

**Titre:** Vérification d'une méthode pour évaluer la méthylation du mercure  
Title: par des bactéries indigènes

**Auteur:** France Gaudreault  
Author:

**Date:** 1989

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Gaudreault, F. (1989). Vérification d'une méthode pour évaluer la méthylation du  
Citation: mercure par des bactéries indigènes [Mémoire de maîtrise, Polytechnique  
Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/58232/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/58232/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de  
recherche:**  
Advisors:

**Programme:** Non spécifié  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

VÉRIFICATION D'UNE MÉTHODE POUR ÉVALUER  
LA MÉTHYLATION DU MERCURE PAR DES BACTÉRIES INDIGÈNES

Par

FRANCE GAUDREULT  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CIVIL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU GRADE DE MAÎTRE ES SCIENCES APPLIQUÉES (M.Sc.A.)

Mai 1989

© France Gaudreault 1989

National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Canadian Theses Service    Service des thèses canadiennes

Ottawa, Canada  
K1A 0N4

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-52721-8

Ce mémoire intitulé:

VÉRIFICATION D'UNE MÉTHODE POUR ÉVALUER  
LA MÉTHYLATION DU MERCURE PAR DES BACTÉRIES INDIGÈNES

présenté par : France GAUDREAU

en vue de l'obtention du grade de : Maîtrise en sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:

M. Luc BOIS, S.M., président

M. Claude E. DELISLE, Ph.D.

Mme. France Gamache, M.Sc.

## SOMMAIRE

Des recherches signalent que des bactéries provenant de sédiments de la rivière Saint-Louis à Beauharnois (Québec) transforment en moyenne 15% du mercure ajouté sous forme inorganique (chlorure de mercure) en mercure organique. L'objectif de la présente étude vise à vérifier cette donnée en suivant la même méthodologie que Richards (1983).

Des sédiments ont été prélevés de la rivière Saint-Louis à Beauharnois afin d'isoler des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux. Après avoir été identifiés, les microorganismes furent soumis à une épreuve de résistance au mercure. Onze colonies résistantes furent utilisées pour vérifier leur production en mercure organique dans des milieux de culture incubés à 35°C pendant 48 heures. Après avoir été inoculés de formol, les échantillons ont été congelés jusqu'à leur analyse pour le mercure. Le mercure, total et inorganique, a été dosé par la méthode d'absorption atomique sans flamme. Le mercure organique fut obtenu en soustrayant le mercure inorganique du mercure total.

La majorité des bactéries de cette présente étude ont été résistantes à 50 mg/L de mercure. Aucune production en mercure organique n'a pu être observée. Les échantillons ont accusé des pertes en mercure total variant de 33 à 48% du mercure ajouté pour les échantillons soumis à l'essai de production de mercure organique. Ces

pertes étaient principalement causées par l'étape de l'incubation à 35°C pendant 48 heures.

La méthode de dosage du mercure n'aurait pas été adéquate pour mesurer une production plus faible que 15% en mercure organique parce que sa précision se situait entre 10,3 et 13,5% pour la concentration de mercure analysée.

## ABSTRACT

Research has shown that bacteria originating from sediment in the Saint-Louis River, in Beauharnois (Québec), transformed on average 15% of the inorganic mercury (mercury chloride) added to the water into organic mercury. The purpose of this study is to verify this result by following the same methodology employed by Richards (1983).

Samples were taken of the sediment in the Saint-Louis River in Beauharnois in order to isolate the total coliform bacteria, the fecal coliform bacteria and the fecal streptococci. After they were identified, the microorganisms were tested for their resistance to mercury. Eleven resistant colonies were used to verify their production of organic mercury in a culture medium incubated at 35 degrees Celsius for 48 hours. The samples were inoculated with formol and then frozen until they could be analyzed for mercury. The total mercury and inorganic mercury were gauged by means of the flameless atomic absorption method. The organic mercury was obtained by subtracting the inorganic mercury from the total mercury.

Most of the bacteria in this study were resistant to 50 mg/l of mercury. No organic mercury production was observed. The samples lost between 33% and 48% of the added mercury when subjected to the organic mercury production test. These losses were mostly caused by the incubation phase at 35 degrees Celsius for 48 hours.

The mercury dosing method would not have been adequate to measure production of less than 15% organic mercury as its precision ranged between 10,3% and 13.5% for the concentration of mercury analyzed.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes deux directeurs, messieurs Claude E. Delisle et Arnold J. Drapeau, pour leur aide précieuse.

Merci également à toute l'équipe du Laboratoire de Santé publique du Québec situé à Sainte-Anne-de-Bellevue, spécialement à messieurs Normand Lambert, Stephen Lapierre et Jean Rochefort ainsi qu'à tous les autres qui m'ont aidée.

Cette recherche a été en partie réalisée grâce à l'appui financier de l'école Polytechnique de Montréal et de l'Association des diplômés de Polytechnique. Je les remercie.

Merci enfin à Linda Grabosky pour la dactylographie de ce texte.

## TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
SOMMAIRE . . . . .	iv
ABSTRACT . . . . .	vi
REMERCIEMENTS . . . . .	viii
LISTE DES TABLEAUX . . . . .	xiii
LISTE DES FIGURES . . . . .	xv
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION . . . . .	1
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES . . . . .	6
2.1 Échantillonnage . . . . .	6
2.1.1 Description du site . . . . .	6
2.1.2 Méthode de prélèvement . . . . .	8
2.2 Isolement des microorganismes . . . . .	9
2.3 Identification des microorganismes . . . . .	10
2.4 Épreuve de résistance des microorganismes au chlorure mercurique (HgCl <sub>2</sub> ) . . . . .	10
2.5 Conservation des souches . . . . .	13

## TABLE DES MATIERES (suite)

	<u>Page</u>
2.6 Essai de production de mercure organique . . . . .	13
2.6.1 Choix des souches . . . . .	13
2.6.2 Incubation des microorganismes en présence du $HgCl_2$ . . . . .	14
2.7 Dosage du mercure dans les cultures bactériennes . . . . .	16
2.7.1 Description de l'appareillage utilisé . . . . .	16
2.7.2 Fiabilité de la méthode . . . . .	17
2.7.2.1 Précision et exactitude . . . . .	17
2.7.2.2 Limite de détection . . . . .	18
2.7.3 Mode opératoire pour le dosage du mercure dans les échantillons . . . . .	18
2.7.4 Calcul et expression des résultats . . . . .	19
2.7.5 Réactifs . . . . .	19
2.7.6 Vérification de la méthode de digestion . . . . .	20
2.8 Recherche des causes des pertes de mercure . . . . .	21
2.8.1 Effets de l'incubation sur la récupération de mercure . . . . .	22
2.8.2 Effet du formol sur la récupération du mercure dans les échantillons . . . . .	23
2.8.3 Vérification de l'adsorption sur les parois du verre . . . . .	25

## TABLE DES MATIERES (suite)

	<u>Page</u>
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS . . . . .	27
3.1 Dénombrement des coliformes totaux, coliformes fécaux et streptocoques fécaux dans les sédiments . . . . .	27
3.2 Identification des microorganismes . . . . .	27
3.3 Résistance des microorganismes au chlorure mercurique . . .	28
3.4 Dosage du mercure dans les cultures bactériennes . . . . .	33
3.5 Vérification de la méthode de digestion . . . . .	34
3.6 Effet de l'incubation sur la récupération de mercure . . .	39
3.7 Effet du formol sur la récupération de mercure . . . . .	40
3.8 Adsorption sur les parois du verre . . . . .	42
CHAPITRE 4 : DISCUSSION . . . . .	43
4.1 Échantillonnage . . . . .	43
4.2 Résistance des microorganismes au chlorure mercurique . . .	43
4.3 Essai de production de mercure organique . . . . .	47
4.4 Dosage du mercure dans les cultures bactériennes . . . . .	54
4.5 Vérification des pertes de mercure . . . . .	57

## TABLE DES MATIERES (suite)

	<u>Page</u>
CHAPITRE 5 : CONCLUSION . . . . .	61
CHAPITRE 6 : RECOMMANDATIONS . . . . .	64
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES . . . . .	66

## LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau</u>		<u>Page</u>
3.1	Nombre de coliformes totaux, coliformes fécaux et streptococques fécaux dans les sédiments . . . . .	27
3.2	Nombre de souches isolées de chaque genre ou espèce . . . . .	28
3.3	Résistance des souches à l'ion $Hg^{++}$ selon la méthode de Richards (1983) modifiée . . . . .	29
3.4	Résistance des souches à l'ion $Hg^{++}$ - Résultats Richards (1983) . . . . .	30
3.5	Résistance des souches à l'ion $Hg^{++}$ selon la méthode en tubes . . . . .	31
3.6	Souches choisies pour vérifier leur production de mercure organique à partir de chlorure mercurique . . . . .	33
3.7	Dosages obtenus à différentes durées de digestion . . . . .	35

## LISTE DES TABLEAUX (suite)

<u>Tableau</u>		<u>Page</u>
3.8	Récupération du mercure dans les échantillons après l'incubation . . . . .	40
3.9	Comparaison de la récupération du mercure pour des échantillons formolés vs acidifiés . . . . .	41
4.1	Effet de l'aérobiose et de la l'anaérobiose sur la production de méthyl-mercure par <u>E. aerogenes</u> incubé à 37°C dans un milieu de culture contenant 30 ug de Hg <sup>++</sup> par mL . . . . .	51
4.2	Taux de méthylation du mercure observés en aérobie et en anaérobie . . . . .	52
4.3	Méthodes d'analyse du mercure lors des expériences sur la méthylation . . . . .	56

LISTE DES FIGURES

<u>Figure</u>		<u>Page</u>
2.1	Plan du site étudié . . . . .	7
3.1	Hauteurs de pics obtenues à différentes températures de digestion - Niveau 1 ug . . . . .	36
3.2	Hauteurs de pics obtenues à différentes températures de digestion - Niveau 3 ug . . . . .	37
4.1	Effet de la température sur la méthylation du mercure . . . . .	49

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

Dans la Baie de Minamata au Japon, entre 1953 et 1975, 864 personnes ont été empoisonnées dont 155 sont décédées. Ce n'est qu'en 1958 que des chercheurs sont parvenus à faire le lien entre la maladie de Minamata et la consommation de poissons contaminés par le méthyl-mercure (M<sup>C</sup>Alpine et Arake, 1958). Sous cette forme méthylée, le mercure trouvé dans les poissons est de 50 à 100 fois plus toxique pour les consommateurs que le mercure inorganique (Chakrabarty, 1982).

En 1969, Jensen et Jernelov ont proposé un mécanisme biologique pour la transformation du mercure ionique ou minéral en méthyl-mercure. Après avoir été méthylé par les microorganismes contenus dans les sédiments, le méthyl-mercure est absorbé par les poissons et accumulé dans la chaîne alimentaire.

Au Canada, la principale source de mercure dans l'environnement provient des usines de chloralcali (chlore et soude caustique) (Coallie et al., 1976). Une de ces usines, la Pittsburg Paint and Glass (PPG) autrefois connue sous le nom de la Standard Chemical, a déversé entre 1949 et 1976, 46,6 tonnes métriques de mercure dans l'eau de la rivière Saint-Louis à Beauharnois (Québec) (Sérodès et Talbot, 1980). De ces 46,6 tonnes, on estime que près des deux tiers sont accumulés dans les

sédiments du sud du lac Saint-Louis dans la région des Iles de la Paix. Du tiers restant, une partie se trouve dans les sédiments de la rivière Saint-Louis, mais également dans les sédiments dragués en 1971 par l'Hydro-Québec et déposés dans une zone confinée appelée "bassion 5B9". Toujours selon Sérodes et Talbot (1980), le lieu où les sédiments sont les plus contaminés (100 mg/Kg) se situe entre l'usine et le barrage Howard Smith. Delisle et al. (1981) ont également étudié les métaux lourds dans les sédiments de cette région du lac Saint-Louis.

Depuis 1985, la PPG possède une usine d'épuration qui traite toute l'eau usée produite par l'usine ainsi que l'eau provenant de tranchées d'interception de l'eau de ruissellement autour du site. D'après monsieur Denis Faucher, responsable des questions environnementales à la PPG, la concentration en mercure de l'effluent de l'usine est de 1 à 2 ug/L à un débit de 100 à 120 gallons par minute. Même si la PPG a réduit de beaucoup ses rejets de mercure dans la rivière Saint-Louis, il n'en demeure pas moins que le mercure accumulé depuis 1949 est toujours présent puisque la disparition des effets du mercure dans les sédiments peut prendre jusqu'à 100 ans. De plus, l'on apprenait récemment par les journaux que la PPG était toujours responsable de déversements de mercure à Beauharnois.

Une accumulation massive de mercure dans les sédiments devrait favoriser une sélection positive du caractère de résistance au mercure

pour les bactéries de la flore benthique. De plus, Olson et al. (1979) ont prouvé que la résistance au mercure est due à des plasmides et est transmissible génétiquement.

En 1973, Vonk et Sijpersteijn observaient que toutes les cultures bactériennes et fongiques qui sont mises en présence de mercure ionique produisent du méthyl-mercure dans des proportions de 0,0015% à 0,0068%. La méthylation du mercure par Clostridium cochlearium dans un milieu de culture incubé en anaérobiose avait été prouvée par Yamada et Tonomura (1972) car ils observaient que 1,2% du mercure ajouté sous forme de chlorure de mercure était transformé en méthyl-mercure. Rowland et al. (1975) affirment que des bactéries intestinales humaines peuvent méthyler jusqu'à 0,3% du mercure ajouté sous forme inorganique dans un milieu de culture. Handy et Noyes (1975) obtiennent des taux de méthylation pour des bactéries incubées dans des milieux de culture en anaérobiose de 1,31% et en aérobie de 1,44%.

Une grande partie des études de méthylation sont effectuées à partir de sédiments. Les taux maximaux de méthylation observés dans ce type d'étude vont de 0,08% (Baker et al., 1983) à 2,5% (Steffan et al., 1988) pour des sédiments incubés en aérobie alors que les taux obtenus pour des sédiments incubés en anaérobiose vont de 0,53% (Olson et Cooper, 1976) à 3,6% (Callister et Winfrey, 1986).

Richards (1983) a observé des pourcentages dont les valeurs moyennes de méthylation étaient de 15,25% pour l'ensemble des souches qu'il a isolées des sédiments de la rivière Saint-Louis et du lac Saint-Louis. Ces résultats sont beaucoup plus élevés que ce que rapportent tous les autres auteurs. On peut penser que pour des souches bactériennes mises en présence de mercure depuis bon nombre d'années, le caractère de résistance a été sélectionné, favorisant, par le fait même, un processus accru de méthylation du mercure.

Le but de la présente étude est de vérifier les résultats de Richards (1983) concernant la méthylation du mercure par des bactéries indigènes en suivant la même méthodologie. Pour ce faire, des bactéries ont été isolées des sédiments provenant du site le plus contaminé de la rivière Saint-Louis, c'est-à-dire à environ 10 mètres en aval de l'effluent de l'usine PPG. A titre de comparaison, des sédiments qui n'ont jamais été en contact avec l'effluent de l'usine (500 m en amont) ont été échantillonnés.

Cependant, certaines modifications ont été apportées à la méthode. Les techniques d'ensemencement des plaques de gélose et des bouillons de culture ont été ~~standardisées~~ de façon à les rendre reproductibles. De plus, le montage pour le dosage à l'absorption atomique a été modifié de trois façons. Premièrement, pour des raisons de sécurité, des bouteilles à DBO (250 mL) ont été utilisées pour les réactions

plutôt que des tubes (plus versant). Deuxièmement, pour éviter des pertes de mercure, les bouteilles à réaction ont été incluses dans le circuit de volatilisation avant l'ajout des réactifs. Et finalement, pour éviter les interférences causées par les vapeurs d'eau, un tube à dessécher a été ajouté au circuit de volatilisation. La vérification des résultats implique évidemment une vérification de la procédure. C'est pourquoi, plusieurs contrôles ont été incorporés: tubes témoins sans bactéries, échantillons acidifiés à l'acide chlorhydrique plutôt que formolés.

La méthode sur la gélose pour déterminer la résistance présentant des risques d'évaporation ou de dilution du mercure, une méthode en tube a été effectuée à titre de comparaison. De plus, l'étape de la digestion lors du dosage du mercure a également été vérifiée par des essais à différentes températures et différentes durées.

Finalement, nous avons évalué les facteurs pouvant causer des pertes soit au cours de l'étape de l'incubation, de l'ajout du formol dans l'échantillon ou de l'adsorption du métal sur les surfaces et dans les pores du verre.

Ces travaux de recherches ont été effectués au Laboratoire de Santé publique du Québec à Sainte-Anne-de-Bellevue à l'intérieur d'une entente avec l'école Polytechnique de Montréal.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Échantillonnage

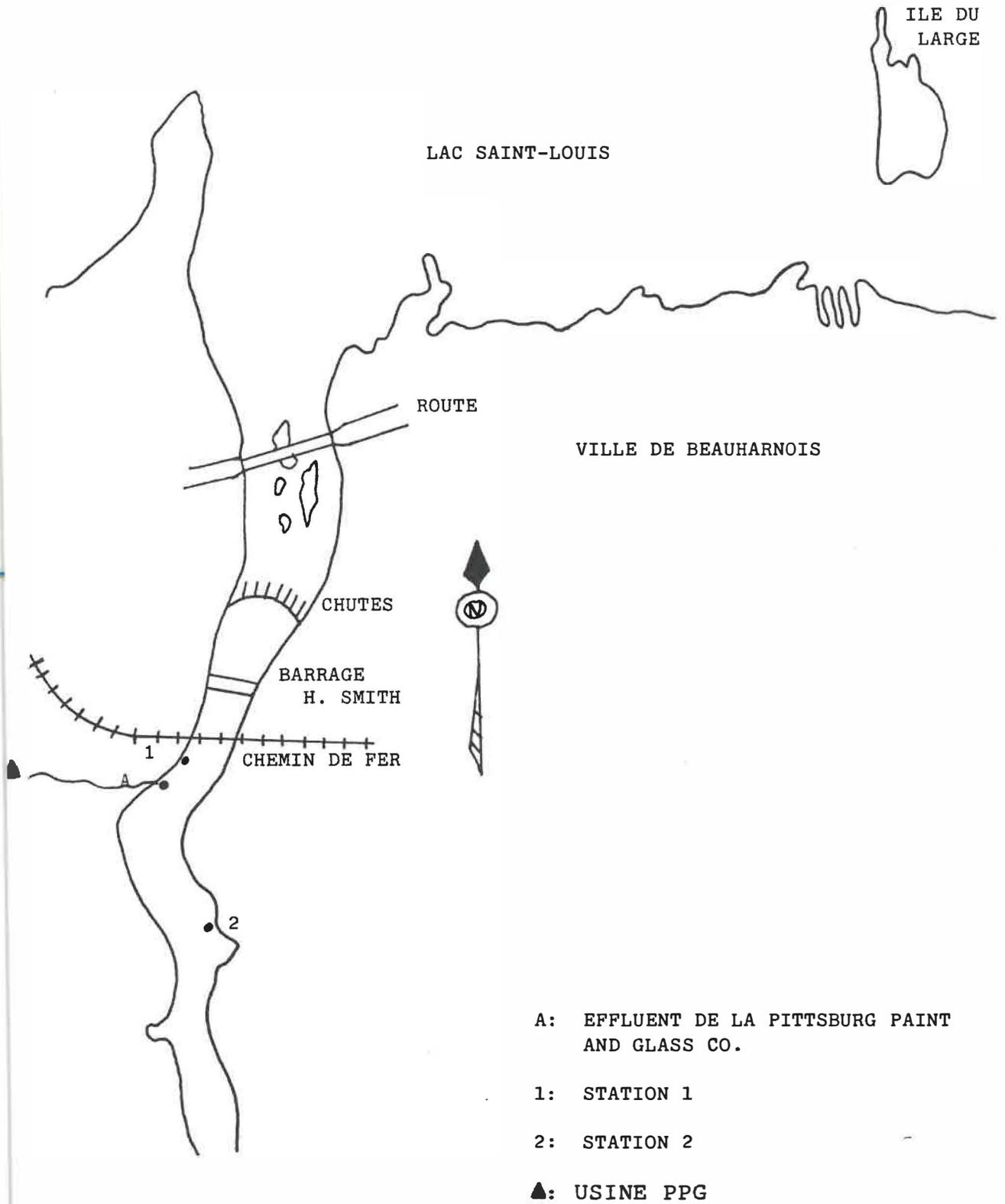
##### 2.1.1 Description du site

La rivière Saint-Louis est un tributaire du lac Saint-Louis. Elle atteint ce dernier au niveau de la municipalité de Beauharnois (Québec) après avoir drainé les terres agricoles de Sainte-Barbe, Cartier, Saint-Louis-de-Gonzague, Saint-Étienne de Beauharnois et Vendôme. Son débit est estimé à  $30 \text{ m}^3/\text{s}$  et sa vitesse d'écoulement à  $4,6 \text{ cm/s}$  (Carignan et Alves, 1978). La zone étudiée concerne la rive de la municipalité de Beauharnois de la voie ferrée jusqu'à environ 500 m en amont.

On retrouve à la figure 2.1 le plan du site étudié sur lequel on a indiqué l'endroit où l'usine Pittsburg Paint and Glass (PPG) fait ses rejets contenant du mercure en «A», ainsi que les deux stations (1 et 2) où des échantillons de sédiments ont été prélevés pour notre étude.

La présente étude porte spécifiquement sur la capacité qu'ont certains microorganismes, qui croissent depuis presque 40 ans dans un milieu contenant du mercure, à le méthyler.

Figure 2.1 - PLAN DU SITE ÉTUDIÉ



L'étude a été limitée aux deux stations suivantes:

Station 1: sur la rive ouest, à environ 10 m en aval de l'effluent de l'usine, près de la voie ferrée à 1,5 m de la rive. La profondeur de l'eau à cet endroit est de 0,75 m. Cette station représente le lieu où les bactéries contenues dans les sédiments sont en contact avec l'effluent contaminé par le mercure.

Station 2: sur la rive est de la rivière à 500 m en amont de l'effluent de l'usine, à 1,5 m de la rive. La profondeur de l'eau où les prélèvements ont été effectués est de 1 m. Cette station représente le lieu où les bactéries des sédiments ne sont pas et n'ont pas été en contact avec l'effluent de l'usine.

#### 2.1.2 Méthode de prélèvement

Les sédiments ont été prélevés en août 1986 aux deux stations ci-haut mentionnées soient: en amont et en aval de l'effluent de l'usine PFG. Au moment de l'échantillonnage, la température ambiante se situait à 24°C et celle des sédiments à 19°C. Une benne Ekman a été utilisée pour prélever 50 g de sédiments à pas plus de 5 cm de profondeur. Les échantillons ont été déposés dans des bouteilles de verre à large ouverture de 300 mL ayant préalablement été stérilisées à l'autoclave pendant

20 minutes. Au total, 4 échantillons ont été prélevés à chacun des sites. Les sédiments ont été conservés à 10°C jusqu'au moment de l'analyse, le jour même. L'analyse consista à dénombrer puis à isoler les microorganismes selon la méthode de la membrane filtrante (Bouchard et al., 1981).

## 2.2 Isolement des microorganismes

Les trois milieux sélectifs et différentiels m-Endo agar (DIFCO 0736-01), m-FC agar (DIFCO 0677-01-1) et m-Enterococcus agar (DIFCO 0746-02) ont été utilisés pour la recherche et le dénombrement respectivement des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux selon la méthode de la membrane filtrante (Bouchard et al., 1981).

A partir des croissances sur les milieux sélectifs, les coliformes totaux et fécaux ont été isolés sur des géloses McConkey et des géloses au sang de mouton et les streptocoques fécaux sur des géloses au sang de mouton et des géloses m-Enterococcus pour un total de 56 souches. Chacune des souches a été identifiée jusqu'au genre et à l'espèce avant de subir l'épreuve de résistance au chlorure mercurique.

### 2.3 Identification des microorganismes

Les coliformes fécaux et les coliformes totaux ont été identifiés jusqu'aux genre et espèce à l'aide du système commercialisé API 20E (Enterobacteriaceae). Pour les souches dont les résultats n'étaient pas codés dans l'index analytique API 20E, leur identification nécessitant des tests supplémentaires, il a été convenu d'employer la batterie de tests utilisée par le LSPQ (Farmer et al., 1985; Edward et Ewin, 1986). Cette batterie comprend 37 tests biochimiques contre 23 dans API 20E.

Dans le cas des streptocoques fécaux, nous avons limité l'identification au genre seulement. Pour ce, des confirmations de cocci Gram positifs et de catalase négative ont été effectuées (APHA, AWWA, WPCF, 1985; Bergey's, 1974).

### 2.4 Épreuve de résistance des microorganismes au chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub>)

#### a) Épreuve de résistance - Méthode de Richards (1983)

Nous avons procédé à la modification suivante de la méthode de Richards (1983): la technique d'ensemencement des plaques a été normalisée de façon à ce que les croissances soient uniformes d'une plaque à l'autre. Pour ce, une suspension en saline de turbidité égale à un standard McFarland no. 0,5 a été préparée à

partir d'une gélose tryptocaséine soya (GTS) inclinée. La surface d'une gélose infusion coeur cerveau (ICC) a été ensemencée à l'aide d'un écouvillon. Après que la surface de la gélose fut séchée, on a procédé tel qu'indiqué dans la méthode de Richards (1983) pour le dépôt des gouttes de  $HgCl_2$  et l'incubation (48 heures à  $35^{\circ}C$ ). Les résistances ont été vérifiées selon les mêmes concentrations en ions  $Hg^{++}$  soient 1,5, 3,1, 6,25, 12,5, 25, 50 et 100  $\mu g/mL$ .

Au total, 56 souches ont été testées pour leur résistance. Une colonie de chaque souche ayant crû à la concentration de mercure correspondant à son niveau de résistance maximal a été repiquée sur une GTS inclinée dans des tubes à bouchons vissés. On a vérifié ensuite la pureté des souches en striant les coliformes sur des géloses McConkey, au sang et pour le cas des streptocoques, sur des géloses m-Enterococcus (APHA, AWWA, WPCF, 1985; Bergey's, 1974; DGPS, 1981).

b) Épreuve de résistance en tube

Environ la moitié de ces 56 souches a été soumise à une épreuve de résistance en tube (Clark et al., 1977; Kondo et al., 1974) dans le but de comparer avec les résultats obtenus selon la méthode de Richards (1983). Les souches ont été alors incubées

dans des tubes d'ICC contenant du mercure. Ainsi, les conditions auxquelles seront soumises les souches lors des expériences de méthylation ont été reproduites. Pour ce faire, la technique d'ensemencement des tubes a été normalisée.

Une boucle de bactéries (provenant des souches mères) a été prélevée du milieu de conservation GTS, inoculée dans 10 mL de bouillon ICC et portée à l'étuve à 35°C pour 24 heures, sauf pour les streptocoques fécaux dont la durée de l'incubation fut de 48 heures.

Après cette incubation, 10 uL de suspension bactérienne ont été prélevés, inoculés dans un autre bouillon ICC de 10 mL afin d'obtenir environ  $10^5$  microorganismes par mL. Ces derniers ensemencements ont été incubés au bain-marie à 35°C pour 30 minutes afin d'obtenir des bactéries en phase de croissance. Un millilitre de cette dernière culture fut ensuite inoculé dans 20 mL de bouillon ICC (25 x 150 mm) contenant 3, 6 et 12  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de chlorure mercurique. Les tubes ont été placés à l'étuve à 35°C pendant 48 heures.

Après l'incubation, la croissance a été vérifiée selon que les milieux étaient troubles ou translucides. Chaque résultat négatif a été vérifié par un étalement de 0,2 mL du bouillon sur

une gélose ICC incubée à 35°C, 48 heures. Des dénombrements ont été effectués également pour les tubes où il y a eu croissance.

## 2.5 Conservation des souches

Les souches ont été conservées sur des pentes de gélose tryptocaséine soya (GTS) dans des tubes à bouchons vissés (16 x 125 mm) après avoir été portées à l'étuve à 35°C pendant 24 heures sauf pour les streptocoques fécaux où l'incubation était de 48 heures. Des cultures de chacune des souches ont aussi été congelées à -70°C dans du glycérol à 20%.

## 2.6 Essai de production de mercure organique

### 2.6.1 Choix des souches

Au total, 11 souches ont été mises en présence de chlorure mercurique pour vérifier leur production en mercure organique. Ces souches ont été choisies en fonction de leur représentativité. Richards (1983) avait comme critère de rejeter les souches sensibles à 3 ug/mL et moins de mercure. En ce qui concerne la présente étude, ce critère ne s'appliqua pas puisque toutes les souches furent résistantes à plus de 3 ug/mL.

### 2.6.2 Incubation des microorganismes en présence du H<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Richards (1983) effectua les essais de production de mercure organique dans des bouillons ICC contenant du H<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> selon des proportions relatives à leur résistance, jusqu'à un maximum de 12 ug/mL. Cependant, l'épreuve de résistance en tube (paragraphe 2.4b) a démontré que les souches de la présente étude ne pouvaient croître à la concentration de 12 ug/mL de mercure. C'est pourquoi ces derniers essais ont été effectués à la concentration de 6 ug/mL de mercure dans le bouillon ICC.

Les bactéries utilisées pour effectuer les essais de production de mercure organique provenaient des souches acclimatées au mercure et non pas des souches mères, ce qui signifie que, tout comme Richards (1983), les souches provenant de colonies qui se situaient sur la plus forte concentration de mercure ont été isolées.

Une boucle de bactéries a été prélevée du milieu de conservation GTS, inoculée dans 10 mL de bouillon nutritif ICC, lequel a été incubé à 35°C pour 24 heures, sauf les streptocoques fécaux pour lesquels la durée de l'incubation était de 48 heures.

Selon la méthode de Richards (1983), après cette incubation une quantité de suspension bactérienne est prélevée et inoculée dans un nouveau bouillon ICC de 10 mL afin d'obtenir finalement environ  $10^5$  microorganismes par mL. Tel que mentionné au paragraphe 2.4b, la quantité prélevée a été normalisée à 10 uL. Ces derniers ensemencements ont été incubés au bain-marie à 35°C pour 30 minutes afin d'obtenir des bactéries en phase de croissance logarithmique. Un millilitre de cette dernière culture a été ensuite inoculé à 20 mL de bouillon ICC (25 x 150 mm, bouchon vissé) contenant 6 ug/mL de  $HgCl_2$ .

Chaque souche a été mise en présence d'ions  $Hg^{++}$  dans 10 tubes différents. Egalement, pour chacune des souches, des bouillons ICC sans mercure ont été inclus à l'étude à titre de témoins. Aussi, plusieurs tubes ont été préparés avec le mercure sans qu'on n'y ait ensemencé les bactéries.

Les tubes ont ensuite été placés à l'étuve à 35°C pour 48 heures. A la sortie de l'incubation, les souches ont été tuées par ajout de 0,4 mL de formaldéhyde, laissées à 4°C pour 24 heures, puis congelées à -20°C jusqu'à l'analyse du mercure.

Onze tubes (correspondants aux 11 souches) ont été préparés en surplus dans le but de leur ajouter du HCl concentré

(0,4 mL) plutôt que le formol pour pouvoir comparer les résultats et peut-être déceler un effet du formol sur la production de mercure organique.

## 2.7 Dosage du mercure dans les cultures bactériennes

### 2.7.1 Description de l'appareillage utilisé

Le montage fut le même que celui de Richards (1983) à l'exception des changements mineurs suivants:

a) plutôt qu'utiliser des tubes pour la réaction, des bouteilles à DBO (250 mL) ont été employées pour des raisons de sécurité parce que ces dernières sont moins versantes.

b) pour éviter les pertes de mercure, les bouteilles à réaction étaient incluses dans le système de volatilisation avant l'ajout des réactifs à l'aide d'un système de bouchon auquel étaient fixés un entonnoir (pour les ajouts de réactifs) et un tube pour le circuit de volatilisation du mercure.

c) nous avons ajouté un tube à dessécher au circuit de volatilisation juste avant la cellule d'absorption pour éviter

les interférences qui auraient pu être causées par les vapeurs de H<sub>2</sub>O (Environnement Canada, 1981).

De plus, les informations suivantes n'étaient pas spécifiées au protocole de Richards:

- l'ampérage de la lampe au mercure ajustée à 2,5 mA;
- ouverture de la fente 0,5 mm;
- l'enregistreuse sur papier graphique ajustée à 20 mV.

## 2.7.2 Fiabilité de la méthode

### 2.7.2.1 Précision et exactitude

La précision a été estimée à partir de dosages effectués sur trois bouillons ICC aux concentrations de 1, 2 et 3 ug. Les moyennes de 7 mesures ont été de  $1,04 \pm 0,14$  ug,  $2,03 \pm 0,21$  ug et de  $2,97 \pm 0,16$  ug avec, respectivement, des coefficients de variation<sup>(1)</sup> de 13,5%, 10,3% et 5,4%.

---

1. Coefficient de variation =  $\frac{\text{Écart type}}{\text{Moyenne}} \times 100$

#### 2.7.2.2 Limite de détection

La limite de détection est de 0,08 ug établie sur 7 mesures effectuées sur des bouillons ICC sans mercure.

#### 2.7.3 Mode opératoire pour le dosage du mercure dans les échantillons

Tel que décrit précédemment, différentes souches bactériennes ont été mises en présence du mercure inorganique (chlorure mercurique) pendant 48 heures dans un bouillon ICC. La concentration de l'ion mercurique dans les tubes a été déterminée à 6 ug/mL (voir 2.6.2). Après incubation, les bactéries ont été formolées par l'addition de 2% (V/V) de formaldéhyde dans les tubes. Ces tubes ont été placés à 4°C pendant 24 heures et ont été congelés par la suite à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

La teneur en mercure dans les échantillons étant déterminée par comparaison des maxima d'absorbance obtenus pour les échantillons avec ceux de la courbe d'étalonnage, nous avons cru nécessaire d'établir cette courbe avec des étalons représentant le plus fidèlement possible nos échantillons à l'aide du bouillon ICC plutôt que le HNO<sub>3</sub> 5%. De plus, les étalons ont subi la même digestion (à 80°C pendant 30 minutes) que les échantillons.

Les courbes ont été tracées à partir de l'absorbance correspondant à 0, 0,5, 1, 2, 2,5 et 3 ug de Hg dans des bouillons ICC préparés la journée même. La différence du mercure total du mercure inorganique nous donne le mercure organique.

#### 2.7.4 Calcul et expression des résultats

Pour doser le mercure organique dans les échantillons, il s'agissait de soustraire la concentration obtenue en mercure inorganique à la concentration obtenue en mercure total.

$$\text{Hg organique} = \text{Hg total} - \text{Hg inorganique} \quad (1)$$

#### 2.7.5 Réactifs

Nous avons utilisé une solution mère de 1000 mg/L de mercure pour préparer les solutions étalons de mercure en ICC.

Pour le dosage du mercure, les réactifs suivants ont été préparés et utilisés tel que décrit par Richards:

- solution de l-cystéine 1%,
- solution réductrice spécifique,
- solution réductrice totale,

- solution de chlorure de sodium 1%,
- solution d'hydroxyde de sodium 45%,
- solution d'acide sulfurique 16 N.

Une solution fraîche de l-cystéine 1% a été préparée à chaque jour d'analyse.

#### 2.7.6 Vérification de la méthode de digestion

Des digestions ont été effectuées à différentes températures et différentes durées pour s'assurer que les paramètres suggérés par Richards (1983) étaient les meilleurs choix du point de vue efficacité à libérer le mercure des sites organiques où il aurait pu se fixer.

##### a) Essais de digestion à différentes durées

Les essais ont été effectués à l'aide de bouillon ICC contenant environ 2 µg de mercure et répétés 7 fois pour chacune des durées de 15, 30, 45 et 60 minutes. Les bouillons ICC ont été préalablement incubés à 35°C pendant 48 heures, bouchons vissés. Avant l'analyse, les tubes sont chambrés puis inversés vingt fois. En utilisant une analyse de variance et un test de

Fisher Snedecor, on a pu vérifier l'hypothèse de l'égalité des moyennes pour les concentrations à chacun des temps.

b) Essais de digestion à différentes températures

Des essais de digestion ont été effectués (30 minutes) à 25°C, 80°C et 90°C. Par un graphique, nous avons comparé chacune des droites de régression linéaire avec celle tracée à l'aide de standards de mercure dilués dans du HNO<sub>3</sub> 5%. Ces standards de mercure servaient de référence puisqu'ils ne nécessitaient aucune digestion.

Nous pouvions alors calculer les intervalles de confiance à 95% des hauteurs de pics pour les concentrations de 1 ug et de 3 ug et vérifier s'ils incluaient les hauteurs de pics obtenues lors des digestions du bouillon ICC à 25°C, 80°C et 90°C.

2.8 Recherche des causes des pertes de mercure

Après quelques dosages sur les 30 échantillons ayant subi les essais de production de mercure organique, nous avons observé des pertes de mercure pouvant aller jusqu'à 50% du mercure ajouté avant l'incubation. C'est pourquoi il a fallu procéder à une étude des

perdes suivant les étapes subies par les échantillons pendant le processus d'incubation et de dosage.

Nous avons donc examiné l'effet de l'incubation sur le bouillon ICC mis en présence du mercure et l'effet du formol sur le dosage du mercure.

#### 2.8.1 Effets de l'incubation sur la récupération de mercure

Pour vérifier l'effet de l'incubation sur le dosage du mercure en milieu ICC, on a fait subir à une même solution d'une part, une réfrigération à 4°C pendant 48 heures et, d'autre part, une incubation à 35°C pendant 48 heures dans le but de comparer la récupération par rapport au temps 0 (avant l'incubation ou la réfrigération). L'essai a été effectué en triplicata aux trois concentrations 3, 6 et 12 ug/mL sans bactérie.

On a mesuré 3 fois 200 mL de bouillon ICC dans des erlenmeyers stériles à bouchons vissés de 300 mL. A l'aide de ces bouillons, 3 solutions à 3, 6 et 12 ug/mL de mercure ont été préparées en ajoutant dans chacune respectivement, 600, 1200 et 2400 uL d'une solution de Hg à 1000 ug/mL. Chacune de ces solutions a été divisée stérilement en 6 aliquots de 20 mL dans des tubes à bouchons vissés de 25 x 150 mm. Trois tubes de

chacune des 3 concentrations (9 tubes) ont été placés au réfrigérateur à 4°C pendant 48 heures et les autres (9 tubes) ont été placés à l'incubateur 35°C pendant 48 heures pour ensuite être dosés pour le Hg total.

Un aliquot de chacune des concentrations a été analysé au temps 0 et au temps 48 heures. Après le délai (48 heures) de réfrigération ou d'incubation, les tubes ont été chambrés puis inversés vingt fois avant l'analyse. La récupération est exprimée en pourcentage selon la formule suivante:

$$\frac{[\text{Concentration après 48h}] \times 100}{[\text{Concentration au temps 0}]} \quad (2)$$

#### 2.8.2 Effet du formol sur la récupération du mercure dans les échantillons

Nous nous sommes interrogé sur l'interférence que pourrait causer le formaldéhyde lors de l'analyse du mercure. Étant donné que plusieurs auteurs (Ramlal et al., 1986; Callister et Winfrey (1986)) acidifient leurs échantillons pour tuer les bactéries, des échantillons formolés ont été comparés avec d'autres acidifiés au HCl concentré. Il semblerait que le HCl serait tout aussi efficace pour tuer les bactéries puisqu'avec la quantité

ajoutée de 100 uL dans 5 mL d'ICC (même quantité que le formol), le pH passe alors à 2.

L'étude a été effectuée à partir de 2 concentrations de mercure en bouillon ICC soient 5 ug/mL et 10 ug/mL. Le mercure a été dosé dans les échantillons immédiatement et 60 minutes après que le formol et le HCl eussent été ajoutés.

La récupération est exprimée en pourcentage selon la formule suivante:

$$\frac{[\text{Concentration après ajout}] \times 100}{[\text{Concentration avant ajout}]} \quad (3)$$

Cette étude a été répétée 3 fois pour obtenir une meilleure estimation des pertes.

Dans deux tubes 25 x 150 mm à bouchons vissés contenant 15 mL de bouillon ICC, 75 et 150 uL d'une solution standard de 1000 ug/mL de Hg ont été ajoutés de façon à obtenir respectivement 5 et 10 ug/mL de Hg dans les tubes. A partir d'un aliquot de 250 uL, le mercure fut dosé avant que le formol ou le HCl aient été ajoutés.

Le contenu des 2 tubes a été divisé en 2 aliquots de 5 mL. Pour un des aliquots, nous avons ajouté 100 uL de formol (2% V/V) et pour l'autre, 100 uL de HCl concentré. Le mercure total a été analysé dans les tubes immédiatement après que le formol ou le HCl eussent été ajoutés et 60 minutes plus tard.

### 2.8.3 Vérification de l'adsorption sur les parois du verre

#### a) Adsorption sur les parois du verre de la bouteille à DBO

Pendant la réaction de dégagement des vapeurs de mercure, la bouteille d'une capacité de 250 mL contenait alors environ 52 mL de liquide. La grande surface non-immersée pouvait retenir le mercure par adsorption. Pour mesurer cette perte, nous avons procédé de la façon suivante:

- après que le pic d'absorbance soit revenu à 0, 20 mL de l-cystéine ont été ajoutés en lavant les parois sans vider la bouteille au préalable et l'analyse a été effectuée une deuxième fois en ajoutant les autres réactifs.

b) Adsorption dans les pores du verre de la bouteille à DBO

Il est probable que le mercure ne fut libéré du verre qu'en partie seulement. Un rinçage à l'acide pourrait dans ce cas libérer le mercure emmagasiné dans les pores du verre. Donc, la même bouteille qui en "a", page précédente, a été vidée, après avoir subi le traitement à la l-cystéine est rincée à l'eau distillée. Ensuite 10 mL de HCl 15% ont été ajoutés, puis brassés fréquemment pendant 15 minutes. Ce contenu a ensuite été analysé en ajoutant les réactifs dans les mêmes proportions que l'analyse normale sauf pour le NaOH, pour lequel le volume a été augmenté d'environ 3 mL pour compenser l'ajout de HCl.

c) Adsorption dans les pores du verre de l'éprouvette d'incubation

L'éprouvette a été vidée, lavée à l'eau distillée puis rincée avec 10 mL de HCl 15%. Le contenu a été brassé fréquemment pendant 15 minutes, puis analysé en ajoutant les autres réactifs dans les mêmes proportions que l'analyse normale sauf pour le NaOH, pour lequel le volume a été augmenté d'environ 3 mL pour compenser l'ajout de HCl.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

#### 3.1 Dénombrement des coliformes totaux, coliformes fécaux et streptocoques fécaux dans les sédiments

Le tableau 3.1 présente les résultats des dénombrements de coliformes totaux et fécaux et streptocoques fécaux dans les sédiments.

Tableau 3.1

#### NOMBRE DE COLIFORMES TOTAUX, COLIFORMES FÉCAUX ET STREPTOCOQUES FÉCAUX DANS LES SÉDIMENTS

PARAMETRE	STATION	UFC*/100g
Coliformes totaux	1	34 000
	2	20 000
Coliformes fécaux	1	4 000
	2	950
Streptocoques fécaux	1	550
	2	10 000

\* UFC: unités formant des colonies (moyenne de 4 échantillons)

#### 3.2 Identification des microorganismes

Nous avons identifié les espèces suivantes dans les proportions présentées au tableau 3.2: Aeromonas hydrophila, Citrobacter freundii,

Escherichia coli et Klebsiella pneumoniae. Les souches d'Aeromonas hydrophila n'ont pas été retenues pour les analyses subséquentes puisqu'étant "oxydase positive", elles ne sont pas considérées dans le groupe des coliformes (APHA, AWWA, WPCF, 1985).

Tableau 3.2

NOMBRE DE SOUCHES ISOLÉES DE  
CHAQUE GENRE OU ESPECE

IDENTIFICATION DES SOUCHES	NOMBRE DE SOUCHES ISOLÉES
<u>Aeromonas hydrophila</u>	4
<u>Citrobacter freundii</u>	3
<u>Escherichia coli</u>	25
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	4
<u>Streptococcus sp.</u>	20

### 3.3 Résistance des microorganismes au chlorure mercurique

Les tableaux 3.3 et 3.5 résument les résultats de la résistance des souches au mercure pour la présente étude. Le tableau 3.4 présente les résistances obtenues par Richards (1983).

Les souches sont considérées comme résistantes si elles ont crû en présence de l'ion  $Hg^{++}$ . Le mercure a été ajouté sous forme de gouttes de  $HgCl_2$  de différentes concentrations. Les souches sont indiquées à ces tableaux à la concentration la plus élevée à laquelle chacune des souches a produit des colonies.

Tableau 3.3

RÉSISTANCE DES SOUCHES A L'ION  $Hg^{++}$

MICROORGANISMES	CONCENTRATION DE L'ION $Hg^{++}$ ( $\mu g/mL$ )			
	12,5	25	50	100
<u>Aeromonas hydrophila</u>	1/4	1/4	1/4	1/4
<u>Citrobacter freundii</u>			3/3	
<u>Escherichia coli</u>			25/25	
<u>Klebsiella pneumoniae</u>		1/4	3/4	
<u>Streptococcus sp.</u>			20/20	

Selon la méthode de Richards (1983)

Tableau 3.4

RÉSISTANCE DES SOUCHES A L'ION Hg<sup>++</sup>  
RÉSULTATS DE RICHARDS (1983)

MICROORGANISMES	CONCENTRATION DE L'ION Hg <sup>++</sup> (ug/mL)						
	1,5	3,1	6,25	12,5	25	50	100
<u>Aeromonas hydrophila</u>		5/11		4/11	1/11		1/11
<u>Citrobacter freundii</u>		2/6	4/6				
<u>Escherichia coli</u>	1/6	3/6	2/6				
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>Streptococcus sp.</u>	5/7	1/7	1/7				

On remarque que la plupart des souches sont résistantes à 50 ug/mL, les souches d'Aeromonas hydrophila présentant toutefois plus de variations que les autres. Si on compare nos résultats avec ceux de Richards (1983) au tableau 3.4, on voit que le seul point en commun est la souche la plus résistante: il s'agit, pour les deux cas, de Aeromonas hydrophila. Pour ce qui est du reste, les résultats diffèrent autant du point de vue niveau de résistance que variabilité. En effet, les souches de Richards furent moins résistantes: 12,5 ug/mL et moins sauf pour Aeromonas hydrophila; il a obtenu des résultats de résistance qui varient considérablement selon les souches: 1,5 ug/mL pour les streptocoques fécaux, 3,1 ug/mL pour

la plupart des souches de Escherichia coli, 12,5 ug/mL pour la majorité des souches de Citrobacter freundii.

La méthode en tube consistait à incuber les souches dans des bouillons ICC contenant différentes concentrations de mercure. Les résultats sont présentés au tableau 3.5. Contrairement aux résultats de Richards (1983) (tableau 3.4), aucune des souches n'a résisté à plus de 6,25 ug/mL d'ions  $Hg^{++}$ . Par contre, ces résultats démontrent une résistance plus faible que les nôtres pour les souches de streptocoques fécaux (1,5 vs 6,25 ug/mL).

Tableau 3.5

RÉSISTANCE DES SOUCHES A L'ION  $Hg^{++}$

MICROORGANISMES	CONCENTRATION DE L'ION $Hg^{++}$ (ug/mL)		
	3,1	6,25	12,5
<u>Aeromonas hydrophila</u>	3/4	1/4	∅
<u>Citrobacter freundii</u>	-	3/3	∅
<u>Escherichia coli</u>	2/10	8/10	∅
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	1/4	3/4	∅
<u>Streptococcus sp.</u>	3/10	7/10	∅

Selon la méthode en tubes

Si on la compare avec la méthode de la goutte, la méthode en tubes donne des résultats de résistance plus faibles.

Notons que nous n'avons observé aucune différence de résistance entre les deux stations sauf pour Aeromonas hydrophila: la souche la plus résistante ayant été échantillonnée en aval des rejets de la PFG et la moins résistante en amont.

Le tableau 3.6 énumère les souches choisies pour l'épreuve de méthylation et donne leur concentration maximale de résistance au mercure selon les deux méthodes décrites au paragraphe 2.4 (page 24).

Tableau 3.6

SOUCHES CHOISIES POUR VÉRIFIER LEUR PRODUCTION DE  
MERCURE ORGANIQUE À PARTIR DE CHLORURE MERCURIQUE

NUMÉRO	IDENTIFICATION	RÉSISTANCE (ug/mL) MÉTHODE RICHARDS (1983) MODIFIÉE	RÉSISTANCE (ug/mL) MÉTHODE EN TUBES
1	<u>Escherichia coli</u>	48	6
2	<u>Escherichia coli</u>	48	6
3	<u>Citrobacter freundii</u>	48	6
4	<u>Citrobacter freundii</u>	48	6
5	<u>Escherichia coli</u>	48	6
6	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	48	6
7	<u>Citrobacter freundii</u>	48	6
8	<u>Streptococcus sp.</u>	48	6
9	<u>Streptococcus sp.</u>	48	6
10	<u>Streptococcus sp.</u>	48	6
11	<u>Streptococcus sp.</u>	48	6

#### 3.4 Dosage du mercure dans les cultures bactériennes

Pour obtenir le mercure organique (méthyl-mercure) dans les échantillons, il s'agissait de soustraire la concentration obtenue en mercure inorganique à la concentration obtenue en mercure total. Les

concentrations dosées en mercure inorganique étaient en moyenne égales aux concentrations dosées en mercure total. Ceci a été vérifié par le test d'égalité des moyennes de Student ( $\alpha = 0,05$ ). Nous ne pouvons pas affirmer qu'il y a eu méthylation du mercure dans nos échantillons.

Nous avons constaté des pertes en mercure total d'en moyenne 40%, variant de 33 à 48%, du mercure ajouté au départ avant l'incubation et la conservation au congélateur.

Les échantillons témoins stériles contenant le milieu ICC et le mercure ont accusé des pertes du même ordre de grandeur.

### 3.5 Vérification de la méthode de digestion

#### a) Essais des différentes durées de digestion

Pour chacune des durées de digestion indiquées au tableau 3.7, l'analyse d'une même quantité de mercure a été répétée sept fois. L'analyse des variances et le test de Fisher Snedecor nous permettent d'affirmer que ces moyennes ne sont pas différentes à un niveau de confiance de 95%.

Tableau 3.7

DOSAGES OBTENUS A DIFFÉRENTES  
DURÉES DE DIGESTION

DURÉE DE LA DIGESTION à 90°C (minutes)	DOSAGES OBTENUS (Moyenne en ug)	ÉCART TYPE
15	2,03	0,16
30	2,03	0,14
45	2,10	0,11
60	2,17	0,24

b) Essais de digestions à différentes températures

Les figures 3.1 et 3.2 représentent les courbes obtenues des concentrations de mercure en fonction des hauteurs de pics aux différentes températures de digestion de 25°C, 80°C et 90°C. Nous avons tracé les régressions linéaires obtenues à l'aide des points 1, 2 et 3 ug. L'analyse à chacun de ces points, pour une température donnée, a été répétée sept fois.

Fig. 3.1 – Comparaison des hauteurs de pics obtenues à différentes températures de digestion – Niveau 1  $\mu\text{g}$

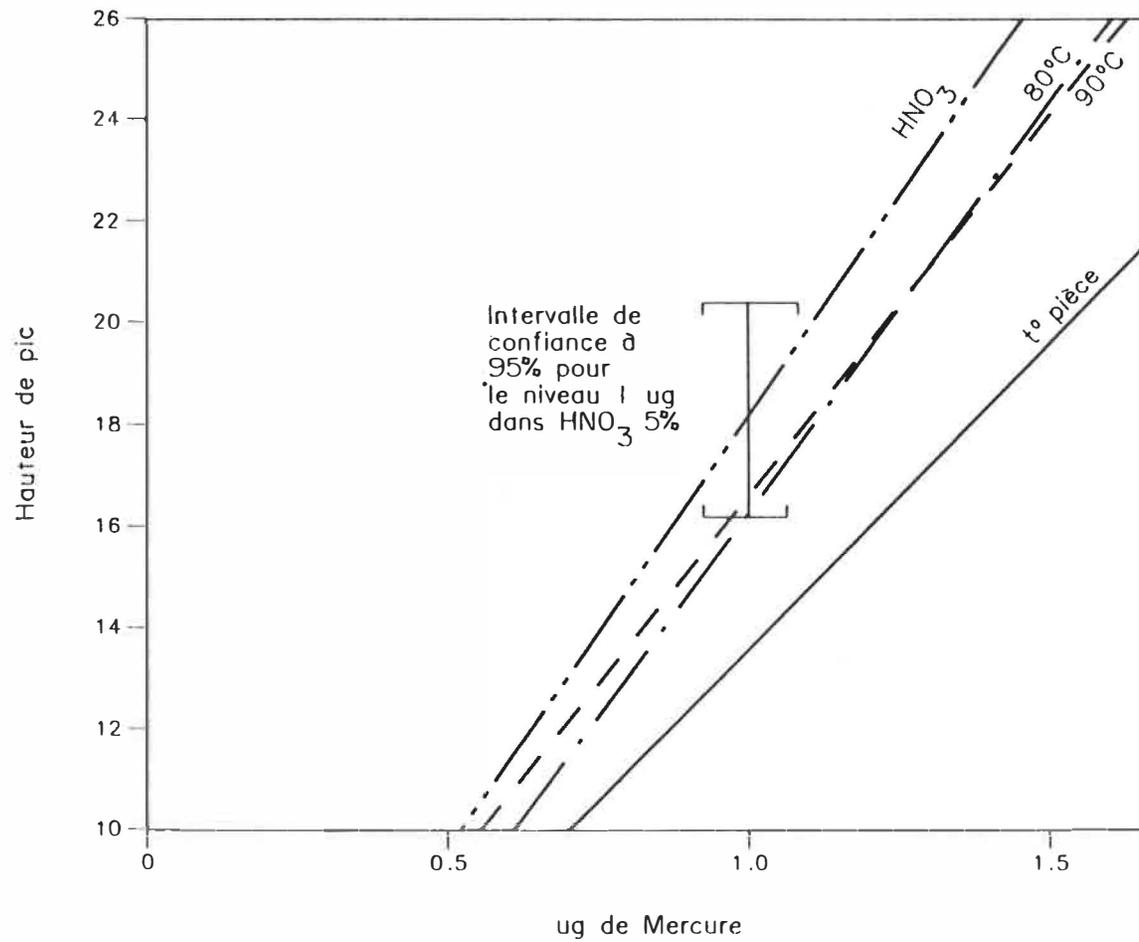
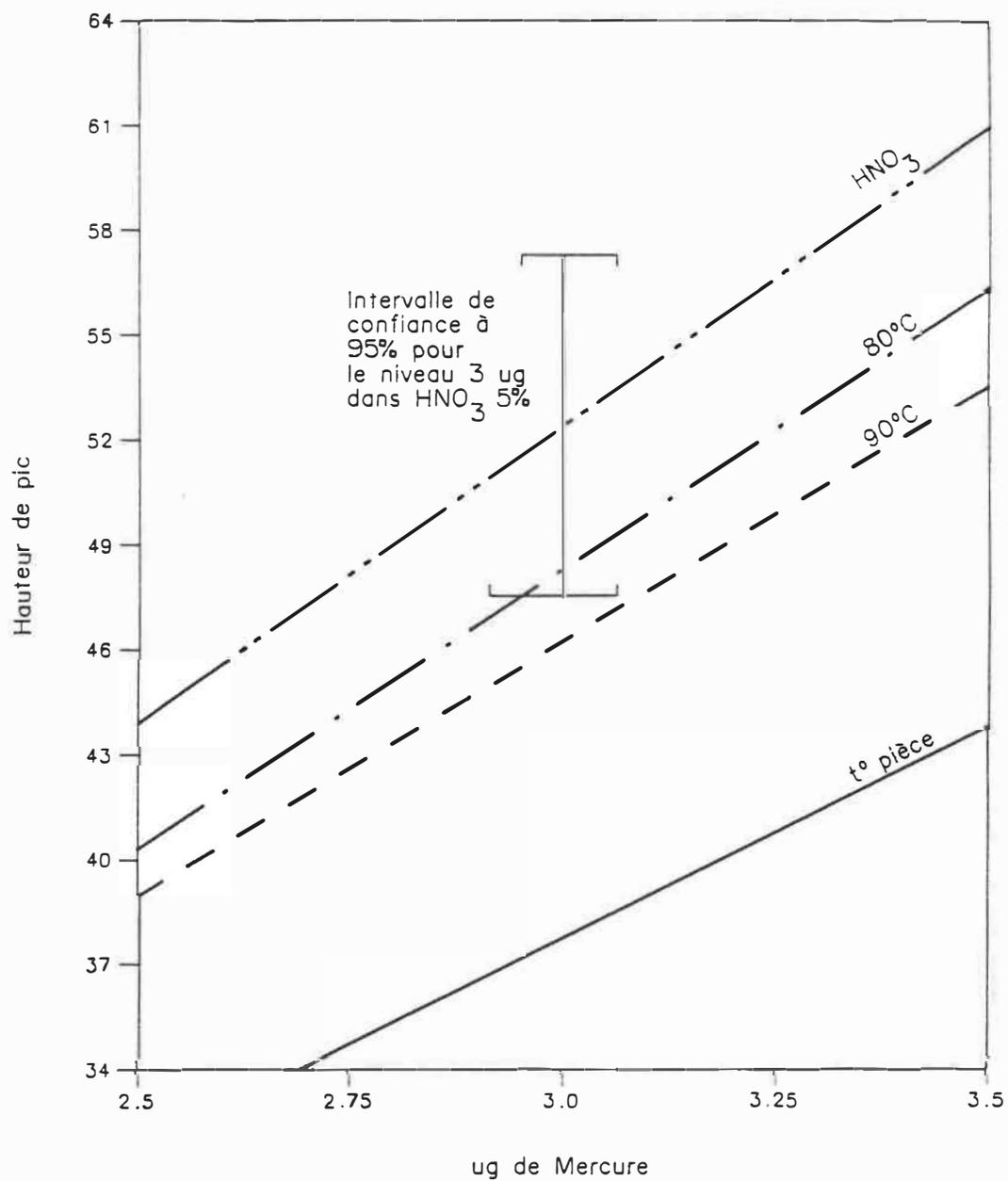


Fig. 3.2- Comparaison des hauteurs de pics obtenus à différentes température de digestion  
Niveau 3 ug



Nous remarquons que nous obtenons des hauteurs de pics plus élevées pour la droite représentant le mercure dilué dans le  $\text{HNO}_3$  5% ce qui signifie que la récupération du mercure a été meilleure que dans le cas où le mercure était en solution dans le milieu ICC lequel a dû être digéré pour libérer le mercure pouvant être lié à la matière organique. Cette courbe sert donc de référence pour évaluer l'efficacité de différentes températures de digestion.

Pour le niveau 1 ug (figure 3.1), l'intervalle de confiance à 95% du point situé sur la droite de référence, inclut les points obtenus pour des digestions à 80°C et 90°C mais exclut le point obtenu pour la digestion à 25°C. A 3 ug (figure 3.2), seule la digestion à 80°C peut être incluse dans l'intervalle de confiance de ce point sur la droite de référence.

Nous pouvons donc conclure que la digestion à 80°C telle que suggérée par Richards (1983) est efficace et qu'elle ne peut être remplacée par une digestion à 25°C qui semble inadéquate pour libérer complètement le mercure pouvant être lié à la matière organique contenue dans le milieu de culture ICC. De plus, il n'est pas nécessaire d'élever la température de digestion à 90°C.

### 3.6 Effet de l'incubation sur la récupération du mercure

Tel que mentionné au paragraphe 2.8.1 (page 36), les tubes stériles contenant le bouillon ICC et le mercure ont été incubés pendant 48 heures à 35°C, bouchons vissés.

Au tableau 3.8, nous remarquons que les échantillons qui ont été réfrigérés pendant 48 heures n'ont subi aucune perte de mercure alors que ceux qui ont été incubés à 35°C pendant la même durée accusent des pertes variant d'environ 49% pour des concentrations de 3 ug/mL de mercure à environ 17% pour 12 ug/mL. Nous observons une décroissance du pourcentage de perte avec l'augmentation de la concentration en mercure.

Nous pouvons aussi affirmer que l'étape du dosage n'entraîne pas de pertes significatives puisque tout le mercure ajouté dans les tubes qui ont été réfrigérés a été recouvré.

Tableau 3.8

RÉCUPÉRATION DU MERCURE DANS LES  
ÉCHANTILLONS APRES L'INCUBATION

ug/mL DE MERCURE DANS L'ÉCHANTILLON	POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION* ÉCHANTILLONS 4°C 48 HEURES	POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION* ÉCHANTILLONS 35°C 48 HEURES
3	105,24 **	51,29
6	106,39 **	70,74
12	106,62 **	83,40

$$* \text{ Pourcentage de récupération} = \frac{\text{Hg final} \times 100}{\text{Hg initial}}$$

\*\* Peut être considérée comme 100% vu la précision de la méthode d'analyse d'environ 10%

### 3.7 Effet du formol sur la récupération de mercure

Les tubes contenant le bouillon ICC et le mercure ont été incubés à 35°C pendant 48 heures. Après ce délai d'incubation, le formol ou le HCl ont été ajoutés pour ensuite effectuer le dosage du mercure selon la méthode de Richards (1983).

Nous observons au tableau 3.9 des pertes importantes variant d'environ 49% pour des concentrations de 3 ug/mL à 15% pour des concentrations de 12 ug/mL, ce qui représente le même ordre de grandeur qu'au tableau 3.8 pour des échantillons n'ayant reçu ni formol, ni acide chlorhydrique.

Les résultats ne présentent aucune différence significative ( $\alpha = 0,05$ ) entre les pertes des échantillons formolés et celles des échantillons acidifiés.

Tableau 3.9

COMPARAISON DE LA RÉCUPÉRATION DU MERCURE POUR  
DES ÉCHANTILLONS FORMOLÉS vs ACIDIFIÉS

CONCENTRATION EN MERCURE (ug/mL)	POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION* FORMOL AJOUTÉ si 2% V/V	POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION* HCl AJOUTÉ si 2% V/V
3	51,05	54,54
6	73,11	67,40
12	84,93	80,70

$$* \text{Récupération} = \frac{\text{Hg final} \times 100}{\text{Hg initial}}$$

### 3.8 Adsorption sur les parois du verre

Nous avons observé des pertes d'en moyenne 8% (n = 3) sur les parois et dans les pores du verre de la bouteille à DBO servant à l'analyse d'un bouillon ICC contenant 5 ug/mL de mercure.

Aucune perte sur les parois du verre du tube ayant servi à l'incubation n'a pu être détectée.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

#### 4.1 Échantillonnage

Les dénombrements de coliformes totaux, coliformes fécaux et streptocoques fécaux sont de 100 à 1000 fois moins élevés que ceux obtenus par Richards (1983). Il semble que l'usine d'épuration des eaux usées de la ville de Beauharnois a contribué à améliorer le niveau bactériologique de pollution de la rivière St-Louis.

#### 4.2 Résistance des microorganismes au chlorure mercurique

Le but de notre étude étant de vérifier les résultats de Richards (1983), il a donc fallu tenter de répéter ses expériences le plus fidèlement possible. Pour l'épreuve de résistance des microorganismes au chlorure mercurique, Richards (1983) s'est référé à la méthode de Keil et al. (1972) qui consiste à déposer sur une gélose de tryptocaséine soya (GTS), préalablement inondée avec un bouillon contenant  $10^5$  E. coli par mL, des disques imprégnés de différentes concentrations de DDT et de BPC Aroclor 1242<sup>R</sup>.

D'autre part, Richards décrit sa méthode comme suit: des gouttes de différentes concentrations de chlorure mercurique ( $HgCl_2$ ) sont

déposées sur une gélose d'infusion cerveau-cœur (ICC) préalablement inondée d'un bouillon contenant la souche bactérienne à étudier.

A ce stade, nous avons rencontré deux difficultés: premièrement, le but de Keil et al. (1972) qui était d'étudier les effets du DDT et du BPC sur la croissance de E.coli différait considérablement du nôtre qui était d'évaluer la résistance des microorganismes au chlorure mercurique; et deuxièmement, Richards (1983) a modifié la technique (GTS vs ICC, disques imbibés vs gouttes) sans en donner les justifications.

Nous nous devons donc de procéder à une vérification de l'applicabilité de cette méthode pour notre étude. Pour ce, les résultats selon la méthode de Richards (1983) ont été comparés avec les résistances maximales obtenues à partir d'une incubation des bactéries dans des tubes de milieu de culture contenant du  $HgCl_2$  (tel que décrit en 2.4 b) (page 24).

Lorsque nous utilisons la méthode qui consiste à déposer des gouttes de  $HgCl_2$  sur des géloses ensemencées de microorganismes, nous obtenons des résultats de résistance plus élevés que ceux de Richards (1983): la plupart des microorganismes testés par Richards (1983) sont résistants à 3,1 et 6,25  $ug/mL$  alors que nous obtenons des croissances sur des zones contenant jusqu'à 50  $ug/mL$  de mercure. Le mercure étant un métal très volatil, le degré d'humidité des géloses peut influencer

l'absorption du métal et par le fait même le diamètre des zones où les gouttes ont été déposées et la concentration du métal. Dans une étude génétique sur la résistance de microorganismes au mercure, Weiss et al. (1977) mesurent des zones d'inhibition autour d'un disque de papier filtre imbibé de mercure; or, ils précisent que les disques sont placés sur des géloses en évitant de les faire sécher au préalable à cause de la grande volatilité du mercure.

La plupart des auteurs utilisent une méthode en bouillons pour isoler des microorganismes résistants ou pour déterminer la concentration inhibitrice minimale. C'est pourquoi nous avons cru intéressant de comparer les résultats d'une telle méthode avec ceux de la méthode de Richards (1983). A partir de la méthode en tubes, nous avons obtenu une inhibition complète à la concentration de 12,5 ug/mL de mercure, la plupart des souches ayant résisté à 6,25 ug/mL. Les bactéries ont donc été inhibées à des concentrations plus faibles qu'avec la méthode de Richards (1983).

Toutefois, les concentrations minimales en mercure pour inhiber la croissance des bactéries varient considérablement d'un auteur à l'autre. Handy et Noyes (1975) obtiennent une bonne croissance dans des milieux liquides contenant plus de 400 ug/mL de mercure pour 14 souches d'Enterobacteriaceae et 3 souches de Bacillus sp. Après adaptation, deux souches d'Enterobacteriaceae et de Bacillus sp. ont

été capables de croître dans une concentration aussi élevée que 1200 ug/mL en mercure. Par contre, Kondo et al. (1974) ont obtenu une résistance maximale beaucoup moins élevée de 20 ug/mL pour des souches de Staphylococcus aureus. Toujours à partir de milieux liquides, Vonk et Sijpersteijn (1973) ont identifié la concentration inhibitrice minimale de Pseudomonas fluorescens à 20 ug/mL, Bacillus sp. et Escherichia coli à 50 ug/mL et Enterobacter aerogenes à 100 ug/mL.

D'autre part, les tests de résistance effectués sur des milieux gélosés donnent des résultats de croissance bactérienne à 20 ug/mL (Trevors, 1986; Summers et Night-Olliff, 1980), 100 ug/mL (Billen et al., 1974) jusqu'à 320 ug/mL (Sprangler et al., 1973). Mais ces géloses n'ont été utilisées que dans le but d'isoler des microorganismes résistants et non pas pour identifier la concentration inhibitrice minimale.

Les bactéries ont subi l'épreuve de résistance et ont été isolées à partir d'une zone contenant du mercure pour les expériences subséquentes de production de mercure organique. Pour certains auteurs, les bactéries sont non seulement sélectionnées pour leur résistance au mercure mais sont aussi acclimatées à ce métal avant d'effectuer des épreuves de méthylation ou de vaporisation du mercure.

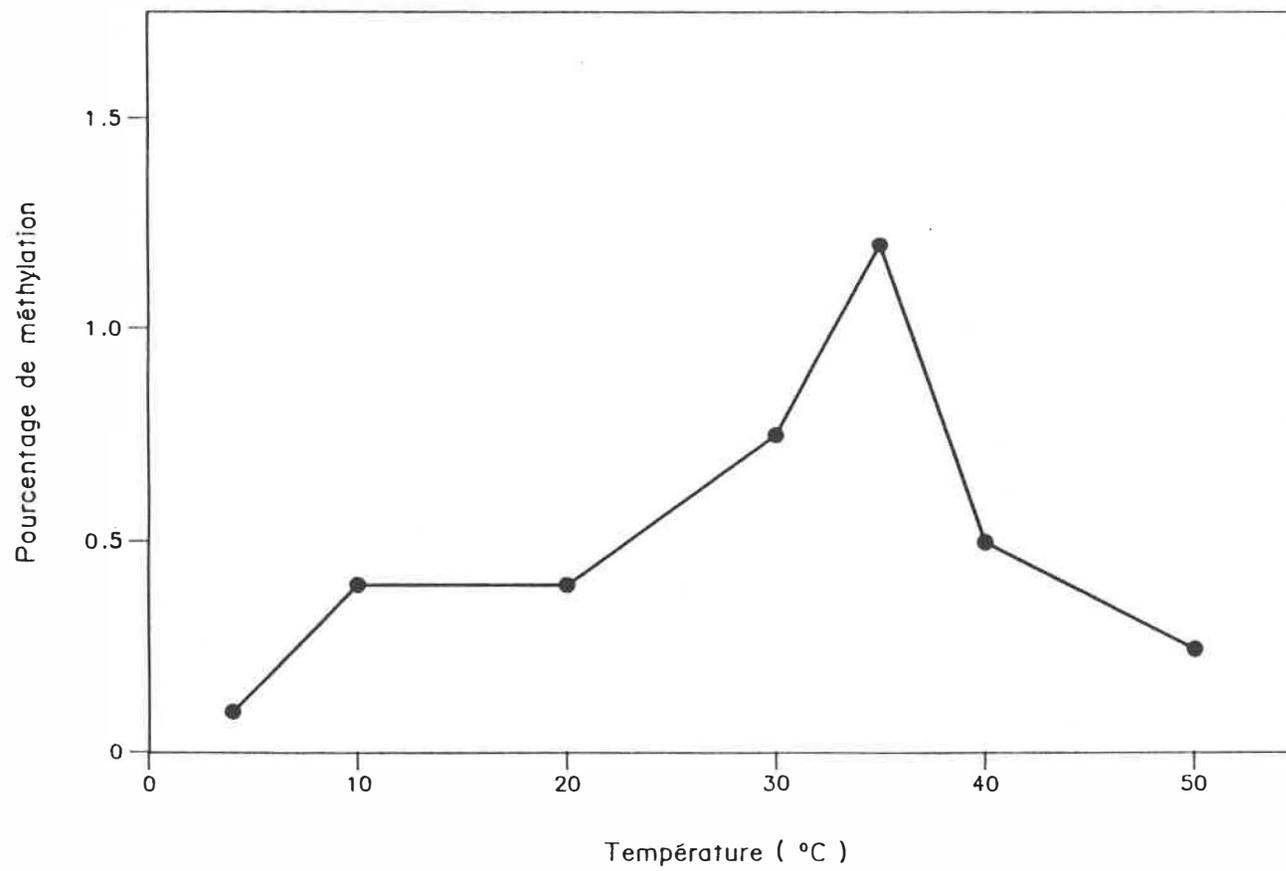
Pour une étude permettant d'évaluer l'emmagasinement du mercure par des cellules bactériennes, Komura et al. (1970) utilisent des bactéries isolées à partir de géloses contenant du mercure. Dans des expériences sur la volatilisation du mercure par des bactéries, les auteurs (Sprangler et al., 1973; Summers et Silver, 1972; Summers et Lewis, 1973; Clark et al., 1977) procèdent par plusieurs transferts des souches dans des milieux contenant du mercure pour les acclimater au préalable. Trevors (1986) repique des colonies de 5 à 10 fois sur des géloses contenant 20 ug/mL de mercure pour une étude de résistance des bactéries Gram négatifs en comparaison avec des Gram positifs. Weiss et al. (1977) induisent les cellules bactériennes en les incubant dans un bouillon nutritif contenant 2 ug/mL de mercure avant d'effectuer des évaluations de résistance. Cependant toutes ces études de résistance précédées d'une acclimatation sont quelque peu distantes des conditions environnementales dans lesquelles les souches ont été isolées.

#### 4.3 Essai de production de mercure organique

Probablement à cause du caractère environnemental de la production de mercure organique, la plupart des études effectuées à partir de sédiments se font aux températures d'incubation entre 20 et 30°C.

Les études effectuées à partir de bactéries incubées dans des milieux de culture d'enrichissement se font pour la plupart entre 30°C et 37°C. Callister et Winfrey (1986) et Steffan et al. (1988) spécifient que la température optimale pour favoriser la méthylation par les bactéries est de 35°C (voir figure 4.1), ce qui est en accord avec Richards (1983). Cependant, lorsqu'il s'agit de la durée de l'incubation, l'on se retrouve devant un éventail de possibilités: Ramlal et al. (1986) vérifient un taux de méthylation dans les sédiments après une incubation de 12 heures, expérience d'une très courte durée si on la compare à celle de Olson et Cooper (1976) qui incubent les sédiments jusqu'à 40 jours. S'il n'y avait que le processus de méthylation en cause, nous pourrions nous attendre à une production de mercure organique proportionnelle à la durée de l'incubation. Mais le problème est complexe. Handy et Noyes (1975) ont observé que la formation du méthyl-mercure est cyclique pendant 20 jours d'incubation. Plusieurs auteurs prétendent, qu'en parallèle au phénomène de méthylation, se produit la déméthylation. Olson et Cooper (1976) ont obtenu de la méthylation aussi bien sous condition aérobie qu'anaérobie pour des sédiments provenant de la Baie de San Francisco, mais ils observent une augmentation de la capacité de méthyler associée directement aux conditions anaérobies. Les sédiments conservent plus le méthyl-mercure sous condition anaérobie qu'aérobie. Ceci peut indiquer que le méthyl-mercure produit sous condition anaérobie est plus stable. Une autre explication de ce phénomène

Fig. 4.1— Effet de la température sur la méthylation du mercure



Tiré de Hamdy et Noyes, 1975.

serait que plusieurs microorganismes "déméthylateurs" opèreraient plutôt et particulièrement sous aérobie, et par conséquent, le méthylmercure serait dégradé plus vite sous condition aérobie à mesure qu'il est produit. Cependant, Spangler et al. (1973) ont isolé des sédiments 30 souches bactériennes qui font la "déméthylation" sous condition aérobie; 21 de ces souches sont des anaérobies facultatifs et peuvent déméthylmer également sous conditions anaérobie. Il est à noter que Billen et al. (1974) ont observé des taux de méthylation approximativement semblables sous conditions aérobies et anaérobies dans des sédiments d'eau douce. De plus, Handy et Noyes (1975) ont observé une production de méthylmercure supérieure pour les cultures aérées comparativement aux cultures ayant crû en absence d'air (tableau 4.1) et n'ont pas détecté de volatilisation lors de leurs expériences.

Nous n'avons, quant à nous, observé aucune méthylation du mercure dans nos échantillons. Ces derniers étaient incubés en aérobie. Le mercure total récupéré a accusé des pertes de 33 à 48%. Nous aurions pu croire que le mercure perdu a été volatilisé par des microorganismes mais les échantillons témoins stériles ont présenté les mêmes pertes. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris une vérification de la cause ou des causes de ces pertes.

Tableau 4.1

EFFET DE L'AÉROBIOSE ET DE LA L'ANAÉROBIOSE SUR LA PRODUCTION  
DE MÉTHYL-MERCURE PAR E. AEROGENES INCUBÉ A 37°C DANS UN  
MILIEU DE CULTURE CONTENANT 30  $\mu\text{g}$  DE  $\text{Hg}^{++}$  PAR mL

JOUR DE L'INCUBATION	CONDITION DE CROISSANCE	MÉTHYL-MERCURE DANS (1) LE MILIEU ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
3	Aérobie	0,4319
10		0,0262
20		0,1796
3	Anaérobie	0,3928
10		0
20		0,1282

(1) Moyenne de 3 aliquots analysés par chromatographie en couches minces.

Tiré de Handy et Noyes (1975)

C'est probablement un mauvais choix de la part de Richards (1983) d'entreprendre une étude de méthylation du mercure dans des conditions aérobies. Le tableau 4.2 représente la liste des auteurs qui ont quantifié la méthylation du mercure avec leur taux maximum observé: à l'exception de Steffan et al. (1988) qui obtiennent un pourcentage de méthylation de 2,5% en aérobie, on peut conclure que les taux les plus élevés ont été obtenus en anaérobie.

Tableau 4.2

TAUX DE MÉTHYLATION DU MERCURE  
OBSERVÉS EN AÉROBIE ET EN ANAÉROBIE

AUTEURS	AÉROBIOSE OU ANAÉROBIOSE	TAUX <sup>(2)</sup> MAXIMAL DE MÉTHYLATION OBSERVÉ (%)
Vonk et Sijpersteijn, 1973	Aérobie	,0068
Baker <u>et al.</u> , 1983	Aérobie	0,08
Jensen et Jernelov, 1969	Aérobie	0,13
Rowland <u>et al.</u> , 1975	Aérobie	0,3
Hamdy et Noyes, 1975	Aérobie	1,44
Hamdy et Noyes, 1975	Anaérobie	1,31
Steffan <u>et al.</u> , 1988	Aérobie	2,5
Olson et Cooper, 1976	Anaérobie	0,529
Yamada et Tonomura, 1972	Anaérobie	1,2
Compeau et Bartha, 1984	Anaérobie	2,6
Berman et Bartha, 1986	Anaérobie	2,88
Callister et Winfrey, 1986	Anaérobie	3,6

Ces résultats tous différents les uns des autres nous portent à croire que les conditions dans lesquelles ces expériences sont

---

2)  

$$\text{Taux} = \frac{\text{méthyl-mercure produit}}{\text{mercure inorganique au départ}} \times 100$$

conduites influencent de beaucoup les observations finales et que, peut-être, la production de méthyl-mercure pourrait être la même sous condition aérobie ou anaérobie. Mais le fait que sa dégradation sous condition anaérobie serait moins importante ferait que la quantité nette restante de méthyl-mercure serait plus grande sous condition anaérobie.

Dans nos échantillons, les concentrations dosées en mercure inorganique sont égales aux concentrations dosées en mercure total. C'est donc dire que nous n'avons décelé aucune production de mercure organique. Mais la méthode d'absorption atomique utilisée pour ce dosage a une précision d'environ 12%. Si le pourcentage de production de mercure organique se situait autour de 15% comme nous l'avait prédit Richards (1983), cette méthode pourrait s'appliquer à nos échantillons ou du moins pourrait nous donner une idée de la tendance générale. Mais pour des résultats tels que cités dans les références, c'est-à-dire des maxima de 0,08% (Baker et al., 1983), 0,13% (Jensen et Jernelov, 1969), 1,44% (Hamdy et Noyes, 1975) et 2,5% (Steffan et al., 1988), cette méthode analytique semble inadéquate.

#### 4.4 Dosage du mercure dans les cultures bactériennes

Dans son mémoire, Richards (1983) exprime la précision de sa méthode de la façon suivante:

"Des analyses ont été effectuées à dix reprises sur le même homogénat de chair de poisson. Elles ont donné un écart type de 0,031 pour le mercure total à la concentration de 0,51 mg Hg/Kg."

Or, on retrouve ce texte intégralement dans la méthode Bouchard et Tremblay (1978) et il ne semble pas que ces chiffres s'appliquent à l'évaluation de la méthylation du mercure dans un bouillon de culture ni que la précision n'ait été vérifiée pour le cas qui nous intéresse. Selon les auteurs, cette méthode permet de doser la teneur en mercure organique et inorganique dans les tissus de poissons, de sang et d'urine. Par extrapolation on parle de méthylation parce que 90% du mercure accumulé dans les tissus des poissons l'est sous la forme de méthyl-mercure. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle la norme de Santé et Bien-Etre Canada de 0,5 mg/Kg pour la teneur maximale en mercure dans les poissons pouvant être consommés est basée sur l'analyse du mercure total seulement. Or rien ne prouve que le mercure organique retrouvé dans des bouillons de culture est bel et bien du méthyl-mercure. La façon de le déterminer serait d'utiliser une méthode de chromatographie qui nous préciserait l'espèce de mercure dont nous sommes en présence. De plus, la précision ci-haut citée

représente un écart type relatif de 6,1% ce qui n'est pas comparable à nos résultats: 13,5%, 10,3%, et 5,5% pour, respectivement des teneurs en mercure total de 1,04, 2,03 et 2,97 ug de mercure.

Aucun auteur n'emploie la méthode d'absorption atomique seule pour évaluer la méthylation du mercure. Au tableau 4.3 on peut voir que les méthodes utilisées sont principalement la chromatographie et les méthodes radiochimiques (traceurs radioactifs).

Tableau 4.3

MÉTHODES D'ANALYSE DU MERCURE LORS  
DES EXPÉRIENCES SUR LA MÉTHYLATION

AUTEURS	MÉTHODES UTILISÉES
Olson et Cooper, 1976 Baker <u>et al.</u> , 1983	Spectrophotomètre d'absorption atomique couplé à un chromatographe
Jensen et Jernelov, 1969 Fageström et Jernelov, 1970 Vonk et Sijpersteijn, 1973 Rowland <u>et al.</u> , 1975 Compeau et Bartha, 1984 Berman et Bartha, 1986	Chromatographie
Matsumura <u>et al.</u> , 1972 Furutani et Rudd, 1980 Callister et Winfrey, 1986 Ramlal <u>et al.</u> , 1986 Steffan <u>et al.</u> , 1988	Méthode radiochimique
Yamada et Tonomura, 1972 Hamdy et Noyes, 1975 Ramamoorthy <u>et al.</u> , 1982	Chromatographie couplée à méthode radiochimique
Nagase <u>et al.</u> , 1982	Chromatographie couplée à spectromètre de masse

#### 4.5 Vérification des pertes de mercure

Nous avons constaté des pertes en mercure total d'en moyenne 40%, variant de 33 à 48%, du mercure ajouté au départ avant l'incubation et la congélation. Les échantillons témoins stériles ont accusé des pertes du même ordre de grandeur ce qui nous prouve que ces pertes n'ont pas été causées par les bactéries. Les tubes témoins ayant été incubés de la même façon que les échantillons, ceci nous permet de soupçonner l'étape de l'incubation à 35°C comme étant la ou une des causes du problème.

Pour vérifier l'effet de l'incubation sur les pertes de mercure, des tubes de bouillon IOC stériles ont été incubés à 35°C pendant 48 heures, et pour comparer, une série de tubes semblables ont été placés à 4°C pendant la même durée. Or, les pertes de 49% à 17% pour les tubes incubés à 35°C n'ont pas été observées pour les tubes réfrigérés. On peut donc s'interroger sur la cause de ces pertes. Il semble évident que la température a joué un rôle important. Les tubes étaient incubés avec des bouchons vissés et hermétiques. Il est fort probable que cette température a favorisé l'évaporation du mercure et que ce mercure contenu dans la phase gazeuse du tube n'ait pu être récupéré dans la partie liquide lors du brassage avant l'analyse et qu'une partie se soit échappée lors de l'ouverture du bouchon.

Le mercure étant un métal très volatil, plusieurs auteurs ont remarqué des pertes de mercure pour leurs expériences dans des conditions différentes ou semblables aux nôtres. Handy et Noyes (1975) ont analysé leurs échantillons contenant du mercure à l'aide de la chromatographie gaz-liquide (OGL) ou en couche mince (CCM). Ils ont remarqué qu'aucune trace de mercure n'a pu être détectée lorsqu'une goutte de 1  $\mu\text{gHg}/0,1\text{mL}$  de benzène fut laissée sur une plaque de CCM pendant 5 heures. Nakamura et al. (1986) ont étudié les caractéristiques de bactéries résistantes isolées des sédiments de la Baie de Ninamata. Entre autres, le taux de volatilisation du mercure pour 70 souches de Pseudomonas se situait entre 12 et 90% pour une moyenne de  $60,4 \pm 17,3\%$ . Les pertes de ces milieux de culture liquides incubés à 25°C pendant 48 heures ont été considérées comme étant l'effet de la volatilisation, mais cette volatilisation n'a pas été vérifiée. Billen et al. (1974) ont trappé le mercure volatilisé lors de l'incubation d'une culture de bactéries à l'aide d'une solution absorbante. Le mercure ainsi volatilisé représentait 31% du mercure dans la solution. Cependant, ces auteurs n'ont pas comparé cette culture avec un milieu semblable ne contenant pas de bactérie ce qui n'exclut pas le fait que la volatilisation ait pu se produire sans les bactéries.

Si on écartait cette possibilité d'évaporation, une autre explication serait que l'incubation à 35°C dans un bouillon de culture

transforme le mercure en partie sous une forme chimique non détectable par la méthode de dosage telle que décrite par Richards (1983) ce qui est peu probable.

L'incubation à 35°C est donc l'étape critique pour ce qui est des pertes puisque nous y avons observé la presque totalité des pertes lors des expériences de méthylation. Comme autre possibilité, l'étape de l'entreposage à -20°C est écartée comme origine de ces pertes puisque les tubes étaient bien vissés et que les tubes placés à 4°C pendant 48 heures n'ont accusé aucune perte significative. Craig et Morton (1976) citent une thèse de l'Université de Tulane écrite par Daughdrill en 1974 qui prétend que des échantillons de sédiments congelés à -15°C pendant 7 jours perdent jusqu'à 50% de leur contenu en mercure. Mais ces auteurs n'ont pas observé une perte en mercure significative pour des sédiments entreposés à -20°C, -6°C ou 20°C pendant 9 semaines ce qui contredit la thèse de Daughdrill (1974). Il se peut que dans le cas de ce dernier, il y a eu perte au niveau des contenants qui n'étaient pas suffisamment hermétiques.

On pouvait penser que le formol utilisé pour tuer les bactéries et arrêter la méthylation pouvait être une cause des pertes de mercure. Des échantillons formolés ont été comparés à des échantillons acidifiés à l'acide chlorhydrique sans déceler aucune différence significative.

Par contre, les pertes sur les parois du verre des bouteilles à réaction pour le dosage (8%) ne sont pas à négliger même si celles-ci sont beaucoup moins importantes que les pertes dues à l'incubation.

Summers et Lewis (1973) ont étudié la volatilisation du chlorure de mercure par des souches résistantes au mercure de Escherichia coli, Staphylococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa. Ils ont procédé par extraction dans des solvants organiques pour ensuite mesurer la radioactivité à l'aide d'un scintillateur liquide. Ils ont constaté qu'il est impossible de récupérer 100% du mercure parce qu'environ 20% est retenu à l'interface des débris cellulaires. Ils soulignent également que le mercure tend à adhérer à la surface de la vaisselle et des surfaces du système mais sans spécifier l'importance de ces pertes.

Une correction pourrait donc être apportée au montage de la présente étude en utilisant des contenants à réaction plus petits de façon à réduire la surface de verre non immergée.

## CHAPITRE 5

### CONCLUSION

Aucune production de mercure organique n'a pu être décelée pour les onze souches bactériennes isolées des sédiments de la rivière Saint-Louis. Nous n'avons donc pu confirmer les résultats de Richards (1983) qui obtenait en moyenne 15% de production de mercure organique pour des bactéries isolées au même site. Une production plus faible aurait cependant été impossible à vérifier puisque la méthode d'absorption atomique pour le dosage du mercure, telle que décrite par Richards (1983), nous donne une précision entre 10,3 et 13,5% pour la concentration analysée. La méthode n'est donc pas adéquate pour ce type d'étude, d'autant plus qu'aucun autre auteur, dans la bibliographie consultée, n'obtient un pourcentage de méthylation aussi élevé. De plus, pour pouvoir parler de méthylation, il aurait fallu s'assurer, par des méthodes appropriées telles que chromatographiques, que le mercure organique produit, s'il en est, est bel et bien du méthyl-mercure.

Il n'a pas été possible de reproduire les résultats de résistance des souches bactériennes: la plupart des bactéries de notre étude sont résistantes à 50 ug/mL de mercure alors que celles de Richards (1983) l'étaient, pour la majorité, à 6,25 ug/mL et moins. En comparant avec une autre méthode en tubes, les mêmes souches qui étaient résistantes à 50 ug/mL de mercure sur des géloses n'étaient pas viables à 12,5 ug/mL

de mercure dans des bouillons. Les modifications que nous avons dû apporter à la méthode proposée par Richards (1983), compte tenu du manque de précision relevé dans celle-ci, peuvent peut-être expliquer la différence entre ses résultats et les nôtres.

Nous avons constaté des pertes en mercure total d'en moyenne 40% variant de 33 à 48% du mercure ajouté avant l'incubation pour les échantillons soumis à l'épreuve de production de mercure organique. Ces pertes ont été principalement causées par l'étape d'incubation puisque les échantillons réfrigérés pendant 48 heures n'ont subi aucune perte alors que ceux qui ont été incubés pendant la même durée accusent des pertes d'environ 49% pour des concentrations de 3 ug/mL de mercure et d'environ 17% pour 12 ug/mL.

L'adsorption sur les parois du verre de la bouteille à réaction lors du dosage du mercure peut être considérée également comme cause des pertes quoique beaucoup moindre: en moyenne 8% pour une concentration de 5 ug/mL de mercure.

Une vérification de l'étape de digestion du mercure lors du dosage nous permet d'affirmer que la température de 80°C et la durée de 30 minutes sont des conditions optimales de digestion.

Richards (1983) parle de déversements sporadiques de chlore effectués par la compagnie PPG. Si de tels déversements ont continué, il se pourrait que nos résultats de dénombrements bactériens aient été affectés.

En somme, il est fort probable que ces souches indigènes de bactéries produisent du mercure organique à partir de chlorure mercurique mais à un pourcentage inférieur au niveau de détection de la méthode de Richards (1983). Toutefois, les souches utilisées, quoique provenant du même site et étant de même genre et espèce, étaient différentes de celles utilisées par celui-ci parce ces dernières n'avaient pas été congelées ou lyophilisées. Aussi, les conditions du site ont pu changer, compte tenu des mesures anti-pollution prises récemment par la compagnie PPG. Ces raisons peuvent expliquer les divergences entre nos résultats et ceux obtenus par Richards (1983).

## CHAPITRE 6

### RECOMMANDATIONS

Dans une étude subséquente, il serait intéressant de vérifier la diminution, s'il en est, du niveau de pollution par le mercure de la rivière Saint-Louis et également du lac Saint-Louis dans la région de Beauharnois suite aux mesures anti-pollution annoncées récemment par la compagnie PPG.

Parce que des souches bactériennes mises en présence de mercure depuis bon nombre d'années ont pu sélectionner le caractère de résistance, favorisant par le fait même le processus de méthylation du mercure, il serait intéressant de connaître leur taux de production en mercure organique. Une technique radioactive permettrait de détecter la méthylation avec une plus grande sensibilité qu'une méthode chimique. Par exemple, Ramlal et al. (1986), qui utilisent une telle technique, ajoutent 0,001 ug Hg par gramme de sédiments pour déceler des pourcentages de méthylation aussi peu élevés que 0,013%.

De plus, il serait intéressant d'ajouter du mercure directement aux sédiments pour étudier la méthylation. La plupart des auteurs utilisent cette alternative qui se rapproche mieux de la réalité environnementale.

Et finalement, il serait intéressant de vérifier si le mercure organique produit est bel et bien du méthyl-mercure en utilisant une méthode du type chromatographie qui peut différencier les espèces de mercure produites.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

APHA, AWWA, WPCF (1985), Standard Methods for the Examination of water and wastewater, 16ème édition, 1268 pp.

BAKER, M.D.; INNIS, W.E.; MAYFIELD C.I.; WONG, C. (1983), Effect of pH on the methylation of mercury and arsenic by sediment microorganisms, Environmental Technology Letters, 4(2) : 89-100.

BERGEY'S manuel of determinative bacteriology, 8ème édition, 1974, R.E. Buchanan et U.E. Gibbons éditeurs, 1268 pp.

BERMAN M. ; RICHARD B. (1986), Levels of chemicals versus biological methylation of mercury in sediments, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 36 : 401-404.

BILLEN, G.; JOIRRS, C.; WOLLAST, R. (1974), A Bacterial methyl mercury mineralizing activity in river sediments, Water Research, 8 : 219—225.

BOUCHARD, A.; PLANTE, R.; TROTTIER J., (1981), Guide d'évaluation de la qualité bactériologique de l'eau potable - Méthodologie de laboratoire, Ministère de l'Environnement du Québec, Direction générale des inventaires et de la recherche, Mai 1981.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES (suite)

- BOUCHARD, A.; TREMBLAY, G. (1978), Détermination du mercure organique et inorganique par absorption atomique sans flamme, Québec, dans : Conférence présentée au 56ème Congrès de l'Institut de Chimie du Canada (Montréal 3-6 juin 1973).
- CALLISTER S.M.; WINFREY, M.R. (1986), Microbial methylation of mercury in upper Wisconsin river sediments, Water Air Soil Pollution, 29 (4) : 453-65.
- CARIGNAN, S.; ALVES, H.D. (1978), Contaminants de l'environnement dans la zone d'influence industrielle de la rivière Saint-Louis dans la région de Beauharnois, Services de protection de l'environnement, Pêches et environnement Canada, 291pp.
- CHAKRABARTY, A.M. (1982), Biodegradation and detoxification of environmental pollutants, CRC Press Inc., FLA. (U.S.A.), 147 p.
- CLARK, D.L.; WEISS, A.A.; SILVER, S (1977), Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in Pseudomonas, Journal of Bacteriology, 132 (1) : 186 - 196.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES (suite)

CODALIE, R.V.; SASSEVILLE, J.L.; VISSER, S.A. (1976), Cheminement du mercure et des insecticides vers les organismes aquatiques, Eau du Québec, 9 (4) : 35-39.

COMPEAU, G; BARIHA, R. (1984), Methylation and demethylation of mercury under controlled redox, pH, and salinity conditions, Applied and Environmental microbiology, 48 (6) : 1203 - 1207.

CRAIG, P.J.; MORTON, S.F (1976), Mercury in Mersey estuary sediments and the analytical procedure for total mercure. Nature, 261, 125-126.

DAUGHDRILL, W.E. (1974), Thèse, Université de Tulane.

DELISE, C.E.; DESCHAMPS, G.R.; BLAIS-LADOUCEUR, L.; MESSIER, M. et MOULIN, J. (1981), Impacts des métaux lourds dans les sédiments et la faune aquatique de la région industrielle de Beauharnois, Québec, Canada, Verh. Internat. Verein. Limnol., 21 : 1116-1125.

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ (DGPS) (1981), Examen microbiologique des médicaments non stériles, essai no.3, 12pp.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES (suite)

EDWARD E.; EWIN, S. (1986), Identification of Enterobacteriaceae, 4e édition, Williams H. et Wing, Elsevier, N.Y., 536 pp.

ENVIRONNEMENT CANADA (1981), Méthodes d'échantillonnage de conservation et de dosage du mercure, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Rapport SPE-3-EC-81-4F.

FAGERSTRÖM, T.; JENERLÖV, A. (1970), Formation of methyl mercury from pure mercuric sulphide in aerobic organic sediment, Water Research, 5 : 121-122.

FAUCHER, D. (1988), Ingénieur chez Pittsburg Paint and Glass, Beauharnois, Québec, Communication personnelle.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES (suite)

- FARMER III J.J.; DAVIS, B.R.; HICKMAN-BRENNER, F.W.; McWORTER, A.;  
HUNTLEY-CARTER, G.P.; ASEBURY, M.A.; RIDDLE, C.; WATHEN-GRADY,  
H.G.; ELLIAS, C.; FANNING, G.R.; STEINGERWALT, A.G.; OHARA, C.M.;  
MORRIS, G.K.; SMITH, P.B.; BRENNER, D.J. (1985), Biochemical  
identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae  
isolated from clinical specimens, Journal of clinical  
microbiology, 21 (1) : 46-76.
- FURUTANI, A.; RUDD, J.W.M. (1980), Measurement of mercury methylation  
in lake water and sediment samples, Applied and Environmental  
Microbiology, 40 (4) : 770-776.
- HAMDY, M.K.; NOYES, O.R. (1975), Formation of Methyl Mercury by  
Bacteria, Applied Microbiology, 30 (3) : 424-432.
- JENSEN, S.; JERNELOV, A. (1969), Biological Methylation of mercury in  
aquatic organisms, Nature, Vol. 223; 753-754.
- KEIL, J.E.; SANDIFER, S.H.; GRABER, C.D.; PRIESTER, L.E. (1972), DDT  
and Polychlorinated biphenyl (aeorclor 1242<sup>R</sup>) Effects of uptake on  
Escherichia coli Growth, Water Research, 6 : 837-841.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES (suite)

KOMURA, I.; IZAKI, H.; TAKAHASHI, H. (1970), Vaporisation of Inorganic Mercury by Cell-free Extracts of Drug Resistant Escherichia coli, Agricultural and Biological Chemistry, 34 (3) : 480-482.

KONDO, I.; ISHIKAWA, T.; NAKAHARA, H (1974), Mercury and Cadmium resistances mediated by the penicillinase plasmid in Staphylococcus aureus, Journal of Bacteriology, 117 (1) : 1-7.

MATSUMURA, F.; GOTOH, Y., BOUSH, G.M. (1972), Factors Influencing Translocation and Transformation of Mercury in River Sediment, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 8 : 267-272.

McALPINE, D.; ARAKE, S. (1958), Minamata disease : an unusual neurological disorder caused by contaminated fish, Lancet, 2 : 629.

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, 24 : 133-142.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES (suite)

NAKAMURA, K.; FUJISAKI, T.; et TAMASHIRO, H. (1986), Characteristics of Hg Resistant bacteria isolated form Minamata Bay Sediment, Environmental Research, 40 : 58-67.

OLSON, B.H.; COOPER, R.C. (1976), Comparison of aerobic and anaerobic methylation of mercuric chloride by San Francisco Bay Sediments, Water Research, 10 : 113-116.

OLSON, B.H.; BARKAY, T.; COLWELL, R.R. (1979), Role of plasmids in mercury transformationn by bacteria isolated from the aquatic environment, Applied Environment Microbiology, 38 : 4780485.

RAMAMOORTHY, S.; CHENG, T.C.; et KUSHNER, D.J. (1982), Effect of microbial life stages on the fate of methyl mercury in natural waters, Bulletin of environmental contamination and toxicology, 29 (2) : 167-173.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES (suite)

RAMLAL, P.S.; RUDD, J.W.M.; HECKY, R.E. (1986), Methods for measuring specific rates of mercury methylation and degradation and their use in determining factors controlling net rates of mercury methylation, Applied and Environmental Microbiology, 51 (1) : 110-114.

RICHARDS, R. (1983), Étude bactériologique de la rivière et du lac Saint-Louis au niveau de la ville de Beauharnois et méthylation du mercure par les souches indigènes, Mémoire de Maîtrise en sciences appliquées, École Polytechnique.

ROWLAND, I.R.; GIASSO, P., DAVIES, M.J. (1975), The methylation of Mercuric chloride by Human Intestinal Bacteria, Experientia, 31 (9) : 1064-1065.

SÉRODES, J.-B.; TALBOT, L. (1980), Projet de restauration du sud du Lac Saint-Louis contaminé par le mercure, BEST-8, 75 p.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES (suite)

SPRANGLER, W.J.; SPIGARELLI, J.L.; ROSE, J.M.; FLIPPIN, R.S.; MILLER, H.H. (1973), Degradation of Methyl mercury by Bacteria Isolated from Environmental Samples, Applied Microbiology, 25 (94) : 485-493.

STEFFAN, R.J.; KORIHALS, E.T. et WINFREY, M.R. (1988), Effects of acidification on mercury methylation, demethylation and volatilization in sediments from an acid-suceptible lake, Applied and Environmental Microbiology, 54 (8) : 2003-2009.

SUMMERS, A.O.; SILVER, S. (1972), Mercury Resistance in a Plasmid-Bearing Strain of Escherichia coli, Journal of Bacteriology, 112 (3) : 1228-1236.

SUMMERS, A.O., LEWIS, Elaine (1973), Volatilization of Mercuric Chloride by Mercury-Resistant Plasmid-Bearing Strains of Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Pseudomonas aeruginosa, Journal of Bacteriology, 113 : 1070-1072.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES (suite)

SUMMERS, A.O.; KIGHT-OLLIFF, L. (1980), Tn1 Generated mutants in the mercuric ion reductase of the Ins P Plasmid, R702, Molecular and General Genetics, 180 : 91-97.

TREVORS, J.T. (1986), Mercury resistant bacteria isolated from sediment, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 36 : 405-411.

VONK, J.W.; SLJPESTELJN, A.K. (1973), Studies on the Methylation of Mercury Chloride by Pure Cultures of Bacteria and Fungi, Antonie Van Leeuwenhoek, 39 : 505-513.

WEISS, A.A.; MURPHY, S.D.; SILVER, S. (1977), Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in Staphylococcus aureus, Journal of Bacteriology, 132 (91) : 197-208.

YAMADA, M.; TONOMURA, K. (1972), Formation of methyl mercury Compounds from inorganic Mercury by Clostridium cochlearium, Journal of Fermentation Technology, Vol. 50, no. 3, pp. 159-166.

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL



3 9334 00290814 1