du potentiel de méthylation normalisé par cellule (%Me<sup>199</sup>Hg cell<sup>-1</sup>) au cours de l'incubation de biofilm du site CAB en absence ou en présence de BESA (5 mM), de MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (0,5 mM), de BESA + MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (5 mM ; 0,5 mM) ou de chloramphénicol (0,2 mM). Les incubations ont été réalisées en présence de <sup>199</sup>Hg<sub>inorg</sub>, à 25 °C, à l'obscurité et en anoxie. Des régressions linéaires (en pointillés) ont été utilisées sur les 3 à 4 premiers points (en incluant le point à t<sub>0</sub>) pour estimer les vitesses de méthylation.



**Tableau 14.** Vitesses de méthylation du mercure du biofilm du site CAB normalisées par la densité bactérienne incubée (%MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>). Le biofilm a été incubé dans l'eau brute stérilisée du site en absence ou en présence de BESA (5 mM), de MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (0,5 mM), de BESA + MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (5 mM ; 0,5 mM) ou de chloramphénicol (0,2 mM). Les vitesses ont été calculées d'après l'équation [3] (Chapitre 2.II.4.b) avec une erreur relative ± 16 %.

Compartiment incubé	%MeHg cell <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>
Biofilm	1,5 ± 0,2×10 <sup>-9</sup>
Biofilm + BESA	4,4 ± 0,7×10 <sup>-9</sup>
Biofilm + MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	9,6 ± 1,5×10 <sup>-10</sup>
Biofilm + BESA + MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0 ± 0,2×10 <sup>-9</sup>
Biofilm + chloramphénicol	1,0 ± 0,2×10 <sup>-10</sup>

En présence de chloramphénicol, la vitesse de méthylation (1,0 ± 0,2×10<sup>-10</sup> %MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) est dix fois inférieure à celui du biofilm incubé en absence d'inhibiteurs (1,5 ± 0,2×10<sup>-9</sup> %MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) ce qui confirme que la méthylation est bien reliée à l'activité biologique et plus particulièrement à la synthèse protéique.

Le biofilm incubé en présence de BESA présente une vitesse de méthylation (4,4 ± 0,7×10<sup>-9</sup> %MeHg cell<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) trois fois supérieure à celui du biofilm sans inhibiteurs (Tableau 14). Deux approches peuvent être considérées selon le mode d'action que l'on attribue au BESA. Si on considère que le BESA agit uniquement comme un inhibiteur de la méthanogenèse, alors on en déduit que les méthanogènes ont un impact négatif sur la méthylation puisque leur inactivation est associé à une augmentation de la vitesse de méthylation. Cette analyse s'accorde avec Avramescu *et al.* (2011) et Correia *et al.* (2012). La deuxième interprétation repose sur la capacité de certaines SRB d'utiliser, dans des conditions où le sulfate est limitant (20 – 30 μM selon Lovley et Klug, 1983 ; Roden *et al.*, 1993 ; Urban *et al.*, 1994 ; dans le cas présent : 28 μM), le BESA et plus particulièrement son groupe sulfonate, comme accepteur d'électrons (Ye *et al.*, 1999 ; Ettwig, 2006). De plus, il a été montré que l'utilisation de BESA pour la croissance peut être couplée à une méthylation significative du mercure (Pak et Bartha 1998b). Ce qui est observé ici peut donc refléter non pas l'inhibition des méthanogènes mais le fait que l'activité des SRB est exacerbée par l'apport de BESA jouant le rôle de nutriments et d'accepteur d'électrons. Ce phénomène n'est cependant pas observé lors de la croissance dans un milieu riche en sulfate (Figure 40) (30 mM dans le milieu SRB vs 28 μM dans l'eau brute, soit 1000 fois plus) puisque la contribution du BESA comme accepteur d'électrons est alors négligeable.

Dans le cas où le biofilm est incubé en présence de BESA et  $\text{MoO}_4^{2-}$ , la vitesse de méthylation ( $1,0 \pm 0,2 \times 10^{-9} \% \text{MeHg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) n'est plus significativement différente de celle du biofilm sans inhibiteurs (Tableau 14). Ce résultat confirme que le BESA joue ici plus un rôle de nutriments et d'accepteur d'électrons pour les SRB que d'inhibiteur de la méthanogenèse puisque son effet sur la vitesse de méthylation est neutralisé par l'ajout de  $\text{MoO}_4^{2-}$ . Si ce dernier est principalement connu comme un antagoniste du sulfate en bloquant l'activité de l'ATP sulfurylase (Taylor et Oremland, 1979 ; Patidar et Tare, 2005), il peut aussi inhiber la respiration du sulfonate (Lie *et al.*, 1999).

Lorsque le  $\text{MoO}_4^{2-}$  est ajouté seul, la vitesse de méthylation obtenue ( $9,6 \pm 1,5 \times 10^{-10} \% \text{MeHg cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) est 1,5 fois inférieure à celle du biofilm sans inhibiteur (Tableau 14). Ce résultat confirme que, dans des conditions où le sulfate est limitant (28  $\mu\text{M}$  dans l'eau brute), la contribution des SRB du biofilm du site CAB dans la méthylation du mercure n'est pas prépondérante. Néanmoins, dans le cas d'un apport exogène d'accepteur d'électrons et de nutriment (essais en présence de BESA), l'activation du métabolisme SRB entraîne une vitesse de méthylation environ trois fois supérieure.

Par ailleurs, la vitesse de méthylation est dix fois supérieure en présence de BESA +  $\text{MoO}_4^{2-}$  (qui inhibent respectivement les MPA et les SRB) qu'en présence de chloramphénicol (qui inhibe l'ensemble des bactéries). Cette différence d'activité méthylante peut donc être attribuée aux IRB présentes au sein du biofilm du site CAB, l'implication d'organismes phototrophes comme les *Chloroflexi* peut être écartée étant donné que les incubations ont été menées à l'obscurité. De plus, cette activité méthylante représente les deux tiers de la vitesse de méthylation du biofilm en absence d'inhibiteurs. On peut donc conclure de cette analyse que la méthylation du mercure par le biofilm du site CAB provient majoritairement (à 66 %) de l'activité des IRB ainsi que de l'activité des SRB dans une moindre mesure (33 %).

## IV. Discussion et conclusion

Le travail présenté dans ce chapitre avait pour objectif de déterminer dans quelle mesure des microorganismes présentant une activité sulfatoréductrice, ferriréductrice ou méthanogène joueraient un rôle dans la méthylation du mercure. Pour cela, des inhibiteurs spécifiques de croissance ont été utilisés au cours d'incubations avec le mercure pour confirmer l'implication des groupes métaboliques visés dans la méthylation. Enfin, des séquences du « gène de la méthylation », *hgcA*, ont été recherchées au sein des échantillons environnementaux et leur diversité a été analysée.

La culture dans des milieux sélectifs a permis de mettre en évidence une activité SRB et/ou IRB dans tous les sites étudiés, au sein du biofilm et/ou du sédiment de surface. Afin de poursuivre ce travail, il serait intéressant de cultiver les échantillons dans un milieu dédié à la méthanogenèse. Le suivi des activités sulfatoréductrices et ferriréductrice au cours du temps ont permis de tester l'effet des inhibiteurs spécifiques de croissance avant leur utilisation dans les expériences de méthylation. Les effets inhibiteurs du molybdate sur l'activité SRB et du chloramphénicol sur les activités SRB et IRB ont été confirmés. Quant au BESA, même si son action sur les méthanogènes n'a pas pu être testée, il favorise l'activité SRB (accepteur d'électrons via la respiration du groupe sulfonate) si la concentration en sulfate est faible. Si la concentration en sulfate est suffisante pour supporter l'activité SRB (milieu SRB), la contribution du BESA à la croissance est alors mineure. Correia *et al.* (2012) ont choisis d'utiliser le chloroforme à la place du BESA comme inhibiteur de l'activité méthanogène mais ce composé présente aussi des inconvénients. En effet, certaines espèces du genre *Dehalobacter* appartenant à la classe des *Firmicutes* sont capables de l'utiliser comme accepteur terminal d'électrons (Groster *et al.*, 2010). De plus, il est connu pour inhiber la voie de synthèse de l'acétyl-CoA et ainsi affecter l'activité métabolique de certaines SRB dites « *complete oxidizers* » (qui oxydent intégralement les substrats carbonés en CO<sub>2</sub> en utilisant principalement la voie de l'acétyl-CoA) (Ekstrom *et al.*, 2003). Ainsi, l'utilisation des inhibiteurs spécifiques nécessite de garder à l'esprit que ces composés peuvent, dans certaines conditions, ne pas avoir l'effet escompté. En ce qui concerne le molybdate, il convient de l'utiliser à une concentration équivalente à celle du sulfate dans le milieu d'incubation au risque que d'autres microorganismes que les SRB soient affectés (Fleming *et al.*, 2006 ; Correia *et al.*, 2011), ce qui est rarement le cas dans la majorité des études (10 fois plus de MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> pour cette étude et Avramescu *et al.*, 2011 ; 1000 fois plus pour Desrosiers *et al.*, 2006 ; Correia *et al.*, 2001 ; Hamelin *et al.*, 2011). Enfin, dans le cas du chloramphénicol, censé stopper l'ensemble de l'activité bactérienne, certains

auteurs rapportent que des souches peuvent y être résistantes (Tee *et al.*, 1996) ou en être physiquement protégées au sein de la matrice du biofilm (Correia *et al.*, 2011).

La recherche de séquences du gène *hgcA*, codant pour la protéine directement responsable de la méthylation du mercure, au sein des échantillons environnementaux a donné des résultats positifs pour deux sites d'étude CAB et KWK-1 (biofilm et sédiment de surface). En ce qui concerne le site CAB, ces résultats sont reliés aux vitesses de méthylation déterminées dans le Chapitre 1. En revanche, pour le site KWK-1 qui ne présentait aucune activité méthylante, cela peut signifier que le gène est présent mais pas exprimé (ou trop peu pour être détecté). Ces résultats rejoignent ceux de Schaefer *et al.* (2014) ; si des séquences *hgcA* ont été retrouvés dans les deux sites étudiés, seul l'un des deux présentait une activité méthylante détectable.

L'analyse des séquences *hgcA* confirme que les microorganismes qui en sont porteurs (et donc potentiellement méthylants) sont proches de représentants des IRB et SRB (83 % des séquences isolées appartiennent à l'un ou l'autre de ces deux groupes métaboliques) ainsi qu'aux MPA dans une moindre mesure, ce qui correspond aux récents résultats de Gilmour *et al.* (2013) et Shaefer *et al.* (2014). Néanmoins, cette première approche mérite d'être optimisée (température d'hybridation, échantillons moins âgés) et approfondie grâce à la qPCR et qRT-PCR.

Deux sites d'études, CAB et BGR-1, avaient été choisis pour tester l'effet des inhibiteurs métaboliques sur la vitesse de méthylation. Malheureusement, les résultats obtenus pour le site subarctique BGR-1 sont inexploitable étant donné que le biofilm, en absence d'inhibiteurs, ne présentait aucune activité méthylante. Il serait intéressant de mener de nouvelles incubations en présence d'inhibiteurs sur le sédiment de surface, ainsi que sur ceux de NAS-1A et SAS-1, puisque c'est le compartiment microbien majoritairement responsable de la méthylation au sein des sites subarctiques (Chapitre 1).

L'incubation du biofilm du site CAB avec le mercure en présence des inhibiteurs a permis de confirmer l'implication des IRB et des SRB dans l'activité méthylante. Les IRB semblent être les principales responsables de la méthylation alors que les SRB ne présentent une activité méthylante prépondérante que lorsqu'un accepteur d'électron est ajouté. Nos résultats vont dans le sens de récentes études en mettant en évidence d'autres métabolismes que les SRB comme principaux méthylateurs dans des biofilms environnementaux. Ainsi, les phototrophes peuvent être responsables de la moitié de l'activité méthylante dans les échantillons issus de lacs canadiens étudiés par Desrosiers *et al.* (2006) et Hamelin *et al.* (2011). Les MPA sont décrites comme

significativement méthylantes (Correia *et al.*, 2011 ; Schaefer *et al.*, 2014) voir les principaux méthylateurs (Hamelin *et al.*, 2011) tout comme les IRB (Avramescu *et al.*, 2011 ; Schaefer *et al.*, 2014). De même que la capacité du biofilm à méthyler le mercure, le rôle des métabolismes qui le composent dans ce processus semble très variable selon les conditions environnementales dans lesquelles il se développe.

Dans notre cas, où des séquences *hgcA* ont pu être affiliées à la classe des *Chloroflexi*, il serait intéressant de tester le rôle des microorganismes phototrophes dans la méthylation du mercure. Pour cela, il faudrait mener des incubations en présence de 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée (DCMU), un inhibiteur de la photosynthèse (il bloque le transfert des électrons au sein du photosystème II), sous exposition lumineuse ou non (Desrosiers *et al.*, 2006 ; Correia *et al.*, 2011 ; Hamelin *et al.*, 2011).



---

**CHAPITRE 4 : Réaction de pseudo-premier-ordre de  
rouilles vertes abiotiques ou biologique vis-a-vis du  $\text{Hg}^{\text{II}}$  et du  
 $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ . Effet du pH et d'agents stabilisants (phosphate,  
silicate, acide polyacrylique et cellules bactériennes)**





## I. Synthèse des résultats

Ce résumé-discussion présente les principaux points qui ressortent de ce travail après avoir exposé les résultats relatifs à la caractérisation d'une rouille verte dans les biofilms utilisés pour cette étude. La suite de ce chapitre a fait l'objet d'une publication qui est retranscrite ici dans son intégralité : Remy P. P., Etique M., Hazotte A. A., Sergent A. S., Estrade N., Cloquet C., Hanna K. and Jorand F. P. A. (2015) Pseudo-first-order reaction of chemically and biologically formed green rusts with  $\text{Hg}^{\text{II}}$  and  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ : Effects of pH and stabilizing agents (phosphate, silicate, polyacrylic acid, and bacterial cells). *Water Research*, 70, 266-278.

Lors des enrichissements des biofilms du site CAB dans un milieu IRB avec comme accepteur d'électrons un oxyde ferrique (la lépidocrocite,  $\gamma\text{-FeOOH}$ ), un minéral secondaire de couleur verte a été formé. Cette phase minérale a été caractérisée par diffraction des rayons X (DRX) au Laboratoire LIEC (UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy, I. Bihannic) et microscopie électronique à transmission (MET) à l'Institut Jean Lamour (Nancy, J. Ghanbaja, S. Migot) comme suit :

- DRX

La suspension contenant le solide à analyser a été centrifugée 5 min à  $14\,000 \times g$  (MiniSpin plus, Eppendorf) sous atmosphère anaérobie, puis après élimination du surnageant, le culot est étalé sur un porte échantillon. L'enregistrement des diffractogrammes se fait à température ambiante dans un intervalle de  $3$  à  $64^\circ$  pour  $2\Theta$  en utilisant une anode au cobalt ( $\lambda = 0,178897$  nm) par un diffractomètre D8 DISCOVER (Bruker) réglé sur un pas de  $0,0359^\circ$  et un temps de collection de 3 s par point.

- MET

La mesure est effectuée par un CM20/STEM Philips couplé à un système d'analyse dispersive en énergie (EDX) à une tension de  $2 \times 10^5$  V. Une goutte de la suspension est déposée sur un porte échantillon en carbone amorphe qui est introduit dans le microscope sous une pression de  $10^{-8}$  Torr.

Le motif de diffraction des électrons correspond à celui de la rouille verte carbonatée, un hydroxysel double lamellaire à valence mixte  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}} (\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12})^{2+} \cdot [\text{CO}_3, 3\text{H}_2\text{O}]^{2-}$  (Bocher *et al.*, 2004). Les clichés de MET montrent la forme hexagonale des cristaux de 1 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 49 a). L'analyse du diffractogramme en DRX confirme ces résultats (Figure 49 b). Les deux techniques montrent la présence d'une phase de lépidocrocite résiduelle, ainsi qu'une phase mineure de vivianite ( $\text{Fe}^{\text{II}}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8(\text{H}_2\text{O})$ ), mais la rouille verte est bien identifiée comme le principal minéral secondaire.

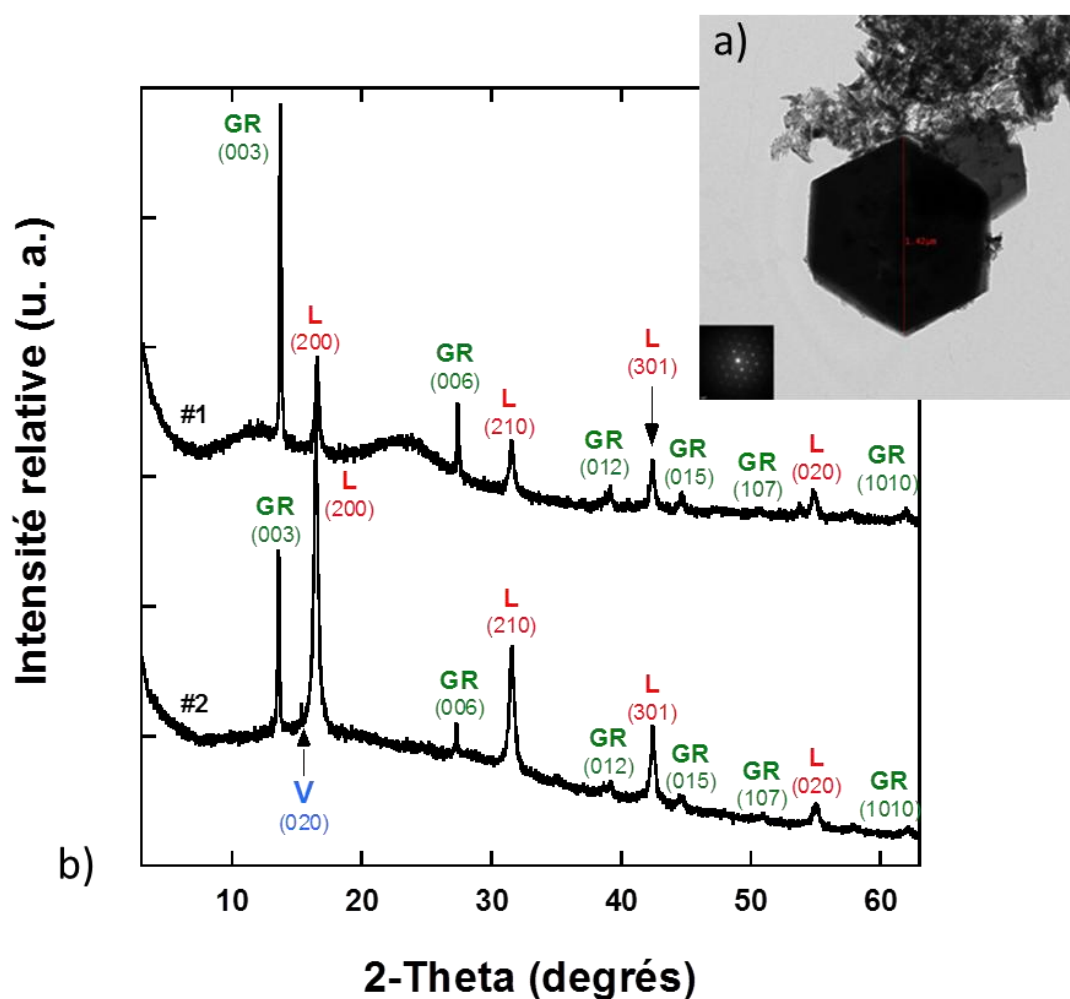


Figure 49. a) Photographie en microscopie électronique à transmission d'un cristal de rouille verte (avec le motif de diffraction des électrons en médaillon) retrouvé dans le biofilm du site CAB après 1 mois d'incubation en présence de lépidocrocite, b) diffractogrammes (Co,  $\lambda = 0,178897 \text{ nm}$ ) des phases minérales issues de deux essais indépendants (#1 et #2) (GR : rouille verte carbonatée ; L : lépidocrocite ; V : vivianite).

Les rouilles vertes sont des minéraux appartenant à la famille des hydroxydes doubles lamellaires de formule générale  $\{\text{Fe}^{\text{II}}_{(1-x)}\text{Fe}^{\text{III}}_x(\text{OH})_2\}^{x+} \cdot \{(x/n)\text{A}^{n-}(\text{p}/n)\text{H}_2\text{O}\}^{x-}$  (Taylor, 1973) et qui peuvent être de différents types selon la nature de l'ion interfoliaire qui stabilise le cristal. Elles peuvent être synthétisées chimiquement en laboratoire, et se retrouvent dans l'environnement naturel ou anthropique (Génin *et al.*, 1998 ; Refait *et al.*, 2003 ; Christiansen *et al.*, 2009 ; Zegeye *et al.*, 2012). C'est sans doute l'activité bactérienne ferriréductrice en milieu anaérobie qui est responsable de leur formation (Berthelin *et al.*, 2006). Les conditions propices à leur formation (anoxie, forte densité cellulaire, présence d'agents stabilisant le cristal comme des polymères) sont très proches de celles retrouvées au sein de biofilms (Zegeye *et al.*, 2010 ; Jorand *et al.*, 2013). Ainsi, il a été montré que l'incubation en anoxie de biofilms environnementaux ferrugineux, en présence de donneur d'électrons, pouvait mener à la formation de rouille verte (Jorand *et al.*, 2011). Les résultats présentés ici confirment que les biofilms favorisent la formation de rouille verte.

L'intérêt qui est porté aux rouilles vertes découle de leur caractère métastable et réducteur à l'encontre de contaminants métalliques (*e.g.*  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Hg}^{\text{II}}$ ,  $\text{Cr}^{\text{VI}}$ ) ou organiques (*e.g.* nitroaromatiques, organochlorés), ce qui contribue à abaisser leur toxicité (Myneni *et al.*, 1997 ; Erbs *et al.*, 1999 ; Loyaux-Lawniczak *et al.*, 2000 ; Hansen *et al.*, 2001 ; Williams et Scherer, 2001 ; Lee et Batchelor, 2002 ; O'Loughlin *et al.*, 2003a et b ; Elsner *et al.*, 2004 ; O'Loughlin *et al.*, 2004 ; Mitsunobu *et al.*, 2008 ; Kone *et al.*, 2009). Toutefois, si la réactivité des rouilles vertes synthétisées artificiellement en laboratoire est largement décrite dans la littérature, celle de rouilles vertes « biogénérées » reste peu documentée. Si aucune différence de nature ou de structure n'est observée entre la rouille verte abiotique et biotique, la seconde apparaît accompagnée de polymères et de corps bactériens fixés à la surface des cristaux. Le minéral formé s'en trouve stabilisé et, dans le même temps, sa réactivité pourrait éventuellement être affectée.

La réactivité de différentes rouilles vertes synthétisées par voie chimique ou biologique a été testée vis-à-vis du mercure cationique. Le rouge méthyle, un composé organique a aussi été étudié afin de mettre en évidence une éventuelle spécificité à l'encontre du substrat. Les résultats présentés ici ne montrent aucune différence significative dans la réactivité de la rouille verte biologique par rapport à la rouille verte abiotique dans le cas du mercure alors que pour le rouge méthyle, la présence d'agents stabilisant (silicates, polymères, corps bactériens) altère la réactivité du minéral certainement dû au fait que ces deux composés ne réagissent pas avec les mêmes sites réactifs. Dans le cadre de la problématique de cette thèse sur la méthylation du mercure, l'information principale

est que la rouille verte biogénérée, proche de la forme environnementale, est capable de réduire le  $\text{Hg}^{\text{II}}$  inorganique en  $\text{Hg}^0$ .

Il apparaît donc qu'au sein d'un biofilm riche en microorganismes ferriréducteurs et où la rouille verte peut être biogénérée (*e.g.* biofilm du site CAB), le mercure inorganique pourrait alors servir de substrat pour la méthylation par les bactéries ou pour la réduction par la rouille verte.

Pour achever cette étude, une expérience qui n'apparaît pas dans l'article qui suit a été réalisée. L'objectif était d'évaluer l'impact de la présence de rouille verte au sein d'un biofilm méthyliant. Ainsi, s'il existe une compétition pour le  $\text{Hg}^{\text{II}}_{\text{inorg}}$  entre la méthylation par les cellules et la réduction par la rouille verte, la vitesse de méthylation devrait s'en trouver affaiblie. Pour cela, une suspension de rouille verte carbonatée abiotique a été ajoutée à un flacon d'incubation contenant du biofilm du site CAB (10 supports K1 colonisés) dans 100 mL d'eau brute autoclavée. La rouille verte a été ajoutée de façon à obtenir une concentration finale de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . L'ajout de Hg monoisotopique étant de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , cette concentration en rouille verte a été choisie afin de correspondre au rapport  $[\text{Hg}]/[\text{GR}] = 1/100$  utilisé dans l'article. Après 7 jours d'incubation à l'obscurité et en anoxie, la vitesse de méthylation par cellule est de  $1,0 \times 10^{-9} \% \text{Me}^{199}\text{Hg cell}^{-1}$  soit de  $\approx 30 \%$  inférieure à celle du contrôle sans rouille verte effectué simultanément ( $1,4 \times 10^{-9} \% \text{Me}^{199}\text{Hg cell}^{-1}$ ). Nous avons démontré, dans l'article qui suit, que la rouille verte carbonatée pouvait réduire  $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol Hg}^{\text{II}} \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , ce qui correspond (pour  $10 \mu\text{g}$  de RV avec une SSA de  $30 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  et une incubation de 7 j) à  $5,5 \times 10^{-6} \text{ mol}$  de  $\text{Hg}^{\text{II}}$  soit  $1,1 \text{ mg}$ . La totalité du  $\text{Hg}^{\text{II}}$  monoisotopique introduit ( $0,1 \mu\text{g}$  soit 10000 fois moins que  $1,1 \text{ mg}$ ) pourrait donc être théoriquement réduit (en quelques min). Dans ce cas, comment expliquer qu'il reste du  $\text{Hg}^{\text{II}}$  disponible pour la méthylation ? On peut suspecter qu'une fraction du mercure et/ou de la rouille verte se sorbe au sein de la matrice du biofilm empêchant ainsi leur réaction ou que la rouille verte est rapidement oxydée par des espèces réactives accompagnant les échantillons d'eau brute ou de biofilm environnementaux à la place du  $\text{Hg}^{\text{II}}$ .

Cette expérience « exploratoire » mérite cependant d'être répétée et approfondie, en dosant les espèces du Fe et du Hg (ici seule l'évolution des rapports isotopiques  $\text{Me}^{199}\text{Hg}/\text{Me}^{202}\text{Hg}$  a été suivie) et en faisant varier la concentration et la nature de la rouille verte notamment. Néanmoins, la présence de rouille verte a abaissé la vitesse de méthylation. Ceci est vraisemblablement dû au fait qu'une fraction du substrat initial ( $\text{Hg}^{\text{II}}$ ) est réduite par la rouille verte en  $\text{Hg}^0$ , rendant le mercure moins disponible pour la méthylation.

Donc si le biofilm n'intervient pas spécifiquement dans la méthylation du mercure, il peut favoriser la formation de minéraux réactifs abaissant la teneur en  $\text{Hg}^{\text{II}}$ , le substrat majoritaire de la méthylation, en présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  solide et dans des conditions anoxiques.

---

## II. Abstract

The kinetics of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  and methyl red (MR) reduction by hydroxycarbonate green rust (GR1) and by hydroxysulfate green rust (GR2) were studied in the presence of naturally occurring organic and inorganic ligands (phosphate, polyacrylic acid, bacterial cells, silicate). The reducing ability of biogenic hydroxycarbonate green rust ( $\text{GR1}_{\text{bio}}$ ), obtained after microbial reduction of lepidocrocite by *Shewanella putrefaciens*, was also investigated and compared to those of chemically synthesized GR1 and GR2 ( $\text{GR1}_{\text{ab}}$  and  $\text{GR2}_{\text{ab}}$ ). Pseudo first-order rate constants ( $k_{\text{obs}}$ ) of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction (at pH 7.0, 8.2, and 9.5) and MR reduction (at pH 7.0) were determined and were normalized to the structural  $\text{Fe}^{\text{II}}$  content of GRs ( $k_{\text{FeII}}$ ) and to the estimated concentration of surface  $\text{Fe}^{\text{II}}$  sites ( $k_{\text{S}}$ ). The  $k_{\text{S}}$  values ranged from  $0.3 \text{ L mmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  to  $43 \text{ L mmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  for the  $\text{Hg}$  reduction, and from  $0.007 \text{ L mmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  to  $3.4 \text{ L mmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  for the MR reduction. No significant discrepancy between  $\text{GR}_{\text{ab}}$  and  $\text{GR}_{\text{bio}}$  was observed in term of reactivity. However, the reduction kinetics of MR was generally slower than the  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction kinetics for all tested GRs. While a slight difference in  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction rate was noted whatever the pH values (7.0, 8.2, or 9.5), the reduction of MR was significantly affected in the presence of ligands. A decrease by a factor of 2-200, depending on the type of ligand used, was observed. These data give new insights into the reactivity of GRs in the presence of co-occurring organic and inorganic ligands, and have major implications in the characterization of contaminated systems as well as water treatment processes.

### III. Introduction

Green rusts (GRs) are mixed ferrous-ferric hydroxides which have a layered structure characterized by alternating positively charged hydroxide layers  $\{\text{Fe}^{\text{II}}_{(1-x)}\text{Fe}^{\text{III}}_x(\text{OH})_2\}^{x+}$  and hydrated anionic interlayers  $\{(x/n)\text{A}^{n-}\cdot m\text{H}_2\text{O}\}^{x-}$ . Two types of GRs are distinguished: green rust 1 (GR1) and green rust 2 (GR2) containing either planar or spherical anions (*e.g.*  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), and non-planar anions (*e.g.*  $\text{SeO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), respectively (Génin et al., 2006). GRs are present in the environment as corrosion products of Fe-based materials (Refait et al., 2003), and as minerals (*e.g.* fougérite) in hydromorphic soils (Génin et al., 1998), in ground water (Christiansen et al., 2009), or in suspended matter of stratified lakes (Zegeye et al., 2012). GRs are described as highly reactive compounds, especially in reducing several organic and inorganic contaminants (Myneni et al., 1997; Erbs et al., 1999; Loyaux-Lawniczak et al., 2000; Hansen et al., 2001; Williams and Scherer, 2001; Lee and Batchelor, 2002; O'Loughlin et al., 2003a and b; Elsner et al., 2004; O'Loughlin et al., 2004; Mitsunobu et al., 2008; Kone et al., 2009) and their roles in the biogeochemical redox cycling of iron and other elements are of growing interest to the scientific community (*e.g.* Carlson et al., 2012; Zegeye et al., 2012). Although their reactivity has been widely investigated with chemically synthesized GR2 ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), the reactivity of GR1, microbially synthesized GR1/GR2, and GR2 in the presence of cells or polymers has been scarcely reported.

GRs can be synthesized at the laboratory scale by a partial oxidation of ferrous salts or by a coprecipitation of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  with  $\text{Fe}^{\text{III}}$  salts in aqueous solution (Schwertmann and Fechter, 1994; Génin et al., 1998; Bocher et al., 2004). They can also be formed by bacterial activities via a bioreduction of ferrihydrite or lepidocrocite under anoxic conditions (Fredrickson et al., 1998; Ona-Nguema et al., 2002) or by an indirect  $\text{Fe}^{\text{II}}$  oxidation by biogenic nitrite (Etique et al., 2014a). In the natural environment, the formation of GRs is sometimes incorrectly considered as a biological process, whereas the reduction of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  species or the oxidation of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  species are only due to an enzymatic reaction. The resulting coprecipitation leading to the formation of GR in the extracellular medium is only based on a chemical process. Furthermore, no difference in structure and composition between chemically and biologically formed GRs has been evidenced, except for the size of crystals, which are larger for the biological GR than for its chemical counterpart (Zegeye et al., 2005), and for the presence of extracellular-polymeric substances (EPS) and/or bacterial cells surrounding biological GR crystals (Zegeye et al., 2010; Jorand et al., 2013). These EPS and cells are perceived as affecting GR reactivity, which might explain the higher stability of the biogenic GR (for several

years in aqueous phase) as compared to the chemical one. However, this phenomenon remains poorly studied and barely understood. Although recent work has demonstrated that the extracellular polymers (EPS from activated sludge in waste water treatment) significantly affect the reactivity of GR1 towards anionic inorganic pollutants ( $\text{NO}_3^-$ ), probably by “screen effect” on reactive sites (Zegeye et al., 2014), knowledge on this reactivity with metallic or organic contaminants is essential to provide greater insight into applied or natural processes in which GRs are involved (e.g. Su and Puls, 2004; Bearcock et al., 2011).

For that purpose, the reactivity of a biologically/chemically synthesized hydroxycarbonate GR1 ( $\text{GR1}_{\text{bio}}/\text{GR1}_{\text{ab}}$ ), and chemically formed sulfate GR2 ( $\text{GR2}_{\text{ab}}$ ) towards  $\text{Hg}^{\text{II}}$  and  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$  (methyl red MR) was investigated in presence of various stabilizing agents. Previous works have already studied the reactivity of  $\text{GR2}_{\text{ab}}$  towards  $\text{Hg}^{\text{II}}$  and MR (O'Loughlin et al., 2003a; Kone et al., 2009), but to the best of our knowledge, the reactivity of biogenic GRs towards these two contaminants has not yet been documented. In anoxic environments, green rust phases are represented by the fougérite mineral, which is a hydroxycarbonate green rust (GR1) (Génin et al., 1998; Mills et al., 2012). Therefore, the most representative iron phase of this fougérite mineral would be the  $\text{GR1}_{\text{bio}}$ .  $\text{GR2}_{\text{ab}}$  is known to be relatively stable as long as common anoxic conditions are preserved at  $\text{pH} \sim 7$  (Ruby et al., 2006), while  $\text{GR1}_{\text{ab}}$  is perceived as unstable iron hydroxides rapidly turning into a mixture of magnetite ( $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$ ) and siderite ( $\text{FeCO}_3$ ) (Taylor et al., 1985; Benali et al., 2001). However, under strict anoxic conditions and neutral to slightly alkaline  $\text{pH}$  (7-9) (this work),  $\text{GR1}_{\text{ab}}$  can be preserved and stored for several days (Etique et al., 2014b). Nonetheless, many experiments were performed with  $\text{GR1}_{\text{ab}}$  supplemented with  $\text{PO}_4^{3-}$  that prevents any further undesirable “transformation” (Bocher et al., 2004). Silicate, quartz, organic polymers, and bacterial cells - compounds which are commonly found in environmental settings or in water or soil remediation processes - were also described to inhibit/prevent GRs dissolution/transformation (Zegeye et al., 2010; O'Loughlin et al., 2010; Sergent et al., 2011; Jorand et al., 2013). Thus, to test the ability of these “stabilizers” to affect the reactivity of GR1 and GR2, the reduction of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  and MR was carried out in the presence of phosphate, silicate, polyacrylic acid (paa), and bacterial cells, at  $\text{pH}$  values allowing a stability of GRs ( $\text{pH} > 7$ ). Control experiments were also performed to evaluate the contribution of aqueous  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and bacterial cells to the transformation of target compounds. The depletion of mercury was monitored over time using ICP-AAS. The MR reduction was monitored by UV-Visible spectrophotometry.



## IV. Chemical background

### 1) Mercury and GR

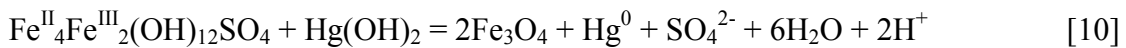
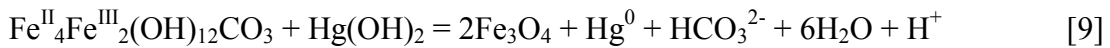
Mercury has two main stable oxidation states:  $\text{Hg}^0$  and  $\text{Hg}^{\text{II}}$ . Elemental  $\text{Hg}^0$  is gaseous under environmental conditions, and under environmentally relevant pH values  $\text{Hg}^{\text{II}}$  exists in pure water in aqueous form as  $\text{Hg}^{2+}$  and mercury dihydroxide ( $\text{Hg}(\text{OH})_2$ ) [7] with a  $pK_a$  value of 6.09 (Pourbaix, 1963):



Thus, the predominant mercury species with pH higher than or equal to 6.09 is  $\text{Hg}(\text{OH})_2$ , and the reduction half reaction equation [8] is:



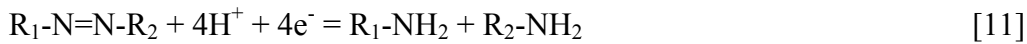
The reduction of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  is effective in the presence of solid  $\text{Fe}^{\text{II}}$  but insignificant with aqueous  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (Charlet et al., 2002). The mixed  $\text{Fe}^{\text{II}}$ - $\text{Fe}^{\text{III}}$  minerals, such as sulfate GR2, are oxidized by  $\text{Hg}^{\text{II}}$  to magnetite (O'Loughlin et al., 2003a). The  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ratio of hydroxycarbonate GR1 can vary from 1/2 to 2/1 (trébeurdenite and fougérite, respectively) (Mills et al., 2012), while it is equal to 2/1 for sulfate GR2, as far as we know (Refait et al., 2006). The oxidation of GR1 and GR2 to magnetite by  $\text{Hg}(\text{OH})_2$  involves an exchange of 2 electrons and is given by equations [9] and [10]



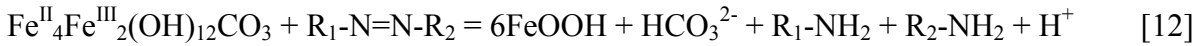
Due to the presence of bicarbonate, the oxidation of GR1 leads to a lower production of  $\text{H}^+$  than that of GR2.

## 2) Methyl red and GR

Methyl red (MR) or 2-(N,N-dimethyl-4-aminophenyl)azobenzenecarboxylic acid ( $C_{15}H_{15}N_3O_2$ ) is an azo dye with one azo group (-N=N-) used as a common pH indicator with a  $pK_a = 5.1$ . As other azo dyes, MR is a recalcitrant pollutant causing a significant burden on the environment. The reduction of MR is known to be achieved with the cleavage of the azo bond (Khalid et al., 2008; Kone et al., 2009), leading to the formation of two aromatic amines (carboxyanilic acid:  $R_1-NH_2$  and p-dimethylaminoaniline:  $R_2-NH_2$ ) as [11]:



Thus, 4  $Fe^{II}$  GR are theoretically needed to reduce MR and, assuming that GR is oxidized into  $FeOOH$ , the reduction equations [12] and [13] can be written as:



## V. Materials and methods

### 1) Chemicals

All solutions were prepared using ACS grade chemicals (except when specified) and 18.2 M $\Omega$  cm N<sub>2</sub>-purged pure water (Purelab Option-Q, Elga LabWater, Antony, France). The mercury solution (750  $\mu$ M) was prepared from an HgCl<sub>2</sub> salt 99.5% (1166745, Merck) in HCl 0.5 M (30721-2.5L, Sigma-Aldrich) and the pH was adjusted to 7.0  $\pm$  0.1 with NaOH 1 M. Ferrous sulfate heptahydrate (FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 99%), ferrous chloride tetrahydrate (FeCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O, 99%), and sodium phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O) were purchased from Sigma-Aldrich. Polyacrylic acid (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)<sub>n</sub> was provided from a stock solution of 2 g L<sup>-1</sup> (Mw 2000 g mol<sup>-1</sup>, Aldrich, 323667). The methyl red (C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) was provided by Sigma-Aldrich (98%, 32654-25G). The mercury concentration present in each reactant (0.3-1.9 ppb) was measured as blank (Table S1).

### 2) Synthesis of GRs

Abiotically formed GRs were synthesized under O<sub>2</sub>-free conditions in an anaerobic chamber scavenging oxygen with palladium catalysts and H<sub>2</sub> (N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>, 95/5) (Coy Laboratory Products Inc.<sup>®</sup>). The GR1<sub>ab</sub> was obtained using a coprecipitation method as described by Bocher et al. (2004) by adding a mixture of Fe<sup>II</sup> and Fe<sup>III</sup> salts to a mixture of sodium hydroxide and sodium carbonate. Ferrous sulfate heptahydrate FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O and ferric sulfate pentahydrate Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O were dissolved in 40 mL of pure water. A [Fe<sup>II</sup>]/[Fe<sup>III</sup>] ratio of 2 was chosen with {[Fe<sup>II</sup>]+[Fe<sup>III</sup>]} = 0.5 M. Magnetic stirring (500 rpm) ensured fast and complete dissolution. Di-sodium carbonate Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ([CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>] = 0.5 M) was dissolved in 40 mL of a 1 M NaOH solution in order to have [OH<sup>-</sup>]/{[Fe<sup>II</sup>]+[Fe<sup>III</sup>]} = 2. The carbonate solution was added to the solution of iron under the same conditions of magnetic stirring, and a bluish-green precipitate appeared immediately. GR1<sub>ab</sub> was used within a week of its formation to test its reactivity with Hg<sup>II</sup> and MR, or was stabilized by addition of extra Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O salt {[PO<sub>4</sub>]<sub>0</sub>/[Fe]} = 0.8% (*i.e.* 4 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) (GR1<sub>ab+p</sub>) or silicic acid (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> 4 mM) (GR1<sub>ab+si</sub>), or paa (500 mg L<sup>-1</sup>) (GR1<sub>ab+paa</sub>). A {[CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>]/[SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>]} ratio of 1 was chosen to prevent the formation of sulfate GR2<sub>ab</sub> as described by Bocher et al. (2004).

The abiotic sulfate GR2 (GR2<sub>ab</sub>) was synthesized using the coprecipitation method developed by Ruby et al. (2003). Briefly, 20 mL of an iron solution, containing 13.3 mmol Fe<sup>II</sup> (3.7 g of FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O) and 6.7 mmol Fe<sup>III</sup> (1.63 g of Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O), were added to 400 mL of pure water.

Iron salts were precipitated by addition of NaOH (50 mL, 40 mM) with a syringe and under magnetic stirring to precipitate all the iron salts ( $n_{\text{NaOH}}/n_{\text{Fe}} = 2$ ).

The biotic carbonate GR1 (GR1<sub>bio</sub>) was produced according to Zegeye et al. (2007) by incubation of *Shewanella putrefaciens* CIP 8040T ( $2.5 \times 10^9$  cells mL<sup>-1</sup>) at 30 °C in a basal medium containing 160 mM of sodium formate (HCOONa) and 300 mM of lepidocrocite ( $\gamma$ -FeOOH) as the sole electron donor and acceptor, respectively. All GRs synthesized were washed in O<sub>2</sub>-free deionized water by centrifugation (5 min,  $10,000 \times g$ ) and the concentration of GRs was determined by the spectrophotometric ferrozine method measuring the concentration of Fe<sup>II</sup> and Fe<sup>tot</sup> (Viollier et al., 2000) after HCl 6 M extraction in a Tecan

Infinite M200 PRO microplate reader. GRs were characterized by X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), and transmission Mössbauer spectroscopy (TMS).

### 3) Experimental set-up of Hg<sup>II</sup> and methyl red reduction by GRs

The Hg<sup>II</sup> solution (5  $\mu$ M, initial starting concentration) was introduced into a 250 mL glass reactor (borosilicated glass, Schott) containing 150 mL of pure water with a GR suspension (500  $\mu$ M, Hg/GR = 1/100). Initially, the glass reactor pH was adjusted to 7.0, 8.2, and 9.5 with NaOH 1 N or HCl 0.5 N. The glass reactor was continuously N<sub>2</sub>-purged and stirred (300 rpm) in order to outgas Hg<sup>0</sup> and prevent any oxidation from ambient air. One milliliter of the unfiltered suspension (*i.e.* with dissolved and adsorbed Hg) was sampled at regular time intervals and was immediately dissolved in an acidic solution of HNO<sub>3</sub>/HCl (500 mL HNO<sub>3</sub> at 65% with 500 mL HCl at 30%, w/v), before being diluted ten times. This acidic digestion was performed in order 1) to stop the reaction and preserve the mercury speciation, and 2) to dissolve the mineral phase and to release the potential adsorbed Hg fraction in the aqueous phase. Thus, the potential adsorption of Hg on GR surfaces should not bias the determination of reduction kinetics. Moreover, the formation of Hg<sup>0</sup> was qualitatively checked by trapping it during the reaction between Hg<sup>II</sup> species and green rust in a solution of KMnO<sub>4</sub> 50 mM (in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%), where the elemental volatile mercury was re-oxidized into Hg<sup>II</sup> under acidic conditions (data not shown).

The methyl red (MR) solution was prepared in pure water and the pH was adjusted to  $7.0 \pm 0.1$  with NaOH 1 N. The MR solution (final concentration  $\sim 15 \mu$ M) was introduced in a glass batch reactor containing 150 mL of pure water with a GR suspension (500  $\mu$ M, MR/GR  $\sim 1/33$ ). During the reaction, the medium was continuously stirred (300 rpm) and 1 mL samples were removed over time after adjusting the pH to  $7.0 \pm 0.1$  in order to avoid shifting the maximum peak (at 430 nm).

Control experiments were also carried out for  $\text{Hg}^{\text{II}}$  and MR on the same terms as before, respectively. The  $\text{Fe}^{\text{II}}_{\text{aq}}$  control was performed (0.2 mM, pH 7.0) to assess the reactivity of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  or MR with aqueous  $\text{Fe}^{\text{II}}$  versus structural  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Such amounts of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  were chosen assuming that  $\sim 0.2$  mM of  $\text{Fe}^{\text{II}}_{\text{aq}}$  (*i.e.* passing through  $0.2 \mu\text{m}$ ) was measured in a suspension of GR (not shown). A bacterial control with  $6 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of *S. putrefaciens* was performed to evaluate the effect of bacteria in the GR1<sub>bio</sub> suspension. The cell density selected was similar to what is required for 500  $\mu\text{M}$  GR1<sub>bio</sub>.

#### 4) Analyses

The Hg concentration was determined with a Milestone DMA-80 Direct Mercury Analyzer (Milestone GmbH, Germany). Its unique processing of samples by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrometry provides a direct analysis of the sample matrices.

The MR concentration was measured by a spectrophotometric analytical method (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies). A broad band in the visible MR spectrum was characterized at 430 nm in pH 7.0 (Figure S1) and was assigned to the azo band (Hou et al., 2007). To avoid artifacts caused by suspended particles, short centrifugations were performed (2 min,  $14,000 \times g$ ) before determining MR concentration. The sorption of MR by GR was not considered here, as we assumed it to be negligible as previously shown (Kone et al., 2009).

XRD data were collected with a D8 Bruker diffractometer, equipped with a monochromator and a position-sensitive detector. The X-ray source was a Co anode ( $\lambda = 0.178897$  nm). The diffractogram was recorded in the 3-64  $2\theta$  range, with a  $0.0359^\circ$  step size and collecting time of 3 s per point.

TMS analyses were performed using a constant acceleration spectrometer with a 50 mCi source of  $^{57}\text{Co}$  in Rh. The spectrometer was calibrated with a 25  $\mu\text{m}$  foil of  $\alpha$ -Fe at room temperature. The cryostat consisted of a closed cycle helium Mössbauer cryogenic workstation with vibration isolation stand manufactured by Advance Research Systems<sup>®</sup>. Helium exchange gas was used to thermally couple the sample to the refrigerator, allowing variable temperature operations from 7 to 300 K. Computer fittings were done using Lorentzian-shape lines.

Transmission electron microscopy was conducted using CM20/STEM Philips coupled with an energy dispersive X-ray system (EDX) using a voltage of 200 kV. One drop of the suspension was

laid on an amorphous carbon-coated grid and loaded into the analysis holder of the microscope under  $10^{-8}$  Torr vacuum.

The surface area of GRs was determined by multipoint N<sub>2</sub>-BET analysis using a Coulter (SA113) surface area analyzer. Prior to specific surface area determination, GR suspensions were dried by vacuum desiccation for 48 h.

## VI. Results and discussion

### 1) Characterization of GRs

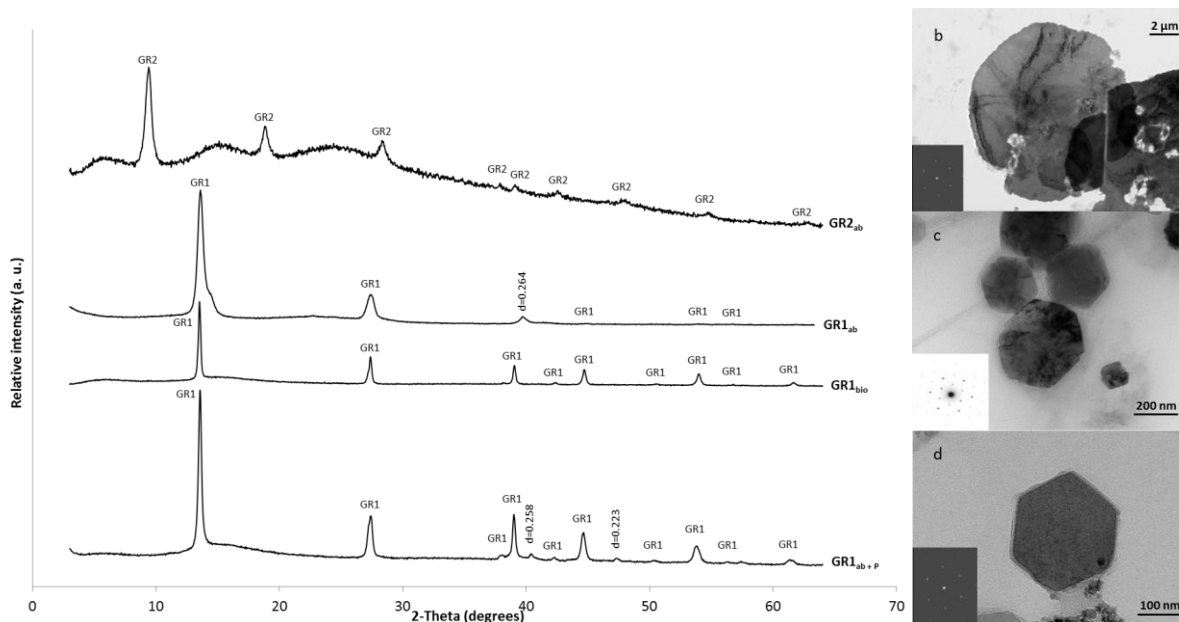
The greenish solid phase formed by either the microbial reduction of lepidocrocite ( $\gamma$ -FeOOH) by *S. putrefaciens* or chemical synthesis was characterized by XRD (Figure 50 a) and the d-values obtained were summarized in Table S2. The carbonate GR1 was identified as a major secondary iron mineral produced by the bacterial activity (GR1<sub>bio</sub>) and as a main product from the coprecipitation method in the presence of carbonate and stabilized with phosphate (GR1<sub>ab+P</sub>) or not stabilized (GR1<sub>ab</sub>), which is in close agreement with previous studies (Drissi et al., 1995; Zegeye et al., 2007). TEM images and electron diffraction patterns were also performed and hexagonal crystals of GR1 were observed in various sizes from 5  $\mu\text{m}$  to 10  $\mu\text{m}$  for GR1<sub>bio</sub> and from 100 nm to 300 nm for GR1<sub>ab+P</sub> (Figure 50 b, and d). This is consistent with the values reported in previous investigations (Ona-Nguema et al., 2002; Zegeye et al., 2014).

The formation of hydroxysulfate GR2 (GR2<sub>ab</sub>) by the coprecipitation method from Ruby et al. (2003) was confirmed both by the d-values from the XRD diffractogram and by the electron diffraction pattern, which is in agreement with the literature (Simon et al., 2003) (Figure 50 a and c, Table S2). Hexagonal particles of GR2<sub>ab</sub> were observed by TEM with sizes ranging from 200 to 400 nm (Figure 50 c), which is in line with what Zegeye et al. (2005) had reported.

All the GRs formed were quasi-free of crystallographic impurities at a discernible level of XRD (Figure 50 a). The Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> ratio was determined by TMS or by ferrozine method on solids (Figure S3, Table S3):  $1.2 \text{ (GR1}_{ab+P}) \leq 1.6 \text{ (GR1}_{bio}) \leq 2.0 \text{ (GR2}_{ab}) \leq 2.2 \text{ GR1}_{ab}$ , and the specific surface area (SSA) was also measured by N<sub>2</sub>-BET analysis:  $13 \text{ m}^2\text{g}^{-1} \text{ (GR1}_{bio}) \leq 14 \pm 2 \text{ m}^2\text{g}^{-1} \text{ (GR2}_{ab}) \leq 31 \pm 6 \text{ m}^2\text{g}^{-1} \text{ (GR1}_{ab+P} \text{ and GR1}_{ab})$  and also expressed as surface area concentration ( $A$ ) in Table 15. These SSA values of green rusts were slightly lower than those obtained by Williams and Scherer (2001):  $47 \pm 7 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ . This fluctuation of SSA of green rusts depends on the synthesis method, which influences the crystal size. Moreover, the delay between its synthesis and its use modifies the crystal size probably by an Ostwald ripening.

Having determined SSA for each GR, the concentration of the surface Fe<sup>II</sup> sites available can be reasonably estimated since the reactivity of GRs is based on this value. Here, an example is given for GR1<sub>bio</sub> with an initial concentration of 500  $\mu\text{M}$  and with the  $A$  value of 4.2  $\text{m}^2 \text{L}^{-1}$  (Table 15). Knowing that the average common value of the surface site density is 5 Fe<sup>II</sup> sites per  $\text{nm}^2$  for

iron oxides (Williams and Scherer, 2001), the number of Fe<sup>II</sup> sites per nm<sup>2</sup> and per L of GR1<sub>bio</sub> was determined at  $2.1 \times 10^{19}$  Fe<sup>II</sup> sites nm<sup>-2</sup> L<sup>-1</sup> (i.e.  $5 \text{ Fe}^{\text{II}} \text{ sites nm}^{-2} \times 4.2 \times 10^{18} \text{ nm}^2 \text{ L}^{-1}$ ). The total concentration of Fe<sup>II</sup> sites on GR1<sub>bio</sub> surface was therefore estimated at 34.8 μM (Table 15).



**Figure 50.** X-ray diffractograms (Co,  $\lambda = 0.178897$  nm) of the biogenic carbonated green rust 1 after microbial reduction of lepidocrocite ( $\gamma\text{-FeOOH}$ ) by *Shewanella putrefaciens* (GR1<sub>bio</sub>), chemically synthesized carbonate green rust 1 (GR1<sub>ab</sub>), chemically synthesized carbonate green rust 1 stabilized by phosphate (GR1<sub>ab+P</sub>) and sulfate green rust 2 (GR2<sub>ab</sub>) (a); TEM images of GR1<sub>bio</sub>, (b), GR2<sub>ab</sub> (c), and GR1<sub>ab+P</sub> (d) crystals. Inserts show the electron diffraction pattern of each GR. With GR1<sub>ab+P</sub>, a few minor peaks ( $d = 0.223$  nm;  $d = 0.258$  nm) were detected on XRD diffractogram (a), corresponding probably to chukanovite ( $\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ ), but this phase was not confirmed by Mössbauer analysis.



Table 15. Kinetics rate constants ( $k_{\text{obs}}$ ,  $\text{min}^{-1}$ ),  $k_{\text{obs}}$  normalized to surface  $\text{Fe}^{\text{II}}$  sites ( $k_{\text{s}}$ ,  $\text{L mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) and  $k_{\text{obs}}$  normalized to structural  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ( $k_{\text{FeII}}$ ,  $\text{L mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) of the reduction of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  ( $5 \mu\text{M}$ ) by chemically synthesized carbonated green rust ( $\text{GR1}_{\text{ab}}$  or  $\text{GR1}_{\text{ab+P}}$  supplemented with phosphate), biogenic carbonated green rust ( $\text{GR1}_{\text{bio}}$ ), chemically synthesized sulfated green rust ( $\text{GR2}_{\text{ab}}$ ), or  $\text{GR2}_{\text{ab}}$  with a cell suspension ( $\text{GR2}_{\text{ab+cells}}$ ). Each batch was conducted with  $0.5 \text{ mM}$  ( $\text{Hg}^{\text{II}}/\text{GR} = 1/100$ ) or  $0.05 \text{ mM}$  ( $\text{Hg}^{\text{II}}/\text{GR} = 1/10$ ) of GR in duplicates (except when specified).  $A$  = surface area concentration ( $\text{m}^2 \text{L}^{-1}$ ). ND = not determined.

	$A$ ( $\text{m}^2 \text{L}^{-1}$ )	Structural $\text{Fe}^{\text{II}}$ ( $\text{mM}$ )	Surface $\text{Fe}^{\text{II}}$ sites ( $\mu\text{M}$ )	$\text{Hg}^{\text{II}}/\text{GR}$	Rate constants	pH 7.0 $\times 10^{-2}$	pH 8.2 $\times 10^{-2}$	pH 9.5 $\times 10^{-2}$					
$\text{GR1}_{\text{ab}}$	$10 \pm 2^{\text{a}}$	2.2	83	1/100	$k_{\text{obs}}$	ND	$2.5 \pm 0.3$	ND					
					$k_{\text{s}}$	ND	$30 \pm 3$	ND					
					$k_{\text{Fe}^{\text{II}}}$	ND	$1.1 \pm 0.1$	ND					
		0.22	8.3	1/10	$k_{\text{obs}}$	ND	$8.6 \pm 0.1$	ND					
					$k_{\text{s}}$	ND	$1036 \pm 12$	ND					
					$k_{\text{Fe}^{\text{II}}}$	ND	$39.1 \pm 0.5$	ND					
$\text{GR1}_{\text{ab+P}}$	$10 \pm 2$	1.2	83	1/100	$k_{\text{obs}}$	$3.8 \pm 0.2$	$3.0 \pm 0.6$	$3.1 \pm 0.2$					
					$k_{\text{s}}$	$45 \pm 2$	$36 \pm 7$	$37 \pm 2$					
					$k_{\text{Fe}^{\text{II}}}$	$3.2 \pm 0.2$	$2.5 \pm 0.5$	$2.6 \pm 0.2$					
					$\text{GR1}_{\text{bio}}$	4.2	1.3	34.8	1/80	$k_{\text{obs}}$	$4.1 \pm 0.2$	$2.2 \pm 0.3$	$2.7 \pm 0.5$
										$k_{\text{s}}$	$118 \pm 6$	$63 \pm 8$	$78 \pm 14$
										$k_{\text{Fe}^{\text{II}}}$	$3.1 \pm 0.1$	$1.7 \pm 0.2$	$2.1 \pm 0.4$
0.13	3.48	1/8	$k_{\text{obs}}$	ND			$3.5 \pm 0.4$	ND					
			$k_{\text{s}}$	ND			$1006 \pm 114$	ND					
			$k_{\text{Fe}^{\text{II}}}$	ND			$27 \pm 3$	ND					
0.013	0.348	1/0.8	$k_{\text{obs}}$	ND	$1.5^{\text{b}}$	ND							
			$k_{\text{s}}$	ND	$4310$	ND							
			$k_{\text{Fe}^{\text{II}}}$	ND	$115$	ND							
$\text{GR2}_{\text{ab}}$	$4.6 \pm 0.7$	2.0	38.2	1/100	$k_{\text{obs}}$	$4.1 \pm 0.2$	$1.6 \pm 0.1$	$1.1^{\text{b}}$					
					$k_{\text{s}}$	$107 \pm 5$	$42 \pm 2$	$29$					
					$k_{\text{Fe}^{\text{II}}}$	$2.0 \pm 0.1$	$0.80 \pm 0.05$	$0.6$					
$\text{GR2}_{\text{ab+cells}}$	$4.6 \pm 0.7$	2.0	38.2	1/100	$k_{\text{obs}}$	$1.8 \pm 0.4^{\text{c}}$	$2.1 \pm 0.5$	$2.8 \pm 0.9$					
					$k_{\text{s}}$	$47 \pm 11$	$55 \pm 13$	$73 \pm 24$					
					$k_{\text{FeII}}$	$0.9 \pm 0.2$	$1.05 \pm 0.25$	$1.4 \pm 0.5$					

<sup>a</sup> Assuming the surface area was the same than  $\text{GR1}_{\text{ab+P}}$ ; <sup>b</sup> n = 1; <sup>c</sup> n = 3 independent experiments

## 2) Kinetics of Hg<sup>II</sup> reduction by GRs

Regardless the GR species, the Hg<sup>II</sup> concentrations decreased rapidly according to an exponential decay at neutral and alkaline pH values (7.0, 8.2, and 9.5) (Figure 51). Since GRs were present in great excess, their concentrations are assumed to have been constant throughout the reaction and the decrease in Hg concentration can be described by a pseudo first-order reaction (equations [14] and [15]):

$$d[\text{Hg}]_t/dt = -k_{\text{obs}} \times [\text{Hg}]_t \quad [14]$$

$$[\text{Hg}]_t = [\text{Hg}]_0 \times \exp(-k_{\text{obs}} \times t) \quad [15]$$

where  $k_{\text{obs}}$  is the pseudo first-order rate constant ( $\text{min}^{-1}$ ), and  $[\text{Hg}]_t$  and  $[\text{Hg}]_0$ , the total concentrations of cationic mercury at time  $t$  and  $0$ , respectively. The fitting by a pseudo first-order reaction is consistent with other studies with GR and various oxidants such as selenite,  $\text{CCl}_4$ , nitrate, and  $\text{Cr}^{\text{VI}}$  (Erbs et al., 1999; Hansen et al., 2001; Williams and Scherer, 2001; Etique et al., 2014b). The values of  $k_{\text{obs}}$  were determined from equation [14] by plotting  $-\ln([\text{Hg}]_t/[\text{Hg}]_0)$  as a function of time  $t$ . To take into account the  $\text{Fe}^{\text{II}}$  content of GRs (Note S1),  $k_{\text{obs}}$  values were normalized to  $\text{Fe}^{\text{II}}$  content ( $k_{\text{Fe}^{\text{II}}}$ ,  $\text{L mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) (Note S2), but it does not significantly affect the hierarchy as regards the kinetic rate constants (Table 15). Similarly, a  $k_{\text{obs}}$  normalization to the concentration of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  sites on the green rust surface ( $k_{\text{S}}$ ,  $\text{L mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) (Note S3) does not seem to influence significantly the decrease of the Hg reduction rate from pH 7.0 to pH 9.5 (Table 15). However, at pH 8.2 the  $k_{\text{S}}$  values clearly highlight the increase of Hg reduction kinetics when  $\text{Hg}^{\text{II}}/\text{GR}$  ratio increases from 1/80 to 1/0.8 for GR1<sub>bio</sub> and from 1/100 to 1/10 for GR1<sub>ab</sub> (Table 15, Figure S4). Thus, this approach with  $k_{\text{S}}$  appeared to be more relevant compared to the expressions of kinetics rate constants in  $k_{\text{obs}}$  and  $k_{\text{Fe}^{\text{II}}}$ .

Control tests were performed with aqueous  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (0.2 mM, pH 7.0) or with bacteria (pH 7.0) and no significant decrease in Hg concentration was observed over time ( $k_{\text{obs}} < 10^{-3} \text{min}^{-1}$ ) (Figure S5 a). This indicates that the depletion of Hg is neither due to a reduction reaction with the aqueous  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , nor to sorption on glass walls. Similarly, bacteria associated with GR1<sub>bio</sub> do not appear to be responsible for the  $\text{Hg}^{\text{II}}$  decrease. Thus, *S. putrefaciens* is not able, in our experimental conditions, to reduce  $\text{Hg}^{\text{II}}$ . It is worth noting that other iron reducers such as *S. oneidensis* MR-1 or *Geobacter*

spp are able to reduce  $\text{Hg}^{2+}$  especially with lower amounts of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  (0.15  $\mu\text{M}$ ) and under growth conditions (Wiatrowski et al., 2006). In the present work, *S. putrefaciens* was in stationary growth phase and no electron donor or carbon source were added (non-growth conditions).

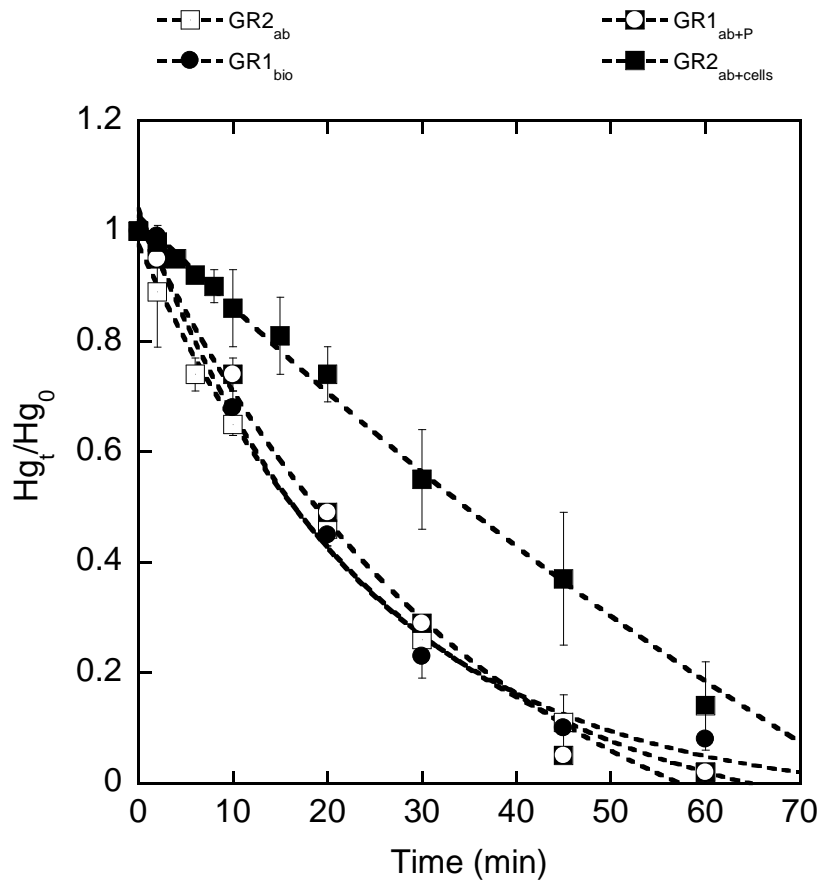
These results demonstrate that GRs reduced effectively  $\text{Hg}^{\text{II}}$  to  $\text{Hg}^0$ . Compared to other  $\text{Fe}^{\text{II}}$  solids, these reaction kinetics are of the same order of magnitude as those induced by magnetite (Wiatrowski et al., 2006) or by the  $\text{Fe}^{\text{II}}$  species sorbed onto phlogopite (Charlet et al., 2002). O'Loughlin et al. (2003a) have reported slightly higher rates of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction by GR2, as they reduced 98.7% of the initial  $\text{Hg}^{\text{II}}$  (6.4  $\text{mmol L}^{-1}$  of GR2<sub>ab</sub> with 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Hg}^{\text{II}}$ , GR/ $\text{Hg}^{\text{II}}$  = 16) after 30 min. Here, we report a thorough reduction of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  in less than an hour (with a ratio 6 times higher GR/ $\text{Hg}^{\text{II}}$  = 100 as compared to O'Loughlin et al., 2003a). Nevertheless, it cannot be excluded that part of  $\text{Hg}^0$  could still be trapped in the solid phase, which would underestimate the kinetics of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction (Pasakarnis et al., 2013).

- a) Evolution of the  $\text{Fe}^{\text{II}}$  concentration and determination of the stoichiometry of the reduction of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  species by GRs

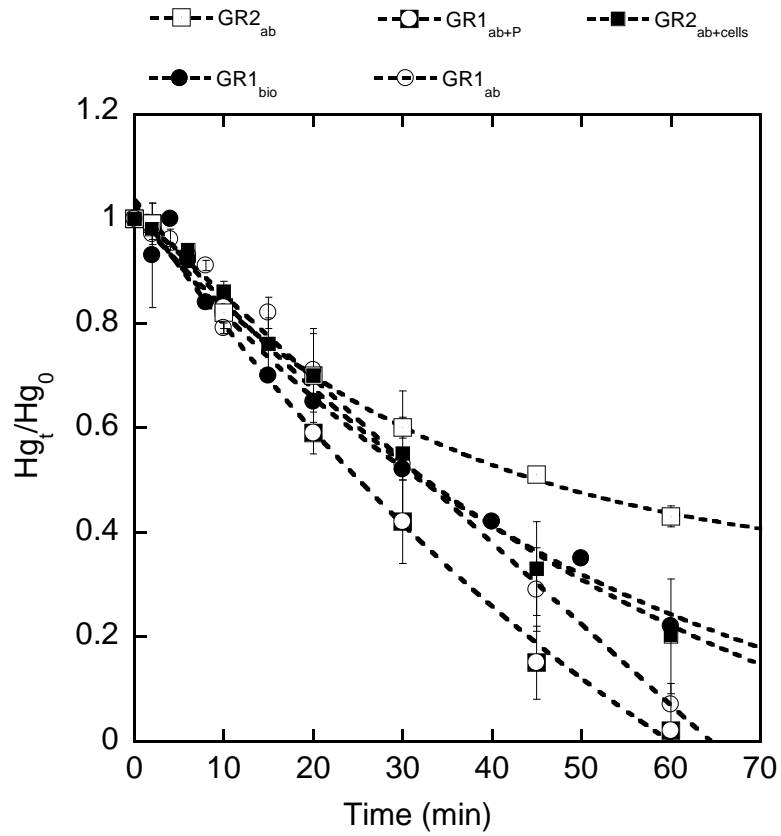
The green rust reactivity was also evaluated by measuring the evolution of the total  $\text{Fe}^{\text{II}}$  concentration of the suspension. Among all experiments, only 3 runs present a detectable decrease of the  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{tot}}$  ratio in the presence of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  species for a ratio  $\text{Hg}^{\text{II}}/\text{GR}$  of 1/10 (GR1<sub>ab</sub>) (Figure S4 a), 1/8 and 1/0.8 (GR1<sub>bio</sub>) (Figure S4 b). For all the other experiments, the  $\text{Fe}^{\text{II}}$  concentration did not vary significantly since GR was used in large excess in comparison to the initial amount of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  species (5  $\mu\text{M}$ ). During the reduction of mercury, the  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{tot}}$  ratio lowered of 0.06 units for GR1<sub>ab</sub> (1/10) and GR1<sub>bio</sub> (1/8) (Figure S4). However, a sharp decrease from 0.67 to 0.46 was noted for the 1/0.8 ratio of  $\text{Hg}^{\text{II}}/\text{GR1}_{\text{bio}}$  (Figure S4 b). Thus,  $\text{Fe}^{\text{II}}$  species of GR were oxidized to  $\text{Fe}^{\text{III}}$  species during the reduction of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  species, and this chemical observation was confirmed by the characterization of magnetite as end product (Figure S6).

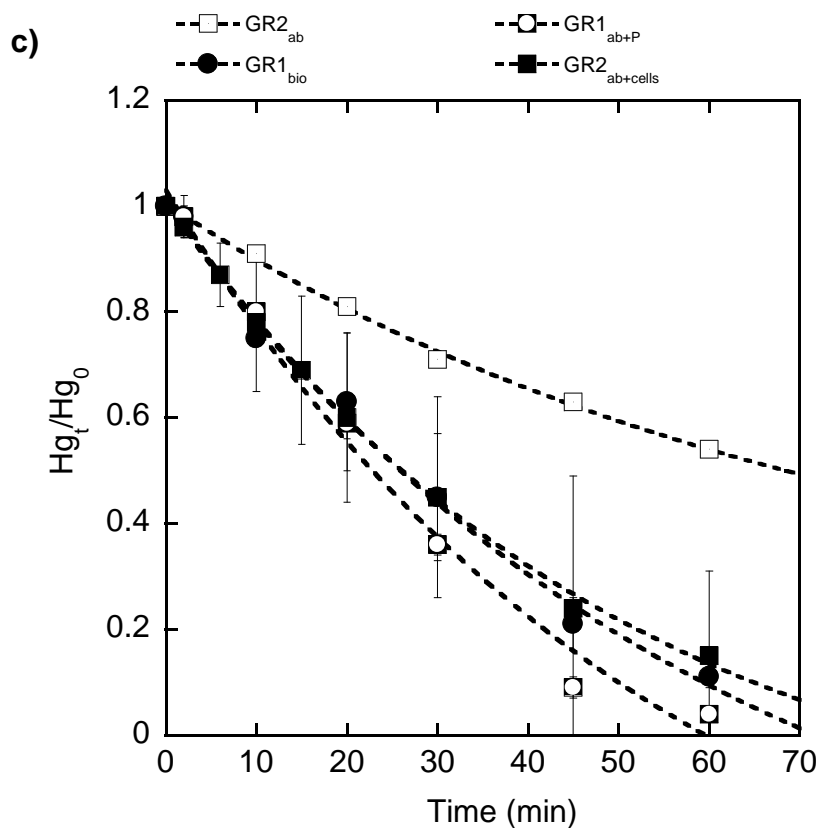
Moreover, the stoichiometry of the reaction between  $\text{Fe}^{\text{II}}$  species and  $\text{Hg}^{\text{II}}$  species was determined at 1/10, 1/8 and 1/0.8 ratios of  $\text{Hg}^{\text{II}}/\text{GR}$  (Figure 52). The expected ratio  $\text{Hg}^{\text{II}}:\text{Fe}^{\text{II}}$  GR corresponding to the amount of consumed  $\text{Hg}^{\text{II}}$  ions over the amount of oxidized  $\text{Fe}^{\text{II}}$  species during the reduction of mercury by green rust is 1:2 according to the equation [9]. This theoretical ratio of  $\text{Hg}^{\text{II}}:\text{Fe}^{\text{II}}$  GR was confirmed by the determination of the 1:1.9 experimental ratio (Figure 52). Thus, this is in agreement (95%) with the stoichiometry of the reaction involving the oxidation of 2 mol of ferrous iron per 1 mol of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduced species.

a)

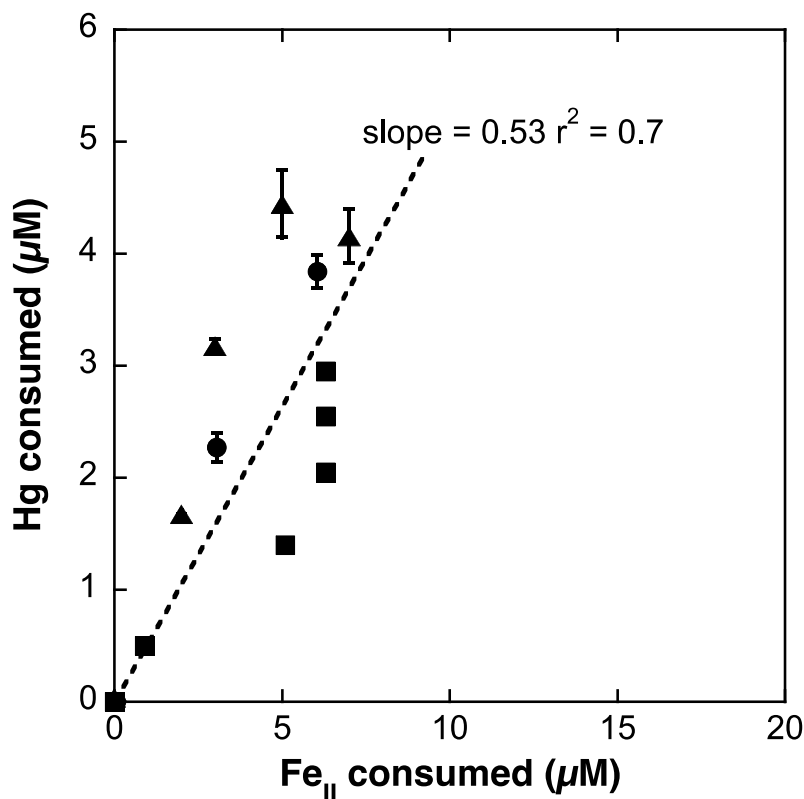


b)





**Figure 51.** Removal of mercury over time in the presence of green rusts: 400  $\mu\text{M}$  of biologically synthesized hydroxycarbonate green rust ( $\text{GR1}_{\text{bio}}$ ), and 500  $\mu\text{M}$  of chemically synthesized hydroxycarbonate green rust ( $\text{GR1}_{\text{ab}}$ ),  $\text{GR1}_{\text{ab}}$  supplemented with phosphate ( $\text{GR1}_{\text{ab+P}}$ ), hydroxysulfate green rust ( $\text{GR2}_{\text{ab}}$ ) and  $\text{GR2}_{\text{ab}}$  supplemented with cells ( $\text{GR2}_{\text{ab+cells}}$ ). The amount of Hg remaining in solution ( $\text{Hg}_t/\text{Hg}_0$ ) is plotted as a function of time at a pH of  $7.0 \pm 0.1$  (a),  $8.2 \pm 0.1$  (b), and  $9.5 \pm 0.1$  (c). The changes in pH after a 60 h incubation time period are reported in Table S7. Bars are the errors of two independent experiments.



**Figure 52.** Evolution of the mercury consumption as a function of the Fe<sup>II</sup> consumption for time between 0 and 60 min with Hg<sup>II</sup>/GR ratios of 1/10 for GR1<sub>ab</sub> (circle), 1/8 (triangle) and 1/0.8 (square) for GR1<sub>bio</sub>. The slope of 0.53 fits well with the expected ratio Hg<sup>II</sup>:Fe<sup>II</sup><sub>GR</sub> of 1:2. Error bars were drawn for two independent assays.

#### b) Effect of pH on GR reactivity

In aqueous systems, GR particles act as Lewis acid and coordinate water or hydroxyl groups. This is why the particles surface chemistry is highly dependent of pH value. Recently, the point of zero charge (pzc) of GRs (GR1 and GR2) has been accurately determined at  $8.3 \pm 0.1$  (Guilbaud et al., 2013). Therefore, at  $\text{pH} < 8.3$ , the surface of GR particles is protonated, leading to a positive surface charge (Figure 53); at  $\text{pH} > 8.3$ , the GR surface is negatively charged (Figure 53). The evolution of the net surface charge of GR with pH may affect the rate and the extent of the reduction of contaminants such as chromate or mercury. Williams and Scherer (2001) demonstrated that the reduction of anionic pollutants such as  $\text{CrO}_4^{2-}$  was enhanced by a sorption onto positively charged surface of GR. Thus, the most significant reduction of Hg<sup>II</sup> should be expected for a negatively charged surface of GRs ( $\text{pH} > 8.3$ ), where the electrostatic interactions are more favorable for Hg<sup>2+</sup> sorption.



c) Minor impact of cells and phosphate on the  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction

Phosphate and bacterial cells (as bacterial bodies with polymeric substances) are known to improve the stability of GRs (Bocher et al., 2004; Jorand et al., 2013) and to affect their reactivity towards nitrate (Etique et al., 2014b; Zegeye et al., 2014). To test whether these stabilizing agents would affect the reactivity of the studied GRs towards  $\text{Hg}^{\text{II}}$ , experiments were performed with and without bacterial cells or phosphate, and the rate and the extent of the  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction were determined. When  $\text{GR}_{2\text{ab}}$  was supplemented with *S. putrefaciens* cells ( $\text{GR}_{2\text{ab}+\text{cells}}$ ),  $k_{\text{S}}$  did not significantly change compared to  $\text{GR}_{2\text{ab}}$  (Figure 51, Table 15). Similarly, no significant difference was noted between  $\text{GR}_{1\text{ab}}$  and  $\text{GR}_{1\text{ab}+\text{P}}$  (*i.e.*  $\text{GR}_{1}$  supplemented with 0.8% phosphate) (Figure 51 b, Table 15). Therefore, bacterial cells or phosphates have a minor impact on the reactivity of GRs towards  $\text{Hg}^{\text{II}}$ , and the  $\text{GR}_{1\text{bio}}$  can reduce  $\text{Hg}^{\text{II}}$  as effectively as  $\text{GR}_{1\text{ab}}$ . This suggests that *S. putrefaciens* did not inhibit significantly the reduction of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  by GRs as it has already been shown for other bacteria (Mishra et al., 2011).

### 3) Kinetics of methyl red reduction by GRs

Here also, the reaction kinetics can be described by a pseudo first-order reaction (equations [16] and [17]):

$$d[\text{MR}]_t/dt = -k_{\text{obs}} \times [\text{MR}]_t \quad [16]$$

$$[\text{MR}]_t = [\text{MR}]_0 \times \exp(-k_{\text{obs}} \times t) \quad [17]$$

where  $k_{\text{obs}}$  is the pseudo first-order rate constant ( $\text{min}^{-1}$ ), and  $[\text{MR}]_t$  and  $[\text{MR}]_0$  the total concentrations of MR at time  $t$  and  $0$ , respectively. However, it should be noted that a certain number of kinetic curves present a latency time (slight sigmoidal shape) ( $\text{GR}_{1\text{ab}+\text{Si}}$  and  $\text{GR}_{1\text{ab}+\text{paa}}$ , Figure 54), and a better description of this lag-time merits to be investigated in further studies.

The values of  $k_{\text{obs}}$  were determined from equation [16] by plotting  $-\ln([\text{MR}]_t/[\text{MR}]_0)$  as a function of time  $t$  (Table 16). The  $\text{Fe}^{\text{II}}$  content of GRs and the concentration of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  sites on the green rust surface were also taken into account to normalize  $k_{\text{obs}}$  values and to define  $k_{\text{FeII}}$  ( $\text{L min}^{-1} \text{mmol}^{-1}$ ) and  $k_{\text{S}}$  ( $\text{L mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$ ), but it does not significantly affect the hierarchy as regards the kinetic rate constants (Table 16).



MR was completely reduced by GR2<sub>ab</sub> in less than 30 min with a  $k_S$  value of 3.4 L mmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> ( $t_{1/2} = 5$  min) (Figure 54). Generally, all the GRs used showed lower  $k_S$  values than those obtained for Hg<sup>II</sup> reduction (except for the Hg<sup>II</sup>/GR ratios of 1/10, 1/8 and 1/0.8). For example, MR was fully reduced by GR1<sub>ab</sub> in 120 min (Figure 54) instead of only 60 min for a total reduction of Hg<sup>II</sup> (Hg<sup>II</sup>/GR ratio of 1/100) (Figure 51 a). However,  $k_S$  obtained for a reaction of MR with GR1<sub>bio</sub> had a significantly lower value (0.057 L mmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) (Table 16) when compared to the reaction between GR1<sub>bio</sub> (1/80) and Hg<sup>II</sup> ( $k_{obs} = 1.18$  mmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) (Table 15). Thus, the time needed to reduce MR by GR1<sub>bio</sub> (1200 min) (Figure 54) is 20 times higher than for the reduction of Hg<sup>II</sup> (60 min) (Figure 51 a).

a) Critical role of bacterial cells and phosphate on MR reduction

Since *Shewanella* spp. were shown to degrade MR (Khalid et al., 2008), the degradation of MR by GR1<sub>bio</sub> could be due to an active metabolism of cells involved in the GR1<sub>bio</sub> formation and remaining in the mineral suspension. To assess the effect of *S. putrefaciens* on MR removal, a series of batch experiments were performed with a fresh cell suspension in the same physiological state (late stationary phase), and with a heat inactivated suspension. In both cases, no significant decrease in MR levels was obtained indicating that cells present with GR<sub>bio</sub> do not contribute to MR removal (Figure S5 b).

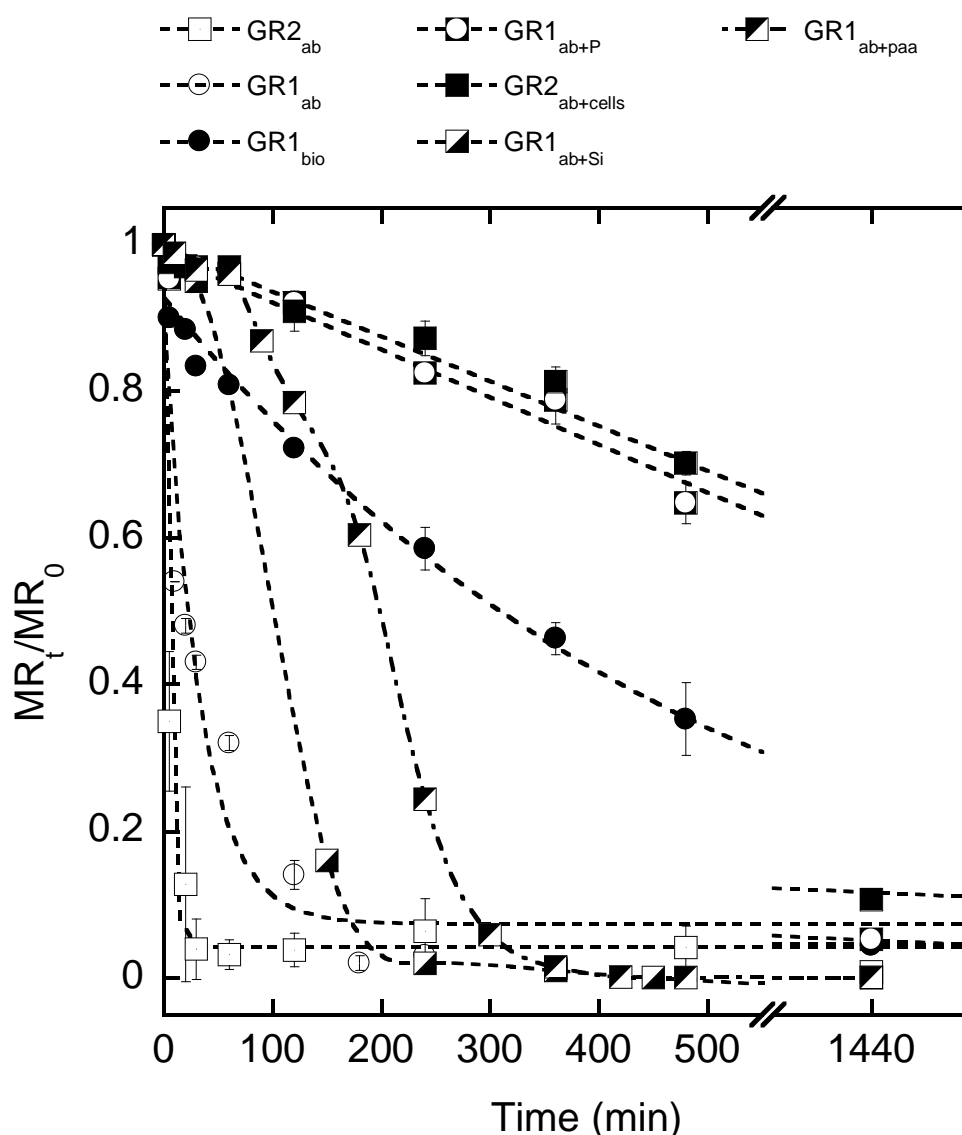
To test whether bacteria could affect the reactivity of GRs, *Shewanella* cells were added to GR2<sub>ab</sub>, the most reactive GR (high  $k_S$ ). A significant decrease in the MR reduction rate by a factor of 200 was observed relative to GR2<sub>ab</sub> (Table 16, Figure 54), which indicates that bacterial cells inhibit considerably the MR reduction by GRs. Similarly,  $k_S$  of GR1<sub>ab+p</sub> was ~500 times lower than that of GR2<sub>ab</sub> (0.007 L mmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> and 3.4 L mmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, respectively, Table 16), thereby underscoring that phosphate impaired significantly the reactivity of GR. This is in line with a recent work dealing with the effect of phosphate on the reduction of nitrate by GR (Etique et al., 2014b).

Table 16. Kinetics rate constants ( $k_{\text{obs}}$ ),  $k_{\text{obs}}$  normalized to surface Fe<sup>II</sup> ( $k_s$ , L mmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) and  $k_{\text{obs}}$  normalized to structural Fe<sup>II</sup> ( $k_{\text{Fe}^{\text{II}}}$ , L mmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) of the reduction of methyl red (MR) by chemically synthesized carbonated green rust (GR1<sub>ab</sub>), GR1<sub>ab</sub> supplemented with 4 mM phosphate (GR1<sub>ab+P</sub>) or with 4 mM H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> (GR1<sub>ab+Si</sub>) or with 0.5 g L<sup>-1</sup> of polyacrylic acid (GR1<sub>ab+paa</sub>) or by biogenic carbonated green rust (GR1<sub>bio</sub>), chemically synthesized sulfated green rust (GR2<sub>ab</sub>), or GR2<sub>ab</sub> supplemented with a cell suspension (GR2<sub>ab+cells</sub>). All experiments were done at pH 7.0 ± 0.1 and in duplicates (except for GR1<sub>ab+Si</sub>).  $A$  = surface area concentration.

	$A$ (m <sup>2</sup> L <sup>-1</sup> )	Structural Fe <sup>II</sup> (mM)	Surface Fe <sup>II</sup> sites (μM)	MR/GR	$k_{\text{obs}} \times 10^{-3}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_s \times 10^{-3}$ (L mmol <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$k_{\text{Fe}^{\text{II}}} \times 10^{-3}$ (L mmol <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
GR1 <sub>ab</sub>	10±2 <sup>a</sup>	2.2	83	1/33	28 ± 4	337 ± 48	13 ± 2
GR1 <sub>ab+P</sub>	10±2	1.2	83	1/33	0.6 ± 0.1	7 ± 1	0.5 ± 0.1
GR1 <sub>ab+Si</sub>	10±2 <sup>a</sup>	1.2	83	1/33	13 <sup>b</sup>	156	11
GR1 <sub>ab+paa</sub>	10±2 <sup>a</sup>	1.2	83	1/33	16 <sup>b</sup>	193	13
GR1 <sub>bio</sub>	4.2	1.3	34.8	1/26	2.0 ± 0.2	57 ± 6	1.5 ± 0.1
GR2 <sub>ab</sub>	4.6±0.7	2.0	38.2	1/33	130 ± 50	3403 ± 1308	65 ± 25
GR2 <sub>ab+cells</sub>	4.6±0.7	2.0	38.2	1/33	0.6 ± 0.2	16 ± 5	0.3 ± 0.1

<sup>a</sup> Assuming the surface area was the same than GR1<sub>ab+P</sub>

<sup>b</sup> n = 1



**Figure 54.** Removal of methyl red (MR) in the presence of green rusts: 400  $\mu\text{M}$  of biologically synthesized hydroxycarbonate green rust ( $\text{GR1}_{\text{bio}}$ ), and 500  $\mu\text{M}$  of chemically synthesized hydroxycarbonate green rust ( $\text{GR1}_{\text{ab}}$ ),  $\text{GR1}_{\text{ab}}$  supplemented with phosphate ( $\text{GR1}_{\text{ab+P}}$ ), silicate ( $\text{GR1}_{\text{ab+Si}}$ ), polyacrylic acid ( $\text{GR1}_{\text{ab+paa}}$ ), hydroxysulfate green rust ( $\text{GR2}_{\text{ab}}$ ) and  $\text{GR2}_{\text{ab}}$  supplemented with cells ( $\text{GR2}_{\text{ab+cells}}$ ). The MR remaining in solution ( $\text{MR}_t/\text{MR}_0$ ) is plotted as a function of time. The pH was manually held at a constant value of 7.0 before each sampling by addition of HCl 1M or NaOH 1M. Bars are the errors of two independent experiments.

- b) A moderate inhibition of GRs reactivity towards MR by silicate and polyacrylic acid

To investigate whether other environmentally relevant components could affect GR reactivity, experiments were performed with  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  and paa. Such compounds can represent (or be models of) aqueous Si from quartz associated with soil particles or extra-cellular polymeric substances from biofilms (Sergent et al., 2011; Jorand et al., 2013). The  $k_S$  of  $\text{GR1}_{\text{ab+Si}}$  and  $\text{GR1}_{\text{ab+paa}}$  ( $0.156 \text{ L mmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  and  $0.193 \text{ L mmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , respectively) were  $\sim 20$  times higher than that of  $\text{GR1}_{\text{ab+P}}$  and  $\sim 10$  times lower than that of  $\text{GR2}_{\text{ab}}$  (Table 16, Figure 54). This result is in line with a recent study pointing out that GR1 stabilized with EPS ( $\text{GR1}_{\text{ab+paa}}$ ) is quasi-unreactive towards nitrate (Zegeye et al., 2014). Thus, it implies that paa and  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  would have a less pronounced “screen effect” than phosphate and cells, or be sorbed onto different reactive sites as compared to MR.

As stated before, the stoichiometric difference ( $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ) between GRs could influence the rate of reduction, as well as the concentration of surface  $\text{Fe}^{\text{II}}$  site of GR. However, even considering  $k_S$  or  $k_{\text{FeII}}$ , the hierarchy of GR reactivity with MR remains unchanged (Table 16):  $k_S(\text{GR1}_{\text{ab+P}}) < k_S(\text{GR2}_{\text{ab+cells}}) < k_S(\text{GR1}_{\text{bio}}) < k_S(\text{GR1}_{\text{ab+Si}}) < k_S(\text{GR1}_{\text{ab+paa}}) < k_S(\text{GR1}_{\text{ab}}) < k_S(\text{GR2}_{\text{ab}})$ .

To know whether MR was effectively reduced and not only sorbed onto the solid phase, the presence of degradation products from MR reduction was checked. At the end of the reduction, the main absorption peak at 430 nm had disappeared while a band in the ultraviolet region at 305 nm had increased (Figure S1). This absorbance band in the UV region could be assigned to the presence of *p*-dimethylaminoaniline. This result is consistent with equation [11], as well as with the findings of Hou et al. (2007) and Kone et al. (2009) who reported that methyl orange and methyl red were reduced by zero-valent iron and  $\text{GR2}_{\text{ab}}$ , respectively, through cleavage of the azo bond into sulfanilic or carboxyanilic acid and *p*-dimethylaminoaniline. Control with aqueous  $\text{Fe}^{\text{II}}$  was performed and no reduction of MR was observed (Figure S5 b).

#### 4) MR and Hg<sup>II</sup> reduction mechanisms by GRs

##### a) Estimation of the number of moles of contaminant that could be reduced by GRs

The number of moles of Hg<sup>II</sup> species or MR that could be reduced for a given surface area of GR at the given pH value can only be determined for a run highlighting an incomplete consumption of the contaminant. Thus, the initial concentration of GR used during the reduction of the pollutant has not to be sufficient to fully reduce the initial amount of Hg<sup>II</sup> species or MR. This phenomenon is described by the term saturation.

Additional experiment was carried out, where Hg<sup>II</sup> species were added successively to the GR1<sub>bio</sub> suspension (400 μM) in quantities of 5 μM - 100 μM to reach a final Hg<sup>II</sup> concentration of 130 μM in the reaction medium (pH 8.2) (Figure 55). One day after the beginning of the reaction, the quantity of Hg<sup>II</sup> removed was 77 μM (Figure 55), representing 59% of the total addition of Hg<sup>II</sup>. Between each addition of Hg<sup>II</sup>, the kinetics of the reaction decreased (first addition:  $k_{\text{obs},\#1} = 4.1 \pm 0.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ; third addition:  $k_{\text{obs},\#3} = 1.6 \pm 0.2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ; last addition:  $k_{\text{obs},\#5} = 5.0 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ) suggesting that the availability of Fe<sup>II</sup> sites on the surface of GR1<sub>bio</sub> lowered. However, all the Fe<sup>II</sup> sites on the GR1<sub>bio</sub> surface do not seem to be saturated with a Hg<sup>II</sup>/GR ratio of 1/5.2 (*i.e.* 77/400). This ratio was increased in another additional run performed with a Hg<sup>II</sup>/GR ratio of 1/0.8 at pH 8.2. A plateau was reached at 1.66 μM (Figure S4 b), evidencing a partial reduction of mercury with an initial concentration of GR1<sub>bio</sub> of 4 μM. Here, a saturation was highlighted and the amount of Hg<sup>II</sup> species reduced by surface area concentration of GR1<sub>bio</sub> was estimated at  $1.1 \times 10^{-4} \text{ mol of Hg}^{\text{II}} \text{ m}^{-2}$ .

For the reduction of MR, none of our carried out experiments showed an incomplete consumption of C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> species at pH 7 (Figure 54). Nevertheless, we can estimate the minimum amount of C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> species that can be reduced by GR1<sub>bio</sub> at  $4.3 \times 10^{-6} \text{ mol of MR m}^{-2}$  or more.

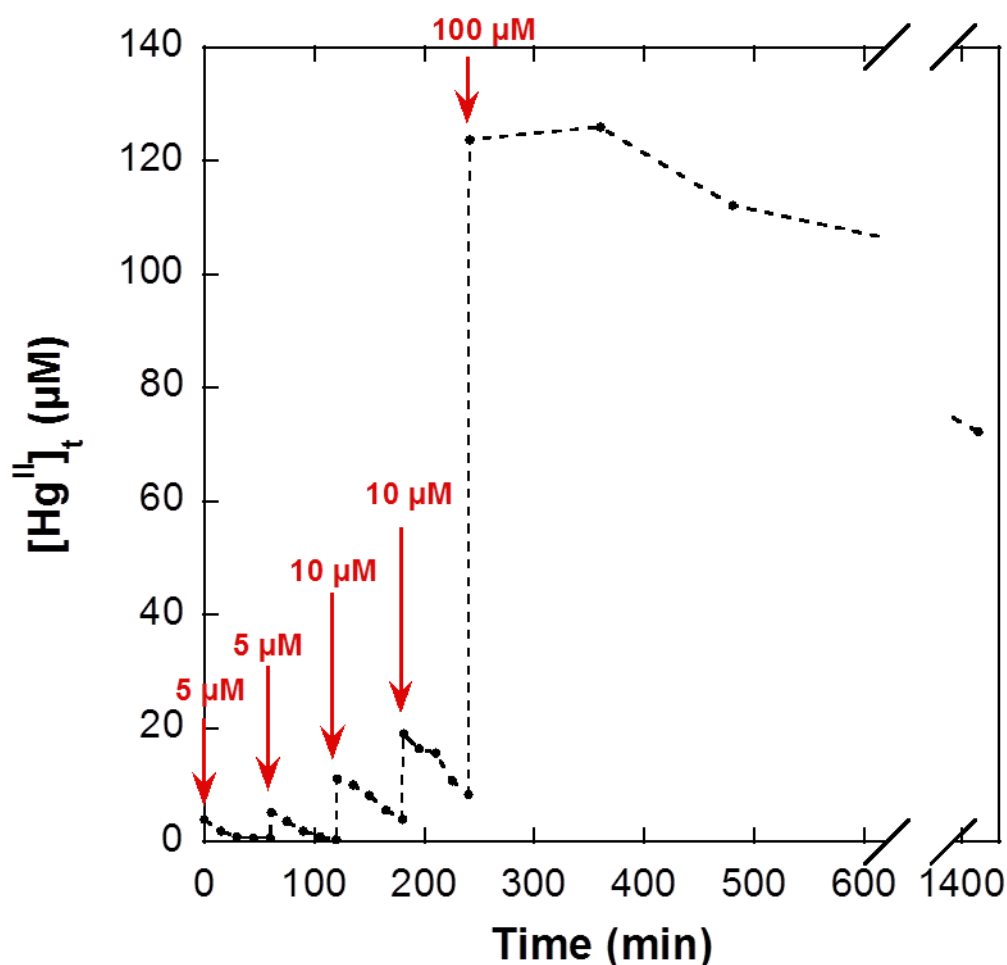


Figure 55. Kinetics of the  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction by biologically synthesized hydroxycarbonate green rust ( $\text{GR1}_{\text{bio}}$ ) with five successive additions of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  with an interval of one hour between each addition in the reaction medium containing an initial  $\text{GR1}_{\text{bio}}$  concentration of  $400 \mu\text{M}$ . The quantity of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  added each hour is indicated by the value under the red arrow. The total amount of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  added in the  $\text{GR1}_{\text{bio}}$  suspension is  $130 \mu\text{M}$  and after 24 hours,  $77 \mu\text{M}$  of  $\text{Hg}(\text{II})$  was reduced into  $\text{Hg}^0$ .

b) Parameters influencing the kinetics of the MR reduction vs the  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction

The MR reaction kinetics were more affected in the presence of GR stabilizing agents, such as phosphate or bacterial cells, than the reduction of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  ( $\text{GR1}_{\text{ab+P}}/\text{Hg}^{\text{II}}$  and  $\text{GR2}_{\text{ab+cells}}/\text{Hg}^{\text{II}}$ , Figure 51 a;  $\text{GR1}_{\text{ab+P}}/\text{MR}$  and  $\text{GR2}_{\text{ab+cells}}/\text{MR}$ , Figure 54). These stabilizing compounds have already proved their ability to prevent the formation of magnetite from  $\text{GR1}_{\text{ab}}$  or  $\text{GR1}_{\text{bio}}$  dissolution (Bocher et al., 2004; Jorand et al., 2013). It was suggested that reactive ferrous sites involved in GR dissolution and located on the lateral faces would be hidden by phosphate (Bocher et al., 2004). For example, the reduction of nitrate by GR1 implies these lateral  $\text{Fe}^{\text{II}}$  sites, and its kinetics is strongly affected by phosphate (Etique et al., 2014b), by EPS (Zegeye et al., 2014), or by silicate (data not shown). In the present investigation, since GR stabilizing agents affect MR reduction, MR would preferentially react with the same  $\text{Fe}^{\text{II}}$  sites of GR as those involved by the sorbing ligands. As  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction was

slightly affected by phosphate or cells, we may suppose that  $\text{Hg}^{\text{II}}$  would preferentially react with other reactive sites, which might rather be located on the basal faces of the GR crystal. Other GR stabilizers such as silicate and paa, are also known to prevent unstable GRs from transforming into magnetite (Sergent et al., 2011; Jorand et al., 2013), however, they affect to a lesser degree the MR reduction by GRs.

In addition, the presence of sorbing ligands could slow down the reactivity of GRs by electrostatic repulsion and/or steric hindrance. Indeed, the interactions of negatively charged MR with GR surfaces covered with a layer of anionic ligands such as phosphate anions, cells, or polymers might also explain the decrease in the reduction rate of MR as compared to that of Hg.

## VII. Conclusion

The difference in reactivity between GRs has more to do with the nature of the contaminant ( $\text{Hg}^{\text{II}}$  or MR) than with the type of GRs (GR1 or GR2). At pH 7, the reaction of GRs with MR is generally slower than with  $\text{Hg}^{\text{II}}$ , and moreover, the reduction of MR seems to be more affected by stabilizing agents than  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction. More precisely, the reduction of MR is sharply limited by phosphate and bacterial cells, whereas in the presence of silicate and paa this reduction is moderate. This difference in GR reactivity towards mercury and methyl red would probably be based on the nature of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  surface sites involved during the reduction: lateral  $\text{Fe}^{\text{II}}$  surface sites would be monopolized for MR reduction, whereas basal  $\text{Fe}^{\text{II}}$  surface sites would interact with  $\text{Hg}^{\text{II}}$  species.

Although the  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction is slightly hindered in the presence of stabilizing agents, the variation of pH suspension from 7.0 to 9.5 leads to a decrease of the kinetics rate. This finding can be explained by the fluctuation of the surface charge of GR (pH 7.0: positive, pH 8.2: zero, pH 9.5: negative) that governs the adsorption and the reduction of  $\text{Hg}(\text{OH})_2$ , the predominant phase of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  species at pH of this investigation.

In environmental conditions where the fougérite mineral can be represented by biologically synthesized hydroxycarbonate green rust ( $\text{GR1}_{\text{bio}}$ ),  $\text{Hg}^{\text{II}}$  species would be more reduced than MR. Indeed, the amount of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  species reduced by surface area of  $\text{GR1}_{\text{bio}}$  ( $1.1 \times 10^{-4}$  mol of  $\text{Hg}^{\text{II}}$   $\text{m}^{-2}$ ) is significantly higher than those of MR ( $4.3 \times 10^{-6}$  mol of MR  $\text{m}^{-2}$ ). In engineering applications using GRs as a reactive sorbent and/or reducing agent, more attention should be paid to the co-occurring ligands as regards the type of target pollutants. These results have strong implications in attenuation and remediation studies aiming to predict the fate and transport of methyl red and mercury in natural or engineered systems.







---

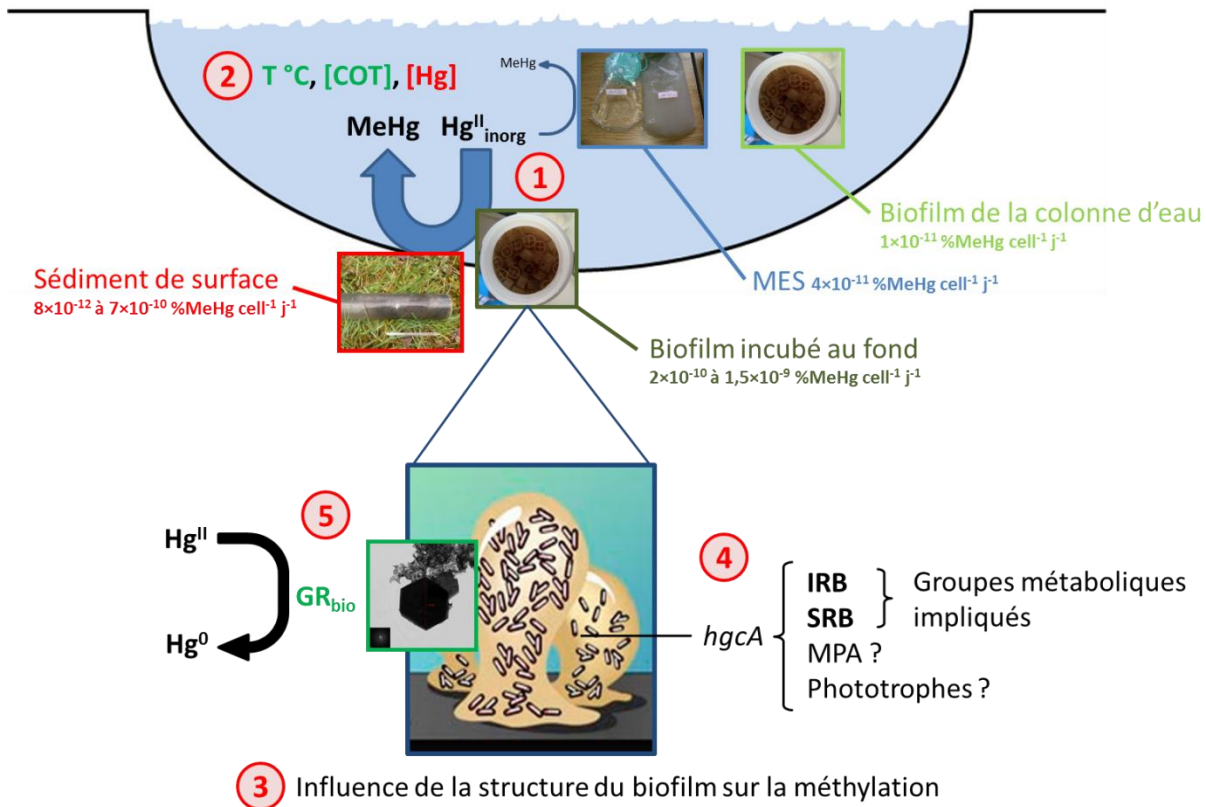
## **CONCLUSION - DISCUSSION**



Ce travail de thèse avait plusieurs objectifs :

- i) Dans un premier temps, un des objectifs consistait à évaluer, au sein d'environnements naturels dulcicoles variés, la contribution relative des compartiments microbiens « eau brute », « biofilms » et « sédiments de surface » à la méthylation du mercure. Parmi ces environnements, le milieu subarctique a été retenu en particulier, pour répondre à la demande d'un projet ANR qui visait à évaluer la transformation de quelques éléments traces métalliques dont le mercure dans les régions du Nord-canadien.
- ii) Une des hypothèses de départ étant que le biofilm microbien pourrait favoriser l'activité des communautés bactériennes méthylantes, nous avons cherché à savoir si l'organisation structurale et la matrice d'EPS pouvaient être des facteurs influençant la méthylation du mercure. Pour ce faire, nous avons comparé les vitesses de méthylation d'une souche pure (souche de collection connue pour son activité méthylante) cultivée sous forme planctonique avec l'activité de la même souche mais cultivée sous forme de biofilm ; nous avons également comparé la méthylation par des biofilms intacts avec la méthylation par des biofilms déstructurés ; et enfin l'effet de l'ajout d'EPS sur la méthylation du mercure par une suspension bactérienne méthylante.
- Nous avons ensuite cherché à savoir si la présence d'un des « gènes de la méthylation » (*hgcA*) était associée à la capacité de méthylation du mercure par les différents échantillons, et à identifier les groupes métaboliques microbiens impliqués dans la méthylation.
- iv) Enfin, nous nous sommes penchés sur la réactivité de la rouille verte carbonatée biogénérée vis-à-vis du mercure. Cet oxyde de fer a été identifié après l'incubation en anoxie d'extraits de biofilms. Sa capacité à réduire le mercure cationique en mercure élémentaire, ainsi qu'un composé organique, le rouge méthyle, a été évaluée et comparée à la réactivité de rouilles vertes synthétisées par voie chimique.

La Figure 56 illustre l'approche expérimentale que nous avons retenue pour répondre à ces objectifs et reprend les principaux résultats.



**Figure 56.** Récapitulatif des résultats majeurs de l'étude : ① Le sédiment de surface est le compartiment majoritairement responsable de la méthylation du mercure (7 sites sur 7) comparé à l'eau brute (1 site sur 7) et au biofilm (2 sites sur 7). Les flèches épaisses et fines représentent respectivement une forte et une faible (ou indétectable) vitesse de méthylation. ② La température d'incubation ainsi que la concentration en carbone organique (en vert) ont une influence positive sur la vitesse de méthylation. Au contraire, la concentration en  $\text{Hg}_{\text{inorg}}$  (en rouge) est négativement corrélée à la vitesse de méthylation. ③ La vitesse de méthylation a été divisée par deux après la déstructuration du biofilm. Le biofilm doit être considéré comme un système complexe et il convient de l'étudier sans le déstructurer. ④ Des séquences du gène *hgcA* ont pu être mises en évidence et leur diversité a été analysée. Les espèces portant le gène *hgcA* au sein de nos échantillons appartiennent aux groupes métaboliques des ferriréductrices (IRB), sulfatoréductrices (SRB), méthanogènes (MPA) et phototrophes. En parallèle, l'utilisation d'inhibiteurs spécifique de croissance a permis de déterminer que les IRB et SRB sont les principaux méthylateurs, les deux autres (suivis d'un point d'interrogation) ne semblent pas participer à la méthylation dans nos conditions expérimentales. ⑤ L'activité IRB au sein du biofilm peut être responsable de la formation de rouille verte, un minéral capable de réduire le  $\text{Hg}^{\text{II}}$  en  $\text{Hg}^0$  et ainsi d'entrer en compétition avec la méthylation.

Dans la première partie de cette étude, les compartiments microbiens des mares dulcicoles qui présentent les plus fortes vitesses de méthylation ( $\%MeHg \text{ cell}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) sont les sédiments de surface. Les vitesses de méthylation ont toujours été détectables dans tous les sites testés pour les sédiments de surface, alors que dans le cas des biofilms l'activité méthylante n'a pu être détectée que dans deux cas sur sept. L'eau brute quant à elle, a présenté une activité méthylante au mieux proche de la limite de détection voire non détectable (Figure 56). Le sédiment de surface apparaît donc comme le contributeur majeur de la méthylation parmi les trois compartiments étudiés. La croissance sous forme de biofilm ne semble donc pas privilégier le développement de communautés plus méthylantes par rapport à celles présentes dans les sédiments de surface. La capacité du biofilm à méthyler ou non le mercure pourrait être attribuée aux conditions physico-chimiques dans lesquelles il s'est développé plutôt qu'à une réelle spécificité de ce compartiment microbien.

Nos résultats s'accordent avec ceux décrits dans la littérature et confirment la grande variabilité de la capacité des compartiments bactériens à méthyler le mercure. Cette variabilité provient sans aucun doute de la diversité des communautés bactériennes, mais on ne peut exclure aussi que les méthodes d'analyse soient également une source de divergence significative (*e.g.* Guimarães *et al.*, 1998 ; Mauro *et al.*, 2001 ; 2002 ; Achá *et al.*, 2005 ; 2011 ; Desrosiers *et al.*, 2006 ; Drott *et al.*, 2008 ; Huguet *et al.*, 2010 ; Avramescu *et al.*, 2011 ; Hamelin *et al.*, 2011 ; Correia *et al.*, 2012 ; 2013). Pour la première fois, nous avons mis en évidence et quantifié les vitesses de méthylation de sédiments de surface de mares thermokarstiques de la région du Nunavik (Province de Québec, Canada). De plus, L'activité méthylante est corrélée à la quantité de carbone organique dissous et elle augmente, sans surprise, avec la température (Figure 56). Ainsi, les changements climatiques actuellement observés dans cette région, en augmentent la température et la durée de la période d'eau libre, augmentent vraisemblablement la méthylation du mercure de ces milieux dulcicoles subarctiques.

Parmi les sites étudiés, un des sites lorrains est contaminé par le mercure (teneurs élevées en  $Hg_{inorg.}$  par rapport aux valeurs moyennes). Pour autant, la capacité à méthyler le mercure des microorganismes de ce site n'apparaît pas spécialement plus haute que pour les autres sites et est au contraire plutôt plus faible. Bien qu'il soit hasardeux d'en faire une généralité du fait d'un nombre d'échantillon faible, la vitesse de méthylation tendrait en effet à diminuer lorsque la concentration en mercure inorganique augmente. Cela s'explique par l'activation d'un système enzymatique de détoxification, comme celui de l'opéron *mer*, qui conduirait donc à diminuer la concentration de  $Hg_{inorg.}$ , le substrat de la méthylation (Gilmour et Henry, 1991 ; Oremland *et al.*, 1995). La

formation de méthylmercure serait donc plutôt favorisée dans les zones faiblement ou peu impactées par une contamination au Hg<sub>inorg</sub>.

En ce qui concerne le biofilm, nous avons cherché à montrer si, en plus de l'activité méthylyante des cellules qu'il contient, son organisation structurale jouait un rôle dans la méthylyation. Nos incubations de biofilms extraits de leurs supports et déstructurés par les ultrasons ont montré des vitesses de méthylyation inférieures à celles des biofilms intacts. D'après ces résultats, il est indispensable de considérer le biofilm bactérien comme un ensemble présentant des propriétés différentes de celles de ses constituants pris séparément, à l'instar d'un organisme vivant par rapport à ses différents organes. L'approche parcellaire que nous avons menée en combinant des cellules planctoniques de la souche *Desulfobulbus propionicus* 1pr3 et des EPS en donne la preuve. Aucune activité méthylyante n'a pu être mesurée lorsque la souche a été cultivée sous forme de biofilm alors qu'avec des cellules planctoniques, avec ou sans EPS, nous avons mesuré une activité méthylyante qui coïncide avec la littérature (Benoit *et al.*, 2001a). On ne retrouve donc pas la même activité méthylyante en présence de cellules planctoniques de *Desulfobulbus propionicus* avec des EPS qu'en présence d'un biofilm de la même souche qui est pourtant majoritairement constitué de ces deux mêmes éléments. Le rôle de barrière diffusive des EPS, empêchant le Hg<sub>inorg</sub> d'atteindre les cellules et d'être méthylyé, peut n'être efficace que lorsqu'ils sont structurés et que les bactéries sont enchâssées dans cette structure. Ainsi, il convient d'étudier le biofilm intact puisqu'en déstructurant la matrice on peut par exemple rompre des interactions entre communautés nécessaires à la méthylyation voire même altérer une partie des cellules avec des traitements agressifs comme les ultrasons. Il serait intéressant, de même, de comparer l'impact de la déstructuration du sédiment sur sa vitesse de méthylyation, puisque le sédiment est généralement homogénéisé avant l'incubation. Dans le cas du biofilm, pour éviter d'avoir à le décrocher et risquer d'abimer sa structure, il convient de le récolter sur des supports et d'incuber directement ces supports colonisés. L'utilisation de supports artificiels dont la surface est connue permet aussi de mieux contrôler la quantité de biofilm qui les colonise et de pouvoir l'exprimer en masse de matière sèche ou en densité cellulaire par unité de surface. L'emploi de supports artificiels peut néanmoins présenter l'inconvénient d'influencer la nature des biofilms qui s'y développent par rapport à des supports naturels (trons immergés, rochers, ...).

L'absence d'activité méthylyante de *Desulfobulbus propionicus* cultivée sous forme de biofilm montre aussi que cette souche se comporte différemment de la souche *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 qui a une activité méthylyante supérieure sous forme de biofilm que sous forme planctonique (Lin *et al.*, 2013). La capacité à méthylyer le mercure sous forme de biofilm n'est donc pas



systematique et dépend certainement de la nature de la souche, des conditions de croissance du biofilm ainsi que des conditions d'incubation du biofilm avec le mercure. Pour poursuivre cette analyse, il faudrait étudier plus précisément l'activité métabolique de *Desulfobulbus propionicus* 1pr3 sous forme de biofilm car si ce mode de croissance affecte l'activité métabolique générale, cela pourrait expliquer que l'activité méthylante soit modifiée. Plus largement, la question de la représentativité des biofilms étudiés dans la littérature par rapports aux biofilms du milieu environnemental demeure. Par exemple, ce qui s'applique à un biofilm mono-espèce (cultivé au laboratoire et ne présentant qu'une seule souche bactérienne) s'applique t'il aux biofilms multi-espèces présents dans l'environnement ?

Pour conclure sur cette première partie, le biofilm ne ressort pas comme un compartiment microbien impactant particulièrement la méthylation du mercure (ni positivement, ni négativement). Il semble que sa capacité à méthyler le mercure découle des conditions dans lesquelles les microorganismes qui le composent se sont développés ainsi que de son organisation structurale, et non d'un effet direct des EPS. En outre, la nature des communautés bactériennes qui forment le biofilm influence probablement son activité méthylante.

Dans la seconde partie de ce travail, l'objectif était d'identifier les acteurs de la méthylation du mercure (groupes métaboliques et taxonomiques bactériens), et ce par plusieurs approches. Dans un premier temps, la culture en milieux spécifiques a permis de mettre en évidence des activités ferriréductrice et sulfatoréductrice pour les biofilms et les sédiments de surface. Afin de compléter cette analyse, cette approche pourrait être étendue à d'autres métabolismes comme l'activité méthanogène et phototrophe. Dans un second temps, nous avons recherché des séquences du « gène de la méthylation » *hgcA*, au sein des échantillons environnementaux et analysé leur diversité. Quatre-vingt-trois pour cent des séquences identifiées ont été affiliées à des séquences d'espèces IRB ou SRB qui, de plus, coïncident avec les séquences identifiées dans la littérature (Gilmour *et al.*, 2013 ; Shaefer *et al.*, 2014). Les autres séquences étaient affiliées à des MPA et des phototrophes (Figure 56). Enfin, la méthylation du mercure par un biofilm a été suivie en présence d'inhibiteurs métaboliques ce qui confirme le rôle des IRB et SRB comme principaux méthylateurs. Le fait que les microorganismes IRB ait été identifiés comme acteurs de la méthylation rejoint de récents résultats qui mettent en avant le rôle d'autres groupes métaboliques que les SRB (IRB, MPA, phototrophes) dans l'activité méthylante (Desrosiers *et al.*, 2006 ; Hamelin *et al.*, 2011 ; Correia *et al.*, 2011 ; Schaeffer *et al.*, 2011 ; Avramescu *et al.*, 2011).

Au vu de nos résultats, il apparaît pertinent de coupler la recherche du gène *hgcA* à des mesures d'activités métaboliques (enrichissements et utilisation d'inhibiteurs) car le gène peut être présent mais pas ou peu exprimé. A l'inverse, le gène n'a pas été retrouvé dans tous les échantillons présentant une activité méthylyante. Ce cas de figure peut s'expliquer par l'implication d'autres gènes que *hgcA* dans la méthylation du mercure, une spécificité limitée des amorces par rapport à la diversité des séquences existantes ou encore un nombre trop faible de copies du gène pour qu'il soit détecté. En ce qui concerne l'approche par l'activité métabolique, il faut garder à l'esprit que les inhibiteurs de croissance peuvent, dans certaines conditions, impacter d'autres métabolismes bactériens que celui visé. En effet, le BESA en plus d'inhiber l'activité méthanogène, peut servir d'accepteur terminal d'électrons aux SRB et le  $\text{MoO}_4^{2-}$ , s'il est trop concentré, peut inhiber d'autres bactéries que les SRB (Fleming *et al.*, 2006). Il n'existe pas, à ce jour, de composés suffisamment spécifiques pour tenir lieu d'inhibiteurs métaboliques idéaux, il convient donc de tester au préalable l'effet de ces composés en fonction des conditions expérimentales et des échantillons étudiés.

Nous avons donc montré que, parmi les groupes métaboliques identifiés par la recherche du gène *hgcA*, ce sont principalement les bactéries sulfatoréductrices et ferriréductrices qui sont responsables de la méthylation du mercure au sein de nos échantillons. Or, l'activité ferriréductrice, par le biais de la précipitation de minéraux, peut-elle avoir un autre impact sur le devenir du mercure ? C'est ce que nous avons examiné dans la dernière partie de notre étude.

L'activité ferriréductrice d'un biofilm dans un milieu de croissance contenant un oxyde ferrique a conduit à la formation d'un minéral mixte  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$  : la rouille verte carbonatée. Ce composé peut être synthétisé en laboratoire (Schwertmann and Fechter, 1994 ; Génin *et al.*, 1998 ; Bocher *et al.*, 2004) et se révèle très réactif vis-à-vis de contaminants inorganiques et organiques (*e.g.* Erbs *et al.*, 1999 ; Loyaux-Lawniczak *et al.*, 2000 ; Hansen *et al.*, 2001 ; O'Loughlin *et al.*, 2003 ; Elsner *et al.*, 2004 ; Mitsunobu *et al.*, 2008 ; Kone *et al.*, 2009). Notre objectif était de comparer la réactivité de rouilles vertes chimiques ou biologiques avec le mercure cationique et le rouge méthyle. Etant donné que la rouille verte biologique est stabilisée par des polymères et des corps bactériens (Zegeye *et al.*, 2010 ; Jorand *et al.*, 2013), et que sa réactivité s'en trouve amoindrie vis-à-vis de certains oxydants comme les nitrites (Zegeye *et al.*, 2014), il est attendu que la réduction du  $\text{Hg}^{\text{II}}$  en  $\text{Hg}^0$  soit également affectée pour une rouille verte « biologique » par rapport à une rouille verte synthétique. Les résultats montrent que la rouille verte biogénérée, ainsi que la présence de ligands (phosphate, silicate, acide polyacrylique) influent sur la réactivité vis-à-vis du rouge méthyle mais pas vis-à-vis du mercure cationique inorganique. Ces différences de réactivité

en fonction du composé ciblé s'expliqueraient par la nature des sites réactifs. Le résultat majeur ici est que la rouille verte d'origine biologique, qui peut être synthétisée par l'activité ferriréductrice de biofilm environnementaux, est capable de réduire le  $\text{Hg}^{\text{II}}$  en  $\text{Hg}^0$  à des vitesses comparables à celles de rouilles vertes synthétiques. Ainsi, au sein de compartiments microbiens dulcicoles (MES, biofilms, sédiments de surface) riches en microorganismes IRB, il pourrait exister une compétition pour le  $\text{Hg}^{\text{II}}_{\text{inorg}}$  entre, d'une part, la méthylation par les bactéries et, d'autre part, la réduction en  $\text{Hg}^0$  par des rouilles vertes, bien entendu si les conditions sont rassemblées pour leur synthèse (Figure 56). Plus d'expérimentations sont nécessaires pour prédire quel processus sera dominant au sein d'un système naturel, et dans quelles conditions. Toutefois, on peut déjà considérer que certains facteurs seront déterminant comme la concentration en oxyde ferrique et donc en rouille verte formée. Il faut aussi tenir compte qu'en fonction du pH du milieu, la charge de surface de la rouille verte peut évoluer, favorisant ou non l'adsorption du mercure sur les sites réactifs. La spéciation du  $\text{Hg}^{\text{II}}$  a aussi son importance ; nous avons ici étudié la réduction de l'espèce  $\text{Hg}(\text{OH})_2$  mais qu'en est-il de la réactivité de la rouille verte vis-à-vis des espèces neutres  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{HgS}_{\text{aq}}$ ,  $\text{HgS}(\text{OH})_{2\text{aq}}$ , ainsi que des complexes avec des molécules organiques (type Hg-cystéine), qui sont décrits comme les principaux substrats de la méthylation (Gilmour *et al.*, 1992 ; Benoit *et al.*, 1999a ; Drott *et al.*, 2007 ; Schaefer et Morel 2009 ; 2011) ? Enfin, si les cristaux de rouille verte sont formés au sein du biofilm, il est probable qu'ils soient emprisonnés dans la matrice d'EPS et donc faiblement accessibles au mercure dissous. Dans ce cas, le devenir du mercure, entre la méthylation et la réduction, reposerait en grande partie sur sa probabilité de rencontre avec les cristaux de rouille verte plutôt qu'avec les bactéries méthylantes. Enfin, il ne faut pas considérer que la réduction du  $\text{Hg}^{\text{II}}$  en  $\text{Hg}^0$  inhibe totalement la formation de méthylmercure étant donné que certaines souches bactériennes sont capables d'utiliser le mercure élémentaire comme substrat à la méthylation (Colombo *et al.*, 2013 ; Hu *et al.*, 2013).

En résumé, notre étude a montré que dans les sites étudiés (mares de zone tempérée et mares thermokarstiques subarctiques), la méthylation du mercure est majoritairement due à l'activité bactérienne des sédiments de surface. Le biofilm n'est pas un lieu particulièrement privilégié de la méthylation du mercure. La capacité des bactéries qui constitue le biofilm à méthyler le mercure n'est donc pas spécifique mais dépend des conditions dans lesquelles il se trouve. Enfin, l'activité ferriréductrice peut impacter la méthylation nette, de façon positive, en participant directement à la formation de méthylmercure d'une part (en plus de l'activité SRB), et de façon négative, en synthétisant des minéraux réactifs de types rouille verte capables de réduire le  $\text{Hg}^{\text{II}}$  en  $\text{Hg}^0$ , d'autre part.



---

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Achá D., Hintelmann H., and Yee J.** (2011) Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region. *Chemosphere*, Vol. 82, No. 6, pp. 911-916
- Achá D., Iniguez V., Roulet M., Guimarães J. R. D., Luna R., Alanoc, L., and Sanchez S.** (2005) Sulfate-reducing bacteria in floating macrophyte rhizospheres from an Amazonian floodplain lake in Bolivia and their association with Hg methylation. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 11, pp. 7531-7535
- Allard B., and Arsenie I.** (1991) Abiotic reduction of mercury by humic substances in aquatic system—an important process for the mercury cycle. *Water Air & Soil Pollution*, Vol. 56, No. 1, pp. 457-464
- Amyot M., Southworth G., Lindberg S. E., Hintelmann H., Lalonde J. D., Ogrinc N., Poulain A. J., and Sandilands K. A.** (2004) Formation and evasion of dissolved gaseous mercury in large enclosures amended with <sup>200</sup>HgCl<sub>2</sub>. *Atmospheric Environment*, Vol. 38, No. 26, pp. 4279-4289
- Ariya P. A., Khalizov A., and Gidas A.** (2002) Reactions of gaseous mercury with atomic and molecular halogens: kinetics, product studies, and atmospheric implications. *The Journal of Physical Chemistry A*, Vol. 106, No. 32, pp. 7310-7320
- Asaduzzaman A. M., and Schreckenbach G.** (2011) Chalcogenophilicity of Mercury. *Inorganic Chemistry*, Vol. 50, No. 8, pp. 3791-3798
- Avramescu M. L., Yumvihoze E., Hintelmann H., Ridal J., Fortin D., and RS Lean D.** (2011) Biogeochemical factors influencing net mercury methylation in contaminated freshwater sediments from the St. Lawrence River in Cornwall, Ontario, Canada. *Science of the Total Environment*, Vol. 409, No. 5, pp. 968-978
- Baker-Austin C., Wright M. S., Stepanauskas R., and McArthur J. V.** (2006) Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, Vol. 14, No. 4, pp. 176-182
- Bale M. J., Fry J. C., and Day, M. J.** (1988) Transfer and occurrence of large mercury resistance plasmids in river epilithon. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 54, No. 4, pp. 972-978
- Barkay T.** (1987) Adaptation of aquatic microbial communities to Hg<sup>2+</sup> stress. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 53, No. 12, pp. 2725-2732
- Barkay T., Gillman M., and Turner R. R.** (1997) Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 11, pp. 4267-4271
- Barkay T., Miller S. M., and Summers A. O.** (2003) Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 27, No. 2-3, pp. 355-384
- Barkay T., Turner R. R., VandenBrook A., and Liebert C.** (1991) The relationships of Hg (II) volatilization from a freshwater pond to the abundance of *mer* genes in the gene pool of the indigenous microbial community. *Microbial ecology*, Vol. 21, No. 1, pp. 151-161
- Bar-Zeev E., Berman-Frank I., Girshevitz O., and Berman T.** (2012) Revised paradigm of aquatic biofilm formation facilitated by microgel transparent exopolymer particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 109, No. 23, pp. 9119-9124
- Batté M., Appenzeller B. M. R., Grandjean D., Fass S., Gauthier V., Jorand F., ... Block J. C.** (2003) Biofilms in drinking water distribution systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, Vol. 2, No. 2-4, pp. 147-168
- Bearcock J.M., Perkins W.T., and Pearce N.J.G.** (2011) Laboratory studies using naturally occurring “green rust” to aid metal mine water remediation. *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 190, pp. 466-473
- Bellama J. M., Jewett K. L., Manders W. F., and Dirk Nies J.** (1988) A comparison of the rates of methylation of mercury (II) species in aquatic media by various organotin and organosilicon moieties. *Science of the Total Environment*, Vol. 73, No. 1, pp. 39-51
- Benali O., Abdelmoula M., Refait P., and Génin J.-M.R.** (2001) Effect of orthophosphate on the oxidation products of Fe(II)-Fe(III) hydroxycarbonate: the transformation of green rust to ferrihydrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 65, pp. 1715-1726
- Ben-Bassat D., and Mayer A. M.** (1978) Light-induced Hg volatilization and O<sub>2</sub> evolution in *Chlorella* and the effect of DCMU and methylamine. *Physiologia Plantarum*, Vol. 42, No. 1, pp. 33-38
- Benoit J. M., Gilmour C. C., and Mason R. P.** (2001a) Aspects of bioavailability of mercury for methylation in pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 1, pp. 51-58

- Benoit J. M., Gilmour C. C., and Mason R. P.** (2001b) The influence of sulfide on solid-phase mercury bioavailability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Environmental Science & Technology*, Vol. 35, No. 1, pp. 127-132
- Benoit J. M., Gilmour C. C., Mason R. P., and Heyes A.** (1999a) Sulfide controls on mercury speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore waters. *Environmental Science & Technology*, Vol. 33, No. 6, pp. 951-957
- Benoit J. M., Mason R. P., and Gilmour C. C.** (1999b) Estimation of mercury-sulfide speciation in sediment pore waters using octanol—water partitioning and implications for availability to methylating bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 18, No. 10, pp. 2138-2141
- Benoit J. M., Mason R. P., Gilmour C. C., and Aiken G. R.** (2001c) Constants for mercury binding by dissolved organic matter isolates from the Florida Everglades. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 65, No. 24, pp. 4445-4451
- Benoit J.M., Gilmour C.C., Mason R.P., Riedel G.S., and Riedel G.F.** (1998) Behavior of mercury in the Patuxent River estuary. *Biogeochemistry* Vol. 40, pp. 249–265
- Bergquist B. A., and Blum J. D.** (2009) The odds and evens of mercury isotopes: applications of mass-dependent and mass-independent isotope fractionation. *Elements*, Vol. 5, No. 6, pp. 353-357
- Berman M., and Bartha R.** (1986) Levels of chemical versus biological methylation of mercury in sediments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 36, No. 1, pp. 401-404
- Berman M., Chase T., and Bartha R.** (1990) Carbon flow in mercury biomethylation by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, No. 1, pp. 298-300
- Berthelin J., Ona-Nguema G., Stemmler S., Quantin C., Abdelmoula M. and Jorand F.** (2006) Bioreduction of ferric species and biogenesis of green rusts in soils. *C.R. Geosciences* 338, pp. 447-455
- Biswas A., Brooks S. C., Miller C. L., Mosher J. J., Yin X. L., and Drake M. M.** (2011) Bacterial growth phase influences methylmercury production by the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132. *Science of the Total Environment*, Vol. 409, No. 19, pp. 3943-3948
- Blayney M. B.** (2001) The need for empirically derived permeation data for personal protective equipment: the death of Dr. Karen E. Wetterhahn. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, Vol. 16, No. 2, pp. 233-236
- Bloom N.** (1989) Determination of picogram levels of methylmercury by aqueous phase ethylation, followed by cryogenic gas chromatography with cold vapour atomic fluorescence detection. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 46, No. 7, pp. 1131-1140
- Bloom N. S., and Lasorsa B. K.** (1999) Changes in mercury speciation and the release of methyl mercury as a result of marine sediment dredging activities. *Science of the Total Environment*, Vol. 237, pp. 379-385
- Bocher F., Géhin A., Ruby C., Ghanbaja J., Abdelmoula M. and Génin J-M.** (2004) Coprecipitation of Fe(II–III) hydroxycarbonate green rust stabilised by phosphate adsorption. *Solid State Sciences*, Vol. 6, No. 1, pp. 117-124
- Boe-Hansen R., Albrechtsen H. J., Arvin E., and Jørgensen C.** (2002) Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions. *Water Research*, Vol. 36, No. 18, pp. 4477-4486
- Bouchard F., Francus P., Pienitz R., Laurion I., and Feyte S.** (2014) Subarctic thermokarst ponds: investigating recent landscape evolution and sediment dynamics in thawed permafrost of northern Québec (Canada). *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, Vol. 46, No. 1, pp. 251-271
- Boudou A., and Ribeyre F.** (1997) Mercury in the food web: accumulation and transfer mechanisms. *Metal ions in biological systems*, Vol. 34, pp. 289-320
- Boudou A., Maury-Brachet R., Coquery M., Durrieu G., and Cossa, D** (2005) Synergic effect of gold mining and damming on mercury contamination in fish. *Environmental Science & Technology*, Vol. 39, No. 8, pp. 2448-2454
- Bowden W. B., Gooseff M. N., Balsler A., Green A., Peterson B. J., and Bradford J.** (2008) Sediment and nutrient delivery from thermokarst features in the foothills of the North Slope, Alaska: Potential impacts on headwater stream ecosystems. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences (2005–2012)*, Vol. 113(G2)



- Braune B., Muir D., DeMarch B., Gamberg M., Poole K., Currie R., ... and Shutt L.** (1999) Spatial and temporal trends of contaminants in Canadian Arctic freshwater and terrestrial ecosystems: a review. *Science of the Total Environment*, Vol. 230, No. 1, pp. 145-207
- Breton J., Vallières C., and Laurion I.** (2009) Limnological properties of permafrost thaw ponds in northeastern Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 66, No. 10, pp. 1635-1648
- Bridges C. C., and Zalups R. K.** (2004) Homocysteine, System b<sup>0,+</sup> and the Renal Epithelial Transport and Toxicity of Inorganic Mercury. *The American Journal of Pathology*, Vol. 165, No. 4, pp. 1385-1394
- Brown N. L., Stoyanov J. V., Kidd S. P., and Hobman J. L.** (2003) The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 27, No. 2-3, pp. 145-163
- Calmels F., and Allard M.** (2004) Ice segregation and gas distribution in permafrost using tomodesitometric analysis. *Permafrost and Periglacial Processes*, Vol. 15, No. 4, pp. 367-378
- Carlson H.K., Clark I.C., Melnyk R.A., and Coates J.D.** (2012) Toward a mechanistic understanding of anaerobic nitrate-dependent iron oxidation: balancing electron uptake and detoxification. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 3, No. 57, pp. 1-6
- Carmouze J. P., Lucotte M., and Boudou A.** (2001) Le mercure en Amazonie: rôle de l'homme et de l'environnement, risques sanitaires. IRD éditions, France
- Castelle S., Schäfer J., Blanc G., Audry S., Etcheber H., and Lissalde J. P.** (2007) 50-year record and solid state speciation of mercury in natural and contaminated reservoir sediment. *Applied Geochemistry*, Vol. 22, No. 7, pp. 1359-1370
- Charlet L., Bosbach D., and Peretyashko T.** (2002) Natural attenuation of TCE, As, Hg linked to the heterogeneous oxidation of Fe(II): an AFM study. *Chemical Geology*, Vol. 190, pp. 303-319
- Chen J., Pehkonen S. O., and Lin C. J.** (2003) Degradation of monomethylmercury chloride by hydroxyl radicals in simulated natural waters. *Water Research*, Vol. 37, No. 10, pp. 2496-2504
- Chen Y., Bonzongo J. C., and Miller G. C.** (1996) Levels of methylmercury and controlling factors in surface sediments of the Carson River system, Nevada. *Environmental Pollution*, Vol. 92, No. 3, pp. 281-287
- Choi M. H., and Cech J. J.** (1998) Unexpectedly high mercury level in pelleted commercial fish feed. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 17, No. 10, pp. 1979-1981
- Choi S. C., Chase T., and Bartha R.** (1994) Metabolic pathways leading to mercury methylation in *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, No. 11, pp. 4072-4077
- Christensen T. R.** (1999) Potential and actual trace gas fluxes in Arctic terrestrial ecosystems. *Polar Research*, Vol. 18, No. 2, pp. 199-206
- Christiansen B.C., Balic-Zunic T., Dideriksen K., and Stipp S.L.S.** (2009) Identification of green rust in groundwater. *Environmental Science & Technology*, Vol. 43, pp. 3436-3441
- Clark D. L., Weiss A. A., and Silver S.** (1977) Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Pseudomonas*. *Journal of bacteriology*, Vol. 132, No. 1, pp. 186-196
- Clarkson T. W., Magos L., and Myers G. J.** (2003) The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations. *New England Journal of Medicine*, Vol. 349, No. 18, pp. 1731-1737
- Coelho-Souza S. A., Guimarães J. R., Mauro J. B., Miranda M. R., and Azevedo S. M.** (2006) Mercury methylation and bacterial activity associated to tropical phytoplankton. *Science of the Total Environment*, Vol. 364, No. 1, pp. 188-199
- Coleman M. L., Hedrick D. B., Lovley D. R., White, D. C., and Pye, K.** (1993) Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature*, Vol. 361, pp. 436-438
- Colombo M. J., Ha J., Reinfelder J. R., Barkay T., and Yee N.** (2013) Anaerobic oxidation of Hg (0) and methylmercury formation by *Desulfovibrio desulfuricans* ND132. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 112, pp. 166-177
- Compeau G. C., and Bartha R.** (1984) Methylation and demethylation of mercury under controlled redox, pH and salinity conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 48, No. 6, pp. 1203-1207
- Compeau G. C., and Bartha R.** (1985) Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 50, No. 2, pp. 498-502

- Compeau G. C., and Bartha R.** (1987) Effect of salinity on mercury-methylating activity of sulfate-reducing bacteria in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 53, No. 2, pp. 261-265
- Correia R. R. S., de Oliveira D. C. M., and Guimarães J. R. D.** (2013) Mercury methylation in mesocosms with and without the aquatic macrophyte *Eichhornia crassipes* (mart.) Solms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 96, pp. 124-130
- Correia R. R., Miranda M. R., and Guimarães J. R.** (2012) Mercury methylation and the microbial consortium in periphyton of tropical macrophytes: effect of different inhibitors. *Environmental Research*, Vol. 112, pp. 86-91
- Cossa D., Sanjuan J., and Noel J.** (1994) Mercury transport in waters of the strait of Dover. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 28, No. 6, pp. 385-388
- Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., and Lappin-Scott H. M.** (1995) Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, Vol. 49, No. 1, pp. 711-745
- Craig P. J., and Moreton P. A.** (1986) Total mercury, methyl mercury and sulphide levels in British estuarine sediments. *Water Research*, Vol. 20, No. 9, pp. 1111-1118
- Crichton R. R. and Pierre J.-L.** (2001) Old Iron, Young Copper : from Mars to Venus. *BioMetals*. Vol. 14, pp. 99-112
- De Beer D., and Stoodley P.** (2006) Microbial biofilms. *The prokaryotes*, pp. 904-937, Springer New York
- De Beer D., Stoodley P., and Lewandowski Z.** (1996) Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms. *Water Research*, Vol. 30, No. 11, pp. 2761-2765
- De Flora S., Bennicelli C., and Bagnasco M.** (1994) Genotoxicity of mercury compounds. A review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 317, No. 1, pp. 57-7
- de Magalhães M. E. A., and Tubino M.** (1995) A possible path for mercury in biological systems: the oxidation of metallic mercury by molecular oxygen in aqueous solutions. *Science of the Total Environment*, Vol. 170, No. 3, pp. 229-239
- Desrosiers M., Planas D., and Mucci A.** (2006) Mercury methylation in the epilithon of boreal shield aquatic ecosystems. *Environmental Science & Technology*, Vol. 40, No. 5, pp. 1540-1546
- Devars S., Avilés C., Cervantes C., and Moreno-Sánchez R.** (2000) Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. *Archives of Microbiology*, Vol. 174, No. 3, pp. 175-180
- Dolbec J., Mergler D., Larribe F., Roulet M., Lebel J., and Lucotte M.** (2001) Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. *Science of the Total Environment*, Vol. 271, No. 1, pp. 87-97
- Dominique Y., Muresan B., Duran R., Richard S., and Boudou A.** (2007) Simulation of the chemical fate and bioavailability of liquid elemental mercury drops from gold mining in Amazonian freshwater systems. *Environmental Science & Technology*, Vol. 41, No. 21, pp. 7322-7329
- Drissi S.H., Refait P., Abdelmoula M., and Génin J.-M.R.** (1995) The preparation and thermodynamic properties of iron(II)-iron(III) hydroxide-carbonate (green rust); Pourbaix diagram of iron in carbonate-containing aqueous media. *Corrosion Science*, Vol. 37, pp. 2025-2041
- Drott A., Lambertsson L., Björn E., and Skjellberg U.** (2007) Importance of dissolved neutral mercury sulfides for methyl mercury production in contaminated sediments. *Environmental Science & Technology*, Vol. 41, No. 7, pp. 2270-2276
- Drott A., Lambertsson L., Björn E., and Skjellberg U.** (2008) Potential demethylation rate determinations in relation to concentrations of MeHg, Hg and pore water speciation of MeHg in contaminated sediments. *Marine Chemistry*, Vol. 112, No. 1, pp. 93-101
- Duran R., Ranchou-Peyruse M., Menuet V., Monperrus M., Bareille G., Goni M. S., ... and Caumette P.** (2008) Mercury methylation by a microbial community from sediments of the Adour Estuary (Bay of Biscay, France). *Environmental Pollution*, Vol. 156, No. 3, pp. 951-958
- Dyke A. S., Prest V. K.** (1987) Late Wisconsinan and Holocene history of the Laurentide ice sheet. *Géographie physique et Quaternaire*, Vol. 41, No. 2, pp. 237-263
- Ebinghaus R., Wilken R. D., and Gisder P.** (1994) Investigation on the formation of monomethylmercury (II) in the Elbe. *About Water*. Vol. 82, No. 19

- Eckley C. S., and Hintelmann H.** (2006) Determination of mercury methylation potentials in the water column of lakes across Canada. *Science of the Total Environment*, Vol. 368, No. 1, pp. 111-125
- Ekstrom E. B., Morel F. M., and Benoit J. M.** (2003) Mercury methylation independent of the acetyl-coenzyme A pathway in sulfate-reducing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 69, No. 9, pp. 5414-5422
- Elsner M., Schwarzenbach R.P., and Haderlein S.B.** (2004) Reactivity of Fe(II)-bearing minerals toward reductive transformation of organic contaminants. *Environmental Science & Technology*, Vol. 38, pp. 799-807
- Environment Canada** (2012) Canadian Climate Normals or Averages 1971–2000, [http://climate.weatheroffice.gc.ca/climate\\_normals/index\\_e.html](http://climate.weatheroffice.gc.ca/climate_normals/index_e.html).
- Erbs M., Hansen H. S. B. and Olsen C. E.** (1999) Reductive dechlorination of carbon tetrachloride using iron(II) iron(III) hydroxide sulfate (green rust). *Environmental Science & Technology*. Vol. 33, No. 2, pp. 307-311
- Etique M., Jorand F. P., Zegeye A., Grégoire B., Despas C., and Ruby C.** (2014a) Abiotic process for Fe (II) oxidation and green rust mineralization driven by a heterotrophic nitrate reducing bacteria (*Klebsiella mobilis*). *Environmental Science & Technology*, Vol. 48, No. 7, pp. 3742-3751
- Etique M., Zegeye A., Grégoire B., Carteret C., and Ruby C.** (2014b) Nitrate reduction by mixed iron(II-III) hydroxycarbonate green rust in the presence of phosphate anions: the key parameters influencing the ammonium selectivity. *Water Research*, Vol. 62, pp. 29-39
- Ettwig K. F.** (2006) Degradation of 2-bromo-ethane sulfonate (BES) and 2-mercapto-ethane sulfonate (coenzyme M) by anaerobic enrichment cultures, *Microbial Diversity Course*, Woods Hole Marine Biological Laboratory, [www.mbl.edu/microbialdiversity/](http://www.mbl.edu/microbialdiversity/)
- Evans M. S.** (2000) The large lake ecosystems of northern Canada. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, Vol. 3, No. 1, pp. 65-79
- Evans M. S., Lockhart W. L., Doetzel L., Low G., Muir D., Kidd K., ... and Delaronde J.** (2005b) Elevated mercury concentrations in fish in lakes in the Mackenzie River Basin: the role of physical, chemical, and biological factors. *Science of the Total Environment*, Vol. 351, pp. 479-500
- Evans M. S., Muir D., Lockhart W. L., Stern G., Ryan M., and Roach P.** (2005a) Persistent organic pollutants and metals in the freshwater biota of the Canadian Subarctic and Arctic: an overview. *Science of the Total Environment*, Vol. 351, pp. 94-147
- Fagerström T., and Jernelöv A.** (1972) Some aspects of the quantitative ecology of mercury. *Water Research*, Vol. 6, No. 10, pp. 1193–1202
- Ferris F. G., Schultze S., Witten T. C., Fyfe W. S., and Beveridge, T. J.** (1989) Metal interactions with microbial biofilms in acidic and neutral pH environments. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 55, No. 5, pp. 1249-1257
- Fiedler N., Udasin I., Gochfeld M., Buckler G., Kelly-McNeil K., and Kipen H.** (1999) Neuropsychological and stress evaluation of a residential mercury exposure. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 107, No. 5, pp. 343
- Fitzgerald W. F., and Mason R. P.** (1997) Biogeochemical cycling of mercury in the marine environment. *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 34, pp. 53-112
- Fitzgerald W. F., Mason R. P., and Vandal G. M.** (1991) Atmospheric cycling and air-water exchange of mercury over mid-continental lacustrine regions. *Water Air and Soil Pollution*, Vol. 56, No. 1, pp. 745-767
- Fleming E. J., Mack E. E., Green P. G., and Nelson D. C.** (2006) Mercury methylation from unexpected sources: molybdate-inhibited freshwater sediments and an iron-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 1, pp. 457-464
- Flemming H. C., and Wingender J.** (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 8, No. 9, pp. 623-633
- Fontaine J., Dewailly É., Benedetti J. L., Pereg D., Ayotte P., and Déry S.** (2008) Re-evaluation of blood mercury, lead and cadmium concentrations in the Inuit population of Nunavik (Québec): a cross-sectional study. *Environmental Health*, Vol. 7, No. 25, pp. 1-13

- Foran J. A., Hites R. A., Carpenter D. O., Hamilton M. C., Mathews-Amos A., and Schwager S. J.** (2004) A survey of metals in tissues of farmed Atlantic and wild Pacific salmon. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, No. 9, pp. 2108-2110
- Fredrickson J.K., Zachara J.M., Kennedy D.W., Dong H., Onstott T.C., Hinman N.W., and Li S.-M.** (1998) Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 62, pp. 3239-3257
- Fréry N., Maury-Brachet R., Maillot E., Deheeger M., De Merona B., and Boudou A.** (2001) Gold-mining activities and mercury contamination of native amerindian communities in French Guiana: key role of fish in dietary uptake. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 109, No. 5, pp. 449
- Fry J. C.** (1988) Determination of biomass. *Methods in aquatic bacteriology*. Pp. 27-72 Wiley
- Fuqua C., and Greenberg E. P.** (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 3, No. 9, pp. 685-695
- Furukawa K., Suzuki T., Tonomura K.** (1969) Decomposition of organic mercurial compounds by mercury-resistant bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 33, No. 1, pp. 128-130
- Furutani A., and Rudd J. W.** (1980) Measurement of mercury methylation in lake water and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 40, No. 4, pp. 770-776
- Gabriel M. C., and Williamson D. G.** (2004) Principal biogeochemical factors affecting the speciation and transport of mercury through the terrestrial environment. *Environmental Geochemistry and Health*, Vol. 26, pp. 421-434
- Gagnon C., Pelletier E., Mucci A., and Fitzgerald W. F.** (1996) Diagenetic behavior of methylmercury in organic-rich coastal sediments. *Limnology and Oceanography*, Vol. 41, No. 3, pp. 428-434
- Génin J.-M.R., Abdelmoula M., Ruby C., and Upadhyay C.** (2006) Speciation of iron; characterisation and structure of green rusts and FeII-III oxyhydroxycarbonate fougérite. *Comptes Rendus Geosciences*, Vol. 338, pp. 402-419
- Génin J.-M.R., Bourrié G., Trolard F., Abdelmoula M., Jaffreziec A., Refait P., Maître V., Humbert B., and Herbillon A.** (1998) Thermodynamic equilibria in aqueous suspensions of synthetic and natural Fe(II)-Fe(III) green rusts: occurrences of the mineral in hydromorphic soils. *Environmental Science & Technology*, Vol. 32, pp. 1058-1068
- Ghambeer R. K., Wood H. G., Schulman M., and Ljungdahl, L.** (1971) Total synthesis of acetate from CO<sub>2</sub>: Inhibition by alkylhalides of the synthesis from CO<sub>2</sub>, methyltetrahydrofolate, and methyl-B12 by *Clostridium thermoaceticum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 143, No. 2, pp. 471-484
- Gilbert B., and Banfield J. F.** (2005) Molecular-scale processes involving nanoparticulate minerals in biogeochemical systems. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Vol. 59, No. 1, pp. 109-155
- Gilmour C. C., and Henry E. A.** (1991) Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environmental Pollution*, Vol. 71, No. (2), 131-169
- Gilmour C. C., Elias D. A., Kucken A. M., Brown S. D., Palumbo A. V., Schadt C. W., and Wall J. D.** (2011) Sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 as a model for understanding bacterial mercury methylation. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 77, No. 12, pp. 3938-3951
- Gilmour C. C., Henry E. A., and Mitchell R.** (1992) Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. *Environmental Science & Technology*, Vol. 26, No. 11, pp. 2281-2287
- Gilmour C. C., Podar M., Bullock A. L., Graham A. M., Brown S. D., Somenahally A. C., ... and Elias D. A.** (2013) Mercury methylation by novel microorganisms from new environments. *Environmental Science & Technology*, Vol. 47, No. 20, pp. 11810-11820
- Gilmour C. C., Riedel G. S., Ederington M. C., Bell J. T., Gill G. A., and Stordal M. C.** (1998) Methylmercury concentrations and production rates across a trophic gradient in the northern Everglades. *Biogeochemistry*, Vol. 40, No. 2-3, pp. 327-345
- Gochfeld M.** (2003) Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 56, No. 1, pp. 174-179
- Golding G. R., Kelly C. A., Sparling R., Loewen P. C., Rudd J. W., and Barkay T.** (2002) Evidence for facilitated uptake of Hg (II) by *Vibrio anguillarum* and *Escherichia coli* under anaerobic and aerobic conditions. *Limnology and Oceanography*, Vol. 47, No. 4, pp. 967-975

- Goñi-Urriza M., Corsellis Y., Lancelor L., Tessier E., Gury J., Monperrus M., and Guyoneaud R.** (2015) Relationships between bacterial energetic metabolism, mercury methylation potential, and *hgcA/hgcB* gene expression in *Desulfovibrio dechloroacetivorans* BerOc1. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-8
- Gough W. A., Cornwell A. R., and Tsuji L. J.** (2004) Trends in seasonal sea ice duration in southwestern Hudson Bay. *Arctic*, pp. 299-305.
- Goulding M., Smith N.J.H. and Mahar D.J.** (1996) Floods of Fortune : Ecology and economy along the Amazon. *Columbia University Press*, New York.
- Gouy M., Guindon S., and Gascuel O.** (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution*, Vol. 27, No. 2, pp. 221-224
- Graham A. M., Aiken G. R., and Gilmour C. C.** (2012) Dissolved organic matter enhances microbial mercury methylation under sulfidic conditions. *Environmental Science & Technology*, Vol. 46, No. 5, pp. 2715-2723
- Grandjean P., Weihe P., Needham L. L., Burse V. W., Patterson D. G., Sampson E. J., Jorgensen P. J., and Vahter M.** (1995) Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic, and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk. *Environmental Research*, Vol. 71, No. 1, pp. 29-38
- Gray J. E., Hines M. E., Higuera P. L., Adatto I., and Lasorsa B. K.** (2004) Mercury speciation and microbial transformations in mine wastes, stream sediments, and surface waters at the Almadén mining district, Spain. *Environmental Science & Technology*, Vol. 38, No. 16, pp. 4285-4292
- Groster A., Duhamel M., Dworatzek S., and Edwards E. A.** (2010) Chloroform respiration to dichloromethane by a *Dehalobacter* population. *Environmental Microbiology*, Vol. 12, No. 4, pp. 1053-1060
- Gu B., Bian Y., Miller C. L., Dong W., Jiang X., and Liang L.** (2011) Mercury reduction and complexation by natural organic matter in anoxic environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 108, No. 4, pp. 1479-1483
- Guentzel J. L., Powell R. T., Landing W. M., and Mason R. P.** (1996) Mercury associated with colloidal material in an estuarine and an open-ocean environment. *Marine Chemistry*, Vol. 55, No. 1-2, pp. 177-188
- Guevara S. R., Queimaliños C. P., del Carmen Diéguez M., and Arribére M.** (2008) Methylmercury production in the water column of an ultraoligotrophic lake of Northern Patagonia, Argentina. *Chemosphere*, Vol. 72, No. 4, pp. 578-585
- Guilbaud R., White M.L., and Poulton S.W.** (2013) Surface charge and growth of sulphate and carbonate green rust in aqueous media. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 108, pp. 141-153
- Guimarães J. R. D., Meili M., Hylander L. D., e Silva E. D. C., Roulet M., Mauro J. B. N., and de Lemos R. A.** (2000) Mercury net methylation in five tropical flood plain regions of Brazil: high in the root zone of floating macrophyte mats but low in surface sediments and flooded soils. *Science of the Total Environment*, Vol. 261, No. 1, pp. 99-107
- Guimaraes J. R. D., Meili M., Hylander L. D., Roulet M., Mauro J. B. N., and de Lemos R. A.** (2000) Mercury net methylation in five tropical flood plain regions of Brazil: high in the root zone of floating macrophyte mats but low in surface sediments and flooded soils. *Science of the Total Environment*, Vol. 261, No. 1, pp. 99-107
- Gunsalus R. P., and Wolfe R. S.** (1978) ATP activation and properties of the methyl coenzyme M reductase system in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of bacteriology*, Vol. 135, No. 3, pp. 851-857
- Gutknecht J.** (1981) Inorganic mercury ( $Hg^{2+}$ ) transport through lipid bilayer membranes. *The Journal of Membrane Biology*, Vol. 61, No. 1, pp. 61-66
- Hamelin S., Amyot M., Barkay T., Wang Y., and Planas D.** (2011) Methanogens: principal methylators of mercury in lake periphyton. *Environmental Science & Technology*, Vol. 45, No. 18, pp. 7693-7700
- Hamelin S., Planas D., and Amyot, M.** (2015) Mercury methylation and demethylation by periphyton biofilms and their host in a fluvial wetland of the St. Lawrence River (QC, Canada). *Science of The Total Environment*, Vol. 512, pp. 464-471
- Hammerschmidt C. R., and Fitzgerald W. F.** (2006) Methylmercury in freshwater fish linked to atmospheric mercury deposition. *Environmental Science & Technology*, Vol. 40, No. 24, pp. 7764-7770

- Hansen H. C. B., Borggaard O. K., and Sørensen J.** (1994) Evaluation of the free energy of formation of Fe(II)-Fe(III) hydroxide-sulphate (green rust) and its reduction of nitrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 58, pp. 2599-2068.
- Hansen H.C.B., Guldberg S., Erbs M., and Koch C.-B.** (2001) Kinetics of nitrate reduction by green rusts effects of interlayer anion and Fe(II):Fe(III) ratio. *Applied Clay Science*, Vol. 18, pp. 81-91
- Hansen H.C.B., Koch C.B., Nancke-Krogh H., Borggaard O.K., Sørensen J.** (1996) Abiotic nitrate reduction to ammonium: key role of green rust. *Environmental Science & Technology*. Vol. 30, No. 6, pp. 2053-2056
- Harada M.** (1995) Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 25, No. 1, pp. 1-24
- Hare A., Stern G. A., Macdonald R. W., Kuzyk Z. Z., and Wang, F.** (2008) Contemporary and preindustrial mass budgets of mercury in the Hudson Bay Marine System: the role of sediment recycling. *Science of the Total Environment*, Vol. 406, No. 1, pp. 190-204
- Harrison J. J., Ceri H., Stremick C. A., and Turner R. J.** (2004) Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environmental Microbiology*, Vol. 6, No. 12, pp. 1220-1227
- Health Canada Mercury Issues Task Group** (2004) Mercury : Your Health and the Environment, A Resource Tool. <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/mercur/index-eng.php>
- Heyes A., Mason R. P., Kim E. H., and Sunderland E.** (2006) Mercury methylation in estuaries: Insights from using measuring rates using stable mercury isotopes. *Marine Chemistry*, Vol. 102, No. 1, pp. 134-147
- Hintelmann H., and Wilken R. D.** (1995) Levels of total mercury and methylmercury compounds in sediments of the polluted Elbe River: influence of seasonally and spatially varying environmental factors. *Science of the Total Environment*, Vol. 166, No. 1, pp. 1-10
- Hintelmann H., Ebinghaus R., and Wilken R. D.** (1993) Accumulation of mercury (II) and methylmercury by microbial biofilms. *Water Research*, Vol. 27, No. 2, pp. 237-242
- Hintelmann H., Welbourn P. M., and Evans R. D.** (1995) Binding of methylmercury compounds by humic and fulvic acids. *Water, Air, and Soil Pollution*, Vol. 80, No. 1-4, pp. 1031-1034
- Horvat M., Nolde N., Fajon V., Jereb V., Logar M., Lojen S., Jacimovic R., Falnoga I., Liya Q., Faganeli J., and Drobne D.** (2003) Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China. *Science of the Total Environment*, Vol. 304, No. 1, pp. 231-256
- Hou X.-L., Yang Z., Yeung K.-S., and Wong H.N.C.** (2007) Chapter 5.3 Five-membered Ring Systems: Furans and Benzofurans. *Progress in Heterocyclic Chemistry*, Vol. 18 (C), pp. 187-217
- Hsu-Kim H., Kucharzyk K. H., Zhang T., and Deshusses M. A.** (2013) Mechanisms regulating mercury bioavailability for methylating microorganisms in the aquatic environment: a critical review. *Environmental Science & Technology*, Vol. 47, No. 6, pp. 2441-2456
- Hu H., Lin H., Zheng W., Tomanicek S. J., Johs A., Feng X., Elias D. A., Liang L., and Gu B.** (2013) Oxidation and methylation of dissolved elemental mercury by anaerobic bacteria. *Nature Geoscience*, Vol. 6, No. 9, pp. 751-754
- Hudson R. J., Gherini S. A., Watras C. J., and Porcella D. B.** (1994) Modeling the biogeochemical cycle of mercury in lakes: The mercury cycling model (MCM) and its application to the MTL study lakes. *Mercury Pollution: Integration and Synthesis*, pp. 473-523
- Huguet L., Castelle S., Schäfer J., Blanc G., Maury-Brachet R., Reynouard C., and Jorand F.** (2010) Mercury methylation rates of biofilm and plankton microorganisms from a hydroelectric reservoir in French Guiana. *Science of the Total Environment*, Vol. 408, No. 6, pp. 1338-1348
- Ikingura J. R., and Akagi H.** (1999) Methylmercury production and distribution in aquatic systems. *Science of the Total Environment*, Vol. 234, No. 1, pp. 109-118
- Ingraham J.L., Maaloe O. and Neidhardt F.C.** (1983) Growth of the Bacterial Cell. Sinauer Associates, Inc. USA
- Ingvorsen K., Zeikus J. G., and Brock T. D.** (1981) Dynamics of bacterial sulfate reduction in a eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 42, No. 6, pp. 1029-1036
- Inoko M.** (1981) Studies on the photochemical decomposition of organomercurials—methylmercury (II) chloride. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, Vol. 2, No. 1, pp. 3-10

- Jay J. A., Morel F. M., and Hemond H. F.** (2000) Mercury speciation in the presence of polysulfides. *Environmental Science & Technology*, Vol. 34, No. 11, pp. 2196-2200
- Jensen S., and Jernelöv A.** (1969) Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature*, Vol. 223, pp. 753-754
- Jette M.** (1994) Et la santé des Inuits, ça va? Rapport de l'enquête Santé Québec auprès des Inuits du Nunavik.
- Jorand F. P. A., Boue-Bigne F., Block J. C., and Urbain V.** (1998) Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Water Science and Technology*, Vol. 37, No. 4, pp. 307-315
- Jorand F. P. A., Sergent A. S., Remy P. P., Bihannic I., Ghanbaja J., Lartiges B., Hanna K. and Zegeye A.** (2013) Contribution of Anionic vs. Neutral Polymers to the Formation of Green Rust 1 from  $\gamma$ -FeOOH Bioreduction. *Geomicrobiology Journal*, Vol. 30, No. 7, pp. 600-615
- Jorand F. P. A., Zegeye A., Ghanbaja J., and Abdelmoula M.** (2011) The formation of green rust induced by tropical river biofilm components. *Science of the Total Environment*, Vol. 409, No. 13, pp. 2586-2596
- Kajiwara Y., Yasutake A., Adachi T., and Hirayama K.** (1996) Methylmercury transport across the placenta via neutral amino acid carrier. *Archives of Toxicology*, Vol. 70, No. 5, pp. 310-314
- Kaplan D., Christiaen D., and Arad S. M.** (1987) Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 53, No. 12, pp. 2953-2956
- Kelly C. A., Rudd J. W. M., Bodaly R. A., Roulet N. P., St. Louis V. L., Heyes A., ... and Edwards G.** (1997) Increases in fluxes of greenhouse gases and methyl mercury following flooding of an experimental reservoir. *Environmental Science & Technology*, Vol. 31, No. 5, pp. 1334-1344
- Kelly C. A., Rudd J. W., and Holoka M. H.** (2003) Effect of pH on mercury uptake by an aquatic bacterium: implications for Hg cycling. *Environmental Science & Technology*, Vol. 37, No. 13, pp. 2941-2946
- Kerin E. J., Gilmour C. C., Roden E., Suzuki M. T., Coates J. D., and Mason R. P.** (2006) Mercury methylation by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 12, pp. 7919-7921
- Kerper L. E., Ballatori N, and Clarkson T. W.** (1992) Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *American Journal of Physiology*, Vol. 262, No. 5, Pt. 2, pp. 761-765
- Khalid A., Arshad M., and Crowley, D.E.** (2008) Decolorization of azo dyes by *Shewanella* sp. under saline conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 79, pp. 1053-1059
- Khan M. A., and Wang F.** (2010) Chemical demethylation of methylmercury by selenoamino acids. *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 23, No. 7, pp. 1202-1206
- Kim K.-H., Hanson P.J., Barnett M.O. and Lindberg S.E.** (1997) Biogeochemistry of mercury in the air-soil-plant system. In: Mercury and its Effects on Environment and Biology, 1st ed., Vol. 34, *Sigel A. and Sigel H., Eds*, pp. 185-212. Marcel Dekker, New York
- King J. K., Kostka J. E., Frischer M. E., and Saunders F. M.** (2000) Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 6, pp. 2430-2437
- King J. K., Kostka J. E., Frischer M. E., Saunders F. M., and Jahnke R. A.** (2001) A quantitative relationship that demonstrates mercury methylation rates in marine sediments are based on the community composition and activity of sulfate-reducing bacteria. *Environmental Science & Technology*, Vol. 35, No. 12, pp. 2491-2496
- Kolter R., and Greenberg E. P.** (2006) Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature*, Vol. 441, pp. 300-302
- Kone T., Hanna K., Abdelmoula M., Ruby C., and Carteret C.** (2009) Reductive transformation and mineralization of an azo dye by hydroxysulphate green rust preceding oxidation using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at neutral pH. *Chemosphere*, Vol. 75, pp. 212-219
- Korthals E. T., and Winfrey M. R.** (1987) Seasonal and spatial variations in mercury methylation and demethylation in an oligotrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 53, No. 10, pp. 2397-2404
- Kudo A., Nagase H., and Ose Y.** (1982) Proportion of methylmercury to the total amount of mercury in river waters in Canada and Japan. *Water Research*, Vol. 16, No. 6, pp. 1011-1015

- Lalonde J. D., Amyot M., Kraepiel A. M., and Morel F. M.** (2001) Photooxidation of Hg (0) in artificial and natural waters. *Environmental Science and Technology*, Vol. 35, No. 7, pp. 1367-1372
- Lalonde J. D., Poulain A. J., and Amyot M.** (2002) The role of mercury redox reactions in snow on snow-to-air mercury transfer. *Environmental Science and Technology*, Vol. 36, No. 2, pp. 174-178
- Landers D. H., Gubala C., Verta M., Lucotte M., Johansson K., Vlasova T., and Lockhart W. L.** (1998) Using lake sediment mercury flux ratios to evaluate the regional and continental dimensions of mercury deposition in arctic and boreal ecosystems. *Atmospheric Environment*, Vol. 32, No. 5, pp. 919-928
- Landner L.** (1971). Biochemical model for the biological methylation of mercury suggested from methylation studies in vivo with *Neurospora crassa*. *Nature*, Vol. 230, pp. 452-454
- Långmark J., Storey M. V., Ashbolt N. J., and Stenström T. A.** (2005) Accumulation and fate of microorganisms and microspheres in biofilms formed in a pilot-scale water distribution system. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 71, No. 2, pp. 706-712
- Larock R. C., and Hershberger S. S.** (1981) Mercury in organic chemistry. 19. Rhodium promoted methylation of organomercurials. *Tetrahedron Letters*, Vol. 22, No. 26, pp. 2443-2446
- Larose C., Dommergue A., De Angelis M., Cossa D., Averty B., Maruszczak N., ... and Ferrari C.** (2010) Springtime changes in snow chemistry lead to new insights into mercury methylation in the Arctic. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, Vol. 74, No. 22, pp. 6263-6275
- Laurion I., Vincent W. F., MacIntyre S., Retamal L., Dupont C., Francus P., and Pienitz R.** (2010) Variability in greenhouse gas emissions from permafrost thaw ponds. *Limnology and Oceanography*, Vol. 55, No. 1, pp. 115-133
- Lawson N. M., Mason R. P., and Laporte J. M.** (2001) The fate and transport of mercury, methylmercury, and other trace metals in Chesapeake Bay tributaries. *Water Research*, Vol. 35, No. 2, pp. 501-515
- Leblanc A, Lapointe S, Beaudet A, Côté I, Dumas P., Labrecque F., Lamy C., Larochelle J., Lepage L., Pelletier F., Weber J-F., Levallois P. et Gingras S.** (2004) Etude sur l'établissement de valeurs de référence d'éléments traces et de métaux dans le sang, le sérum et l'urine de la population de la grande région de Québec. Institut National de Santé Publique du Québec.
- Lee W., and Batchelor B.** (2002) Abiotic reductive dechlorination of chlorinated ethylenes by iron-bearing soil minerals : Pyrite and magnetite. *Environmental Science & Technology*, Vol. 36, No. 23, pp. 5147-5154
- Lehnerr I., Louis V. L. S., Hintelmann H., and Kirk J. L.** (2011) Methylation of inorganic mercury in polar marine waters. *Nature Geoscience*, Vol. 4, No. 5, pp. 298-302
- Lewis K.** (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 45, No. 4, pp. 999-1007
- Li M., Pokhrel S., in .., M dler L., Damoiseaux R., and Hoek E. M.** (2010) Stability, bioavailability, and bacterial toxicity of ZnO and iron-doped ZnO nanoparticles in aquatic media. *Environmental Science & Technology*, Vol. 45, No. 2, pp. 755-761
- Li Y. L., Vali H., Yang J., Phelps T. J., and Zhang C. L.** (2006) Reduction of iron oxides enhanced by a sulfate-reducing bacterium and biogenic H<sub>2</sub>S. *Geomicrobiology Journal*, Vol. 23, No. 2, pp. 103-117
- Li Y., and Cai Y.** (2013) Progress in the study of mercury methylation and demethylation in aquatic environments. *Chinese Science Bulletin*, Vol. 58, No. 2, pp. 177-185
- Li Y., Mao Y., Liu G., Tachiev G., Roelant D., Feng X., and Cai Y.** (2010) Degradation of methylmercury and its effects on mercury distribution and cycling in the Florida Everglades. *Environmental Science & Technology*, Vol. 44, No. 17, pp. 6661-6666
- Lie T. J., Clawson M. L., Godchaux W., and Leadbetter E. R.** (1999) Sulfidogenesis from 2-aminoethanesulfonate (taurine) fermentation by a morphologically unusual sulfate-reducing bacterium, *Desulforhopalus singaporensis* sp. nov. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 65, No. 8, pp. 3328-3334
- Lie T. J., Leadbetter J. R., and Leadbetter E. R.** (1998) Metabolism of sulfonic acids and other organosulfur compounds by sulfate-reducing bacteria. *Geomicrobiology Journal*, Vol. 15, No. 2, pp. 135-149
- Lie T. J., Pitta T., Leadbetter E. R., Godchaux III W., and Leadbetter J. R.** (1996) Sulfonates: novel electron acceptors in anaerobic respiration. *Archives of Microbiology*, Vol. 166, No. 3, pp. 204-210
- Lin C. C., and Jay J. A.** (2007) Mercury methylation by planktonic and biofilm cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Environmental Science & Technology*, Vol. 41, No. 19, pp. 6691-6697



- Lin C. C., Yee N., and Barkay T.** (2012) Microbial transformations in the mercury cycle. *Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury*, pp. 155-191
- Lin H., Hurt Jr R. A., Johs A., Parks J. M., Morrell-Falvey J. L., Liang L., ... and Gu B.** (2014) Unexpected Effects of Gene Deletion on Interactions of Mercury with the Methylation-Deficient Mutant  $\Delta hgcAB$ . *Environmental Science & Technology Letters*, Vol. 1, No. 5, pp. 271-276
- Lin H., Hurt Jr R. A., Johs A., Parks J. M., Morrell-Falvey J. L., Liang L., ... and Gu B.** (2014) Unexpected Effects of Gene Deletion on Interactions of Mercury with the Methylation-Deficient Mutant  $\Delta hgcAB$ . *Environmental Science & Technology Letters*, Vol. 1, No. 5, pp. 271-276
- Lin T. Y., Kampalath R. A., Lin C. C., Zhang M., Chavarria K., Lacson J., and Jay J. A.** (2013) Investigation of Mercury Methylation Pathways in Biofilm versus Planktonic Cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Environmental Science & Technology*, Vol. 47, No. 11, pp. 5695-5702
- Lindberg S. E., and Harriss R. C.** (1974) Mercury-organic matter associations in estuarine sediments and interstitial water. *Environmental Science and Technology*, Vol. 8, No. 5, pp 459-462
- Lindqvist O., Jernelov A., Johansson K., and Rodhe H.** (1984) Mercury in the Swedish environment: global and local sources. *National Swedish Environment Protection Board*. SNV Report PM 1816
- Lindqvist O., Johansson K., Bringmark L., Timm B., Aastrup M., Andersson A., Hovsenius G., Håkanson L., Iverfeldt Å., and Meili M.** (1991) Mercury in the Swedish environment — Recent research on causes, consequences and corrective methods. *Water, Air, and Soil Pollution*, Vol. 55, No. 1-2, pp. xi-261
- Liu J., Aruguete D. M., Murayama M., and Hochella Jr M. F.** (2009) Influence of size and aggregation on the reactivity of an environmentally and industrially relevant nanomaterial (PbS). *Environmental Science & Technology*, Vol. 43, No. 21, pp. 8178-8183
- Liu Y. R., Yu R. Q., Zheng Y. M., and He J. Z.** (2014) Analysis of the Microbial Community Structure by Monitoring an Hg Methylation Gene (*hgcA*) in Paddy Soils along an Hg Gradient. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 80, No. 9, pp. 2874-2879
- Lockhart W. L., Stern G. A., Low G., Hendzel M., Boila G., Roach P., ... and DeGraff N.** (2005) A history of total mercury in edible muscle of fish from lakes in northern Canada. *Science of the Total Environment*, Vol. 351, pp. 427-463
- Lockhart W. L., Wilkinson P., Billeck B. N., Danell R. A., Hunt R. V., Brunskill G. J., ... and Louis V. S.** (1998) Fluxes of mercury to lake sediments in central and northern Canada inferred from dated sediment cores. *Biogeochemistry*, Vol. 40, No. 2-3, pp. 163-173
- Lorey P., and Driscoll C. T.** (1999) Historical trends of mercury deposition in Adirondack lakes. *Environmental Science and Technology*, Vol. 33, No. 5, pp. 718-722
- Lovley D. R., and Klug M. J.** (1983) Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 45, No. 1, pp. 187-192
- Loyaux-Lawniczak S., Refait P., Ehrhardt J.-J., Lecomte P. and Génin J.-M. R.** (2000) Trapping of Cr by formation of ferrihydrite during the reduction of chromate ions by Fe(II)-Fe(III) hydroxysalt green rusts. *Environmental Science & Technology*. Vol. 34, No. 3, pp. 438-443
- Lunau M., Lemke A., Walther K., Martens-Habbena W., and Simon M.** (2005) An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy. *Environmental Microbiology*, Vol. 7, No. 7, pp. 961-968
- Macdonald R. W., Harner T., and Fyfe J.** (2005) Recent climate change in the Arctic and its impact on contaminant pathways and interpretation of temporal trend data. *Science of the Total Environment*, Vol. 342, No. 1, pp. 5-86
- Magos L., Halbach S., and Clarkson T. W.** (1978) Role of catalase in the oxidation of mercury vapor. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 27, No. 9, pp. 1373-1377
- Mainville N., Webb J., Lucotte M., Davidson R., Betancourt O., Cueva E., and Mergler D.** (2006) Decrease of soil fertility and release of mercury following deforestation in the Andean Amazon, Napo River Valley, Ecuador. *Science of the Total Environment*, Vol. 368, No. 1, pp. 88-98
- Martin-Cereceda M., Jorand F., Guinea A., and Block J. C.** (2001) Characterization of extracellular polymeric substances in rotating biological contactors and activated sludge flocs. *Environmental Technology*, Vol. 22, No. 8, pp. 951-959

- Martin-Doimeadios R. R., Tessier E., Amouroux D., Guyoneaud R., Duran R., Caumette P., and Donard O. F. X.** (2004) Mercury methylation/demethylation and volatilization pathways in estuarine sediment slurries using species-specific enriched stable isotopes. *Marine Chemistry*, Vol. 90, No. 1, pp. 107-123
- Marvin-DiPasquale M. C., Agee J., Bouse R., and Jaffe B.** (2003) Microbial cycling of mercury in contaminated pelagic and wetland sediments of San Pablo Bay, California. *Environmental Geology*, Vol. 43, No. 3, pp. 260-267
- Marvin-DiPasquale M. C., and Oremland R. S.** (1998) Bacterial methylmercury degradation in Florida Everglades peat sediment. *Environmental Science & Technology*, Vol. 32, No. 17, pp. 2556-2563
- Marvin-DiPasquale M., Agee J., McGowan C., Oremland R. S., Thomas M., Krabbenhoft D., and Gilmour C. C.** (2000) Methyl-mercury degradation pathways: A comparison among three mercury-impacted ecosystems. *Environmental Science & Technology*, Vol. 34, No. 23, pp. 4908-4916
- Mason R. A., and Sullivan K. A.** (1999) The distribution and speciation of mercury in the South and equatorial Atlantic. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, Vol. 46, No. 5, pp. 937-956
- Mason R. P.** (2013) The Methylation of Metals and Metalloids in Aquatic Systems. *Methylation-From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment*, pp. 271-301
- Mason R. P., and Fitzgerald W. F.** (1993) The distribution and biogeochemical cycling of mercury in the equatorial Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, Vol. 40, No. 9, pp. 1897-1924
- Mason R. P., and Lawrence A. L.** (1999) Concentration, distribution, and bioavailability of mercury and methylmercury in sediments of Baltimore Harbor and Chesapeake Bay, Maryland, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 18, No. 11, pp. 2438-2447
- Mason R. P., Fitzgerald W. F., and Morel F. M. M.** (1994) The biogeochemical cycling of elemental mercury: Anthropogenic influences. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 58, No. 15, pp. 3191-3198
- Mason R. P., Fitzgerald W. F., Hurley J., Hanson A. K., Donaghay P. L., and Sieburth J. M.** (1993) Mercury biogeochemical cycling in a stratified estuary. *Limnology and Oceanography*, Vol. 38, No. 6, pp. 1227-1241
- Mason R. P., Reinfelder J. R., and Morel F. M. M.** (1996) Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. *Environmental Science and Technology*, Vol. 30, No. 6, pp. 1835-1845
- Mason R. P., Rolffhus K. R., and Fitzgerald W. F.** (1995) Methylated and elemental mercury cycling in surface and deep ocean waters of the North Atlantic. *Mercury as a Global Pollutant*, Springer Netherlands, pp. 665-677
- Mason R. Y., and Fitzgerald W. F.** (1990) Alkylmercury species in the equatorial Pacific. *Nature*, Vol. 347, pp. 457-459
- Matilainen T.** (1995) Involvement of bacteria in methylmercury formation in anaerobic lake waters. *Mercury as a Global Pollutant*. Springer Netherlands pp. 757-764
- Mauro J. B., Guimarães J. R., and Melamed R.** (1999) Mercury methylation in a tropical macrophyte: influence of abiotic parameters. *Applied Organometallic Chemistry*, Vol. 13, No. 9, pp. 631-636
- Mauro J. B., Guimarães J. R., and Melamed, R.** (2001) Mercury methylation in macrophyte roots of a tropical lake. *Water, Air, and Soil Pollution*, Vol. 127, No. 1-4, pp. 271-280
- Mauro J., Guimaraes J., Hintelmann H., Watras C., Haack E., and Coelho-Souza S.** (2002) Mercury methylation in macrophytes, periphyton, and water—comparative studies with stable and radio-mercury additions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 374, No. 6, pp. 983-989
- Maury-Brachet R., Durrieu G., Dominique Y., and Boudou A.** (2006) Mercury distribution in fish organs and food regimes: Significant relationships from twelve species collected in French Guiana (Amazonian basin). *Science of the Total Environment*, Vol. 368, No. 1, pp. 262-270
- Mcalpine D., and Araki S.** (1958) Minamata disease an unusual neurological disorder caused by contaminated fish. *The Lancet*, Vol. 272, No. 7047, pp. 629-631
- Mehrotra A. S., and Sedlak D. L.** (2005) Decrease in net mercury methylation rates following iron amendment to anoxic wetland sediment slurries. *Environmental Science & Technology*, Vol. 39, No. 8, pp. 2564-2570
- Meili M.** (1997) Mercury in lakes and rivers. *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 34, pp. 21-52

- Mergler D., Anderson H. A., Chan L. H. M., Mahaffey K. R., Murray M., Sakamoto M., and Stern A. H.** (2007) Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, Vol. 36, No. 1, pp. 3-11
- Miller D. R., and Akagi H.** (1979) pH affects mercury distribution, not methylation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 3, No. 1, pp. 36-38
- Mills S.J., Christy A.G., Génin J.-M.R., Kameda T., and Colombo F.** (2012) Nomenclature of the hydrotalcite supergroup: natural layered double hydroxides. *Mineralogical Magazine*, Vol. 76, pp. 1289-1336
- Misawa T., Hashimoto K., and Shimodaira S.** (1974) The mechanism of formation of iron oxide and oxyhydroxides in aqueous solutions at room temperature. *Corrosion Science*, Vol. 14, pp. 131-149
- Mishra B., O'Loughlin E.J., Boyanov M.I., and Kemner K.M.** (2011) Binding of HgII to high-affinity sites on bacteria inhibits reduction to Hg0 by Mixed FeII/III phases. *Environmental Science & Technology*, Vol. 45, pp. 9597-9603
- Miskimmin B. M., Rudd J. W., and Kelly C. A.** (1992) Influence of dissolved organic carbon, pH, and microbial respiration rates on mercury methylation and demethylation in lake water. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 49, No. 1, pp. 17-22
- Mitsunobu S., Takahashi Y., and Sakai Y.** (2008) Abiotic reduction of antimony (V) by green rust (Fe<sub>4</sub>(II)Fe<sub>2</sub>(III)(OH)<sub>12</sub>SO<sub>4</sub>•3H<sub>2</sub>O). *Chemosphere*, Vol. 70, pp. 942-947
- Moberly J. G., Miller C. L., Brown S. D., Biswas A., Brandt C. C., Palumbo A. V., and Elias D. A.** (2012) Role of morphological growth state and gene expression in *Desulfovibrio africanus* strain Walvis Bay mercury methylation. *Environmental Science & Technology*, Vol. 46, No. 9, pp. 4926-4932
- Molina C. I., Gibon F. M., Duprey J. L., Dominguez E., Guimarães J. R. D., and Roulet M.** (2010) Transfer of mercury and methylmercury along macroinvertebrate food chains in a floodplain lake of the Beni River, Bolivian Amazonia. *Science of the Total Environment*, Vol. 408, No. 16, pp. 3382-3391
- Monperrus M., Krupp E., Amouroux D., Donard O. F. . , and Rodriguez Martin-Doimeadios R. C.** (2004) Potential and limits of speciated isotope-dilution analysis for metrology and assessing environmental reactivity. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 23, No. 3, pp. 261-272
- Monperrus M., Rodriguez Martin-Doimeadios R. C., Scancar J., Amouroux D., and Donard O. F.** (2003) Simultaneous sample preparation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis of monomethylmercury and tributyltin in a certified oyster tissue. *Analytical chemistry*, Vol. 75, No. 16, pp. 4095-4102
- Monperrus M., Tessier E., Amouroux D., Leynaert A., Huonnic P., and Donard O.F.X.** (2007) Mercury methylation, demethylation and reduction rates in coastal and marine surface waters of the Mediterranean Sea. *Marine Chemistry* Vol. 107, pp. 49-63
- Monperrus M., Tessier E., Veschambre S., Amouroux D., and Donard O.** (2005) Simultaneous speciation of mercury and butyltin compounds in natural waters and snow by propylation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Vol. 381, No. 4, pp. 854-862
- Montgomery S., Lucotte M., and Cournoyer L.** (2000) The use of stable carbon isotopes to evaluate the importance of fine suspended particulate matter in the transfer of methylmercury to biota in boreal flooded environments. *Science of the Total Environment*, Vol. 261, No. 1, pp. 33-41
- Muir D. C., and de Wit C. A.** (2010) Trends of legacy and new persistent organic pollutants in the circumpolar arctic: Overview, conclusions, and recommendations. *Science of the Total Environment*, Vol. 408, No. 15, pp. 3044-3051
- Myneni S.C.B., Tokunaga T.K., and Brown Jr. G.E.** (1997) Abiotic Se redox chemistry in the presence of Fe(II, III)-oxides. *Science*, Vol. 278, pp. 1106-1109
- Nagase H., Ose Y., Sato T., and Ishikawa T.** (1982) Methylation of mercury by humic substances in an aquatic environment. *Science of the Total Environment*, Vol. 25, No. 2, pp. 133-142
- Nguyen-Thé D.** (2010) Pollution des eaux souterraines par du mercure à Veney (54) – Lorraine. Rapport public BRGM/RP-58241-FR
- Nierenberg D. W., Nordgren R. E., Chang M. B., Siegler R. W., Blayney M. B., Hochberg F., ... and Clarkson T.** (1998) Delayed cerebellar disease and death after accidental exposure to dimethylmercury. *New England Journal of Medicine*, Vol. 338, No. 23, pp. 1672-1676

- Nriagu J. O.** (1994) Mechanistic steps in the photoreduction of mercury in natural waters. *Science of the Total Environment*, Vol. 154, No. 1, pp. 1-8
- O'Loughlin E. ., Kelly S. D., Cook R. E., Csencsits R., and Kemner K. M.** (2003b) Reduction of uranium (VI) by mixed iron (II)/iron (III) hydroxide (green rust): formation of UO<sub>2</sub> nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, Vol. 37, No. 4, pp. 721-727
- O'Loughlin E. ., Kelly S. D., Kemner K. M., Csencsits R., and Cook R. E.** (2003a) Reduction of Ag<sup>I</sup>, Au<sup>III</sup>, Cu<sup>II</sup>, and Hg<sup>II</sup> by Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> hydroxysulfate green rust. *Chemosphere*, Vol. 53, No. 5, pp. 437-446
- O'Loughlin E. ., and Burris D.R.** (2004) Reduction of halogenated ethanes by green rust. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, pp. 41-48
- O'Loughlin E. ., Gorski C.A., Scherer M.M., Boyanov M.I., and Kemner K.M.** (2010) Effects of oxyanions, natural organic matter, and bacterial cell numbers on the bioreduction of lepidocrocite ( $\gamma$ -FeOOH) and the formation of secondary mineralization products. *Environmental Science & Technology*, Vol. 44, pp. 4570-4576
- Oechel W. C., Hastings S. J., Vourlitis G., Jenkins M., Riechers G., and Grulke N.** (1993) Recent change of Arctic tundra ecosystems from a net carbon dioxide sink to a source. *Nature*, Vol. 361, No. 6412, pp. 520-523
- Okabe S., Nielsen P. H., Jones W. L., and Characklis W. G.** (1995) Sulfide product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. *Water Research*, Vol. 29, No. 2, pp. 571-578
- Olowe A.A.** (1992) The simultaneous presence of green rust 2 and sulphate-reducing bacteria in the drilling corrosion of steel piles in a harbor. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (série II)*. Vol. 314, No. 11, pp. 1157-1163
- Ona-Nguema G., Abdelmoula M., Jorand F., Benali O., Géhin A., Block J.-C., and Génin J.-M.R.** (2002) Iron (II, III) hydroxycarbonate green rust formation and stabilization from lepidocrocite bioreduction. *Environmental Science & Technology*, Vol. 36, pp. 16-20
- Ona-Nguema G., Carteret C., Benali O., Abdelmoula M., Génin, J.-M. R. and Jorand F.** (2004) Competitive formation of hydroxycarbonate green rust 1 versus hydroxysulphate green rust 2 in *Shewanella putrefaciens* cultures. *Geomicrobiology Journal*. Vol. 21, No. 2, pp. 79-90
- Oremland R. S., and Capone D. G.** (1988) Use of "specific" inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. *Advances in microbial ecology*, pp. 285-383, Springer US
- Oremland R. S., and Taylor B. F.** (1978) Sulfate reduction and methanogenesis in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 42, No. 2, pp. 209-214
- Oremland R. S., Culbertson C. W., and Winfrey M. R.** (1991) Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 57, No. 1, pp. 130-137
- Oremland R. S., Miller L. G., Dowdle P., Connell T., and Barkay T.** (1995) Methylmercury oxidative degradation potentials in contaminated and pristine sediments of the Carson river, Nevada. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, No. 7, pp. 2745-2753
- Outridge P. M., Sanei H., Stern G. A., Hamilton P. B., and Goodarzi F.** (2007) Evidence for control of mercury accumulation rates in Canadian High Arctic lake sediments by variations of aquatic primary productivity. *Environmental Science & Technology*, Vol. 41, No. 15, pp. 5259-5265
- Pacyna E. G., Pacyna J. M., Steenhuisen F., and Wilson S.** (2006) Global anthropogenic mercury emission inventory for 2000. *Atmospheric Environment*, Vol. 40, pp. 4048-4063
- Pak K. R., and Bartha R.** (1998a) Mercury methylation and demethylation in anoxic lake sediments and by strictly anaerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 3, pp. 1013-1017
- Pak K. R., and Bartha R.** (1998b) Mercury methylation by interspecies hydrogen and acetate transfer between sulfidogens and methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 6, pp. 1987-1990
- Parks J. M., Johs A., Podar M., Bridou R., Hurt R. A., Smith S. D., ... and Liang L.** (2013) The genetic basis for bacterial mercury methylation. *Science*, Vol. 339, No. 6125, pp. 1332-1335
- Parry J. D.** (2004) Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 54, pp. 167-196

- Pasakarnis T.S., Boyanov M.I., Kemner K.M., Mishra B., O'Loughlin E.J., Parkin G., and Scherer M.M.** (2013) Influence of chloride and Fe(II) content on the reduction of Hg(II) by magnetite. *Environmental Science & Technology*, Vol. 47, pp. 6987-6994.
- Passos C. J., and Mergler D.** (2008) Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cadernos de Saúde Pública*, Vol. 24, pp. 503-520
- Patidar S. K., and Tare V.** (2005) Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomass. *Bioresource technology*, Vol. 96, No. 11, pp. 1215-1222
- Pazderová J., Jirásek A., Mráz M., and Pechan J.** (1974) Post-mortem findings and clinical signs of dimethyl mercury poisoning in man. *Internationales Archiv für Arbeitsmedizin*, Vol. 33, No. 4, pp. 323-328
- Peiffer S., Dos Santos Afonso M., Wehrli B., and Gaechter R.** (1992) Kinetics and mechanism of the reaction of hydrogen sulfide with lepidocrocite. *Environmental Science & Technology*, Vol. 26, No. 12, pp. 2408-2413
- Percival S. L., Knapp J. S., Edyvean R., and Wales D. S.** (1998) Biofilm development on stainless steel in mains water. *Water Research*, Vol. 32, No. 1, pp. 243-253
- Peterson H. G., Healey F. P., and Wagemann R.** (1984) Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 41, No. 6, pp. 974-979
- Pfeiffer W. C., Drude de Lacerda L., Malm O., Souza C. M. M., da Silveira E. G., and Bastos W. R.** (1989) Mercury concentrations in inland waters of gold-mining areas in Rondonia, Brazil. *Science of the Total Environment*, Vol. 87, pp. 233-240
- Pfeiffer W. C., Lacerda L. D., Salomons W., and Malm O.** (1993) Environmental fate of mercury from gold mining in the Brazilian Amazon. *Environmental Reviews*, Vol. 1, No. 1, pp. 26-37
- Pienitz R., Doran P. T., and Lamoureux S. F.** (2008) Origin and geomorphology of lakes in the polar regions. *Polar Lakes and Rivers: Limnology of Arctic and Antarctic Aquatic Ecosystems*, pp. 25-41
- Pinheiro M. C. N., Crespo-López M. E., Vieira J. L. F., Oikawa T., Guimarães G. A., Araújo C. C., ... and Silveira L. C. L.** (2007) Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. *Environment International*, Vol. 33, No. 1, pp. 56-61
- Pirrone N., and Mahaffey K. R.** (2005) Dynamics of mercury pollution on regional and global scales: atmospheric processes and human exposures around the world. *Springer*.
- Ploug H., Grossart H. P., Azam F., and Jørgensen B. B.** (1999) Photosynthesis, respiration, and carbon turnover in sinking marine snow from surface waters of Southern California Bight: implications for the carbon cycle in the ocean. *Marine Ecology. Progress Series*, Vol. 179, pp. 1-11
- Pongratz R., and Heumann K. G.** (1999) Production of methylated mercury, lead, and cadmium by marine bacteria as a significant natural source for atmospheric heavy metals in polar regions. *Chemosphere*, Vol. 39, No. 1, pp. 89-102
- Potera C.** (1996) Biofilms invade microbiology. *Science*, Vol. 273(5283), pp. 1795-1797
- Pourbaix M.** (1963) Atlas d'équilibres électrochimiques. *Gauthier-Villars et Cie*, Paris, pp. 422-427
- Ragsdale S. W., and Pierce E.** (2008) Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, Vol. 1784, No. 12, pp. 1873-1898
- Ralston D. M., and O'Halloran T. V.** (1990) Ultrasensitivity and heavy-metal selectivity of the allosterically modulated MerR transcription complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 87, No. 10, pp. 3846-3850
- Ramlal P. S., Rudd J. W. M., Furutani A., and Xun L.** (1985) The effect of pH on methyl mercury production and decomposition in lake sediments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 42, No. 4, pp. 685-692
- Ranchou-Peyruse M., Monperrus M., Bridou R., Duran R., Amouroux D., Salvado J. C., and Guyoneaud R.** (2009) Overview of mercury methylation capacities among anaerobic bacteria including representatives of the sulphate-reducers: implications for environmental studies. *Geomicrobiology Journal*, Vol. 26, No. 1, pp. 1-8
- Rasmussen L. D., Turner R. R., and Barkay T.** (1997) Cell-density-dependent sensitivity of a mer-lux bioassay. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 8, pp. 3291-3293

- Ravichandran M., Aiken G. R., Reddy M. M., and Ryan J. N.** (1998) Enhanced dissolution of cinnabar (mercuric sulfide) by dissolved organic matter isolated from the Florida Everglades. *Environmental Science & Technology*, Vol. 32, No. 21, pp. 3305-3311
- Refait P., Abdelmoula M., Génin J.-M.R., and Sabot R.** (2006) Green rusts in electrochemical and microbially influenced corrosion of steel. *Comptes Rendus Geosciences*, Vol. 338, pp. 476-487.
- Refait P., Charton A. and Génin J.-M. R.** (1998) Identification, composition, thermodynamic and structural properties of a pyroaurite-like iron(II)-iron (III) hydroxy-oxalate Green Rust. *European Journal of Solid State and Inorganic Chemistry*. Vol. 35, No. 10-11, pp. 655-666
- Refait P., Memet J.-B., Bon C., Sabot R. Génin J.-M.R.** (2003) Formation of the Fe(II)–Fe(III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel. *Corrosion Science*. Vol. 45, pp. 833–845
- Refait P., Reffass M., Landoulsi J., Sabot R. and Jeannin M.** (2007) Role of phosphate species during the formation and transformation of the Fe(II–III) hydroxycarbonate green rust. *Colloids and Surfaces*. Vol. 299, pp. 29-37
- Regnell O., Tunlid A., Ewald G., and Sangfors O.** (1996) Methyl mercury production in freshwater microcosms affected by dissolved oxygen levels: role of cobalamin and microbial community composition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 53, No. 7, pp. 1535-1545
- Remy P. P., Etique M., Hazotte A. A., Sergent A. S., Estrade N., Cloquet C., Hanna K. and Jorand F. P. A.** (2015) Pseudo-first-order reaction of chemically and biologically formed green rusts with  $Hg^{II}$  and  $C_{15}H_{15}N_3O_2$ : Effects of pH and stabilizing agents (phosphate, silicate, polyacrylic acid, and bacterial cells). *Water research*, Vol. 70, pp. 266-278
- Rendi R., and Ochoa S.** (1962) Effect of chloramphenicol on protein synthesis in cell-free preparations of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 237, No. 12, pp. 3711-3713
- Renner R.** (2004) Mercury woes appear to grow. *Environmental Science and Technology*, Vol. 38, No. 8, pp. 144A-144A
- Revol P.** (2007) Commune de Vacqueville. Captage communal 02697X0007/F sur la commune de Veney 02698X0026/HY ; Rapport d'hydrogéologue agréé, Pollution au mercure, (Seichamps, 54) pp. 1-21
- Revol P.** (2008) Commune de Vacqueville. Captage communal 02698X0026/HY sur la commune de Veney Rapport d'hydrogéologue agréé, Pollution au mercure : Mesures des teneurs en mercure. (Seichamps, 54) pp. 1-27
- Richter-Menge J., Overland J., Proshutinsky A., Romanovsky V., Bengtsson L., Brigham L., ... and Walsh J.** (2006) State of the Arctic Report. *NOAA OAR Special Report, NOAA/OAR/PMEL*, Seattle, WA
- Robinson J. B., and Tuovinen O. H.** (1984) Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiological Reviews*, Vol. 48, No. 2, p. 95
- Roden E. E., and Lovley D. R.** (1993) Dissimilatory Fe(III) reduction by the marine microorganism *Desulfuromonas acetoxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59No. 3, pp. 734-742
- Rodriguez Martin-Doimeadios R. C., Monperrus M., Krupp E., Amouroux D., and Donard O. F. X.** (2003) Using speciated isotope dilution with GC-inductively coupled plasma MS to determine and unravel the artificial formation of monomethylmercury in certified reference sediments. *Analytical chemistry*, Vol. 75, No. 13, pp. 3202-3211
- Rodríguez-González P., Epov V. N., Bridou R., Tessier E., Guyoneaud R., Monperrus M., and Amouroux D.** (2009) Species-specific stable isotope fractionation of mercury during Hg (II) methylation by an anaerobic bacteria (*Desulfobulbus propionicus*) under dark conditions. *Environmental Science & Technology*, Vol. 43, No. 24, pp. 9183-9188
- Roulet M., Lucotte M., Canuel R., Farella N., Courcelles M., Guimaraes J. R., ... and Amorim M.** (2000) Increase in mercury contamination recorded in lacustrine sediments following deforestation in the central Amazon. *Chemical Geology*, Vol. 165, No. 3, pp. 243-266
- Roulet M., Lucotte M., Farella N., Serique G., Coelho H., Passos C. S., ... and Amorim M.** (1999) Effects of recent human colonization on the presence of mercury in Amazonian ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution*, Vol. 112, No. 3-4, pp. 297-313
- Roulet M., Lucotte M., Saint-Aubin A., Tran S., Rheault I., Farella N., ... and Amorim M.** (1998) The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chao formation of the lower Tapajos River Valley, Para state, Brazil. *Science of the Total Environment*, Vol. 223, No. 1, pp. 1-24

- Ruby C., Géhin A., Abdelmoula M., Génin J.-M. R. and Jolivet J. P.** (2003) Coprecipitation of Fe(II) and Fe(III) cations in sulphated aqueous medium and formation of hydroxysulphate green rust. *Solid State Sciences*. Vol. 5, pp. 1055-1062
- Ruby C., Géhin A., Aissa R., Ghanbaja J., Abdelmoula M. and Genin J.-M. R.** (2006) Chemical stability of hydroxysulphate green rust synthesized in the presence of foreign anions: Carbonate, phosphate and silicate. *Hyperfine Interactions*. Vol. 167, No. 1-3, pp. 803-807
- Rusten B., Eikebrokk B., Ulgenes Y., and Lygren E.** (2006) Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. *Aquacultural engineering*, Vol. 34, No. 3, pp. 322-331
- Sakamoto M., Nakano A., and Akagi H.** (2001) Declining Minamata male birth ratio associated with increased male fetal death due to heavy methylmercury pollution. *Environmental Research*, Vol. 87, No. 2, pp. 92-98
- Sambrook J. and Russel D.W.** (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, Cold Spring Harbour, New York
- Schaefer J. K., and Morel F. M.** (2009) High methylation rates of mercury bound to cysteine by *Geobacter sulfurreducens*. *Nature Geoscience*, Vol. 2, No. 2, pp. 123-126
- Schaefer J. K., Kronberg R. M., Morel F. M. M., and Skyllberg U.** (2014) Detection of a key Hg methylation gene, *hgcA*, in wetland soils. *Environmental Microbiology Reports*
- Schaefer J. K., Rocks S. S., Zheng W., Liang L., Gu B., and Morel F. M.** (2011) Active transport, substrate specificity, and methylation of Hg (II) in anaerobic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 108, No. 21, pp. 8714-8719
- Schaefer J. K., Yagi J., Reinfelder J. R., Cardona T., Ellickson K. M., Tel-Or S., and Barkay T.** (2004) Role of the bacterial organomercury lyase (MerB) in controlling methylmercury accumulation in mercury-contaminated natural waters. *Environmental Science & Technology*, Vol. 38, No. 16, pp. 4304-4311
- Schäfer J., Castelle S., Blanc G., Dabrin A., Masson M., Lancelleur L., and Bossy C.** (2010) Mercury methylation in the sediments of a macrotidal estuary (Gironde Estuary, south-west France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, Vol. 90, No. 2, pp. 80-92
- Schauder R., Eikmanns B., Thauer R. K., Widdel F., and Fuchs G.** (1986) Acetate oxidation to CO<sub>2</sub> in anaerobic bacteria via a novel pathway not involving reactions of the citric acid cycle. *Archives of Microbiology*, Vol. 145, No. 2, pp. 162-172
- Schroeder W. H., Anlauf K. G., Barrie L. A., Lu J. Y., Steffen A., Schneeberger D. R., and Berg T.** (1998) Arctic springtime depletion of mercury. *Nature*, Vol. 394, No. 6691, pp. 331-332
- Schuster P. F., Krabbenhoft D. P., Naftz D. L., Cecil L. D., Olson M. L., Dewild J. F., Susong D. D., Green J. R., and Abbott M. L.** (2002) Atmospheric mercury deposition during the last 270 years: a glacial ice core record of natural and anthropogenic sources. *Environmental Science and Technology*, Vol. 36, No. 11, pp. 2303-2310
- Schuur E. A., Bockheim J., Canadell J. G., Euskirchen E., Field C. B., Goryachkin S. V., ... and Zimov S. A.** (2008) Vulnerability of permafrost carbon to climate change: Implications for the global carbon cycle. *BioScience*, Vol. 58, No. 8, pp. 701-714
- Schwertmann U., and Fechter H.** (1994) The formation of green rust and its transformation to lepidocrocite. *Clay Minerals*, Vol. 29, pp. 87-92.
- Sedell J. R., and Dahm C. N.** (1990) Spatial and temporal scales of dissolved organic carbon in streams and rivers. *Organic acids in aquatic ecosystems*, pp. 261-279
- Segall H. J., and Wood J. M.** (1974) Reaction of methyl mercury with plasmalogens suggests a mechanism for neurotoxicity of metal-alkyls. *Nature*, Vol. 248, pp. 456-458
- Seller P., Kelly C. A., Rudd J. W. M., and MacHutchon A. R.** (1996) Photodegradation of methylmercury in lakes. *Nature*, Vol. 380, pp. 694-697
- Sergent A. S., Jorand F., and Hanna K.** (2011) Effects of Si-bearing minerals on the nature of secondary iron mineral products from lepidocrocite bioreduction. *Chemical Geology*, Vol. 289, No. 1, pp. 86-97
- Servais P., Billen G., and Hascoët M. C.** (1987) Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water research*, Vol. 21, No. 4, pp. 445-450

- Si Y., Zou Y., Liu X., Si X., and Mao J.** (2015) Mercury methylation coupled to iron reduction by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Chemosphere*, Vol. 122, pp. 206-212
- Sibille I.** (1998) Stabilité biologique des réseaux de distribution d'eau potable. *L'Année Biologique*, Vol. 37, No. 3, pp. 117-161
- Siciliano S. D., and Lean D. R.** (2002) Methyltransferase: an enzyme assay for microbial methylmercury formation in acidic soils and sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 21, No. 6, pp. 1184-1190
- Siciliano S. D., O'Driscoll N. J., and Lean D. R. S.** (2002) Microbial reduction and oxidation of mercury in freshwater lakes. *Environmental Science & Technology*, Vol. 36, No. 14, pp. 3064-3068
- Siciliano S. D., O'Driscoll N. J., Tordon R., Hill J., Beauchamp S., and Lean D. R.** (2005) Abiotic production of methylmercury by solar radiation. *Environmental Science & Technology*, Vol. 39, No. 4, pp. 1071-1077
- Sigee D. C.** (2005) Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment. *John Wiley & Sons*, Chichester, England, pp. 1-31
- Silbergeld E. K., Silva I. A., and Nyland J. F.** (2005) Mercury and autoimmunity: implications for occupational and environmental health. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 207, No. 2, pp. 282-292
- Simbahan J., Kurth E., Schelert J., Dillman A., Moriyama E., Jovanovich S., and Blum P.** (2005) Community analysis of a mercury hot spring supports occurrence of domain-specific forms of mercuric reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 12, pp. 8836-8845
- Simon L., Francois M., Refait P., Renaudin G., Lelaurain M., and Génin J.-M. R.** (2003) Structure of the Fe(II-III) layered double hydroxysulphate green rust two from Rietveld analysis. *Solid State Sciences*. Vol. 5, pp. 327-334
- Skerfving S.** (1974) Methylmercury exposure, mercury levels in blood and hair, and health status in Swedes consuming contaminated fish. *Toxicology*, Vol. 2, No. 1, pp. 3-23
- Skogerboe R. K., and Wilson S. A.** (1981) Reduction of ionic species by fulvic acid. *Analytical Chemistry*, Vol. 53, No. 2, pp. 228-232
- Smith T., Pitts K., McGarvey J. A., and Summers A. O.** (1998) Bacterial oxidation of mercury metal vapor, Hg (0). *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 4, pp. 1328-1332
- Sørensen J., Christensen D., and Jørgensen B. B.** (1981) Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate-reducing bacteria in anaerobic marine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 42, No. 1, pp. 5-11
- Sørensen S. J., Bailey M., Hansen L. H., Kroer N., and Wuertz S.** (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 3, No. 9, pp. 700-710
- Spangler W. J., Spigarelli J. L., Rose J. M., and Miller H. M.** (1973) Methylmercury: bacterial degradation in lake sediments. *Science*, Vol. 180, No. 4082, pp. 192-193
- Spry D. J., and Wiener J. G.** (1991) Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: a critical review. *Environmental Pollution*, Vol. 71, No. 2, pp. 243-304
- St. Louis V. L., Sharp M. J., Steffen A., May A., Barker J., Kirk J. L., ... and Smol J. P.** (2005) Some sources and sinks of monomethyl and inorganic mercury on Ellesmere Island in the Canadian High Arctic. *Environmental Science & Technology*, Vol. 39, No. 8, pp. 2686-2701
- Steffan R. J., Korthals E. T., and Winfrey M. R.** (1988) Effects of acidification on mercury methylation, demethylation, and volatilization in sediments from an acid-susceptible lake. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 54, No. 8, pp. 2003-2009
- Stein E. D., Cohen Y., and Winer A. M.** (1996) Environmental distribution and transformation of mercury compounds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, Vol. 26, No. 1, pp. 1-43
- Stern A. H.** (2005) A review of the studies of the cardiovascular health effects of methylmercury with consideration of their suitability for risk assessment. *Environmental Research*, Vol. 98, No. 1, pp. 133-142
- Stewart P. S.** (2003) Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology*, Vol. 185, No. 5, pp. 1485-1491
- Stewart P. S., and Franklin M. J.** (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 6, No. 3, pp. 199-210



- Stoodley P., Sauer K., Davies D. G., and Costerton J. W.** (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, Vol. 56, No. 1, pp. 187-209
- Stumm W., and Morgan J. J.** (1996) Aquatic Chemistry, Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters. 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York
- Su C., and Puls R.W.** (2004) Significance of iron(II,III) hydroxycarbonate green rust in arsenic remediation using zerovalent iron in laboratory column tests. *Environmental Science & Technology*, Vol. 38, pp. 5224-5231
- Suda I., Suda M., and Hirayama K.** (1993) Degradation of methyl and ethyl mercury by singlet oxygen generated from sea water exposed to sunlight or ultraviolet light. *Archives of Toxicology*, Vol. 67, No. 5, pp. 365-368
- Summers A. O., and Silver S.** (1972) Mercury resistance in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 112, No. 3, pp. 1228-1236
- Talmi Y., and Mesmer R. E.** (1975) Studies on vaporization and halogen decomposition of methyl mercury compounds using GC with a microwave detector. *Water Research*, Vol. 9, No. 5, pp. 547-552
- Taylor B. F., and Oremland R. S.** (1979) Depletion of adenosine triphosphate in *Desulfovibrio* by oxyanions of group VI elements. *Current Microbiology*, Vol. 3, No. 2, pp. 101-103
- Taylor H. F. W.** (1973) Crystal structures of some double hydroxide minerals. *Mineralogical Magazine*. Vol. 39, No. 304, pp. 377-389
- Taylor R.M., Schwertmann U., and Fechter H.** (1985) A rapid method for the formation of Fe(II)-Fe(III) hydroxycarbonate. *Clay Minerals*, Vol. 20, pp. 147-151
- Tee W., Dyal-Smith M., Woods W., and Eisen D.** (1996) Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 34, No. 7, pp. 1760-1764
- Teitzel G. M., and Parsek M. R.** (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 4, pp. 2313-2320
- Trolard F., Abdelmoula M., Bourrié G., Humbert B. and Génin, J.-M.R.** (1996) Evidence of the occurrence of a "Green Rusts" component in hydromorphic soils. Proposition of the existence of a new mineral: "fougerite". Mise en évidence d'un constituant de type « rouille verte » dans les sols hydromorphes. Proposition de l'existence d'un nouveau minéral : la « fougerite ». *Comptes Rendus de l'Académie de Sciences (série Iia)*. Vol. 323, No. 12, pp. 1015-1022
- Truong H. Y. T., Chen Y. W., and Belzile N.** (2013) Effect of sulfide, selenite and mercuric mercury on the growth and methylation capacity of the sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *Science of the Total Environment*, Vol. 449, pp. 373-384
- Ullrich S. M., Tanton T. W., and Abdrashitova S. A.** (2001) Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, Vol. 31, No. 3, pp. 241-293
- Urban N. R., Brezonik P. L., Baker L. A., and Sherman L. A.** (1994) Sulfate reduction and diffusion in sediments of Little Rock Lake, Wisconsin. *Limnology and Oceanography*, Vol. 39, No. 4, pp. 797-815
- Van Oostdam, J., Donaldson, S. G., Feeley, M., Arnold, D., Ayotte, P., Bondy, G., ... & Kalhok, S.** (2005). Human health implications of environmental contaminants in Arctic Canada: A review. *Science of the Total Environment*, 351, 165-246.
- Vandal G. M., Mason R. P., and Fitzgerald W. F.** (1991) Cycling of volatile mercury in temperate lakes. *Water Air & Soil Pollution*, Vol. 56, No. 1, pp. 791-803
- Verdon R., Brouard D., Demers C., Lalumière R., Laperle M., and Schetagne R.** (1991) Mercury evolution (1978–1988) in fishes of the La Grande hydroelectric complex, Quebec, Canada. *Water Air & Soil Pollution*, Vol. 56, No. 1, pp. 405-417
- Vincent W. F., Whyte L. G., Lovejoy C., Greer C. W., Laurion I., Suttle C. A., ... and Mueller D. R.** (2009) Arctic microbial ecosystems and impacts of extreme warming during the International Polar Year. *Polar Science*, Vol. 3, No. 3, pp. 171-180
- Viollier E., Inglett P. W., Hunter K., Roychoudhury A. N., and Van Cappellen P.** (2000) The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Applied geochemistry*, Vol. 15, No. 6, pp. 785-790

- Wagner-Döbler I., Von Canstein H., Li, Y., Timmis K. N., and Deckwer W. D.** (2000) Removal of mercury from chemical wastewater by microorganisms in technical scale. *Environmental science & technology*, Vol. 34, No. 21, pp. 4628-4634
- Warner K. A., Roden E. E., and Bonzongo J. C.** (2003) Microbial mercury transformation in anoxic freshwater sediments under iron-reducing and other electron-accepting conditions. *Environmental Science & Technology*, Vol. 37, No. 10, pp. 2159-2165
- Watanabe N., Nagase H., Nakamura T., Watanabe E., and Ose Y.** (1986) Chemical methylation of mercury (II) salts by polydimethylsiloxanes in aqueous solution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 11, No. 2, pp. 174-178
- Watras C. J., Bloom N. S., Hudson R. J. M., Gherini S., Munson R., Claas S. A., and Huckabee J. W.** (1994). Sources and fates of mercury and methylmercury in Wisconsin lakes. *Mercury pollution: Integration and Synthesis*, pp. 153-177
- Watras C. J., Morrison K. A., Host J. S., and Bloom N. S.** (1995) Concentration of mercury species in relationship to other site-specific factors in the surface waters of northern Wisconsin lakes. *Limnology and Oceanography*, Vol. 40, No. 3, pp. 556-565
- Weast R.C.** (1973) Handbook of Chemistry and Physics. *CRC Press*, Cleveland, Ohio
- Weber J. H.** (1993) Review of possible paths for abiotic methylation of mercury (II) in the aquatic environment. *Chemosphere*, Vol. 26, No. 11, pp. 2063-2077
- Wedepohl K. H.** (1995) The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 59, No. 7, pp. 1217-1232
- Weiss A. A., Murphy S. D., and Silver S.** (1977) Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, Vol. 132, No. 1, pp. 197-208
- Whitman W. B., Coleman D. C., and Wiebe W. J.** (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 95, No. 12, pp. 6578-6583
- Wiatrowski H. A., Das S., Kukkadapu R., Ilton E. S., Barkay T., and Yee N.** (2009) Reduction of Hg (II) to Hg (0) by magnetite. *Environmental Science and Technology*, Vol. 43, No. 14, pp. 5307-5313
- Wiatrowski H. A., Ward P. M., and Barkay T.** (2006) Novel reduction of mercury (II) by mercury-sensitive dissimilatory metal reducing bacteria. *Environmental Science & Technology*, Vol. 40, No. 21, pp. 6690-6696
- Williams A. G. B. and Scherer M. M.** (2001) Kinetics of Cr(VI) reduction by carbonate green rust. *Environmental Science & Technology*. Vol. 35, No. 17, pp. 3488-3494
- Winfrey M. R., and Rudd J. W.** (1990) Environmental factors affecting the formation of methylmercury in low pH lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(7), 853-869
- Woggon H., Klein S., Jehle D., and Zydek G.** (1983) Transformation reactions of special metals in organisms and in the environment. Abiotic methylation reactions of mercury, especially by methyltin compounds and humic and fulvic acids. *Die Nahrung*, Vol. 8, No. 8, pp. 851-862
- Wood J. M., Kennedy F. S., and Rosen C. G.** (1968) Synthesis of methyl-mercury compounds by extracts of a methanogenic bacterium. *Nature* Vol. 220, pp. 173-174
- Wren C. D., and MacCrimmon H. R.** (1983) Mercury levels in the sunfish, *Lepomis gibbosus*, relative to pH and other environmental variables of Precambrian Shield lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(10), 1737-1744
- Wright D. R., and Hamilton R. D.** (1982) Release of methyl mercury from sediments: effects of mercury concentration, low temperature, and nutrient addition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 39, No. 11, pp. 1459-1466
- Xun L., Campbell N. E. R., and Rudd J. W.** (1987) Measurements of specific rates of net methyl mercury production in the water column and surface sediments of acidified and circumneutral lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 44, No. 4, pp. 750-757
- Yamada M. and Tonomura K.** (1972) Formation of methylmercury compounds from inorganic mercury by *Clostridium cochlearium*. *Journal of Fermentation Technology*, Vol. 50, pp. 159-166
- Yamamoto M.** (1996) Stimulation of elemental mercury oxidation in the presence of chloride ion in aquatic environments. *Chemosphere*, Vol. 32, No. 6, pp. 1217-1224

- Ye D., Quensen J. F., Tiedje J. M., and Boyd S. A.** (1999) 2-Bromoethanesulfonate, sulfate, molybdate, and ethanesulfonate inhibit anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls by pasteurized microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 1, pp. 327-329
- Yoshikawa K., and Hinzman L. D.** (2003) Shrinking thermokarst ponds and groundwater dynamics in discontinuous permafrost near Council, Alaska. *Permafrost and Periglacial Processes*, Vol. 14, No. 2, pp. 151-160
- Yu H., Chu L., and Misra T. K.** (1996) Intracellular inducer  $Hg^{2+}$  concentration is rate determining for the expression of the mercury-resistance operon in cells. *Journal of bacteriology*, Vol. 178, No. 9, pp. 2712-2714
- Zegeye A., Bonneville S., Benning L.G., Sturm A., Fowle D.A., Jones C.A., Canfield D.E., Ruby C., MacLean L.C., Nomosatryo S., Crowe S.A., and Poulton S.W.** (2012) Green rust formation controls nutrient availability in a ferruginous water column. *Geology*, Vol. 40, pp. 599-602
- Zegeye A., Etique M., Carteret C., Ruby C., Schaaf P., and Francius G.** (2014) Origin of the differential nanoscale reactivity of biologically and chemically formed green rusts crystals investigated by chemical force spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, Vol. 118, pp. 5978-5987
- Zegeye A., Mustin C. and Jorand F.** (2010) Bacterial and iron oxide aggregates mediate secondary iron mineral formation: green-rust vs magnetite. *Geobiology*, Vol. 8, No. 3, pp. 209-22.
- Zegeye A., Ona-Nguema G., Carteret C., Huguet L., Abdelmoula M., and Jorand F.** (2005) Formation of hydroxysulphate green rust 2 as a single iron(II-III) mineral in microbial culture. *Geomicrobiology Journal*, Vol. 22, pp. 389-399
- Zegeye A., Ruby C. and Jorand F.** (2007) Kinetic and thermodynamic analysis during dissimilatory  $\gamma$ -FeOOH reduction: formation of green rust 1 and magnetite. *Geomicrobiology Journal*. Vol. 24, No. 1, pp. 51-64
- Zhang T. C., and Bishop P. L.** (1994) Density, porosity, and pore structure of biofilms. *Water Research*, Vol. 28, No. 11, pp. 2267-2277
- Zhang T., Kim B., Levard C., Reinsch B. C., Lowry G. V., Deshusses M. A., and Hsu-Kim H.** (2011) Methylation of mercury by bacteria exposed to dissolved, nanoparticulate, and microparticulate mercuric sulfides. *Environmental Science & Technology*, Vol. 46, No. 13, pp. 6950-6958
- Zheng W., and Hintelmann H.** (2010) Nuclear field shift effect in isotope fractionation of mercury during abiotic reduction in the absence of light. *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. A 114, No. 12, pp. 4238-4245



---

## **ANNEXES AUX CHAPITRES 2 ET 3**



Tableau A1. Compositions des flacons d'incubation des différents compartiments microbiens avec le mercure.

	Eau brute	Biofilm	Biofilm + eau brute	Sédiment	Sédiment + eau brute
Eau brute	99,9 mL	-	99,9 mL	-	99,9 mL
Eau brute autoclavée 121 °C, 15 min	-	99,9 mL	-	99,9 mL	-
Support K1 colonisé	-	10	10	-	-
Sédiment de surface	-	-	-	2 g MH	2g MH
<sup>199</sup> Hg inorganique 1 mg L <sup>-1</sup>	100 µL <i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	100 µL <i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	100 µL <i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	100 µL <i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	100 µL <i>1 µg L<sup>-1</sup></i>
Vf	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL

Tableau A2. Composition du milieu fermentatif utilisé pour la culture de la souche *Desulfobulbus propionicus* 1pr3 décrit par Benoit *et al.*, 2001.

Composé	Concentration (mol L <sup>-1</sup> )	Volume (mL L <sup>-1</sup> )
Pyruvate de sodium	$2,4 \times 10^{-2}$	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$1,7 \times 10^{-3}$	-
NH <sub>4</sub> Cl	$4,7 \times 10^{-3}$	-
KCl	$6,7 \times 10^{-3}$	-
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	$4,8 \times 10^{-2}$	-
Mix vitamines (DSMZ 908)	-	1
Mix éléments traces (DSMZ SL-10)	-	1
MgCl <sub>2</sub>	$3,1 \times 10^{-3}$	-
CaCl <sub>2</sub>	$1,4 \times 10^{-3}$	-
NTA	$1 \times 10^{-4}$	-

Après dissolution complète du pyruvate, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, KCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et l'ajout des vitamines et éléments traces, le pH est ajusté à 7,2 et la solution est dégazée sous N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20) avant d'être autoclavée. Juste avant l'inoculation, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> et NTA sont ajoutés à partir de solutions mères indépendantes, en quantités adéquates pour atteindre les concentrations voulues.

**Tableau A3.** Compositions des flacons d'incubation des différents contrôles (stérilisés et chimiques) ainsi que les potentiels de méthylation (%MeHg) à 7 j. La moyenne des valeurs en gras ( $0,074 \pm 0,053$  %MeHg) a été utilisée pour calculer l'intervalle de confiance ( $0,232$  %MeHg). L'essai avec des sédiments de surface autoclavés a conservé, malgré la stérilisation, une activité méthylyante au moins 100 fois supérieure à celle des autres contrôles, il n'a donc pas été pris en compte dans le calcul.

	Eau brute autoclavée	Biofilms autoclavés	Sédiments autoclavés	Eau ultra pure	BESA	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Chloramphénicol
Eau brute autoclavée	99,9 mL	99,9 mL	99,9 mL	-	99,9 mL	99,9 mL	99,9 mL
Supports K1 colonisés autoclavés	-	10	-	-	-	-	-
Sédiment autoclavé	-	-	2 g MH	-	-	-	-
BESA 5 mM	-	-	-	-	1 mL (5 mM)	-	-
MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 0,5 mM	-	-	-	-	-	1 mL (0,5 mM)	-
Chloramph. 0,2 mM	-	-	-	-	-	-	1 mL (0,2 mM)
Eau ultra pure	-	-	-	99,9 mL	-	-	-
<sup>199</sup> Hg <sub>inorg</sub> 1mg L <sup>-1</sup>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>
Vf	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
%MeHg à 7 j	<b>0,178</b>	<b>0,102</b>	10,2	<b>0,031±0,018</b>	0,038	0,078	0,041



**Tableau A4.** Simulation itérative montrant l'évolution du ratio  $[\text{MeHg}]/[\text{Hg}_{\text{inorg}}]$  au cours du temps sachant que :

$$[\text{Hg}_{\text{inorg}}]_t = [\text{Hg}_{\text{inorg}}]_{t-1} - [\text{Hg}_{\text{inorg}}]_{t-1} \times \% \text{MeHg } j^{-1} + [\text{MeHg}]_{t-1} \times \% \text{DeMeHg } j^{-1}$$

$$[\text{MeHg}]_t = [\text{MeHg}]_{t-1} + [\text{Hg}_{\text{inorg}}]_{t-1} \times \% \text{MeHg } j^{-1} - [\text{MeHg}]_{t-1} \times \% \text{DeMeHg } j^{-1}$$

Avec :

$\% \text{MeHg } j^{-1}$  : le potentiel de méthylation par jour (fixé à 0,05)

$\% \text{DeMeHg } j^{-1}$  : le potentiel de déméthylation par jour (fixé à 0,2)

Soit un ratio  $\frac{\% \text{MeHg } j^{-1}}{\% \text{DeMeHg } j^{-1}} = 0,25$

Temps (j)	$[\text{Hg}_{\text{inorg}}]$ (ppb)	$[\text{MeHg}]$ (ppb)	$[\text{Hg}_{\text{total}}]$ (ppb)	$[\text{MeHg}]/[\text{Hg}_{\text{inorg}}]$
0	<b>1000</b>	<b>10</b>	1010	0,01
1	952	58	1010	0,06
2	916	94	1010	0,10
3	889	121	1010	0,14
4	869	141	1010	0,16
5	854	156	1010	0,18
6	842	168	1010	0,20
7	834	176	1010	0,21
8	827	183	1010	0,22
9	822	188	1010	0,23
10	819	191	1010	0,23
11	816	194	1010	0,24
12	814	196	1010	0,24
13	813	197	1010	0,24
14	811	199	1010	0,24
15	811	199	1010	0,25
16	810	200	1010	0,25
17	809	201	1010	0,25
18	809	201	1010	0,25
19	809	201	1010	0,25
20	809	201	1010	0,25
21	808	202	1010	0,25
22	808	202	1010	0,25
23	808	202	1010	0,25
24	808	202	1010	0,25
25	808	202	1010	0,25
26	808	202	1010	0,25
27	808	202	1010	0,25
28	808	202	1010	0,25
29	808	202	1010	0,25
...	...	...	...	...
$t_x$	808	202	1010	0,25

Quelles que soient les concentrations initiales (en gras), un équilibre est atteint (ici au 15<sup>ème</sup> jour), où le ratio  $\frac{[\text{MeHg}]}{[\text{Hg}_{\text{inorg}}]}$  se stabilise à 0,25 ce qui correspond au rapport des potentiels de méthylation et de déméthylation.

**Tableau A5.** Composition du milieu de culture spécifique de l'activité SRB (sulfate comme seul accepteur d'électrons).

Composé	Concentration (mol L <sup>-1</sup> )	Concentration (g L <sup>-1</sup> )	Volume (mL L <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> Cl	4,48×10 <sup>-3</sup>	-	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,82×10 <sup>-2</sup>	-	-
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3,19×10 <sup>-3</sup>	-	-
CaCl <sub>2</sub>	9×10 <sup>-4</sup>	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47×10 <sup>-3</sup>	-	-
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1×10 <sup>-4</sup>	-	-
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	2×10 <sup>-4</sup>	-	-
Mix vitamines (DSMZ 908)	-	-	1
Mix éléments traces (DSMZ SL-10)	-	-	1
Extraits de levures	-	0,1	-
Acétate de sodium	1×10 <sup>-2</sup>	-	-
Lactate de sodium	1×10 <sup>-2</sup>	-	-
Pyruvate de sodium	1×10 <sup>-2</sup>	-	-
Tampon HEPES	1×10 <sup>-2</sup>	-	-

Les solutions de FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O et Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> sont à autoclaver séparément. Après autoclavage, le milieu est dégazé sous un flux d'N<sub>2</sub> (99 %) et le pH est ajusté à 6,9.

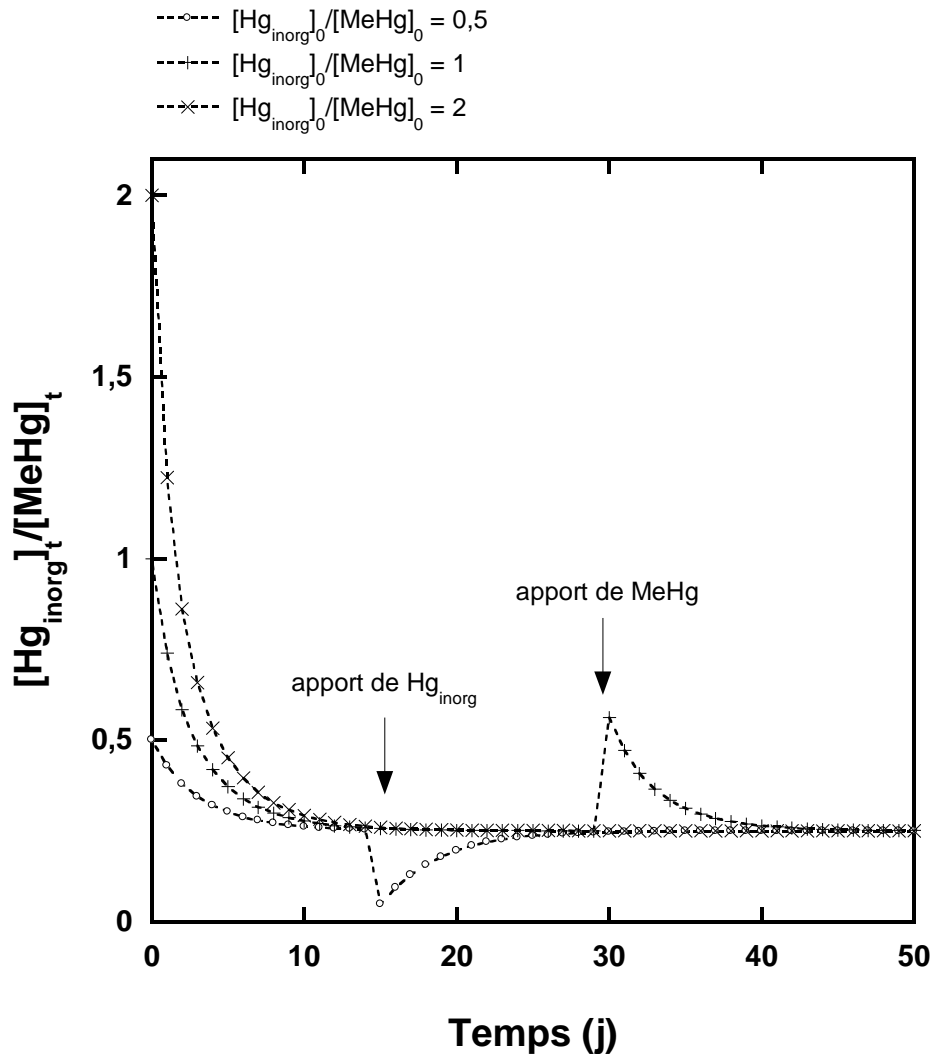
**Tableau A6.** Composition du milieu de culture spécifique de l'activité IRB (Fe<sup>III</sup> comme seul accepteur d'électrons).

Composé	Concentration (mol L <sup>-1</sup> )	Volume (mL L <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> Cl	2,2×10 <sup>-2</sup>	-
NaCl	3×10 <sup>-3</sup>	-
KCl	1,2×10 <sup>-3</sup>	-
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1,1×10 <sup>-3</sup>	-
CaCl <sub>2</sub>	6,7×10 <sup>-5</sup>	-
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	2,7×10 <sup>-4</sup>	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2×10 <sup>-3</sup>	-
Mix vitamines (DSMZ 908)	-	1
Mix éléments traces (DSMZ SL-10)	-	1
Acétate de sodium	1×10 <sup>-2</sup>	-
Lactate de sodium	1×10 <sup>-2</sup>	-
Formiate de sodium	1×10 <sup>-2</sup>	-
Lépidocrocite/Fe <sup>III</sup> citrate	1,5×10 <sup>-1</sup>	-

Après dissolution complète et dégazage du milieu sous un flux d'N<sub>2</sub> (99 %) le pH est ajusté à 7 avant d'autoclaver.

Tableau A7. Compositions des flacons d'incubation des biofilms déstructurés ou en présence d'inhibiteurs spécifiques de croissance avec le mercure.

	Biofilm déstructuré	Biofilm déstructuré + eau brute	Biofilm + BESA	Biofilm + Mo	Biofilm + BESA + Mo	Biofilm + chloramphénicol
Eau brute	-	99,9 mL	-	-	-	-
Eau brute autoclavée 121 °C, 15 min	99,9 mL	-	98,9 mL	98,9 mL	98,9 mL	98,9 mL
Support K1 colonisé	10	10	10	10	10	10
BESA 500 mM	-	-	1 mL (5 mM)	-	1 mL (5 mM)	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 50 mM	-	-	-	1 mL (0,5 mM)	1 mL (0,5 mM)	-
Chloramphénicol 20 mM	-	-	-	-	-	1 mL (0,2 mM)
<sup>199</sup> Hg <sub>inorg</sub> 1mg L <sup>-1</sup>	100 µL <i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	100 µL <i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	100 µL <i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	100 µL <i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	100 µL <i>1 µg L<sup>-1</sup></i>	100 µL <i>1 µg L<sup>-1</sup></i>
Vf	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL



**Figure A1.** Simulation itérative du rapport des teneurs  $[Hg_{inorg}]/[MeHg]$  au cours du temps à partir de trois situations initiales ( $[Hg_{inorg}]_0/[MeHg]_0 = 0,5 ; 1$  ou  $2$ ). Quel que soit le ratio  $[Hg_{inorg}]_0/[MeHg]_0$  initial, un équilibre est atteint à partir du jour 15 où  $[Hg_{inorg}]_t/[MeHg]_t$  tend vers la valeur 0,25 soit le rapport des potentiels de méthylation ( $\%MeHg\ j^{-1} = 0,05$ ) et de déméthylation ( $\%DeMeHg\ j^{-1} = 0,2$ ). Un apport ponctuel de  $Hg_{inorg}$  ou de MeHg au système entraîne une fluctuation avant un retour à l'équilibre.

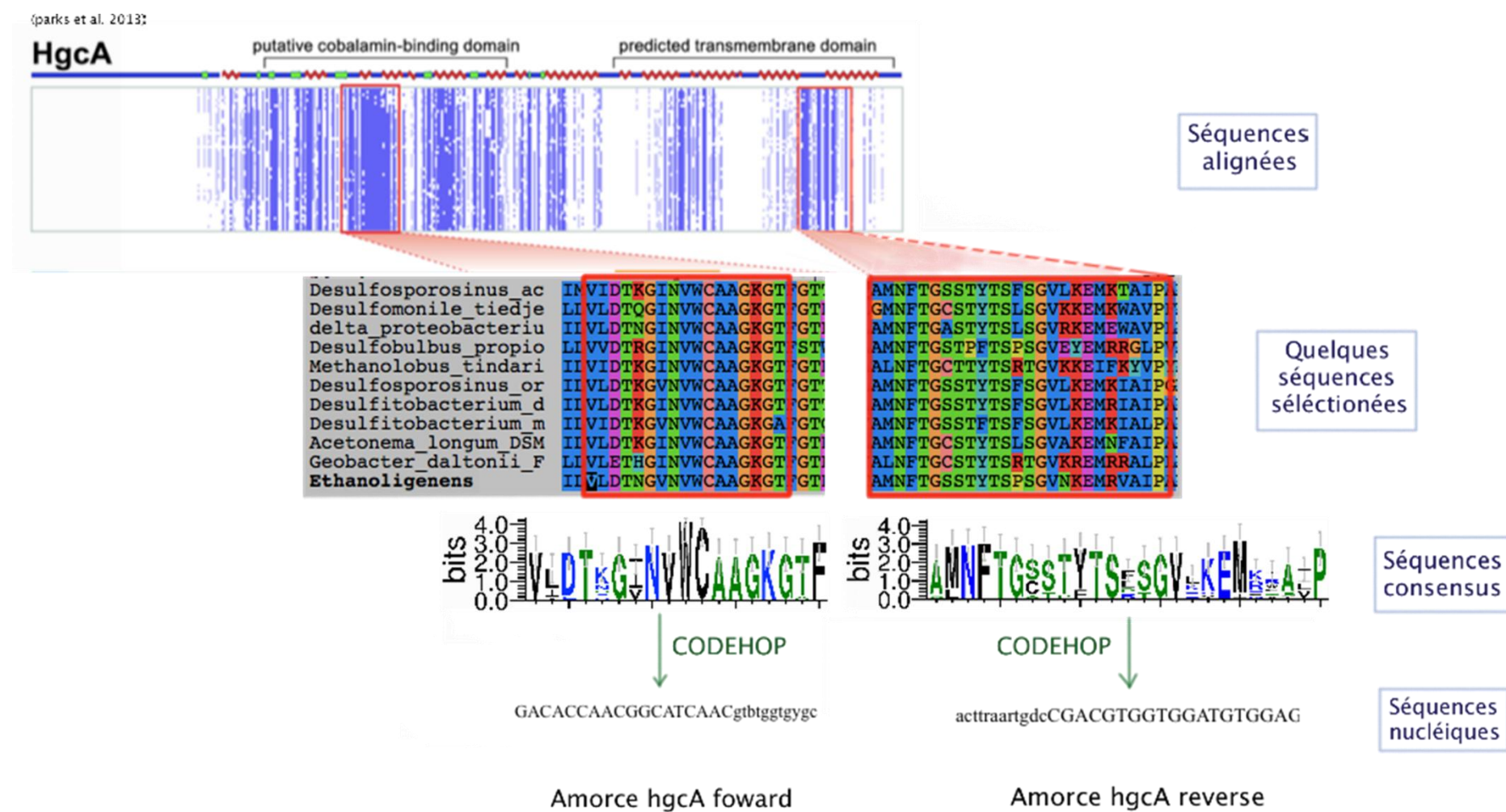


Figure A2. Stratégie d'élaboration des amorces pour cibler le gène *hgca*.

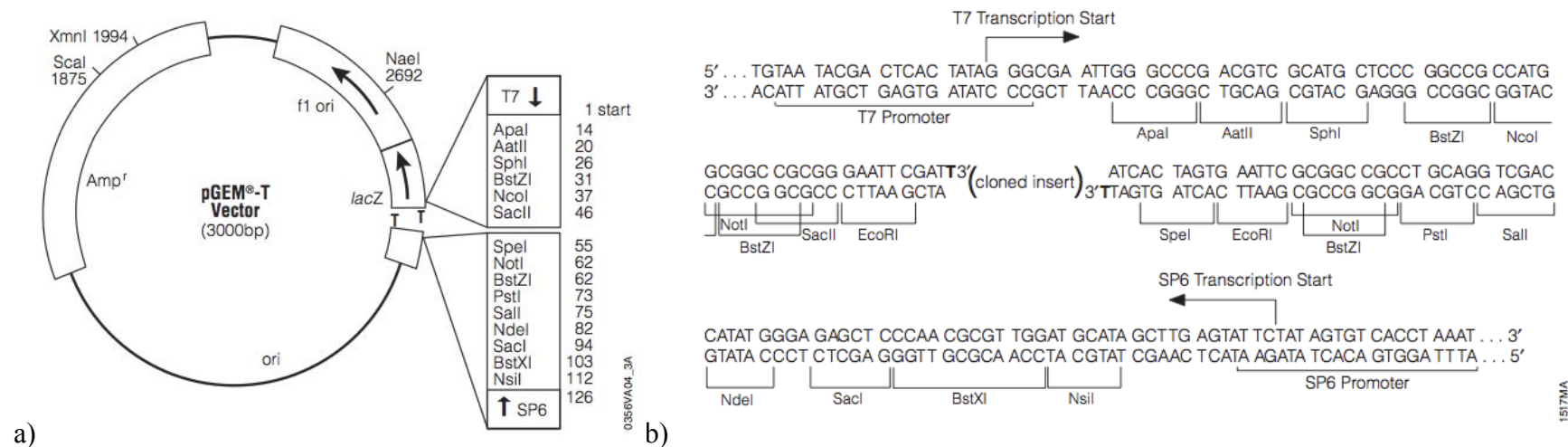


Figure A3. Structure a) et séquence b) du vecteur d'expression pGEM-T.

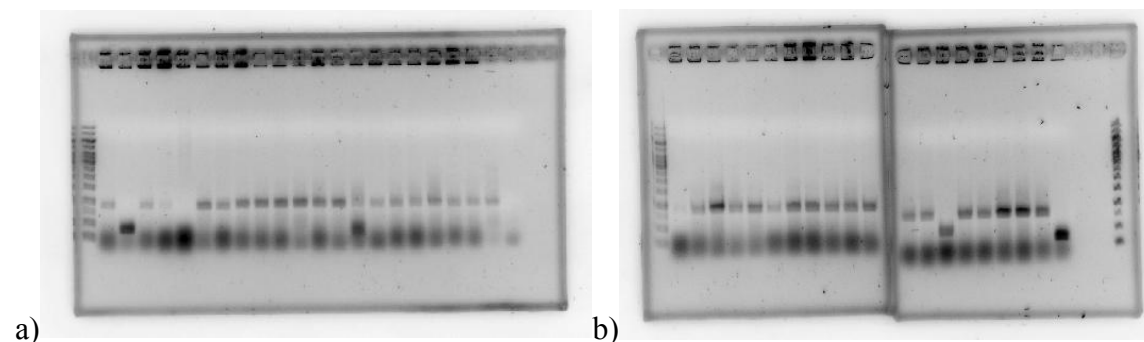


Figure A4. Photographie du gel d'agarose après migration des produits obtenus à partir des PCR sur colonies d'*E. coli* ayant intégré l'insert issu de (a) CAB biofilm et (b) CAB sédiment. Sur chaque gel, la bande la plus à gauche correspond au marqueur de taille.

Note A1.

Calcul de la concentration en Hg total dans les flacons d'incubation :

$$[\text{Hg}]_{\text{totale}} = \frac{[\text{Hg}]_{\text{eau brute}} \times V_{\text{eau brute}} + [\text{Hg}]_{\text{solide}} \times m_{\text{solide}} \times \mu + m_{\text{Hg spike}}}{V_{\text{incubation}}}$$

Avec :

$[\text{Hg}]_{\text{totale}}$  : la concentration totale de Hg dans le flacon d'incubation (en  $\text{g L}^{-1}$ )

$[\text{Hg}]_{\text{eau brute}}$  : la concentration de Hg dans l'eau brute utilisée comme matrice (en  $\text{g L}^{-1}$ )

$V_{\text{eau brute}}$  : le volume d'eau brute (100 mL)

$[\text{Hg}]_{\text{solide}}$  : la concentration de Hg dans l'échantillon solide (biofilm ou sédiment) (en  $\text{g gMS}^{-1}$ )

$m_{\text{solide}}$  : la masse de matière humide (après centrifugation  $5000 \times g$ , 10 min) incubée (dans le cas du sédiment) (en gMH)

$\mu$  : le facteur de conversion entre la masse de matière sèche et la masse de matière humide (après centrifugation  $5000 \times g$ , 10 min) (dans le cas du sédiment) (en  $\text{gMS gMH}^{-1}$ )

$m_{\text{Hg spike}}$  : la masse de Hg introduite lors de l'ajout de la solution monoisotopique (0,1  $\mu\text{g}$ )

$V_{\text{incubation}}$  : le volume du milieu réactionnel (=  $V_{\text{eau brute}}$ ) (100 mL)

Note A2.

Calcul de la quantité de COT consommée par cellule et par jour dans les flacons d'incubation :

$$Q = \frac{[\text{COT}]_0 \times 0,2}{[\text{bact.}]_0 \times t \times M_C} \times 10^{-15}$$

Avec :

$Q$  : la quantité de de COT consommée par cellule et par jour ( $\text{fmol COT cell}^{-1} \text{j}^{-1}$ )

$[\text{COT}]_0$  : la concentration en COT initialement présente dans le flacon d'incubation correspondant à la somme des apports des éléments incubés (e.g.  $[\text{COT}]_{\text{sédiment}} + [\text{COT}]_{\text{eau brute}}$ ) ( $\text{g L}^{-1}$ )

0,2 : on considère ici que seul 20 % du COT est biodisponible pour les bactéries (Sevrais *et al.*, 1987)

$[\text{bact.}]_0$  : la densité bactérienne incubée ( $\text{cell L}^{-1}$ )

$t$  : la durée de l'incubation jusqu'à l'arrêt de la méthylation (j)

$M_C$  : la masse molaire atomique du carbone ( $12,0107 \text{ g mol}^{-1}$ )

$10^{-15}$  : le facteur de conversion entre mol et fmol





---

## **ANNEXES AU CHAPITRE 4**



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)

# Pseudo-first-order reaction of chemically and biologically formed green rusts with $\text{Hg}^{\text{II}}$ and $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ : Effects of pH and stabilizing agents (phosphate, silicate, polyacrylic acid, and bacterial cells)

P.-Ph. Remy <sup>a,b</sup>, M. Etique <sup>a,b</sup>, A.A. Hazotte <sup>a,b,1</sup>, A.-S. Sergent <sup>a,b</sup>,  
N. Estrade <sup>c,d,2</sup>, C. Cloquet <sup>c,d</sup>, K. Hanna <sup>e,f</sup>, F.P.A. Jorand <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Lorraine, LCPME, UMR 7564, Institut Jean Barriol, Villers-lès-Nancy F-54601, France

<sup>b</sup> CNRS, LCPME, UMR 7564, Institut Jean Barriol, Villers-lès-Nancy F-54601, France

<sup>c</sup> CNRS, CRPG, UMR 7358, BP 20, Vandœuvre-lès-Nancy F-54501, France

<sup>d</sup> Université de Lorraine, CRPG, UMR 7358, BP 20, Vandœuvre-lès-Nancy F-54501, France

<sup>e</sup> ENSCR, CNRS, UMR 6226, CS 50837, Rennes Cedex 7 F-35708, France

<sup>f</sup> Université européenne de Bretagne, Rennes F-35000, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 1 July 2014

Received in revised form

24 November 2014

Accepted 3 December 2014

Available online 12 December 2014

### Keywords:

Reductive transformation

Layered double hydroxides

Cationic mercury

Methyl red

Biogenic green rust

Surface area concentration

## ABSTRACT

The kinetics of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  and methyl red (MR) reduction by hydroxycarbonate green rust (GR1) and by hydroxysulfate green rust (GR2) were studied in the presence of naturally occurring organic and inorganic ligands (phosphate, polyacrylic acid, bacterial cells, silicate). The reducing ability of biogenic hydroxycarbonate green rust (GR1<sub>bio</sub>), obtained after microbial reduction of lepidocrocite by *Shewanella putrefaciens*, was also investigated and compared to those of chemically synthesized GR1 and GR2 (GR1<sub>ab</sub> and GR2<sub>ab</sub>). Pseudo first-order rate constants ( $k_{\text{obs}}$ ) of  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction (at pH 7.0, 8.2, and 9.5) and MR reduction (at pH 7.0) were determined and were normalized to the structural  $\text{Fe}^{\text{II}}$  content of GRs ( $k_{\text{FeII}}$ ) and to the estimated concentration of surface  $\text{Fe}^{\text{II}}$  sites ( $k_s$ ). The  $k_s$  values ranged from 0.3 L mmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> to 43 L mmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> for the  $\text{Hg}$  reduction, and from 0.007 L mmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> to 3.4 L mmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> for the MR reduction. No significant discrepancy between GR<sub>ab</sub> and GR<sub>bio</sub> was observed in term of reactivity. However, the reduction kinetics of MR was generally slower than the  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction kinetics for all tested GRs. While a slight difference in  $\text{Hg}^{\text{II}}$  reduction rate was noted whatever the pH values (7.0, 8.2, or 9.5), the reduction of MR was significantly affected in the presence of ligands. A decrease by a factor of 2–200, depending on the type of ligand used, was observed. These data give new insights into the reactivity of GRs in the presence of co-occurring organic and inorganic ligands, and have major implications in the characterization of contaminated systems as well as water treatment processes.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Université de Lorraine, LCPME, UMR 7564, 405 rue de Vandœuvre, Villers-lès-Nancy F-54601, France. Tel.: +33 (0) 383 685 248.

E-mail address: [frederic.jorand@univ-lorraine.fr](mailto:frederic.jorand@univ-lorraine.fr) (F.P.A. Jorand).

<sup>1</sup> Present address: LUNAM University, Subatech-LPGN, UMR 6457 & 6112, BP 92208, F-44322 Nantes Cedex 3, France.

<sup>2</sup> Present address: Pacific Centre for Isotopic and Geochemical Research, EOAS, The University of British Columbia, 2207 Main Mall, Vancouver, British Columbia V6T 1Z4, Canada.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.007>

0043-1354/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table S1. Total mercury concentration in each compound used for experimentation with mercury test.

	Pure water	SnCl <sub>2</sub>	GR1 <sub>bio</sub>	GR1 <sub>ab+P</sub>	GR2 <sub>ab</sub>	Sp	Fe <sup>II</sup> <sub>aq.</sub>	Hg <sup>II</sup>	GR1 <sub>ab</sub>
Hg (ppb)	0.482	0.760	0.370	1.872	0.315	0.574	0.519	104.514	ND

Table S2a.  $d_{hkl}$  (nm) parameters from XRD analysis for chemically synthesized and biogenic carbonated green rust from the present study (GR1<sub>ab+P</sub>, GR1<sub>ab</sub>, and GR1<sub>bio</sub>) and from the literature <sup>a</sup>(Drissi *et al.*, 1995), <sup>b</sup>(Zegeye *et al.*, 2007).

Relative intensity	hkl	$d_{hkl}$ GR1 <sub>ab+P</sub>	$d_{hkl}$ GR1 <sub>ab</sub>	$d_{hkl}$ GR1 <sub>bio</sub>	Ref <sup>a</sup> abiotic	Ref <sup>b</sup> biotic
100	003	0.759	0.758	0.759	0.751	0.751
32	006	0.377	0.379	0.378	0.373	0.375
1	101	0.274	-	0.274	0.273	n.d.
15	012	0.268	-	0.268	0.265	0.266
3	104	0.247	-	0.248	0.247	n.d.
12	015	0.235	0.235	0.235	0.233	0.233
1	107	0.209	-	0.209	0.208	n.d.
9	018	0.198	0.197	0.197	0.196	0.196
1	0012	0.189	0.189	0.188	0.188	n.d.
2	1010	0.175	-	0.174	0.173	n.d.

n.d. : no data

Table S2b.  $d_{hkl}$  (nm) parameters from XRD analysis for chemically synthesized hydroxysulfate green rust from the present study (GR2<sub>ab</sub>) and from the literature <sup>a</sup>(Simon *et al.*, 1997), <sup>b</sup>(Hansen *et al.*, 1994).

Relative intensity	hkl	$d_{hkl}$ GR2 <sub>ab</sub>	Ref <sup>a</sup>	Ref <sup>b</sup>
100	001	1.091	1.09	1.10
80	002	0.547	0.545	0.549
60	003	0.365	0.362	0.366
20	004/100	0.276	0.275	0.275
30	101	0.67	0.266	0.226
30	102	0.246	0.245	n.d.
30	005/103	0.220	0.219	0.2195

n.d. : no data

**Table S3.** Mössbauer hyperfine parameters of spectra measured at 7, 150 and 12 K for the GR1<sub>bio</sub>, GR1<sub>ab+P</sub> and GR2<sub>ab</sub> synthesized according to Zegeye *et al.* (2007), Bocher *et al.* (2004), and Ruby *et al.* (2006), respectively. The GR1<sub>bio</sub> Mössbauer spectrum indicates the presence of 20 % of a Fe<sup>II</sup>-Fe<sup>III</sup> phase assumed to be magnetite in the sample (four sextets). However, no trace of magnetite was detected with XRD under anoxic conditions, and we cannot exclude that the presence of magnetite could be due to an oxidation of GR1<sub>bio</sub> exposed to ambient air before the Mössbauer analysis. GR1<sub>ab</sub> was not characterized by TMS, and its ratio Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> was determined by colorimetry (Ferrozine) on the solid phase.

		$\delta$ ( $0.11 \pm 4 \text{ mm s}^{-1}$ )	$\Delta \text{ or } 2\varepsilon$ ( $\text{mm s}^{-1}$ )	$H$ (kOe)	$RA$ (%)
GR1 <sub>bio</sub>	D <sub>1</sub> (Fe <sup>II</sup> <sub>GR</sub> )	1.25	2.13		22.6%
	D <sub>2</sub> (Fe <sup>II</sup> <sub>GR</sub> )	1.24	2.64		26.1%
	D <sub>3</sub> (Fe <sup>III</sup> <sub>GR</sub> )	0.42	0.51		30.4%
	Fe <sup>II</sup> /Fe <sup>III</sup> = 1.6				
	S <sub>1</sub> (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ?)	0.69	-0.19	523	
	S <sub>2</sub> (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ?)	0.24	0.25	493	
	S <sub>3</sub> (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ?)	1.72	0.21	383	
S <sub>4</sub> (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ?)	0.33	0.56	267		
GR1 <sub>ab+P</sub>	D <sub>1</sub> (Fe <sup>II</sup> <sub>GR</sub> )	1.10	2.93		28%
	D <sub>2</sub> (Fe <sup>II</sup> <sub>GR</sub> )	0.25	0.36		45%
	D <sub>3</sub> (Fe <sup>III</sup> <sub>GR</sub> )	1.10	2.57		27%
Fe <sup>II</sup> /Fe <sup>III</sup> = 1.2					
GR2 <sub>ab</sub>	D <sub>1</sub> (Fe <sup>II</sup> <sub>GR</sub> )	1.31	2.91		66%
	D <sub>2</sub> (Fe <sup>II</sup> <sub>GR</sub> )	0.49	0.47		34%
Fe <sup>II</sup> /Fe <sup>III</sup> = 2.0					
GR1 <sub>ab</sub>		ND	ND	ND	2.2*

$\delta$  ( $\text{mm s}^{-1}$ ) isomer shift with respect to metallic  $\alpha$ -iron at room temperature;  $\Delta$  or  $2\varepsilon$  ( $\text{mm s}^{-1}$ )

quadrupole splitting;  $H$  (kOe) hyperfine field; RA, relative abundance.

\*determined by ferrozine measurement.

Table S4. Values of pH for batch experiments (n=2) before (initial pH) and after 60 min of incubation (final pH) with  $\text{Hg}^{\text{II}}$ .

Batch experiment	Initial pH	final pH
$\text{SnCl}_2$	2.4	2.4
$\text{GR2}_{\text{ab}}$	$7.0 \pm 0.2$	$6.6 \pm 0.1$
	$8.0 \pm 0.1$	$7.2 \pm 0.1$
	$9.5 \pm 0.1$	$8.9 \pm 0.3$
$\text{GR2}_{\text{ab+cells}}$	$7.0 \pm 0.1$	$6.5 \pm 0.1$
$\text{GR1}_{\text{bio}}$	$7.0 \pm 0.1$	$7.2 \pm 0.3$
	8.1	8.0
	$9.5 \pm 0.1$	$9.0 \pm 0.6$
$\text{GR1}_{\text{ab}}$	$8.2 \pm 0.1$	$9.0 \pm 0.1$
$\text{GR1}_{\text{ab+P}}$	$7.0 \pm 0.1$	$7.6 \pm 0.3$
	$8.0 \pm 0.1$	$8.0 \pm 0.2$
	$9.5 \pm 0.1$	$8.8 \pm 0.3$
$\text{Fe}^{\text{II}}$ (2mM)	$3.3 \pm 0.1$	$3.5 \pm 0.1$

Note S1. Calculation of  $k_s$  ( $\text{L m}^{-2} \text{min}^{-1}$ ) =  $k_{\text{obs}}$  normalized to specific surface area (SSA)

$$k_s = k_{\text{obs}} / ([\text{GR}] \times \text{MW}_{\text{GR}} \times \text{SA}_{\text{GR}})$$

Where

$[\text{GR}]$  is the GR concentration =  $500 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

$\text{MW}_{\text{GR}}$  is the molecular weight of GR ( $652.8 \text{ g mol}^{-1}$  and  $778.8 \text{ g mol}^{-1}$  for GR1 and GR2, respectively)

$\text{SA}_{\text{GR}}$  is the surface area of GR involved in the reaction ( $\text{m}^2 \text{ L}^{-1}$ )

Note S2. Calculation of structural  $\text{Fe}^{\text{II}}$

$$[\text{Fe}^{\text{total}}] = [\text{Fe}^{\text{II}}] + [\text{Fe}^{\text{III}}] = [\text{GR}] \times 6$$

$$[\text{Fe}^{\text{II}}] / [\text{Fe}^{\text{III}}] = \text{Mössbauer ratio}$$

*e.g.* GR1<sub>ab+P</sub>

$$[\text{Fe}^{\text{II}}] = 1.2 \times [\text{Fe}^{\text{III}}]$$

$$1.2 \times [\text{Fe}^{\text{III}}] + [\text{Fe}^{\text{III}}] = [\text{Fe}^{\text{total}}]$$

$$[\text{Fe}^{\text{III}}] = [\text{Fe}^{\text{total}}] / 2.2$$

$$[\text{Fe}^{\text{II}}] = [\text{Fe}^{\text{total}}] - [\text{Fe}^{\text{total}}] / 2.2 = 1.63 \text{ mM}$$

$$[\text{Fe}^{\text{II}}]_{\text{GR1}_{\text{ab+P}}} = 1.63 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$[\text{Fe}^{\text{II}}]_{\text{GR1}_{\text{bio}}} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$[\text{Fe}^{\text{II}}]_{\text{GR2}_{\text{ab}}} = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$$

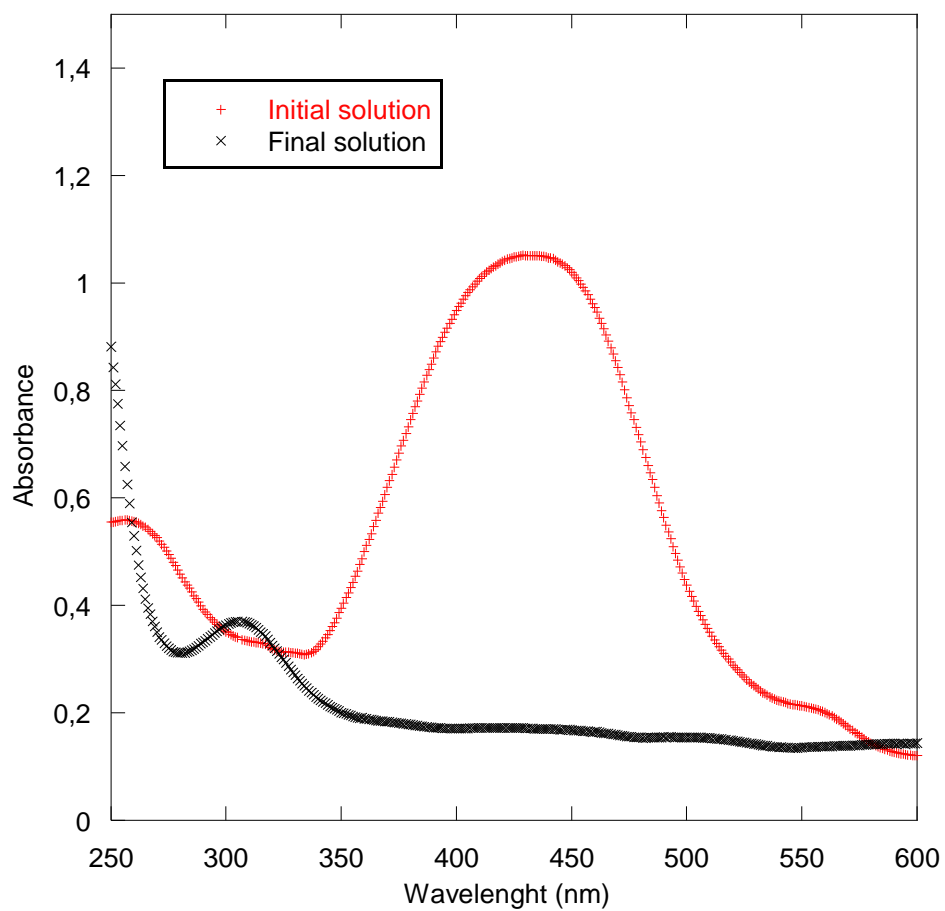
$$[\text{Fe}^{\text{II}}]_{\text{GR1}_{\text{ab}}} = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$$

Note S3. Calculation of  $k_{\text{FeII}}$  ( $\text{L mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) =  $k_{\text{obs}}$  normalized to the structural  $\text{Fe}^{\text{II}}$  concentration

$$k_{\text{FeII}} = k_{\text{obs}} / [\text{Fe}^{\text{II}}]_{\text{GR}}$$

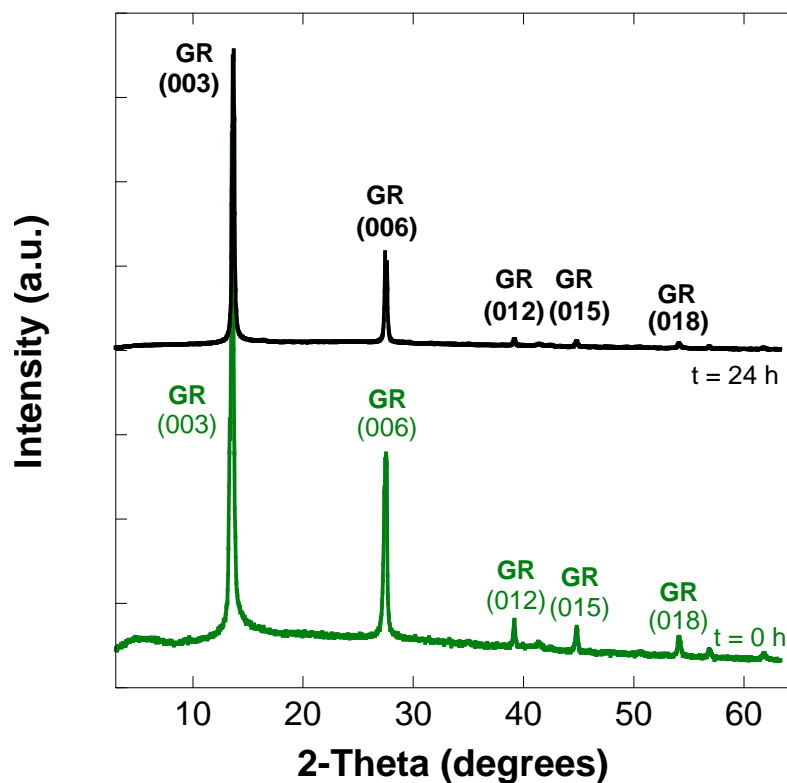
Where

$[\text{Fe}^{\text{II}}]_{\text{GR}}$  is the structural  $\text{Fe}^{\text{II}}$  concentration ( $\text{mol L}^{-1}$ )

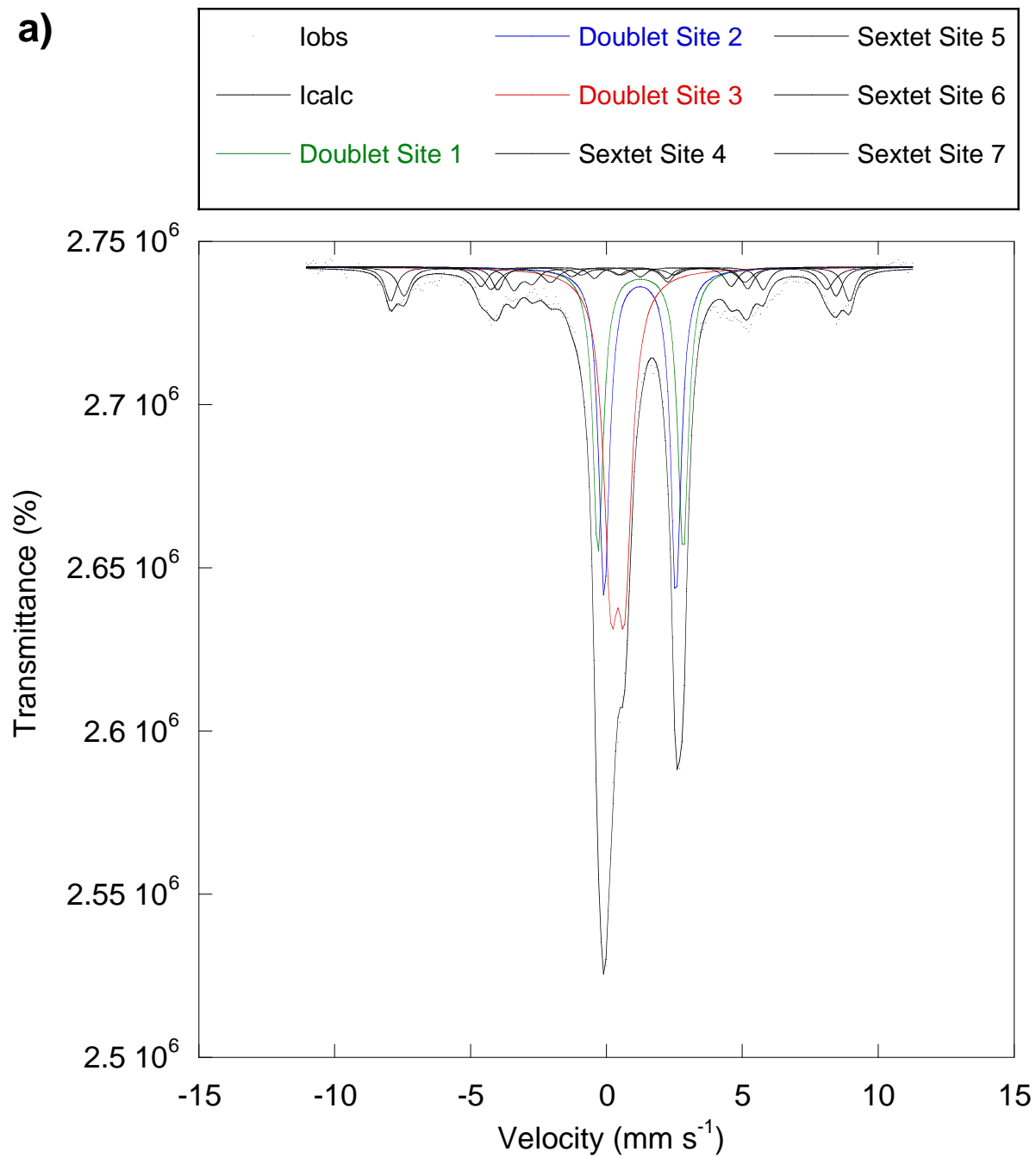


**Figure S1.** UV-Vis spectra of initial MR solution (+) and the same solution after 300 min of incubation with 500  $\mu$ M GR2<sub>ab</sub> (x).

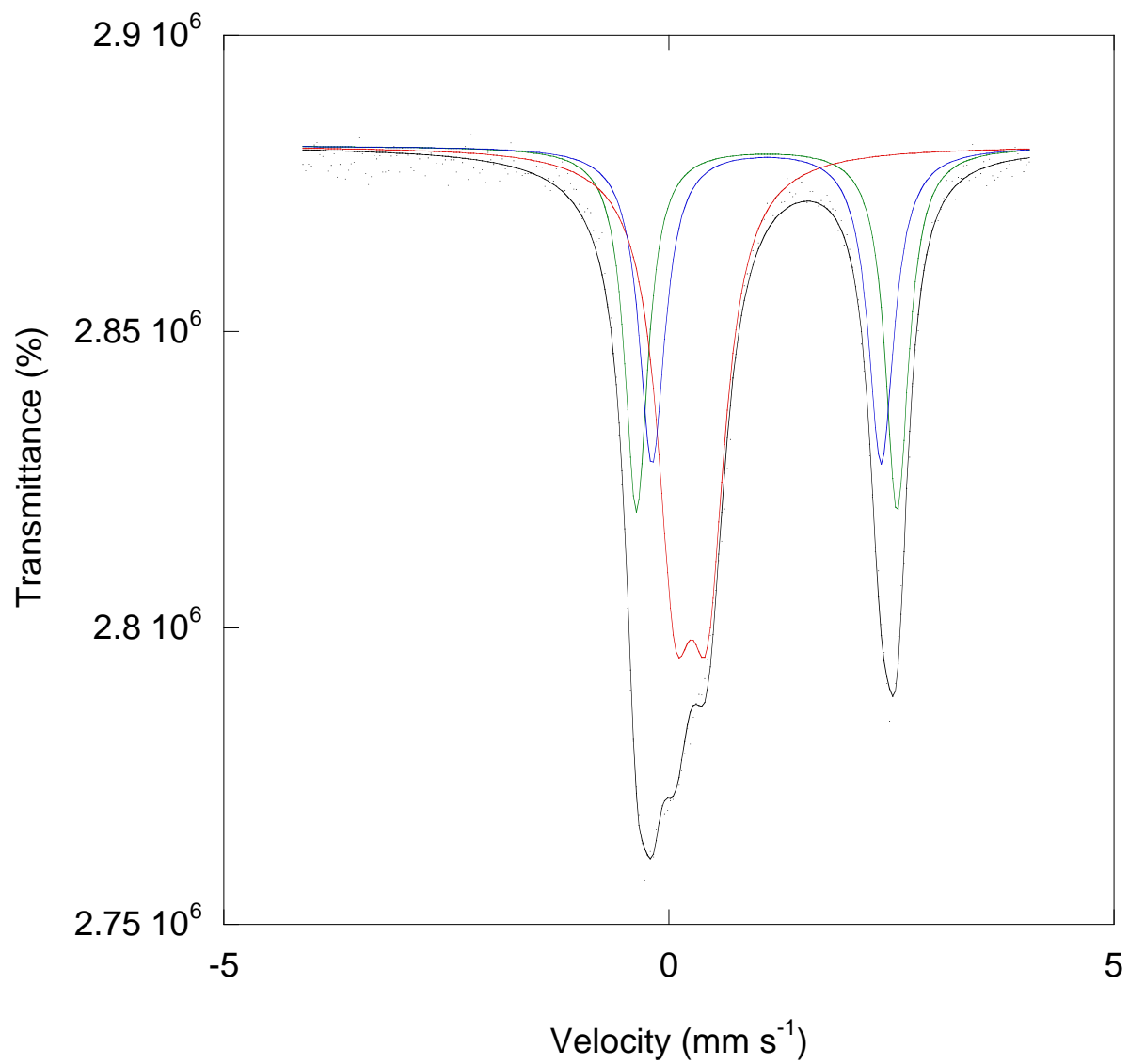
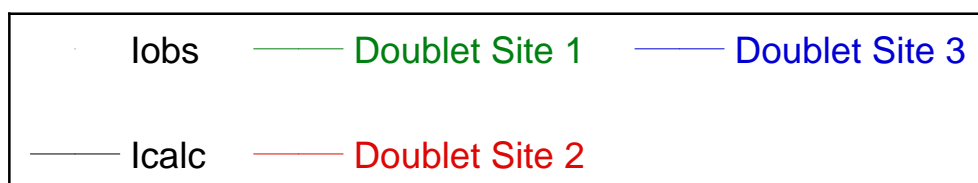




**Figure S2.** X-ray diffractograms of biologically synthesized hydroxycarbonate green rust (GR1<sub>bio</sub>) before addition of Hg<sup>II</sup> at the concentration of 5  $\mu$ M (green line, t = 0 h), and 24 h after (black line, t = 24 h). The initial concentration of GR1<sub>bio</sub> was 400  $\mu$ M. The lattice planes of green rust (GR) are written in brackets. The intensity is expressed in arbitrary unit (a. u.).



b)



c)

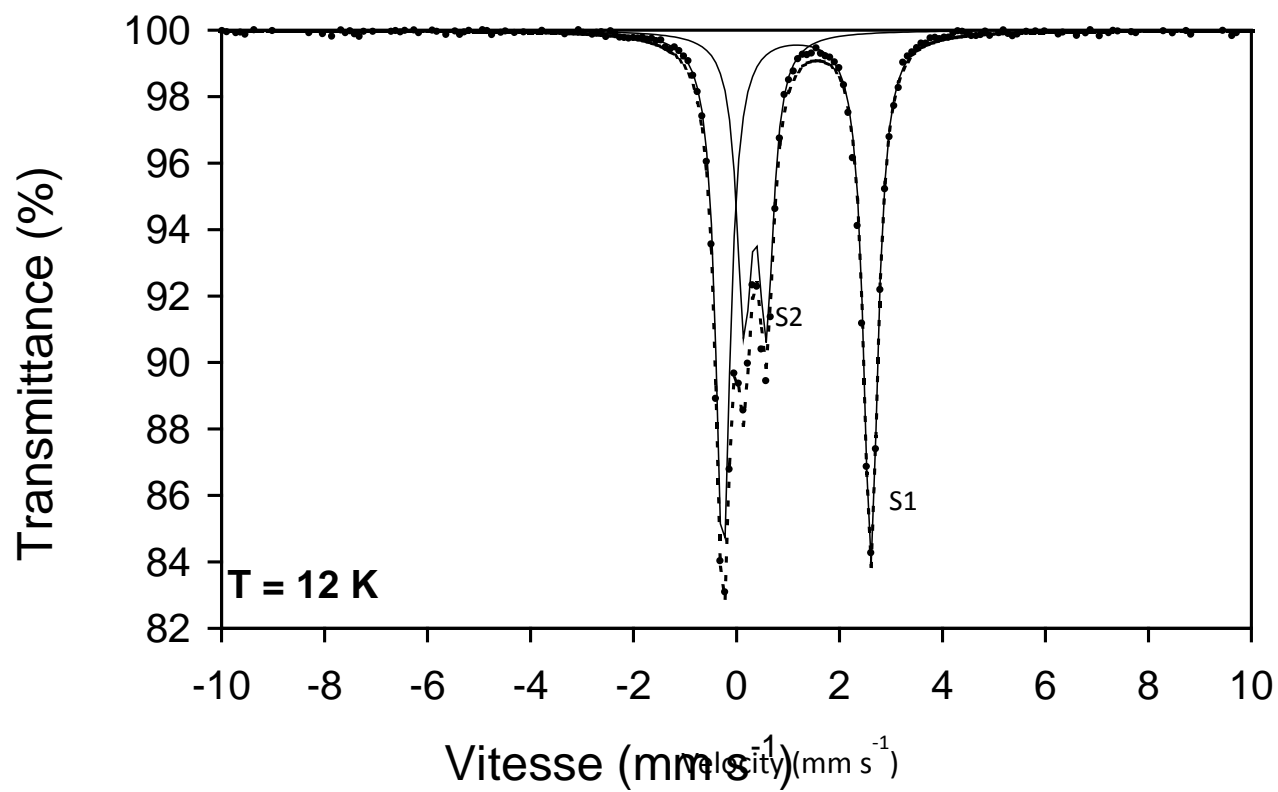
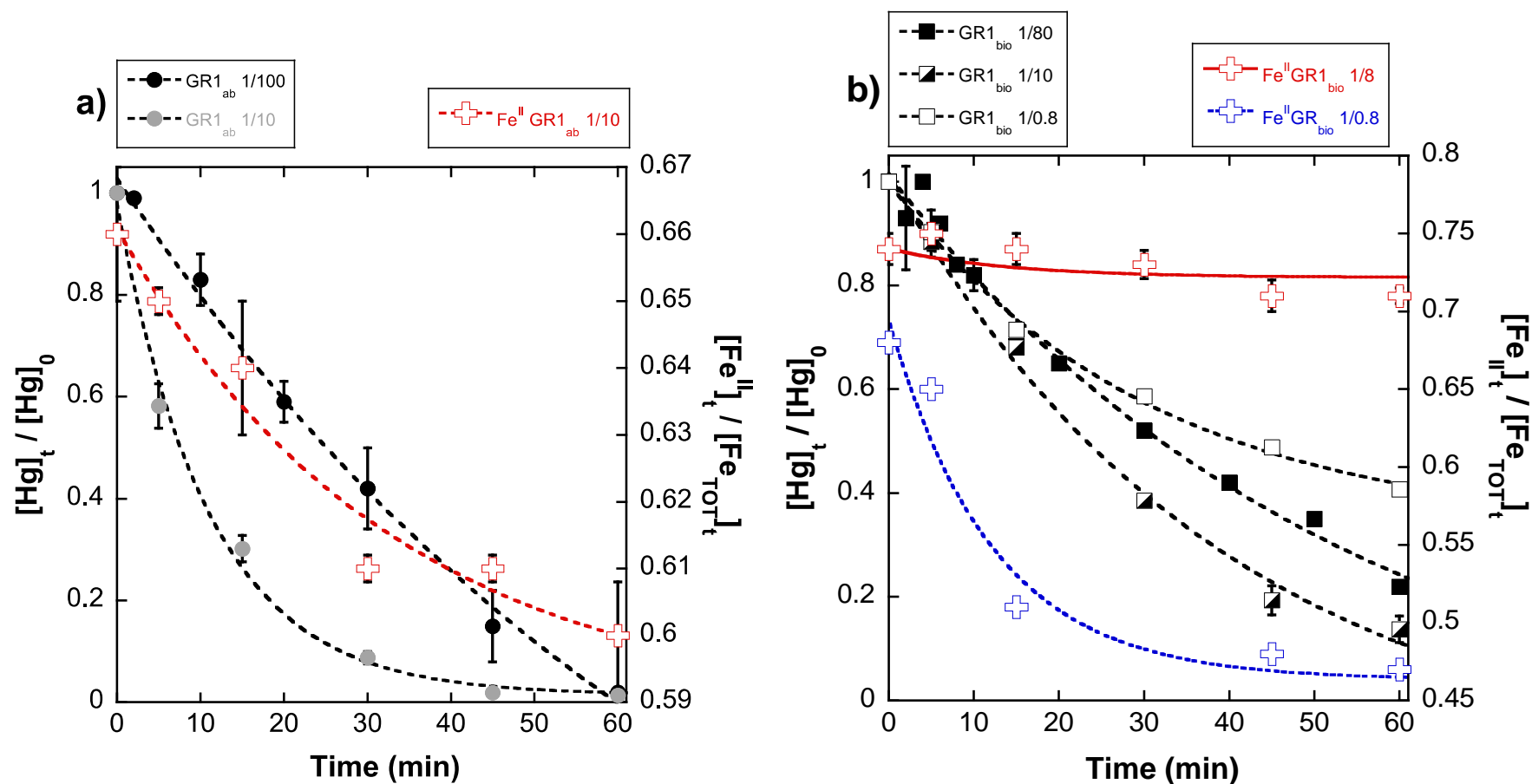
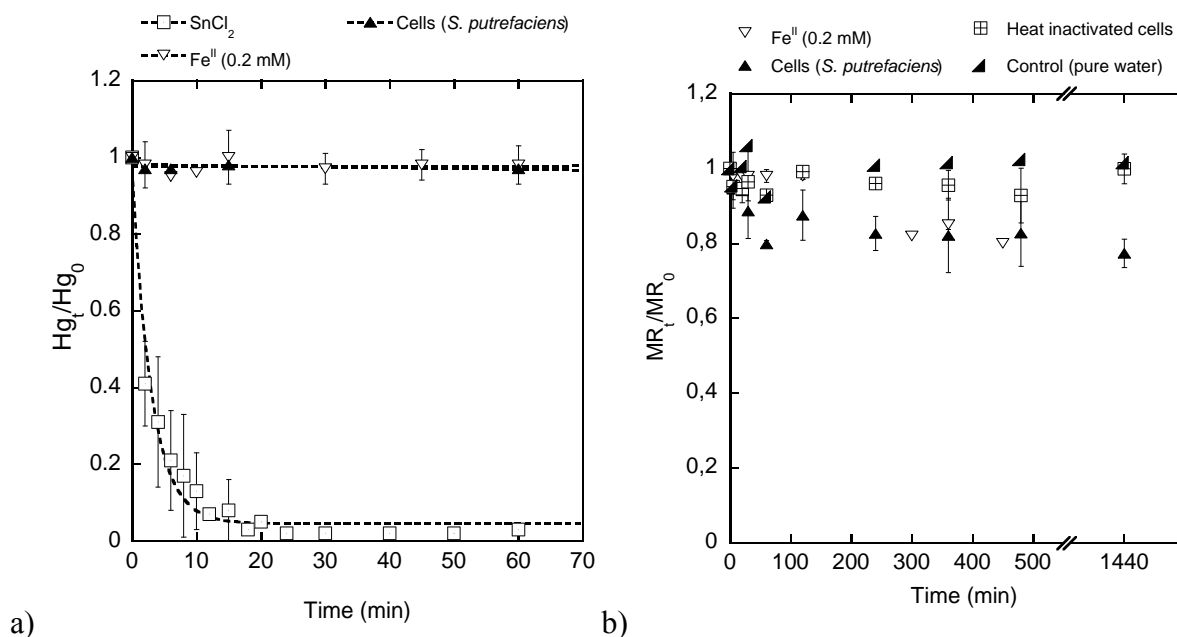


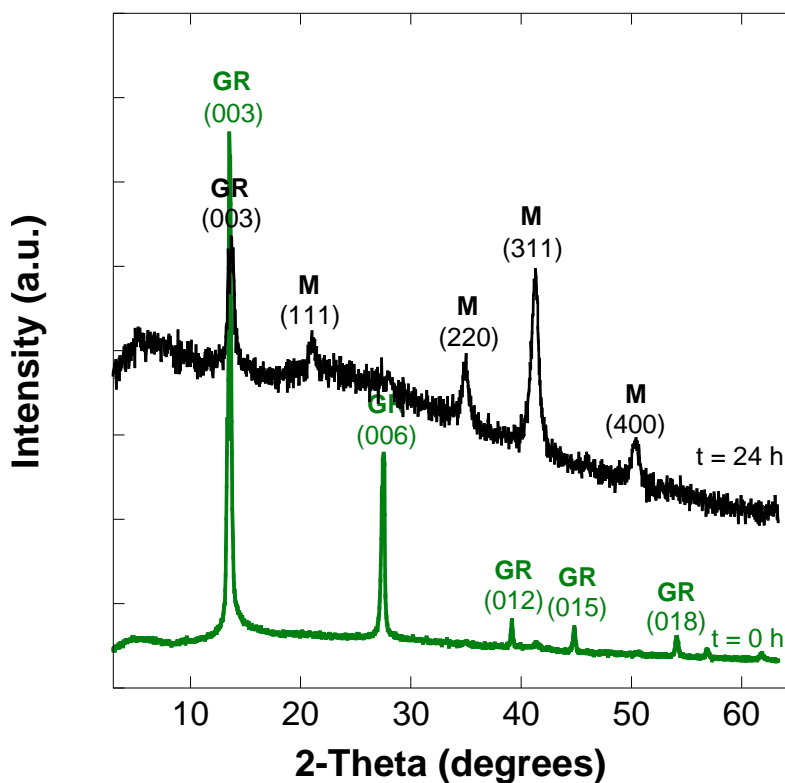
Figure S3. Mössbauer spectra of a) GR1<sub>bio</sub>, b) GR1<sub>ab+P</sub>, and c) GR2<sub>ab</sub>.



**Figure S4.** Removal of mercury and oxidation of ferrous iron content of chemically synthesized green rust (GR1<sub>ab</sub>, a) and biologically formed green rust (GR1<sub>bio</sub>, b) over the time at pH 8.2. The initial concentration of Hg<sup>II</sup> species was 5  $\mu\text{M}$  and the initial concentrations of green rusts used were 4  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$  for GR1<sub>bio</sub>, and 50  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  for GR1<sub>ab</sub>. The Hg<sup>II</sup>/GR ratios were 1/0.8, 1/8, 1/80 and 1/10, 1/100 respectively. Error bars were drawn for two independent assays.



**Figure S5.** (a): Disappearance of mercury over time in the presence of 50  $\mu M$   $Sn^{II}$  (pH  $3.0 \pm 0.5$ ), and 0.2 mM aqueous  $Fe^{II}$  (pH  $7.0 \pm 0.1$ ) or  $6 \times 10^5$  cells  $mL^{-1}$  of *Shewanella putrefaciens* (pH  $7.0 \pm 0.1$ ) (cells), a cell density that is equivalent to that used for the synthesis of  $GR_{bio}$  and that is expected to remain with  $GR1_{bio}$ . The changes in pH after a 60 h incubation time period are reported in Table S7. Bars are the errors of two independent experiments. The stannic solution ( $SnCl_2$ , 50  $\mu M$  pH = 3) was prepared from a stock solution (22.5 mM in HCl 1.5 M) ( $SnCl_2$  salt, 98% anhydrous, 196981000, Acros). It was used as an indicator for  $Hg^{II}$  reduction, since  $Sn^{II}$  is known to be a powerful reducer (Zheng and Hintelmann, 2010). In order to avoid  $Sn^{II}$  precipitation, which can occur along with increasing pH,  $Hg^{II}$  reduction by aqueous  $Sn^{II}$  were only performed at pH 3. (b): Disappearance of methyl red (MR) over time in the presence of 0.2 mM aqueous  $Fe^{II}$  (pH 7.0),  $6 \times 10^5$  cells  $mL^{-1}$  of a fresh *S. putrefaciens* suspension (cells) or heat inactivated cells (dead Sp cells), or a solution of MR in pure water.



**Figure S6.** X-ray diffractograms of biologically synthesized hydroxycarbonate green rust (GR1<sub>bio</sub>) before addition of Hg<sup>II</sup> at the concentration of 5  $\mu$ M (green line,  $t = 0$  h), and 24 h after (black line,  $t = 24$  h). The initial concentration of GR1<sub>bio</sub> was 4  $\mu$ M. The green rust (GR) was oxidized into magnetite (M) during the reduction of mercury. The lattice planes are written in brackets. The intensity is expressed in arbitrary unit (a. u.).







---

## RESUME

La formation de monométhylmercure, la forme la plus toxique du mercure dans les écosystèmes aquatiques, est principalement due à l'activité bactérienne anaérobie mais de nombreuses questions restent en suspens quant aux rôles exacts des groupes métaboliques impliqués. Afin de connaître la contribution relative des compartiments microbiens (biofilms, matières en suspension dans l'eau brute, sédiments de surface) dans la méthylation du mercure, nous avons évalué les vitesses de méthylation (pourcentage de  $Hg_{inorg}$  méthylé par cellule et par jour) d'échantillons provenant de mares dulcicoles de région tempérée (Lorraine) et de mares thermokarstiques subarctiques (Nunavik, Québec). Par ailleurs, nous avons étudié l'influence de certains constituants du biofilm (polymères bactériens extracellulaires, (bio)-minéraux) sur la méthylation du mercure. Si les cellules bactériennes des biofilms étudiés ne semblent pas significativement plus méthylantes que d'autres, celles des sédiments de surface apparaissent par contre comme le compartiment contribuant majoritairement à la méthylation du mercure. Celle-ci est reliée à la concentration en carbone organique ainsi qu'à la température d'incubation, en revanche, plus la concentration en  $Hg_{inorg}$  est élevée, plus la vitesse de méthylation diminue. Par ailleurs, les groupes métaboliques ferriréducteurs et sulfatoréducteurs ont été identifiés comme étant impliqués dans la méthylation du mercure en couplant une approche métabolique (utilisation d'inhibiteurs spécifiques de croissance) à la recherche de séquences du gène *hgcA* et à l'analyse de leur diversité. Enfin, nous avons montré que l'activité ferriréductrice des biofilms environnementaux étudiés est susceptible de produire un hydroxysel  $Fe^{II}-Fe^{III}$  : la rouille verte. Malgré la présence des polymères extra-cellulaires associés à la rouille verte « biologique », celle-ci est capable de réduire  $Hg^{II}$  en  $Hg^0$  et est ainsi susceptible d'entrer en compétition avec la méthylation du mercure.

**Mots clés** : méthylation du mercure ; mare thermokarstique ; biofilm ; bactéries ferriréductrices ; bactéries sulfatoréductrices ; rouille verte.

## SUMMARY

Monomethylmercury formation, the neurotoxic form of mercury in aquatic ecosystems, is mainly linked to anaerobic microbial activity. In order to assess the relative contribution of several microbial compartments (biofilms, suspended matters in raw water, and surface sediment) we evaluated methylation rates (methylated  $Hg_{inorg}$  cell<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> % of total  $Hg_{inorg}$ ) of samples from ponds of temperate area (Lorraine, France) and from subarctic thermokarst ponds (Nunavik, Quebec). Moreover, the influence of some biofilm components (extracellular polymers, "bio"minerals) on the mercury methylation was studied. Biofilms were not found to specifically promote mercury methylation, whereas surface sediment emerges as the main compartment involved in mercury methylation. The formation of methylmercury is positively linked to the temperature and to the organic carbon concentration whereas it is negatively related with the  $Hg_{inorg}$  concentration. Iron reducing and sulfate reducing metabolisms were identified as active methylators by coupling the research of *hgcA* sequences and determination of their diversity with a metabolic approach (use of specific inhibitors). Finally, the reactivity of green rust, a biomineralized  $Fe^{II}-Fe^{III}$  hydroxysalt which can be produced by iron reducing activity of environmental biofilms, may compete with mercury methylation by reducing  $Hg^{II}$  into  $Hg^0$ , despite the presence of bacterial polymers surrounding and stabilizing biogenerated green rust.

**Keywords**: mercury methylation, thermokarst pond, biofilm, iron reducing bacteria, sulfate reducing bacteria, green rust.