UNIVERSITE DE LAUSANNE

FACULTÉ DES SCIENCES

ASSOCIATIONS ENTRE PHASES MINÉRALES DE FER ET DE MANGANÈSE, POLLUANTS ANTHROPOGÉNIQUES ET BIOTA EN MILIEU LACUSTRE: MISE EN ÉVIDENCE PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE.

THÈSE DE DOCTORAT

PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

PAR
CHARLES-PHILIPPE LIENEMANN
DIPLÔMÉ EN CHIMIE DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE

LAUSANNE, JUIN 1997

GR-92

UNIVERSITE DE LAUSANNE

FACULTÉ DES SCIENCES

ASSOCIATIONS ENTRE PHASES MINÉRALES DE FER ET DE MANGANÈSE, POLLUANTS ANTHROPOGÉNIQUES ET BIOTA EN MILIEU LACUSTRE: MISE EN ÉVIDENCE PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE.

THÈSE DE DOCTORAT

PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

PAR
CHARLES-PHILIPPE LIENEMANN
DIPLÔMÉ EN CHIMIE DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE

LAUSANNE, JUIN 1997

Imprimatur

Université de Lausanne

Faculté des Sciences

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

MM M. le Prof. Jean-Claude BUENZLI, directeur de thèse, MM. les Profs Jean-François GAILLARD, Stanislav Fakan, et M. le Dr Didier Perret, experts, M. le Prof. Peter VOGEL, président.

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de Monsieur Charles-Philippe LIENEMANN, chimiste diplômé de l'Université de Genève

intitulée ASSOCIATIONS ENTRE PHASES MINERALES DE FER ET DE MANGANESE, POLLUANTS ANTHROPOGENIQUES ET BIOTA EN MILIEU LACUSTRE: MISE EN EVIDENCE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Lausanne, le 14 juillet 1997

pour *Le doyen de la Faculté des Sciences:*
Professeur Peter VOGEL

REMERCIEMENTS:

Je tiens à remercier sincèrement le Dr Didier Perret qui a su guider ma recherche et qui m'a permis de montrer l'utilité de la microscopie électronique dans les études environnementales.

Mes remerciements vont également aux Professeurs Jean-François Gaillard, Pierre Stadelmann, Stan Fakan, Januz Dominik pour leur précieuse aide lors de mon travail sur le terrain et avec les microscopes électroniques.

Un grand merci également au Prof. Jean-Claude Bünzli pour la liberté qu'il m'a accordée lors de ce travail de thèse.

Ce mémoire ne serait pas ce qu'il est sans l'amitié qui m'a lié à Marc Monnerat et Martial Taillefert avec qui les heures sur le terrain se sont révèlées vraiment plaisantes, et avec qui j'ai eu de nombreuses interactions lorsqu'il a fallu mettre sur pages nos résultats.

Je remercie également ma fiancée, Stéphanie Rouchon, pour sa patience et son aide lors de la rédaction de ce mémoire.

Un remerciement tout particulier à Franco Ardizzoni et à l'équipe du Centre de Microscopie Electronique de l'UniL pour leur précieuse aide "microscopique"et leur convivialité.

Un grand merci aussi aux personnes avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer afin d'élargir la vision d'ensemble de mon travail de thèse: Barbara McGregor chez le Prof. Dave Stahl, Emmanuelle Charton et Hélène Percherancier chez la Prof. Anne-Monique Gounot et le Dr Mauro Tonolla chez le Prof. Raymond Peduzzi, ainsi que le Prof. Gary G. Leppard.

La partie effectuée avec les plaquettes de Teflon^{TM} n'aurait été possible sans l'intervention d'Yves Morier et de Hugues Siegenthaler.

Je ne saurais oublier toutes les personnes qui m'ont donné leur précieuse aide dans toutes sortes de domaines, Gilles Boss, l'Atelier de l'ICMA, Georges Beyeler et Raymond Durgnat, Blaise Villars ainsi que mes collègues proches: Dr Denis Mavrocordatos, Christine Couture, Enrico Leipzig-Pagani, Loïc Perring, Sébastien Barnet, Carmen Del Rio Cantero, Marc Lomello, Ghislaine Besson, Brian Greidanus, Cédric Féliers, Dr Laurence Méjanelle, Kevin Johnson et la Fondation du 450ème.

Et finalement, je tiens à remercier ma famille: mon père et ma mère, Françoise et Jean-Christophe, ma grand-mère Marguerite, Dominique, Camille et Céline pour leur soutien lors de la rédaction de ce manuel et pendant les 4 ans de ma thèse.

RÉSUMÉ

La compréhension des mécanismes de formation/association/transformation des substances colloïdales et particulaires dans les milieux aquatiques naturels nécessite l'utilisation de schémas analytiques complexes. Les méthodes d'analyses chimiques conventionnelles à l'échelle macroscopique apportent des informations sur la composition globale des échantillons. En parfaite complémentarité, la microscopie électronique, développée et optimalisée pour l'étude des milieux aquatiques naturels, est un puissant outil de caractérisation des substances colloïdales organiques et minérales. En outre, l'utilisation de la microscopie électronique analytique (sondes spectroscopiques connectées au microscope) permet de déterminer la composition des entités particulaires, à l'échelle de la microparticule individuelle.

Dans ce travail, nous avons d'abord optimalisé les méthodes de visualisation des entités organiques en privilégiant la conservation de l'état natif des échantillons. Dans ce but, nous avons également développé une méthode de prélèvement *in situ* basée sur la réactivité des oxyhydroxides de fer et de manganèse. Deux systèmes naturels méromictiques ont été choisis pour l'application de ces méthodes: Le lac de Lugano (Tessin) et le lac Paul (MI/WI; Etats-Unis); nos efforts ont portés sur la détermination de la morphologie et de la composition des particules de fer et de manganèse, principaux pièges des polluants dans les milieux aquatiques.

L'utilisation d'une méthode de marquage sélectif (protéinate d'argent) de la matière organique a permis de mettre en évidence par microscopie électronique à transmission, de manière non-équivoque, l'omniprésence des polysaccharides d'origine algale ou bactérienne dans les échantillons naturels, ainsi que leur association quasi systématique avec des microparticules de fer. Ces résultats inédits, confirmés par des synthèses en laboratoire dans des conditions environnementales, ont permis de comprendre la morphologie inhabituelle de colloïdes riches en fer formés dans le lac Paul: En présence de polysaccharides fibrillaires, le Fe^{2+} s'oxyde à la surface des fibrilles qui agissent probablement comme centres de nucléation; il en résulte des colloïdes amorphes d'aspect organo-minéral, dont la composition et la morphologie s'écartent des modèles traditionnels de

laboratoires (généralement des sphères rigides) utilisés dans l'étude des mécanismes d'adsorption des métaux traces. Ces observations nous ont permis de montrer que, contrairement aux considérations généralement acceptées sur les interactions entre matière organique et phases particulaires, les processus naturels de production de colloïdes de fer peuvent conduire à la formation de granules attachés sur des réseaux de polysaccharides (cas du lac de Lugano) ou d'entités intimes fer-polysaccharides de morphologie mal définies (cas du lac Paul).

Dans le lac de Lugano et le lac Paul, les phases particulaires de Mn sont produites par des bactéries, dont la nature n'est pas identique entre les deux lacs. Selon les résultats morphologiques, il est postulé qu'un micro-organisme de type *Metallogenium* est à l'origine de la formation de MnO_x dans le lac de Lugano. Cette bactérie est intégralement recouverte d'oxyde de Mn dans les stades finaux observés et sa survie au sein de la matrice minérale est probablement impossible. Un phénomène similaire est observé avec certaines structures de fer dans le lac Paul, également produites par le biota au départ, où des spécimens préparés par ultramicrotomie révèlent des reliquats complètement noyés dans un gange de fer. La bactérie responsable de l'oxydation du Mn^{2+} en MnO_x dans le lac Paul est probablement proche de l'espèce *Zooglea*, qui semble contrôler la formation des oxydes de Mn à sa surface.

L'approche microscopique que nous avons adoptée, combinée à des analyses chimiques conventionnelles, nous a d'autre part donné l'opportunité de mettre en évidence la spécificité d'interactions entre certains éléments traces ou nutrients et certaines phases particulaires.

Dans le lac de Lugano, la présence d'une phase stoechiométrique entre phosphates et fer a été montrée sans équivoque. Pour ces analyses, l'approche microscopique présente l'avantage de ne pas induire d'artefact sur la détermination du rapport molaire P:Fe (0,48±0,03 pour environ 1100 particules analysées), contrairement à l'approche analytique classique (filtrations et ultrafiltrations), qui génère d'importantes variations sur les résultats obtenus ($P:Fe_{coll.}$=21,6±50,7; $P:Fe_{part.}$=1,12±0,98 et $P:Fe_{membr.}$=0,54±0,58).

Résumé

Dans le lac Paul, nous avons pu distinguer des concentrations traces de cobalt associé à des particules riches en manganèse formées à l'interface oxique/anoxique du lac. Il a d'autre part été possible de quantifier le rapport de concentrations (Co:Mn = 2%) dans les particules individuelles de manganèse. Ces résultats ont été confirmés par les méthodes analytiques conventionnelles (GFAAS, ICP) et montrent un enrichissement en cobalt dans les phases particulaires par rapport aux concentrations mesurées dans la colonne d'eau. Nos observations nous permettent de mettre en évidence que les substances dissoutes présentes dans le milieu aquatique sont susceptibles d'interagir de manière sélective avec les phases particulaires.

Bien que les méthodes microscopiques nécessitent un investissement en temps important pour l'acquisition de résultats statistiquement valables, elles permettent d'obtenir des informations difficiles, voire impossibles à déterminer selon les approches conventionnelles (analyses chimiques classiques effectuées sur les suspensions échantillonnées).

ABSTRACT

Natural waters contain a broad diversity of mineral and organic particles. In order to understand the relationship between them, instrumentation capable of recording detailed and subtle modifications is required. Conventional analytical techniques can describe bulk chemical characteristics, whereas Analytical Electron Microscopies (AEM) combined with the development of unbiased specimen preparation schemes are the optimum tools to characterize colloidal entities. Moreover, AEM go much beyond the basic level of morphological observation and render possible to gain physico-chemical information difficult to obtain by conventional analytical procedures.

We report here the development of visualization techniques of organic material, difficult to reveal by conventional transmission electron microscopy because of their poor electron density. Optimization of specimen preparation and visualization parameters allows unbiased identification of organic substructures. The development of a new sampling technique, based on the reactivity of freshly-formed iron and manganese oxides allowed *in situ* collection of particles on Teflon™ plates. Lake Lugano (Switzerland) and Paul Lake (MI/WI - USA) were chosen to apply these methods to natural systems.

The derivation of a staining scheme originally developed for resin-embedded thin sections allowed the specific identification of polysaccharides among various specimens. Their high number concentration in the water column of Lake Lugano and Paul Lake, and their numerous association with iron oxyhydroxides, have highlighted their ubiquity in aquatic systems. Intimate mixtures observed between iron oxyhydroxides and polysaccharides were investigated by laboratory studies in order to understand their morphology. The results obtained have evidenced a mechanism, where Fe^{2+} is oxidized at the surface of fibrillar material which acts as nucleation cell. These observations have shown that natural iron-rich particles are more complex than conventional models based on a solid-water interface coated with low molecular weight organic matter.

Further investigations were conducted on mineral particles (iron(oxy)hydroxides and manganese oxides), which have been evidenced to play a key role in the transport and distribution of trace heavy metals and anthropogenic pollutants within natural aquatic sys-

tems. Mn oxidation was investigated in both lakes, and shows differences in the morphology of the final product and behaviour. In lake Lugano, a *Metallogenium*-like structure was observed. The final encrusted product is probably no longer a bacterium, but the presence of a cell in the first step of its development gives it a biological origin. A similar evolution is observed in Paul lake with iron oxides, where the final product, revealed with the help of ultramicrotomy, shows a empty spot in the center of the structure left by the bacterium that have initiated the oxidation. The identification of the bacterium responsible for the oxidation of Mn^{2+} to MnO_x in Paul lake through a microbiological approach assigned it to *Zooglea.*

AEM investigations combined with conventional bulk chemistry also evidenced specific associations between anthropogenic pollutants and iron or manganese phases: A close examination of the composition of individual Fe-rich particles in Lake Lugano reveals that phosphorus is omnipresent in the spherical entities and that the correlation between these two elements, as revealed by AEM, is tight ($[P:Fe]_{part.}$=0,48±0,03). This observation suggests that a stoechiometric P-Fe phase is produced in the water column of Lake Lugano. On the other hand, bulk chemistry failed to produced valid data because of numerous artefact created by filtration and ultrafiltration devices, but also because the size fractionation approach is not the appropriate procedure for this kind of determination ($P:Fe_{coll.}$=21,6±50,7; $P:Fe_{part.}$=1,12±0,98 and $P:Fe_{membr.}$=0,54±0,58). The inspection of particulate manganese in Paul Lake by high resolution AEM has shown that bacteria covered by manganese oxide overgrowth are the most likely candidates for the scavenging of Co in the water column. Co:Mn ratios obtained at the level of individual particles ($[Co:Mn]_{part.}$=2%) and ratios inferred from bulk water analyses indicate that Mn crusts are enriched in Co compared to the solution. Theses results give prominence to the fact that dissolved species can interact selectively with particles in aquatic systems.

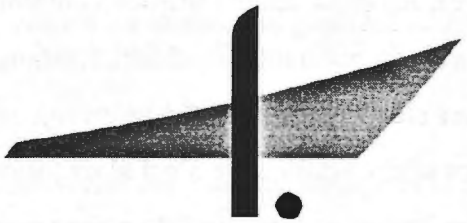
If microscopic investigations by themselves are rather fastidious due to numerous measurements necessary to statistically validate the observations, they can bring to the fore information that is difficult, or even impossible to obtain by conventionnal techniques. A multidisciplinary approach allows to reduce the number of analyses necessary to validate results, by crosslinking the techniques on the same topics.

TABLE DES MATIÈRES:

1. INTRODUCTION 2
   1.1 Contexte de l'étude 4
   1.2 Buts et structure de l'étude 7
2. NOTIONS GÉNÉRALES 12
   2.1 Cycle du fer 13
   2.2 Cycle du Mn 16
   2.3 La microscopie électronique : Un outil performant 20
3. PRÉPARATION EN LABORATOIRE 27
   3.1 Microscopie électronique 28
      3.1.1 Préparation des porte-spécimens 29
      3.1.2 Ultracentrifugation 29
      3.1.3 Inclusion en résine et ultramicrotomie 32
      3.1.4 Présentation des TEM et SEM à disposition 33
   3.2 Etude de la matière organique par microscopie électronique 35
      3.2.1 Optimalisation du marquage à l'acétate d'uranyle 38
         3.2.1.1 Méthode de post-staining 38
         3.2.1.2 Marquage "en bloc" 39
      3.2.2 Microscopie électronique à filtre d'énergie: Optimalisation de la syntonisation de contraste 41
      3.2.3 Combinaison entre acétate d'uranyle et syntonisation de contraste 44
      3.2.4 Optimalisation du marquage avec le protéinate d'argent 46
   3.3 Colloïdes de fer: synthèses en laboratoires 48
      3.3.1 Conditions de synthèse 49
      3.3.2 Association avec la matière organique 51
      3.3.3 Caractérisations par spectroscopie EDS 54
   3.4 Récupération in situ de phases particulaires sur supports Teflons^{TM} 55
      3.4.1 Plaquettes Teflon^{TM}: Approche chimique 56
      3.4.2 Plaquettes Teflon^{TM}: Approche microscopique 58
      3.4.3 Effet de la surface des plaquettes de Teflon^{TM} 58
4. PREMIER CAS D'ÉTUDE: LE LAC DE LUGANO 61
   4.1 Problématique des phosphates dans le lac de Lugano 62
   4.2 Contexte de l'étude 62
      4.2.1 Instrumentation 63
   4.3 Le lac de Lugano 64
      4.3.1 Caractéristiques générales du bassin nord 66
   4.4 Echantillonage 67
      4.4.1 Schéma de fractionnement 69
      4.4.2 Méthodologie analytique 70
   4.5 Caractérisations physico-chimiques du lac 72
      4.5.1 Mesure de la température 72

4.5.2 Mesure de l'oxygène dissous ... 73
4.5.3 Mesure du pH ... 74
4.5.4 Mesure de la turbidité ... 74
4.6 Résultats des analyses chimiques ... 76
4.6.1 Fractionnement du fer dans la colonne d'eau ... 76
4.6.1.1 Fer ferreux ... 76
4.6.1.2 Fractionnement par filtration / ultrafiltration ... 78
4.6.1.3 Fer récolté sur les membranes ... 78
4.6.2 Fractionnement du manganèse dans la colonne d'eau ... 78
4.6.2.1 Fractionnement par filtration / ultrafiltration ... 78
4.6.2.2 Manganèse récolté sur les membranes ... 82
4.6.3 Fractionnement des phosphates dans la colonne d'eau ... 82
4.6.3.1 Fractionnement par filtration / ultrafiltration ... 82
4.6.3.2 Phosphates récoltés sur les membranes ... 83
4.6.4 Mesure des sulfures, du carbone organique total et autres observations ... 85
4.6.5 Rapport P:Fe ... 87
4.6.5.1 Rapport molaire P:Fe mesurés dans les particules ... 87
4.6.5.2 Rapport molaire P:Fe mesurés dans les colloïdes ... 87
4.6.6 Rappel des résultats obtenus selon l'approche chimique ... 90
4.6.6.1 Critique des résultats ... 90
4.6.6.2 Corrélation entre fer et phosphates ... 90
4.6.6.3 Evolution saisonnière des espèces particulaires ... 91
4.7 Résultats obtenus par microscopie électronique ... 91
4.7.1 Principe de l'échantillonage ... 91
4.7.2 Analyse morphologique ... 93
4.7.3 Résultats de l'analyse morphologique ... 97
4.7.4 Analyse physico-chimique ... 98
4.7.5 Interprétation des résultats EDS ... 101
4.8 Interprétations des résultats (comparaison chimie-TEM) ... 109
4.8.1 Les entités du manganèse ... 109
4.8.2 Les entités du fer ... 112
4.9 Utilisation des plaquettes de Teflon™ ... 119
4.10 Rappel des résultats et lien avec le réel ... 123
5. SECOND CAS D'ÉTUDE: LE LAC PAUL ... 127
5.1 Problématique des métaux traces ... 128
5.2 Contexte de l'étude ... 130
5.2.1 Collaboration ... 130
5.2.2 Instrumentation ... 131
5.2.3 Méthodologie analytique ... 132
5.3 Le lac Paul ... 132
5.3.1 Caractéristiques générales du lac ... 134
5.3.2 Comportement des métaux traces dans le lac Paul ... 134
5.4 Caractérisation physico-chimique ... 136
5.4.1 Mesure de la température ... 136
5.4.2 Mesure de l'oxygène ... 137
5.4.3 Mesure du pH ... 137

5.4.4 Mesure de la turbidité 138
5.5 Variations temporelles du lac Paul 139
5.6 Méthode de prélèvement et conditions d'analyse 141
5.6.1 Schéma de fractionnement 142
5.6.2 Echantillonage pour analyses chimiques 143
5.6.3 Echantillonage et conditions pour les analyses microscopiques 143
5.7 La colonne d'eau : voyage en TEM 146
5.7.1 Résultats de l'analyse morphologique 150
5.8 Etude du Mn dans la colonne d'eau du lac Paul 151
5.8.1 Profils chimiques du manganèse 151
5.8.2 Profil chimique du Co et association avec le Mn 152
5.8.3 Approche par microscopie électronique: Les particules du Mn et leurs associations avec les bactéries 156
5.8.4 Interactions entre cobalt et manganèse 158
5.8.5 Résumé des résultats obtenus concernant le Mn dans la colonne d'eau du lac Paul 163
5.9 Etude du Fe dans la colonne d'eau du lac Paul 165
5.9.1 Spéciation chimique du fer 165
5.9.2 Profil chimique du plomb 167
5.9.3 Colloïdes de Fe: magma fibrillaire 168
5.9.4 Carbone organique dissous 170
5.9.5 Résultats obtenus avec des sections de Nanoplast 171
5.9.6 Mise en évidence des polysaccharides 174
5.9.7 Interactions entre plomb et fer; analyses par microscopie électronique analytique 176
5.9.8 Résumé des résultats obtenus sur le Fe dans la colonne d'eau du lac Paul 178
5.10 Echantillon in situ avec plaques Teflon™ 179
5.10.1 Analyses chimiques du matériel déposé sur les plaquettes Teflon™ 180
5.10.2 Analyses microscopiques du matériel déposé sur les plaquettes Teflon™ 184
5.11 Rappel des résultats et lien avec le réel 185
6. RÉSUMÉ ET PERSPECTIVES 187
6.1 Rappel des résultats 188
6.1.1 Récupération de phase authigènes par les plaques de Teflon™ 189
6.1.2 Formation d'oxydes de Mn par les bactéries 190
6.1.3 Importance des polysaccharides dans la formation des oxydes de Fe(III) 191
6.1.4 Spécificité des métaux traces pour les phases de Fe ou de Mn 192
6.2 Perspectives 192
6.2.1 Etats d'oxydation des phases d'oxyhydroxydes de Mn 193
6.2.2 Importance du biota sur la croissance des phases d'oxyhydroxydes de fer et de manganèse 196
6.2.2.1 Profils phylogéniques du lac Paul 197
6.2.2.2 Isolement et culture de la souche bactérienne responsable de l'oxydation du Mn .. 199
6.2.3 Caractérisation des polysaccharides dans le milieu naturel 201
6.2.4 Processsus d'adsorption des particules de fer et de manganèse sur les plaquettes de Teflon™ 202
BIBLIOGRAPHIE 203



INTRODUCTION

1. INTRODUCTION.....2
1.1 Contexte de l'étude.....4
1.2 Buts et structure de l'étude.....7

1. INTRODUCTION

L'impact de l'homme sur son environnement n'a cessé de s'aggraver au cours de ce siècle. Si, pendant plusieurs siècles, les eaux ont été utilisées comme le système auto-épurateur capable d'ingérer toutes sortes de polluants, l'industrialisation, l'urbanisation et l'agriculture intensive de ce dernier siècle ont intensifié leurs rejets polluants jusqu'à certains points de non-retour. La conscience collective s'est alors tournée vers les milieux scientifique afin de comprendre les limites et équilibres du milieu naturel, dans le but de protéger et préserver les environnements intacts et de restaurer les systèmes gravement pollués. Il est en effet pertinent de noter que la science de l'environnement est en pleine expansion, et que cette croissance coïncide avec la mise en évidence de milieux profondément modifiés, où l'équilibre entre composants de l'écosystème est perturbé. Depuis la description de lacs profondément pollués découverts au milieu du siècle (*Baldi et al., 1949; Liechti, 1994; Tilzer et Serruya, 1990*), les effets de la pollution humaine s'étendent maintenant à des systèmes de plus grande envergure, tels la Mer Noire ou l'Adriatique (*Ros, 1994*).

Les eaux douces couvrent 2% de la planète, essentiellement regroupées sous la forme de calottes glaciaires aux deux pôles. Seuls 0,6% de ces eaux douces sont actuellement disponible pour les besoins de l'homme. Les eaux, présentes dans les lacs (66% du total des eaux douces disponibles), constituent une des réserves importantes d'eau potable pour l'humanité. L'accumulation de substances toxiques, de métaux traces, d'engrais agricoles et de rejets industriels a dégradé la qualité de ces eaux, obligeant, avant consommation, la conception de stations de traitement de plus en plus performantes.

Les lacs ne sont pas des réservoirs homogènes. Biologiquement, la biomasse des milieux lacustres est essentiellement constituée de bactéries et de plancton. La croissance du phytoplancton étant inhérente à la lumière, ces organismes se répartissent essentiellement dans les couches de surface. Le zooplancton et les bactéries, se nourissant de ce phytoplancton, sont par conséquent également plus abondants dans les couches de surface.

De par les propriétés physiques de l'eau (densité maximale à 4°C), une stratification thermique s'établit au cours de la saison, isolant les eaux de surface, plus chaudes et plus

légères, des eaux profondes, froides et denses. Habituellement, on distingue en été (période de stratification maximale) trois strates dans un lac:

- La couche de surface, brassée par les vents (épilimnion).
- La couche intermédiaire, zone dans laquelle le gradient de température est élevé (métalimnion).
- La couche profonde, avec une température oscillant entre 4 et 6 °C (hypolimnion).

Le retour à la saison froide rafraîchit les eaux de surface et la différence de densité entre épilimnion et hypolimnion s'atténue. Le brassage des eaux peut avoir lieu et est alors contrôlé par de nombreux facteurs : la morphologie du lac (surface, volume et profondeur, forme du bassin), la géographie qui l'entoure (montagnes, vents) et la météorologie.

Une diversité chimique est également présente pour chacune de ces couches d'eau. Elle peut engendrer une stratification chimique lorsque les eaux sont fortement enrichies en cations et anions. Comme dans le cas de la température, une différence de densité est observée en fonction de la concentrations en ions (par exemple: $\rho_{\text{eau de mer}}$=1,025 g/cm^3) et les couches d'eau riches en cations et anions vont se stabiliser sur le fond du lac.

On trouve dans l'eau, en plus de l'ensemble des substances dissoutes, des particules endogènes et exogènes, de type minéral ou organique. La matière organique existe sous forme vivante (bactéries, algues, zooplancton), mais est aussi composée des déchets et détritus relargués ou provenant de la décomposition de ces organismes. Les particules minérales forment souvent des agrégats avec cette matière organique, ce qui a pour effet de modifier les échanges des particules dans les masses d'eau (sédimentation - remise en suspension). La diversité dans la composition des eaux est donc très grande et ses composants chimiques varient avec la saison.

1.1 Contexte de l'étude

Comme nous venons de le voir, les périodes chaudes de l'été créent une stratification thermique au sein des masses d'eau. Dans un lac oligotrophe, la production primaire en surface est faible. A l'équilibre, le cycle de la matière organique est représenté dans le schéma 1.1.

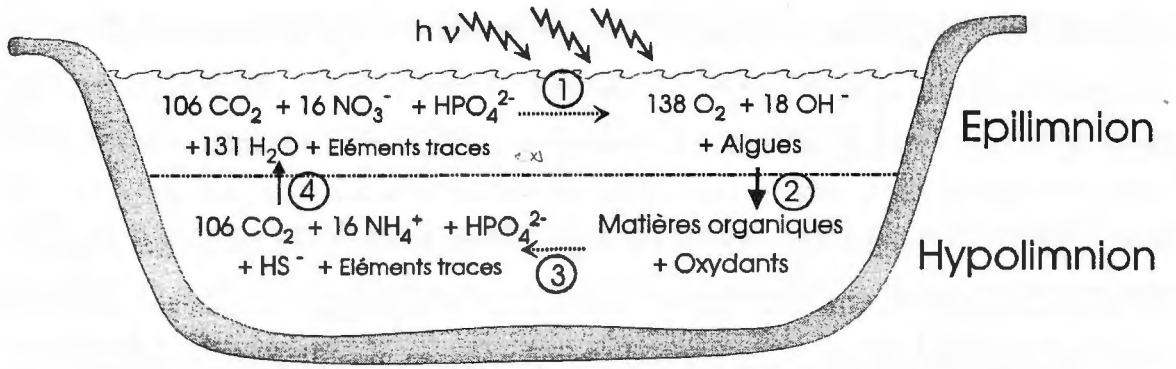


Figure 1.1: Cycle de photosynthèse dans un lac, selon Buffle et DeVitre (1994). 1: Photosynthèse - 2: Sédimentation - 3: Respiration - 4: Diffusion. Les oxydants consommés dans la réaction d'oxydation sont, dans l'ordre: O_2, Mn(IV), NO_3^-, Fe(III), SO_4^{2-}. La sédimentation est rapide, alors que le processus de diffusion est lent.

Les organismes qui meurent sédimentent et sont dégradés par les micro-organismes des couches plus profondes (respiration). Cette dégradation s'accompagne d'une consommation de l'oxygène présent dans les couches profondes. Le phénomène de diffusion étant lent, la concentration en oxygène diminue dans les couches profondes jusqu'au brassage de l'hiver.

Si l'on s'intéresse au processus de formation de la matière organique, essentiellement composée de carbone, on constate que le phosphore est généralement l'élément limitatif, devant l'azote et le carbone. Le phosphore avec ce rôle clef, fut d'ailleurs pris comme traceur dans les années 1920 pour découvrir les contaminations des effluents domestiques (*Barroin, 1991*).

Ainsi lorsque l'équilibre est maintenu entre la quantité de phosphates arrivant dans le lac par son bassin versant et la quantité éliminée par les émissaires ou par sédimentation et

incorporation dans le sédiment, cette productivité reste constante et le lac suit son cycle annuel, dépendant de la saison.

En présence de fortes concentrations en phosphates (lacs eutrophes ou hyper-eutrophe), la productivité primaire s'accroît. A titre d'exemple, et en considérant que les réactions présentées dans la figure 1.1 aient un rendement de 100%, 1 g de P réactif intervient dans la production d'environ 114 g d'algues en surface, qui, une fois sédimentées au fond du lac, consomment 140 g d'oxygène pour leur dégradation. En considérant que la solubilité maximale de l'oxygène dans l'eau est de 10 mg/l, la dégradation de ces algues consomme l'oxygène dissous contenu dans 14 m^3 d'eau.

Dans cette situation, les eaux deviennent anoxiques, la matière organique qui continue de sédimenter va alors se dégrader en consommant d'autres accepteurs d'électrons; petit à petit, des conditions de plus en plus réductrices s'installent au fond de la masse d'eau. La dissolution des phases sédimentaires permet un relargage des formes dissoutes (Fe^{2+}, Mn^{2+}, PO_4^{3-}) et des espèces traces (Cd^{2+}, Pb^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}) au sein de la colonne d'eau. Un deuxième gradient de densité, basé sur la force ionique des eaux, s'installe, qui ne sera plus perturbé par l'homogénéisation des températures en hiver. Les eaux de l'hypolimnion peuvent alors s'enrichir en composés dissous et toxiques, qui vont diffuser vers les couches de surface. Le lac est alors considéré comme méromictique.

Parmi les problèmes de société, la pollution due aux phosphates est un phénomène actuel. En 1975, une ordonnance fédérale a fixé des objectifs à atteindre pour le déversements des eaux usées et au cours de l'année 1986, les autorités suisses ont interdit l'adjonction de phosphates dans les lessives, afin de limiter les rejets riches en phosphates dans nos effluents. Malgré cela, et bien qu'en 10 ans la charge en P en entrée de station d'épuration ait diminué d'un tiers, bon nombre de systèmes aquatiques souffrent encore de l'eutrophisation.

A cela s'ajoutent les émissions croissantes de métaux traces, connexes à l'activité humaine et aux effets d'acidification des sols. Il est établi que notre civilisation industrielle continue de produire des déchets de métaux, qui finissent leur course dans les milieux

naturels. Des analyses de sédiments ont d'ailleurs montré que les apports de métaux lourds avaient augmenté lors des dernières décades (*Imboden et al., 1980*), l'apport anthropogénique dans l'environnement excédant les émisions naturelles d'un facteur 20 pour le Pb (*Nriagu, 1979*) par exemple. La mobilité et la disponibilité de ces métaux dans les milieux aquatiques dépendent de processus hydrologiques, biologiques et chimiques, les phases solides, colloïdales et particulaires (*Stumm et Morgan, 1981; Vilks et Deguel-dre, 1991*) jouant un rôle important dans le cycle des éléments traces. Un grand nombre d'investigations ont été entreprises sur le lien existant entre particules et métaux traces (*Sigg et al., 1983; Sigg et al., 1987; Shafer et Armstrong, 1991; Coale et Flegal, 1989; Borg, 1983*). Il a ainsi été montré que des espèces dissoutes peuvent être oxydées ou réduites, après leur adsorption sur une phase solide (*Hering et Stumm, 1990*), modifiant par là leur solubilité et leur toxicité. Le fer et le manganèse, produits sous formes colloïdales et particulaires au sein des masses d'eau, s'avèrent être des pièges efficaces de métaux lourds (*Manceau et al., 1992; Tessier et al., 1996; Balistrieri et al. 1992b*). Dans des conditions réductrices, régnant par exemple au fond des lacs méromictiques, ces phases minérales sont dégradées et les métaux lourds piégés sont alors remobilisés.

Une étude menée sur douze ans (*von Gunten et Lienert, 1993*) au sein d'un aquifère situé sous la rivière Glatt (Suisse) est un exemple idéal montrant le lien existant entre l'eutrophisation des systèmes naturels par les phosphates et le danger de pollution des ressources en eaux par les métaux traces. Au niveau des eaux douces disponibles pour l'homme, les aquifères représentent le deuxième réservoir (22%) accessible.

Dans ce système l'eau percole au travers du sous-sol de la rivière pour alimenter l'aquifère. Dans la zone des infiltrations, des conditions réductrices sont créées par l'eutrophisation des eaux de la rivière. Une dissolution réductive s'installe et les particules du sous-sol sont ainsi remobilisées, libérant du Mn^{2+} et du Cd^{2+} dans les eaux de percolation. Ces métaux se retrouvent ainsi relargués dans l'aquifère dans laquelle l'homme puise son eau potable. L'étude montre la diminution des conditions d'eutrophisation suite à l'interdiction des phosphates dans les lessives. Ceci est illustré en mesurant les concentrations de Mn^{2+} et Cd^{2+} relarguées dans l'aquifère. Il est ainsi montré que la réduction de la

concentration des phosphates dans les eaux de surface réduit de façon importante le processus d'eutrophisation et par conséquent les conditions réductrices au sein de la zone de percolation. Ceci se traduit par une diminution de la dissolution réductrice du manganèse et du relargage du cadmium, amenant une amélioration de la qualité des eaux souterraines.

Dans le cas des lacs, les eaux ont des temps de résidence très élevés et le renouvellement de la masse d'eau polluée est très lent comme nous pouvons le voir dans la table 4.1.

Table 1. 1 : Temps de résidence moyens des eaux de certains lacs européens

Lacs:	Temps de résidence:
Lac de Lugano	12,3 ans (bassin nord)
Lac Léman	2-20 ans, moyenne:11,2 ans
Lac d'Annecy	3,2 ans

1.2 Buts et structure de l'étude

Comme nous venons de le voir, un lac est un ensemble complexe, encore mal connu au niveau du comportement et de l'évolution des différents composants présents dans sa masse d'eau. La grande diversité des espèces chimiques et les rapports dynamiques qui les lient en font un véritable réacteur, encore difficilement contrôlable.

Les notions de toxicité et de biodisponibilité sont en étroite liaison avec la forme chimique des éléments considérés. Il est par conséquent important de pouvoir déterminer la forme chimique sous laquelle l'espèce concernée se trouve et par là même connaître sa spéciation.

Bien que de nombreuses études, tant biologiques que chimiques, aient permis l'investigations des phases solides de Fe et de Mn, celle-ci sont encore mal caractérisées dans les milieux naturels, car la majorité des études est effectuée sur des systèmes modèles de laboratoire. L'influence de la matière organique sur la production, la composition, la morphologie et principalement la réactivité des oxyhydroxydes de Fe et de Mn est encore assez mal connue.

Le but de cette étude consiste donc en une meilleure caractérisation des particules de fer et de manganèse, principaux pièges de métaux et polluants au sein des masses d'eau. Afin de

mener à bien pareille tâche, ce travail prendra comme modèles le lac de Lugano (Suisse) et le lac Paul (USA), tout deux méromictiques et représentant une opportunité unique de tester en milieu naturel les concepts et modèles dérivés des études de laboratoire.

Nous nous attacherons particulièrement aux relations qui existent entre le biota et les phases de fer et de manganèse, ainsi qu'aux spécificités qui peuvent exister entre certains polluants et le fer ou le manganèse. Pour parvenir à ces buts, il nous a fallu développer des modes de prélèvements non perturbants. Dans la philosophie d'une approche sans artefact, nous avons notamment envisagé une méthode de collecte des particules de fer et de manganèse *in situ*. Nous avons appliqué à ces échantillons des techniques analytiques adaptées à la spéciation des espèces et d'une grande spécificité. Le choix d'une approche principalement microscopique, conjuguée à une palette de techniques de spectroscopie, tant macroscopiques que microscopiques, a mis en évidence le fait que la microscopie électronique analytique est un outil pointu, extrêmement utile pour la compréhension de systèmes environnementaux complexes.

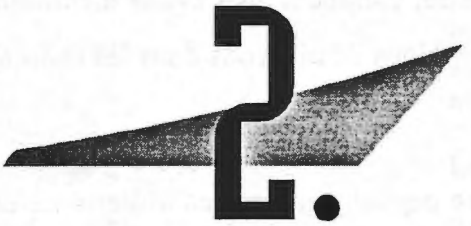
Le chapitre 1 nous a permis de montrer rapidement l'interrelation qui existe entre phosphates et pollution par les métaux traces dans les milieux eutrophes.

Dans le chapitre 2, nous décrirons les processus liés au problème des milieux eutrophes, en nous focalisant sur le comportement des espèces du fer et du manganèse. Nous poserons également les bases qui permettront la compréhension de notre principal outil: la microscopie électronique analytique.

Le chapitre 3 sera consacré aux études de laboratoire entreprises avant les études de terrain et qui nous ont permis d'ajuster nos instruments analytiques, de les adapter à l'étude des milieux naturels et de concevoir le mode de prélèvement *in situ* de particules lacustres. En particulier nous avons cherché dans ce chapitre à permettre une visualisation intégrale de la matière organique par microscopie électronique, sans pour autant créer d'artefact sur sa morphologie. C'est dans ce chapitre également que nous mettrons en évidence les paramètres importants contrôlant la synthèse de particules de fer amorphe.

Le chapitre 4 décrira les résultats obtenus sur le lac de Lugano, alors que le chapitre 5 sera consacré aux investigations menées sur le lac Paul.

La conclusion (chapitre 6) nous permettra de corréler les observations similaires qui peuvent exister entre le lac Paul et le lac de Lugano, bien que la composition chimique de ces systèmes soit différente. Les résultats de ces deux études seront discutés dans leur ensemble, en une synthèse générale des informations obtenues à l'aide des deux systèmes naturels. Finalement nous proposerons quelques travaux de recherche qui pourraient être menés dans la continuité de cette étude, en nous basant sur quelques résultats préliminaires obtenus sur des échantillons de laboratoire ou naturels.



NOTIONS GÉNÉRALES

2. NOTIONS GÉNÉRALES 12
2.1 Cycle du fer 13
2.2 Cycle du Mn 16
2.3 La microscopie électronique : Un outil performant 20

2. NOTIONS GÉNÉRALES

Parmi les espèces particulaires minérales identifiées dans les lacs, les particules de fer et de manganèse se révèlent être, comme nous l'avons mentionné dans le ch.1, des pièges efficaces pour les polluants. Nous détaillerons dans les chapitres 2.1 et 2.2 les cycles de ces deux éléments.

L'importance de la matière organique dans les milieux naturels est depuis longtemps étudiée. Sa grande diversité, ainsi que les nombreux groupes réactifs qui lui sont associés, permettent des interactions variées avec les phases minérales. Nous distinguerons dans ce travail la matière organique vivante (bactéries, algues) des produits exsudés ou provenant de la décomposition des micro-organismes.

Lors d'interactions entre produits exsudés et particules minérales, on distingue généralement deux types de mécanismes, en fonction du rapport entre la taille de la particule minérale et la masse moléculaire de la molécule organique. Ainsi, lorsque la molécule organique est intégralement adsorbée sur la surface de la particule minérale (taille > 100 nm ou petit poids moléculaire), des inversions de charges sont observées et la coagulation devient possible entre plusieurs particules de charges opposées. Plusieurs études ont été effectuées afin de comprendre ce phénomène, tant avec des modèles synthétiques (*Hesselink, 1971; Pefferkorn et al., 1990*) qu'avec des échantillons issus du milieu naturel (*Tipping et Ohnstad, 1984*).

Lorsque la molécule organique est un polymère et que sa masse moléculaire est importante, celle-ci peut s'adsorber sur une particule minérale de petite taille ($\varnothing$ < 100 nm; *Fillela et Buffle, 1993*) et étendre une partie de sa longueur en dehors de la sphère d'hydratation de la particule. Cette extension peut être sous forme de boucles (Figure 2.1) ou de brins libres en solution qui peuvent interagir avec d'autres particules minérales (*Foster, 1981*). Ce mécanisme d'interaction résulte en un pontage entre particules par des liens organiques et prend le nom de "bridging".

Les fibrilles et exopolymères excrétés par les bactéries (*Leppard, 1986*), observés en abondance dans les milieux lacustres, sont les principaux acteurs de ce second type

d'interactions. Toutes ces associations modifient les vitesses de sédimentation des agrégats (*Fleer et Lyklema, 1974; Aly et Letey, 1988*), accélérant leur enfouissement dans les sédiments ou prolongeant leur séjour dans les masses d'eau.

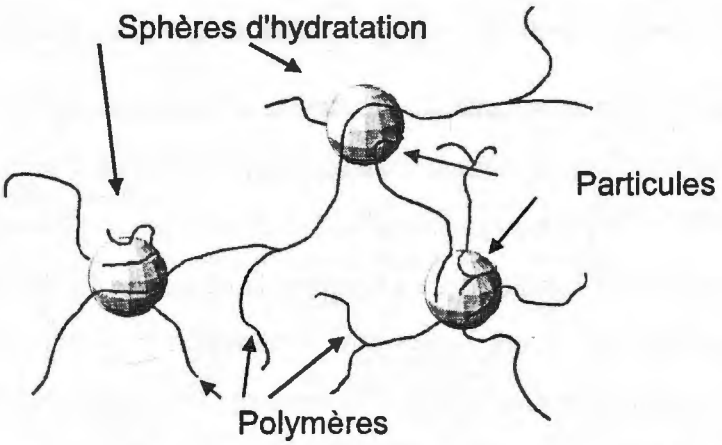


Figure 2.1: Modèle d'interaction entre particules et fibrilles organiques

Les bactéries, quant à elles, ont le plus grand rapport entre surface spécifique et volume de tous les êtres vivants (*Beveridge, 1989*). Leur surface externe, qui porte des groupements carboxyliques et phosphates, est habituellement chargée négativement, et les bactéries sont donc appellées par ces propriétés à intervenir de façon prédominante dans la spéciation des cations. Nous verrons d'autre part, dans les cas du fer et du manganèse, que les bactéries et autres espèces vivantes ont une importance prédominante sur la spéciation de ces deux éléments.

2.1 Cycle du fer

Le fer est le quatrième élément le plus abondant dans la croûte terrestre, sa concentration en masse étant estimée à 5% par *Rankama et Sahama (1950)*. Le fer est présent sur Terre dans un grand nombre de roches, mais également dans les minéraux accumulés par sédimentation. De ce fait, il représente 4,8% des charges en suspension dans les rivières (*Salomons et Forstner, 1984*) avec des concentrations s'étendant généralement de 0,4 à 2 µM (*Davison et DeVitre, 1992*). C'est un élément très réactif, avec des états d'oxydation de 0, (+II) et (+III). Le passage entre les états (+II) et (+III) ou inversément est facilement observé en fonction des conditions oxydantes ou réductrices dans lesquelles l'élément se trouve. L'ion Fe^{3+} n'est pas stable à pH neutre et est rapidement hydrolysé pour former des oxydes ou des hydroxydes, mais il est soluble à pH acide (*Stumm et Morgan, 1981)*. En revanche l'ion Fe^{2+} est stable, quel que soit le pH, dans un milieu totalement anoxique et même en présence d'oxygène dissous à pH inférieur à 4. Le Fe(II)

précipite en présence de sulfures. L'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} est généralement considérée comme relevant d'un processus chimique, bien que cette réaction soit gouvernée par des bactéries dans certains systèmes possédant des conditions extrêmes (pH=2; *Fortin et al., 1996*).

Le fer est essentiel pour tous les organismes vivants, du procaryote à l'eucaryote (*Ehrlich, 1996*). De nombreux processus enzymatiques l'utilisent au sein de protéïnes ou d'hèmes à des fins variées (*Reid et al., 1993*). Le fer est également utilisé comme source d'énergie par certaines bactéries qui oxydent le Fe^{2+} en Fe^{3+} ou en couplant la réduction du Fe(III) à l'oxydation de la matière organique. Les bactéries les plus communément rencontrées dans les systèmes redox du cycle du fer sont *Gallionella* (*Ehrenberg, 1836*), *Thiobacillus ferrooxidans* (*Colmer et al., 1950*), le groupe des *Siderocapsaceae*, *Leptothrix* et *Sphaerotilus*.

La grande réversibilité $Fe^{3+} \leftrightarrow Fe^{2+}$ permet à cet élément de se retrouver sous les deux formes dans la majorité des lacs possédant une zone suffisamment réductrices pour stabiliser le Fe(II). Dans la gamme des accepteurs d'électrons, (Figure 2.2) le Fe(III) est situé entre les nitrates et la matière organique (*Stumm et Morgan, 1981*).

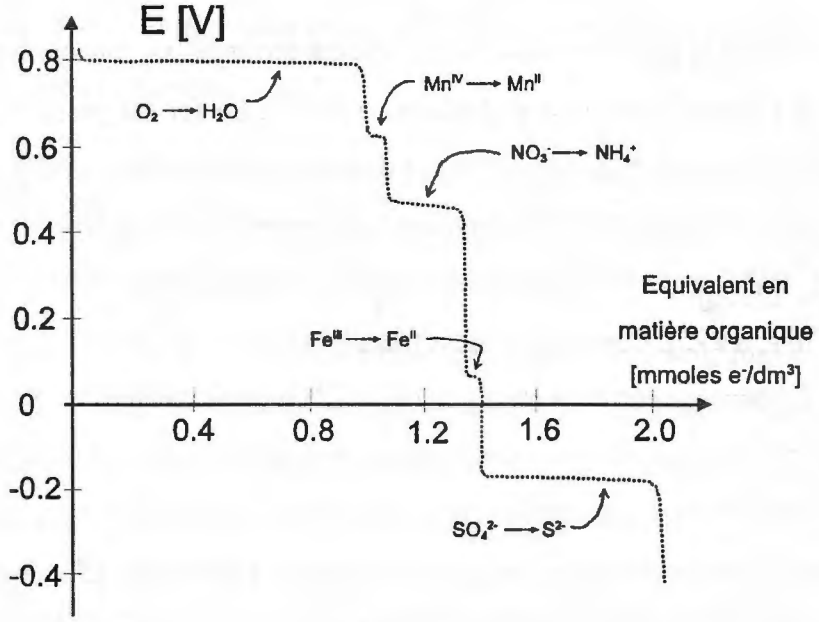


Figure 2.2: Courbe de titration des oxydants d'une eau lacustre d'après *Buffle et DeVitre (1994)*. La longueur du plateau définit la capacité oxydante de chaque oxydant vis-à-vis de la matière organique. Plus ce plateau est à un potentiel élevé, plus l'oxydant est facilement réductible.

Ainsi, une fois que la totalité de l'oxygène, des nitrates et du Mn(IV et III) a été consommée au fond des lacs par la minéralisation de la matière organique ayant sédimenté, le Fe(III) prend le relais.

Son cycle au sein d'un milieu eutrophe est illustré dans la figure 2.3:

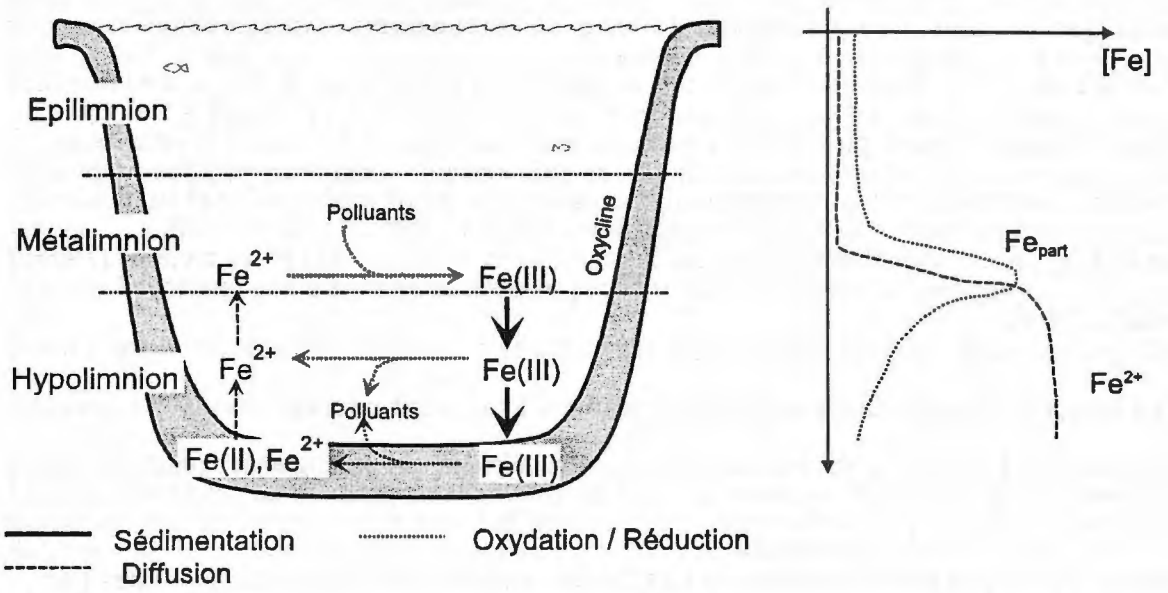


Figure 2.3: Cycle du fer dans les lacs stratifiés: Les chiffres romains représentent les phases minérales alors que les chiffres arabes illustrent les espèces dissoutes. Les étapes d'oxydation permettent l'incorporation de polluants (pesticides, PO_4^{3-}, métaux traces), qui sont relargués au fond des lacs par dissolution réductive des oxydes de fer et de manganèse.

La diffusion du Fe(II), formé dans les couches de profondeur, jusqu'à l'oxycline, permet sa réoxydation chimique en présence d'oxygène. Cette phase particulaire, fraîchement formée, piège les polluants (*Sigg, 1987; Sigg et al., 1987*). La sédimentation de ces entités les ramène dans des conditions réductrices et la dissolution des oxyhydroxydes de Fe(III) par passage à l'état d'oxydation +(II) libère les polluants et espèces nutritives adsorbées. La roue du fer ("ferrous wheel") telle qu'elle est décrite par *Campbell et Torgersen (1980)* est ainsi bouclée.

La présence de grandes quantités d'espèces dissoutes et particulaires minérales dans les eaux de rivières et lacustres complique quelque peu le schéma précédent. On trouve ainsi de très nombreuses associations entre particules de fer et d'autres espèces particulaires, allochtones (association avec des argiles, *Hiraide et al., 1988a*) ou autochtones (oxydes

mixtes de Mn et de Fe, *Jones et Bowser, 1978; Nriagu et Dell, 1974*). Les espèces minérales dissoutes (Ca^{2+}, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}) peuvent également être incorporées ou adsorbées sur les oxydes de fer (*DeVitre et al., 1988; Fortin et al., 1993*).

La présence de matériel de type organique varié dans les milieux naturels modifie également quelque peu le comportement du fer et sa composition. Ainsi des investigations menées sur le fer dans les rivières ont montré qu'il existe sous la forme de colloïdes chargés négativement, pouvant être associés à des substances humiques (*Hiraide et al, 1988b*). Des associations entre exopolymères de haut poids moléculaire et particules de fer ont également été décelées dans les lacs (*Pizarro et al., 1995*) et les rivières (*Perret et al., 1994*).

Les bactéries, mentionnées auparavant, peuvent également intervenir dans la formation d'oxydes de fer(III). Au niveau des processus bactériens, on distingue les réactions enzymatiques, illustrées par *Gallionella*, des réactions indirectes impliquant des changements locaux de pH par consommation de CO_2, la destruction de structures chelatantes (*Aristovskaya et Zavarzin, 1971*) ou la production d'agents oxydants. Ces mécanismes sont généralement observés lorsque l'oxydation chimique est ralentie par des conditions de pH ou d'oxygène limitantes.

2.2 Cycle du Mn

La concentration du manganèse dans la croûte terrestre est de 0,1% (*Morgan, 1967*). Le Mn est donc cinquante fois moins répandu que le fer et sa répartition est beaucoup moins homogène en concentration (0,002 à 10%), bien qu'on le retrouve dans tous les milieux naturels (*Ehrlich, 1996*). Il est le composant majeur et mineur d'une centaine de minéraux (*Ehrlich, 1996*) principalement sous la forme de dépôts d'origine sédimentaire composés d'oxydes, de carbonates et de silicates. La présence de manganèse dans les eaux naturelles est principalement due au phénomène d'érosion des roches. La majorité des minéraux contiennent du Mn(II) (*DeVitre et Davison, 1992*), sa libération sous forme d'ion aqueux Mn^{2+} donnant suite à de nombreuses réactions d'oxydation, de réduction ou

d'hydrolyse en fonction des conditions physico-chimiques préva-lant dans le milieu concerné.

Le manganèse possède de nombreux états d'oxydation (0, +II, +III, +IV, +VI et +VII) par la disponibilité de ses électrons des couches 4s et 3d. En milieu naturel, les états +II, +III et +IV sont communément observés. Seul le Mn^{2+} est soluble à l'état libre alors que les formes +III et +IV sont insolubles et majoritairement sous la forme d'oxydes. Le passage de l'état +II à l'état +IV est moins évident que pour l'oxydation du fer. Son potentiel d'oxydation, situé entre ceux de l'oxygène et des nitrates dans les milieux naturels (voir figure 2.2), favorise l'oxydation dans les conditions prévalant dans les milieux naturels. Mais la haute énergie d'activation requise par la réaction (*Stumm et Morgan, 1981*) ralentit considérablement l'oxydation et permet la stabilisation du Mn^{2+} soluble dans les eaux naturelles oxiques.

Le manganèse est un élement trace important dans les systèmes biologiques. Il est requis dans de nombreuses réactions à caractère enzymatique, notamment pour la photosynthèse (*Ehrlich, 1996*) et la protection des bactéries contre les superoxydes (*Archibald et Fridovich, 1981; Kono et Fridovich, 1983*). Il peut également servir comme source d'énergie pour certaines bactéries soit en fixant le CO_2 (*Nealson, 1978*), soit en couplant l'oxydation du Mn^{2+} aux différents cycles de l'ATP (*Ehrlich, 1983*).

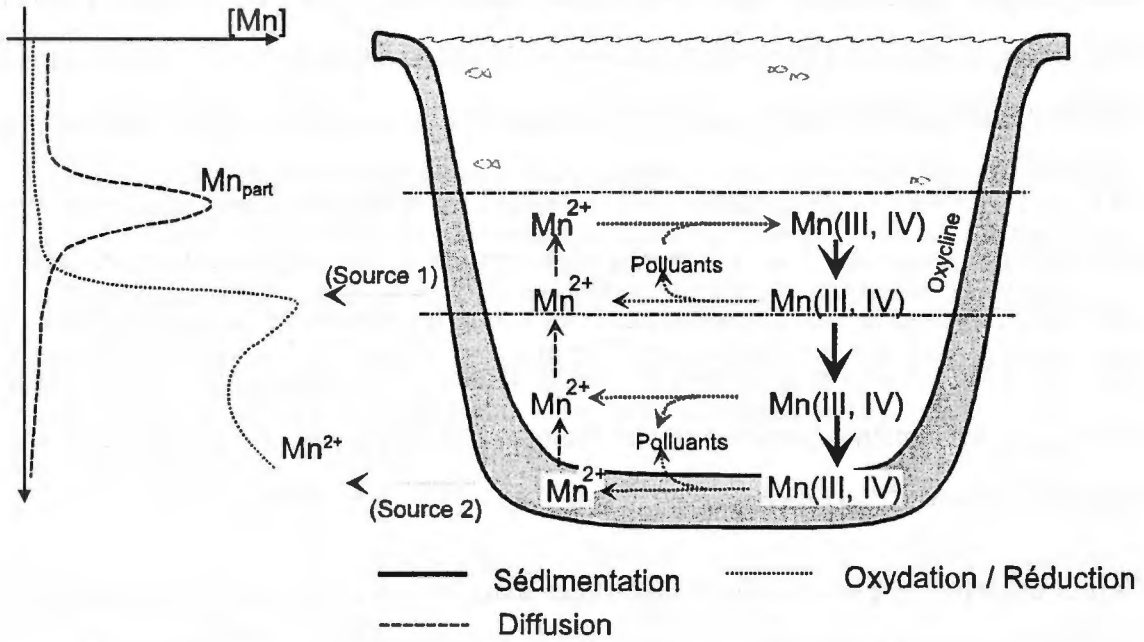
Chimiquement, les phases solides identifiées dans les systèmes aquatiques proviennent principalement de trois réactions menant à la formation d'oxydes possédant les états d'oxydation +III et +IV:

- $Mn^{2+} + {}^1/_2\, O_2 + 2\, OH^- = MnO_2 + H_2O$
- $Mn^{2+} + {}^1/_4\, O_2 + {}^3/_2\, H_2O = MnOOH + H_2O$
- $3\, Mn^{2+} + {}^1/_2\, O_2 + 3\, H_2O = Mn_3O_4 + 6\, H^+$

De par son potentiel redox plus faible que celui du fer, le manganèse a un cycle similaire, mais situé avant, et au-dessus de ce dernier dans le temps, respectivement l'espace. Ainsi, lors de la stratification saisonnière d'un lac, le Mn^{2+} est le premier à apparaître à la surface des sédiments et à diffuser dans la colonne d'eau. En présence d'oxygène, l'oxydation

bactérienne du Mn^{2+} produit du MnO_x qui va à son tour sédimenter pour rejoindre le sédiment (Figure 2.4). La particularité du Mn vient de sa réduction aisée en zone anoxique; ainsi dès que l'interface est passée, le MnO_x est rapidement réduit et seulement 10% des particules atteignent le sédiment (*Davison et al., 1982*). Ce phénomène donne un aspect assez différent au profil du Mn^{2+} par rapport à celui du Fe^{2+} dans les lacs méromictiques (Figure 2.4).

Figure 2.4: Cycle du Mn dans les lacs stratifiés: Le pic de Mn^{2+} est dû au fait que deux sources de Mn(II) alimentent l'interface. La première source est le Mn^{2+} produit dans les sédiments qui diffuse vers la surface; la seconde provient des particules sédimentant qui se réduisent en milieu anoxique et relarguent ainsi du Mn^{2+}.



Le Mn(II) est thermodynamiquement instable à pH neutre et en présence d'oxygène. Son oxydation est par contre limitée cinétiquement. En présence d'oxyde de Fe(III), l'oxydation chimique du Mn^{2+} en milieu acide est possible selon la réaction (*DeVitre et Davison, 1992*):

- $2Fe(OH)_3 + 2H^+ + 3Mn^{2+} = Mn_3O_4 + 2\,Fe^{2+} + 2H_2O + 4H^+$

Une fois la réaction amorcée, les phases d'oxydes de manganèse peuvent également permettre l'oxydation du Mn^{2+} par une procédure d'auto-catalyse (*DeVrind et al., 1986*). Dans un premier temps, l'ion Mn^{2+} s'adsorbe rapidement sur la surface de l'oxyde de Mn

pour être ensuite lentement oxydé (*Stumm et Morgan, 1981*). La vitesse de disparition du Mn^{2+} dépend alors de la concentration des phases solides du Mn selon l'équation ci-dessous:

$$\frac{-d[Mn(II)]}{dt} = k_1 \cdot [Mn(II)] \cdot [O_2] \cdot [OH^-]^2 \cdot [MnO_x]_s$$

Le calcul de demi-vie du Mn(II) effectué par *DeVitre et Davison (1992)*, basé sur des constantes de vitesse d'oxydation mesurées en laboratoires et en présence d'oxydes de Fe ou de Mn (*Diem et Stumm, 1984; Morel, 1983*) est de 700 ans à pH=7 (contre 4 heures pour le Fe(II)) et de 7 ans à pH=8. En milieu naturel, la demi-vie du Mn(II) est de 1 à 100 jours (*Chapnick et al., 1982*). Cette observation, très différente des calculs effectués par *DeVitre et Davison (1992)* met en évidence des facteurs externes influençant fortement le processus d'oxydation du Mn^{2+}. Des études effectuées sur les rivières (*Balikungeri et al., 1985*), les lacs (*Jaquet et al., 1982; Klaveness, 1977; Maki et al., 1987*), les eaux souterraines (*Gounot, 1994*), les couches de surface (*Mandernack et al., 1995; Cowen et Silver, 1984; Cowen et Bruland, 1985; Cowen et al., 1986*) et de profondeur (*Ehrlich, 1983*) des océans, ont permis de montrer l'importance des bactéries dans l'oxydation du Mn, quelle que soit la nature des milieux investigués. Ces observations sont confirmées par le fait que, généralement, les vitesses d'oxydation mesurées (*Nealson et al., 1988*) sont trop rapides pour être expliquées par une oxydation chimique seule.

Différents processus d'oxydation biologiques existent et sont très bien décrits dans *Nealson et al. (1989)*. On distingue généralement les processus d'oxydation directe et indirecte, mentionnés dans la table 2.1:

TABLE 2.1: Différents processus d'oxydation biologique du Mn^{2+} en MnO_x

Type:	Intermédiaires:	Rôle de la bactérie:	Références:
Oxydation indirecte	H_2O_2	Production d'oxydants	*Dubinina (1978); Kono et Fridovich (1983); Archibald et Fridovich (1981)*
Oxydation indirecte	Gradients de pH et O_2	Modification des conditions redox aux alentours de la cellule	*Richardson et al. (1988)*

Type:	Intermédiaires:	Rôle de la bactérie:	Références:
Oxydation directe	Sites de nucléation	Production d'agents chelatants	*Ghiorse (1984)*
Oxydation directe	Enzymes	Production d'enzymes intra- ou extracellulaires	*Adams et Ghiorse (1987); Boogerd et DeVrind (1987)*

Tous ces processus sont donc dépendants de la population bactérienne, mais nécessitent la présence d'oxygène (*Ferris et al., 1987*). Bien que la majorité des processus d'oxydation du Mn observés dans les milieux naturels soit d'origine biologique, directe ou indirecte, peu d'études ont permis d'affirmer que la bactérie tire de l'énergie du processus d'oxydation. Ainsi sur tous les cas répertoriés de bactéries oxydantes du Mn^{2+}, seules deux sont capables de croître de façon autotrophique (*Ali et Stokes, 1971; Kepkay et Nealson, 1987*). Dans la majorité des cas (*Ehrlich, 1996*), les bactéries sont mixotrophes (la source de carbone est organique, l'oxydation du Mn peut fournir de l'énergie) ou hétérotrophes (l'oxydation du Mn n'est pas profitable à la bactérie). Si le gain en énergie est suspecté pour de nombreuses bactéries capables d'oxyder le manganèse, une nouvelle explication a été donnée par *Sunda et Kieber (1994)*. Cette étude montre que certaines bactéries trouvées dans un estuaire peuvent lier l'oxydation du Mn^{2+} à la dégradation de substances humiques. Cette nouvelle voie est importante puisque les acides humiques représentent le réservoir le plus important de matière organique, habituellement non-utilisé par les micro-organismes.

2.3 La microscopie électronique : Un outil performant

Comme nous l'avons déjà mentionné, les particules de fer et de manganèse sont des pièges efficaces des polluants. Différents processus permettent la formation de ces particules dans les milieux naturels (chimique pour le fer, biologique pour le manganèse), donnant lieu à des morphologies caractéristiques. Les interactions avec la matière organique sont également importantes et modifient passablement le comportement des particules dans les masses d'eau. L'étude de ces phénomènes nécessite une palette importante de techniques analytiques, permettant de mesurer de nombreux paramètres (tailles, qualité chimique, propriétés physiques) dans l'optique de connaître le devenir des espèces particulaires. La

microscopie électronique est un outil intéressant par le fait qu'elle peut coupler certaines de ces observations sur le même échantillon.

La microscopie électronique regroupe sous son terme trois techniques, la microscopie électronique à transmission (TEM), à balayage (SEM) et à transmission-balayage (STEM). Toutes les trois reposent sur la formation d'une image par l'interaction d'un faisceau d'électrons avec l'objet à étudier. Les principales interactions entre le faisceau incident et le spécimen sont schématisées dans la figure 2.5:

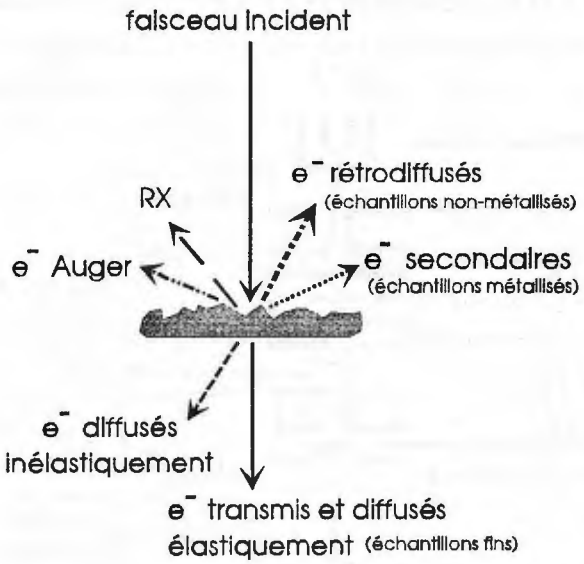


Figure 2.5: Interactions entre électrons du faisceau incident et spécimen.

La microscopie à balayage permet d'observer les images formées par les électrons rétrodiffusés ou secondaires, selon que le matériel ait été métallisé ou non. Pour visualiser un échantillon naturel (peu conducteur) en mode SEM, le spécimen est recouvert d'une couche conductrice (Au, Pt, Pd pour la visualisation ou C pour les analyses chimiques) conservant les aspérités du spécimen et agissant comme source d'électrons secondaires. Les différences d'émission entre zones de reliefs différents provoquent la formation d'une image de la surface du spécimen.

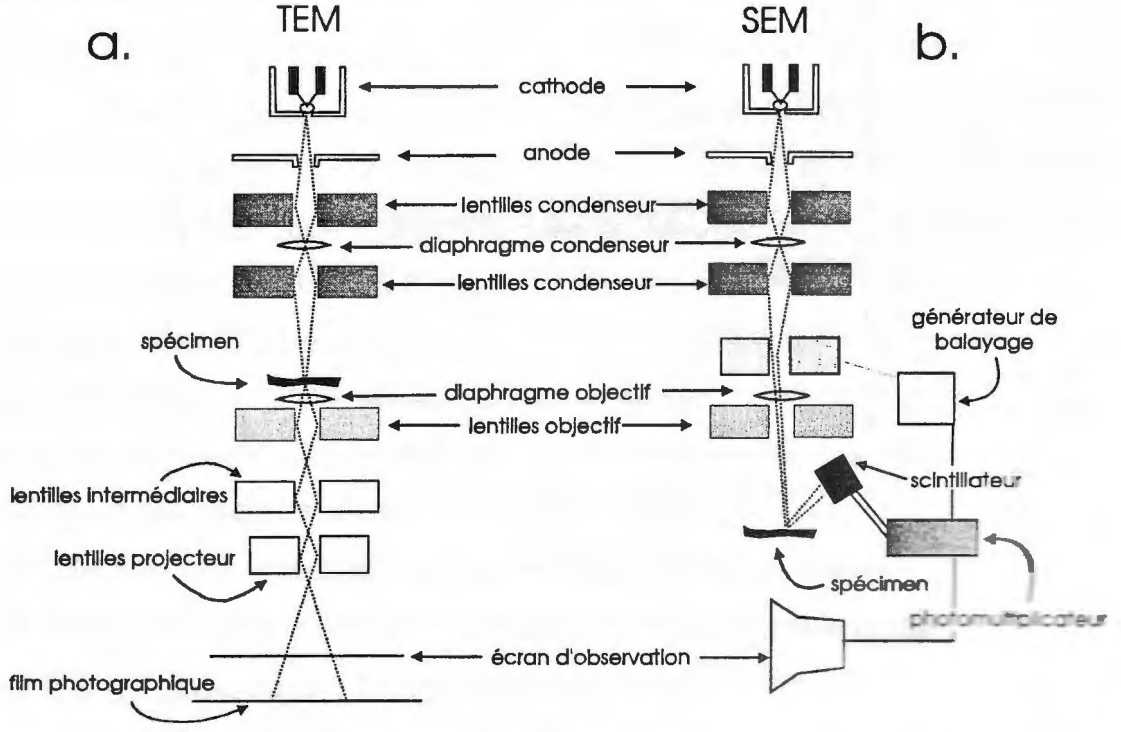
En microscopie à transmission, les électrons incidents heurtent le spécimen et sont soit transmis, soit déviés et freinés, soit arrêtés. Le contraste entre les zones où les électrons sont transmis et celles où ils sont arrêtés forme une image du spécimen "en transparence".

Les schémas des microscopes permettant la visualisation des électrons ayant ou non interagi avec la matière sont donnés dans la figure 2.6.

La visualisation en mode STEM est intermédiaire entre les deux modes pré-cités, puisque ce sont les électrons transmis qui sont observés, mais que le spécimen est balayé par un faisceau d'électrons incidents focalisés en un point de 2 à 100 nm.

L'interaction entre le faisceau incident et les molécules se trouvant sur son chemin provoque la formation d'une image sur l'écran de visualisation. La présence d'un haut vide dans la colonne du microscope est nécessaire, afin de permettre aux électrons de ne pas être absorbés par l'air et l'humidité. Pour étudier un échantillon contenant des particules par microscopie électronique, il est donc nécessaire de passer par une étape de préparation apte à fournir un spécimen remplissant un certain nombre de conditions requises pour la microscopie.

Figure 2.6: Schémas d'un microscope à transmission (a) et à balayage (b). Les différences de potentiel admises entre l'anode et la cathode sont de 1,5 à 25 kV (SEM) et de 25 à 300 kV (TEM); *Pottu-Boumendil (1989)*.



Le spécimen doit être déshydraté avant d'être introduit dans la colonne du microscope électronique, il doit être suffisament fin pour être visualisé en mode de transmission (TEM) ou posséder suffisament de relief pour être étudié en mode de réflection (SEM). Son support (métallique) doit permettre la dissipation de l'énergie thermique et électrique dégagée lors de l'interaction entre la matière constituant le spécimen et le faisceau d'électrons. Dans le cas de la TEM, cette condition est remplie par la présence d'une grille métallique recouverte d'une couche de carbone, alors que pour la SEM, c'est l'ensemble support-spécimen qui doit être conducteur; c'est pourquoi chaque spécimen est recouvert d'une couche de métal (cas de la visualisation) ou de carbone (lors d'analyses chimiques).

Si les interactions entre électrons incidents et spécimen permettent la formation d'une image, elles génèrent également des informations chimiques concernant le spécimen. Ces informations peuvent être mesurées à l'aide de spectromètres (EELS et EDS) couplés au microscope. Lors des interactions électrons-matière, on distinguera plusieurs phénomènes capables de révéler la nature chimique du spécimen (Figure 2.7):

- les électrons ayant subit des chocs élastiques, traversant la matière sans avoir perdu leur énergie initiale, et qui sont responsables de la formation de l'image du spécimen.
- les électrons inélastiques, interagissant avec les électrons du spécimen et perdant de l'énergie.
- les rayons X réémis lors du réarrangement des électrons lorsque un électron des couches internes est éjecté.

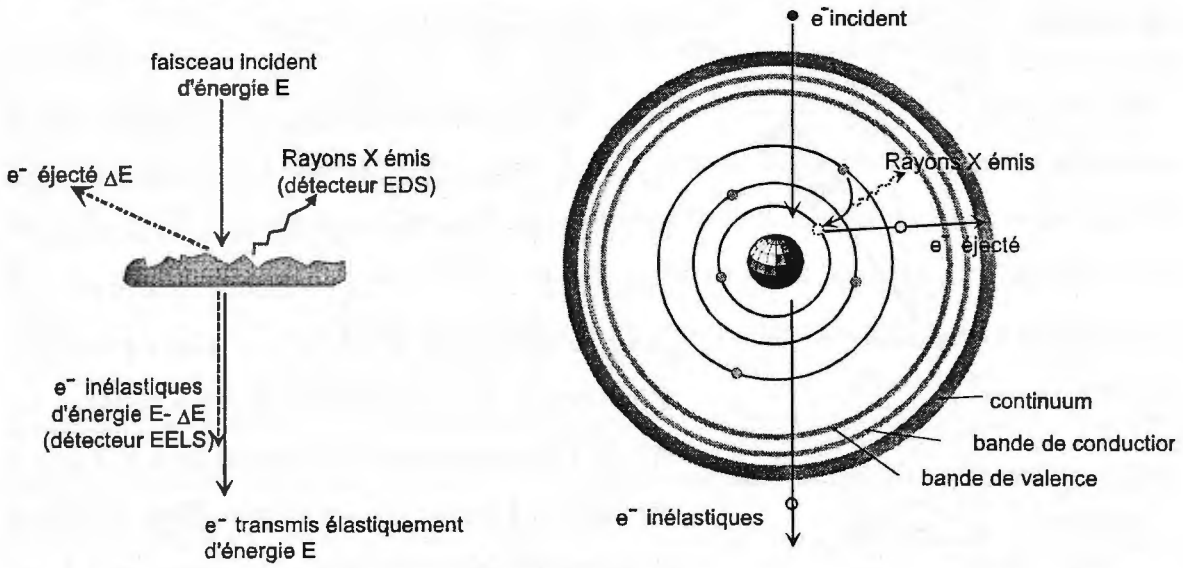


Figure 2.7: Interactions électrons-matière: Spectralement, après le passage d'un faisceau mono-énergétique au travers du spécimen, la gamme d'énergies mesurables sous ce dernier est la suivante:

1) $\Delta E_{loss} = 0$ eV, ou bande zero-loss. Les électrons caractérisés par cette énergie sont les électrons incidents n'ayant pas été diffusés ou diffusés élastiquement par le spécimen.

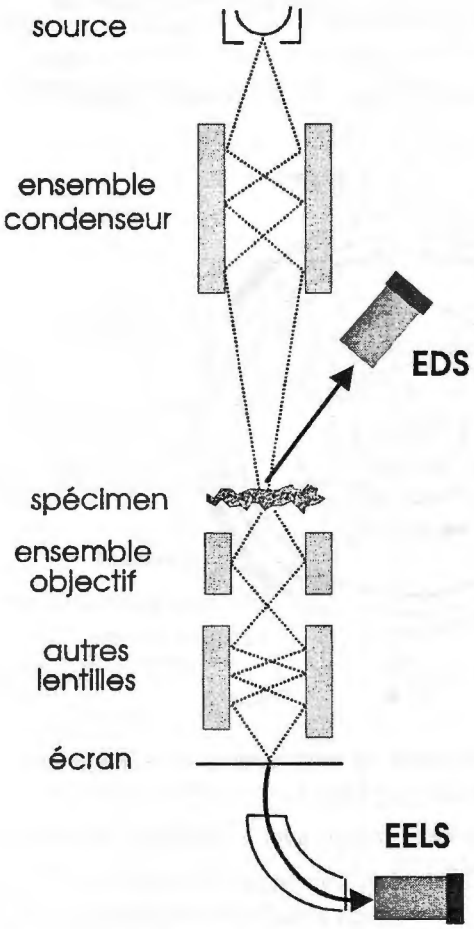
2) $0 < \Delta E_{loss} < 100$ eV, cette région est composée des électrons ayant interagit avec les électrons de valence du spécimen (région des plasmons).

3) $\Delta E_{loss} > 100$ eV, à certaines valeurs d'énergie très précises, une augmentation du signal est observée, correspondant aux électrons ayant interagit avec un électron d'un élément particulier du spécimen.

L'éjection d'un électron des couches internes du spécimen vers le continuum n'est possible qu'à partir d'un certain seuil d'énergie ΔE. L'électron incident (ayant provoqué l'éjection) perd lors de ce processus la même énergie ΔE_{loss}, qui est caractéristique de l'atome avec lequel il a interagit. La spectrométrie à perte d'énergie électronique (EELS) permettra de connaître l'énergie résultante des électrons transmis et donc, en assignant les

seuils de perte d'énergie aux éléments données, de connaître la composition chimique du spécimen sous le faisceau.

Au niveau du spécimen, la lacune électronique laissée par l'électron éjecté sera comblée par les électrons des couches supérieures. Cette réorganisation des niveaux énergétiques des électrons s'accompagne de l'émission d'un rayon X d'énergie égale à la valeur entre les niveaux de départ et d'arrivée de l'électron se réorganisant.



L'énergie du rayon X est également caractéristique de l'atome considéré et permettra de connaître la nature chimique du spécimen à l'aide d'un détecteur à dispersion d'énergie (EDS).

Selon le phénomène étudié (émission X, spectroscopie EDS; électrons transmis, spectroscopie EELS), la position du détecteur varie comme illustré sur la figure 2.8. L'angle de collection étant fixe pour le détecteur EDS, il est alors possible d'incliner le spécimen (tilt) de façon à collecter au mieux les rayonnements X émis dans plusieurs directions à partir du spécimen. Des analyses chimiques qualitatives et quantitatives sont ainsi possibles à l'échelle de la particule individuelle.

Figure 2.8: Positions des détecteurs EDS et EELS.

Les deux techniques s'avèrent donc être complémentaires puisque c'est le même phénomène qui est observé de part et d'autre du spécimen. L'aspect des deux spectres EELS et EDS est donné dans la figure 2.9 dans le cas d'un spécimen contenant du Mn.

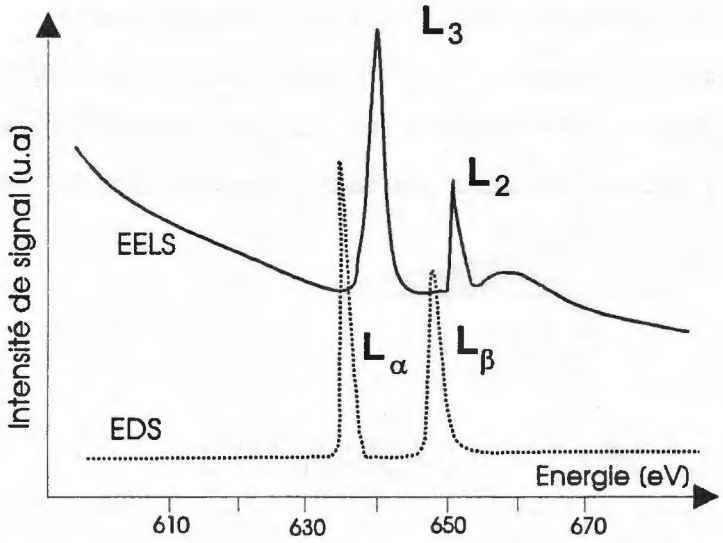


Figure 2.9: Schéma des spectres EELS et EDS résultant de l'éjection d'un électron des couches L d'un atome de Mn:
L'électron interagissant avec un atome de Mn perd des quanta d'énergie ΔE= 640 et 651 eV (*Reimer et al., 1992*; bandes L_3 et L_2 du Mn pour éjecter les électrons de la couche L). En fonction des lacunes créées dans la couche L, des électrons des couches supérieures comblent ces lacunes en émettant des radiations X d'énergie 0,637 et 0,649 keV (*Barbi, 1977;* bandes Lα et Lβ).

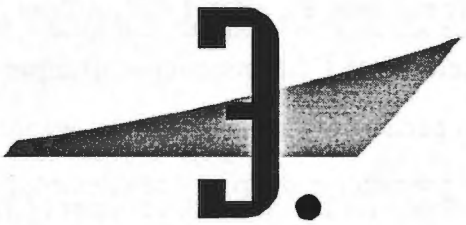
Généralement, les spectres EELS sont enregistrés dans la région de 0 à 1000 eV (0 à 1 keV) en fonction de la sensibilité et de la résolution du détecteur. Cette région concerne essentiellement les électrons des couches L et M des atomes ayant un numéro atomique entre 10 et 30. Les spectres EDS sont par contre habituellement enregistrés entre 0 et 10 keV, et ce sont essentiellement les émissions K (pour $10 < Z < 30$) qui sont observées. Les émissions L (pour $20 < Z < 30$) sont également présentes dans cette gamme d'énergie.

L'intensité des raies EDS et l'efficacité des détecteurs n'étant pas constante avec l'énergie des émissions X, le recours à une standardisation est nécéssaire. Nous en avons utilisé trois au cours de ce travail de thèse:

- méthode des standards externes: Synthèses de colloïdes de Fe-P dont la composition est caractérisée chimiquement, analyse du spécimen par microscopie électronique et corrélation entre le rapport des signaux EDS et le rapport de concentrations chimiques. (ch.3.3.3)
- méthode sans standard (Reed, 1993): L'intensité des pics (I) peut être estimée à partir des rendements de fluorescence (ω), du poids atomique (A), d'un facteur de perte d'ionisation (R), de la tension d'accélération (E_0) et de l'énergie critique d'excitation (E_c) selon:

$$I = 9,54 \cdot 10^4 \cdot ((\omega \cdot R)/(A \cdot 3 \cdot 10^5)) \cdot \left(\left(\frac{E_o}{E_c}\right) \cdot \ln\left(\frac{E_o}{E_c}\right) - \left(\frac{E_o}{E_c}\right) + 1\right)$$

- utilisation de la routine MBTS (Metallurgical Biological Thin Specimen) du programme Noran Voyager: A partir des éléments indiqués comme présents dans le spécimen par l'utilisateur, le programme utilise les rapports entre raies de nature différente pour reconstituer le spectre par itération, et générer une quantification relative des éléments mesurés.



PRÉPARATION EN LABORATOIRE

3.1 Microscopie électronique 28
3.2 Etude de la matière organique par microscopie électronique.....35
3.3 Colloïdes de fer: synthèses en laboratoires 48
3.4 Récupération in situ de phases particulaires sur supports Teflons^{TM} ...55

3.1 Microscopie électronique

La préparation des spécimens en microscopie électronique est une étape cruciale dans l'observation d'échantillons naturels. En effet, l'échantillonage doit d'abord éviter toute perturbation capable de détériorer l'état physico-chimique du spécimen (*Davidson, 1984*). Ainsi au niveau des particules ou colloïdes, qui seront le principal sujet de notre étude, les manipulations de préparation devront être exemptes de toute procédure capable de provoquer la coagulation, une modification de l'état redox ou l'adsorption d'éléments étrangers à la particule elle-même (*Buffle et Leppard, 1995*). Un échantillon de microscopie électronique doit également être représentatif du milieu naturel (*Rossiter et Hamilton, 1991; Smart et Tovey, 1982*) dont il est issu, et en cela la préparation de plusieurs grilles de microscopie électronique est nécessaire. Finalement la visualisation des différents spécimens doit être faite avec le plus d'objectivité possible et une approche systématique est recommandée afin de ne pas être aveuglé par la présence d'une espèce au dépend d'une autre.

Les méthodes de préparation classiques issues de la biologie sont basées sur l'inclusion du spécimen dans des résines hydrophobes (*Hayat, 1981; Robards et Wilson, 1993*). L'inclusion est suivie d'une étape permettant la visualisation : l'ultramicrotomie. Celle-ci sera décrite au ch. 3.1.3, et consiste en un découpage en sections fines. Cette procédure nécessite la déshydratation préalable de l'échantillon, en remplaçant successivement les molécules d'eau par un solvant organique (*Robards et Wilson, 1993*) dans lequel la résine est soluble. Cela a principalement deux désavantages dans l'étude des colloïdes aquatiques. Le premier est la déshydratation du spécimen, qui a pour tendance de modifier sa morphologie et souvent d'augmenter l'adsorption par les colloïdes d'ions dissous. Le second est lié au passage dans un milieu hydrophobe, ce qui peut désorber des molécules organiques adsorbées à la surface des particules minérales.

Différentes techniques ont été utilisées ou mises au point durant ce travail. La technique principalement utilisée est l'ultracentrifugation, décrite au ch. 3.1.2. La seconde technique est la déposition par adsorption *in situ* sur des grilles préalablement déposées sur des plaques en Teflon™. Cette procédure, décrite au ch. 3.4.2, peut être suivie, comme la

préparation par ultracentrifugation, d'une étape de post-protection avec une fine couche de résine hydrophile permettant d'éviter les phénomènes de déshydration déjà mentionnés. Le dernier des modes de préparation de spécimens utilisés est l'inclusion dans une résine hydrophile suivie de l'étape d'ultramicrotomie et sera décrit au ch. 3.1.3.

3.1.1 Préparation des porte-spécimens

Toutes les techniques de TEM requièrent le dépôt d'un spécimen sur un porte-spécimen, schématisé dans la figure 3.1.

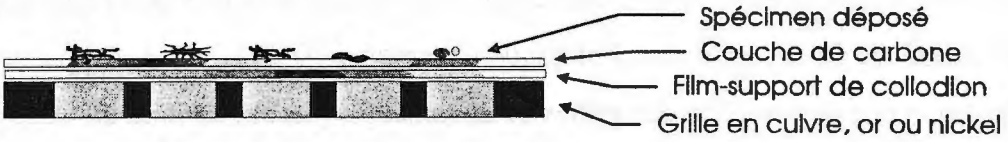


Figure 3.1: Coupe d'une grille de microscopie électronique à transmission.

Celui-ci se compose d'une grille de microscopie (Cu, Au, Ni, nylon, Be), recouverte d'un ou plusieurs films supports électron-transparents. Dans notre cas, des grilles de Cu, Ni et Au de 3,05 mm et de 200 mesh ont été utilisées. La préparation du premier film support se fait à l'aide d'une solution de collodion diluée à 0,5 % dans de l'acétate de pentyle. La procédure, décrite dans *Perret (1991)*, consiste à former un film de collodion par évaporation du solvant sur une lame de verre (76 x 26 mm); ce film est ensuite déposé sur une surface d'eau. Les grilles de microscopie sont déposées sur le film ainsi obtenu, d'une épaisseur de 2-6 nm (*Lienemann et al., 1997a*). Après récupération des grilles, un film de carbone est déposé par évaporation (évaporateur Balzers EVM 052A), le contrôle de son épaisseur (6-10 nm; *Lienemann et al., 1997a*) étant effectué par la vibration d'un cristal de quartz (Balzers QSG 301). La couche de carbone permet de rendre le porte-spécimen conducteur, tant du point de vue thermique qu'électrique. Cette couche est d'une importance capitale pour la stabilité du spécimen.

3.1.2 Ultracentrifugation

La méthode de préparation des spécimens par ultracentrifugation est basée sur la séparation des particules et colloïdes de densité supérieure à celle de l'eau. La loi de Stokes régit le temps de centrifugation nécessaire t [sec] pour qu'une particule de densité ρ [g/cm^3] et de diamètre d [cm], accélérée dans un champ gravitationnel de vitesse angulaire ω [rad/s]

passe d'un point x_1 à un point x_2 [cm] dans un liquide de densité ρ_0 [g/cm^3] et de viscosité η [poise]:

$$t = \frac{18\eta \ln((x_1)/(x_2))}{(\rho - \rho_0)d^2\omega^2}$$

L'utilisation judicieuse de cette équation permet la séparation par ultracentrifugation en cascade des particules de taille et de densité différentes (*Perret et al., 1991; 1994*). Dans le cas de particules non-sphériques, un facteur de correction peut être calculé afin de palier aux phénomènes de disparité morphologique (*Lerman, 1979*). L'ultracentrifugation permet également de déposer, sur des grilles de microscopie placées au fond de tubes de centrifugation, les particules et colloïdes présents dans la masse d'eau. Pour cette application, le montage requis est illustré dans la figure 3.2.

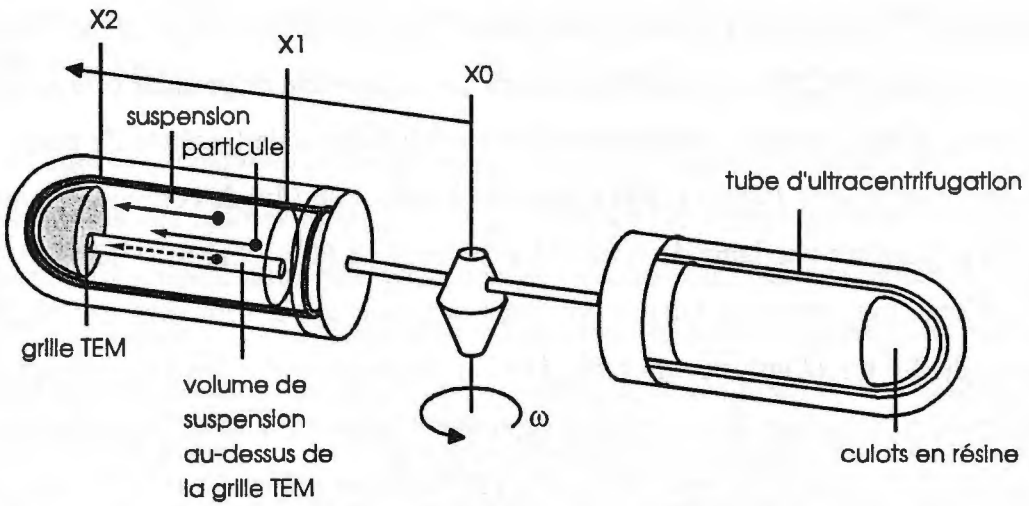


Figure 3.2: Principe d'ultracentrifugation pour la préparation de grilles de microscopie.

Les grilles de microscopie sont légèrement collées à l'aide d'un adhésif sec (Lettraset®) sur un culot en résine époxy (Weicon®) qui s'adapte parfaitement au fond du tube de centrifugation. Le lent ajout de la suspension à centrifuger est précédé d'une mesure de turbidité pour estimer la charge en particules. En fonction des figures 3.3a et b, le choix d'un volume approprié permet d'obtenir une grille dont la couverture en particule est adéquate pour la visualisation en microscopie électronique.

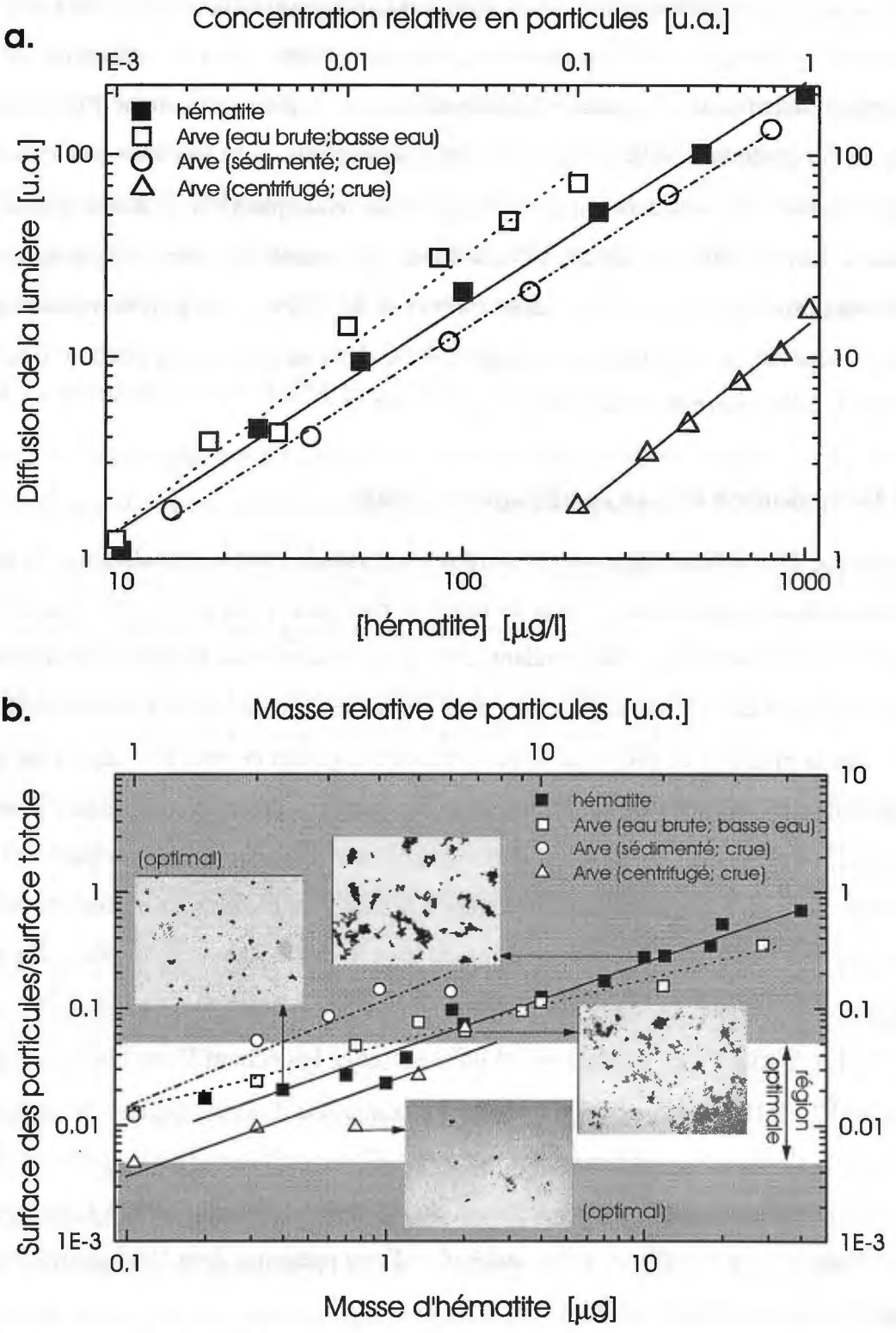


Figure 3.3: (a) Droite de calibration montrant le rapport entre concentration en particules (hématite ou échantillon de l'Arve (GE)) et diffusion de la lumière mesurée par light scattering. (b) Relation existant entre la concentration en particules présentes dans la solution centrifugée et la couverture de l'image obtenue. Le passage entre les graphes a et b permet d'optimaliser la couverture des grilles TEM en mesurant initialement la concentration particulaire à l'aide d'un signal de turbidité ou de light scattering.

Une fois la centrifugation terminée, la solution surnageante est délicatement retirée à l'aide d'une pipette ou d'une pompe péristaltique et les grilles de microscopie sont récupérées. Dans le cas de spécimens particulièrement fragiles, provenant d'échantillons anoxiques ou contenant de la matière organique susceptible de se modifier par le séchage de la grille, une micro-couche de résine hydrophile (Nanoplast™) peut être déposée en protection. La déposition s'effectue à l'aide d'une micro-centrifugeuse à disque horizontal (7000 tours/minute) comme décrit dans *Perret et al. (1991)*. La polymérisation de la résine est achevée en deux étapes : séchage à 40°C dans un dessicateur pendant 6 heures, puis à 60°C à l'air libre pendant 6 heures également.

3.1.3 Inclusion en résine et ultramicrotomie

La technique d'ultracentrifugation est extrêmement rapide pour la visualisation de spécimens naturels, elle permet de déposer du matériel particulaire sur grille sans en altérer les propriétés physico-chimiques. Cependant, certaines techniques de microscopie analytique (AEM) imposent des limites supérieures dans l'épaisseur du spécimen (*Mavrocordatos, 1997*), que la méthode de préparation par ultracentrifugation ne peut résoudre dans le cas de particules de grandes dimensions. D'autre part, les structures internes d'objets (bactéries, agrégats de particules) déposés par ultracentrifugation ne peuvent être explorées. Pour ce faire, nous avons recours à la méthode d'ultramicrotomie, basée sur l'inclusion de l'échantillon dans une résine de type hydrophobe ou hydrophile. De nombreux types de résines existent sur le marché, la plupart étant hydrophobes (Epon™, Spurr™, LR White™) et généralement utilisées pour les échantillons biologiques. Le Nanoplast™ FB101 est une résine hydrophile composée d'un monomère de mélamine soluble dans l'eau, qui se polymérise après ajout d'un catalyseur (B-52; acide p-toluène sulfonique) en libérant des molécules d'eau (*Bachhuber et Frösch, 1983*). Ce processus permet d'échanger par infiltration les molécules d'eau présentes dans l'échantillon par de la résine fixant le tout dans un bloc.

Le désavantage de cette méthode réside dans l'étape subséquente qui consiste en l'ultramicrotomie du bloc de résine afin d'obtenir des sections suffisamment minces (30-200 nm) pour être observables par TEM. Le grand nombre de sections préparées multiplie les

étapes de visualisation : chaque section doit être observée afin de trouver la partie d'intérêt ou de pouvoir reconstruire à partir de plusieurs sections voisines la structure d'un agrégat en 3D (*Leppard et al., 1996*). La coupe du bloc de résine s'effectue soit avec des couteaux de verre dans le cas de résine molles (de type époxy), ou des couteaux de diamant pour le Nanoplast™ et les résines incluant des particules minérales. Ce mode de préparation, bien qu'ayant ses avantages, est extrêmement long et coûteux (tant au niveau des heures passées lors de la visualisation que pour l'acquisition d'un couteau de diamant).

3.1.4 Présentation des TEM et SEM à disposition

Différents microscopes ont été utilisés lors de la visualisation et l'analyse des spécimens. Leurs caractéristiques sont mentionnées dans les tables 3.1 et 3.2:

Généralement, toutes les grilles ont été pré-visualisées sur le microscope Zeiss EM 10. Pour les micrographies, deux types de négatifs ont été utilisés:

- pour la microscopie à transmission: Kodak SO-163, taille 8,3 x 10,2 cm.
- pour la microscopie à balayage: Kodak TMX-6052, taille 6,2 x 7,2 cm.

Pour le microscope électronique Hitachi HF-2000, le détecteur EDS est un Noran, piloté avec le programme Voyager installé sur station Sun SparkStation IPX. Quelques essais en mode d'analyse PEELS ont également été effectués avec cet appareil (ch. 6.2).

En outre deux microscopes ont été utilisés lors des campagnes effectuées aux Etats-Unis afin de vérifier l'état des spécimens préparés sur le terrain avant le retour en Europe. Aucune analyse et micrographie n'ont été effectuées sur ces appareils, seules quelques visualisations des spécimens ont été entreprises pour diriger la suite des manipulations à terminer. Il s'agit d'un microscope électronique à transmission Jeol 100C dans les locaux de l'Université de Notre-Dame (Notre-Dame, IN) et mis à disposition par le Prof. T. Kozel et d'un microscope électronique à transmission de type Hitachi H-700H dans les locaux de l'Electron Probe Instrumentation Center (EPIC) de Northwestern University (Evanston, IL) géré par le Prof. V. Dravid.

Table 3.1: Microscopie électronique à transmission; CME: *Centre de Microscopie Electronique, Université de Lausanne;* CIME: *Centre Interdépartmemental de Microscopie Electronique, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne*

Microscopes à transmission:	Utilisation:	Détecteurs:	Tension d'accélération: [kV]	Diaphragme: [µm]	Analyses:	Lieu:
Zeiss EM 10	Visualisation de routine	---	80	Condenseur: 100 Objectif: 10	---	CME Prof. S. Fakan
Philips CM-12	Analyses de routine	EDS: EDAX-SUTV, N_2 liquide	80	Condenseur: 100 Obejctif: 10	sonde: 400 nm tilt: 30° aggrandiss.: 19500x temps: 30 sec.	CME Prof. S. Fakan
Hitachi HF-2000 FEG	Analyses EDS fines	EDS: Noran PEELS: Gatan	200 (canon à émission de champ)	Condenseur: 300	Paramètres ajustés en fonction des analyses	CIME Prof. P. Buffat Prof. P. Stadelman

Table 3.2: Microscopie électronique à balayage; CME: *Centre de Microscopie Electronique, Université de Lausanne*

Microscopes à balayage:	Utilisation:	Détecteurs:	Tension d'accélération: [kV]	Diaphragme: [µm]	Lieu:
Jeol JSM-6300F	Visualisation	---	5	Condenseur: 500 Objectif: 30	CME Prof. S. Fakan
Jeol JSM-35	Analyses EDS	EDS: Link	25	Condenseur: 200 Objectif: 30	CME Prof. S. Fakan

3.2 Etude de la matière organique par microscopie électronique

L'importance de la matière organique a été mise en évidence depuis le début des études lacustres. Ses associations avec les particules minérales ont longuement été étudiées, et l'influence que peuvent avoir des substances humiques et fulviques sur la charge de surface des particules a également été démontrée (*Filella et Buffle, 1993*). L'effet des matières organiques fibrillaires sur les associations entre colloïdes a été étudiée dans les milieux lacustres (*Leppard, 1984; Leppard, 1995; Filella et al., 1993*). Des groupes polysaccharides au sein de ces entités ont été détectés tant dans les milieux marins (*Kell et al., 1994; Benner et al., 1992*), que dans les sols (*Chenu et Guérif, 1991; Foster, 1981*) ou les lacs (*Burnison et Leppard, 1984*), mettant en évidence le caractère réfractaire d'entités qui étaient considérées jusque là facilement biodégradables et assimilées par les micro-organismes (*Foster, 1981; Heissenberger et Herndl, 1994; Tranvik et al. 1993*).

La très faible densité électronique de ces entités est partiellement à l'origine de sa tardive mise en évidence par microscope électronique. Il nous a donc semblé utile avant d'étudier les lacs de Lugano (ch.4) et Paul (ch.5), de mettre au point des méthodes de visualisation permettant l'observation des polysaccharides fibrillaires aquatiques dans des conditions aussi peu biaisées que possible. Pour cela nous avons eu recours dans un premier temps à un modèle simplifié, constitué de sphères minérales d'hématite (α-Fe_2O_3 ; diamètre = 70 nm), en présence de fibrilles de xanthane (Pfizer N.Y., Flocon 4800C, PM > 2 10^6 dalton; *Stokke et al., 1989; Christensen et al., 1993*). La synthèse des particules d'hématite est obtenu par hydrolyse acide et est décrite dans plusieurs publications (*Penners, 1985; Matijevic, 1978; Liang, 1988; Mavrocordatos et al., 1994; Perret et al., 1995*). Dans un second temps et dans le but d'étudier un système plus complexe et davantage similaire au milieu naturel, des fibrilles d'alginate (Kelco, Manucol DM, PM: 10^6) ont été testées. Finalement des suspensions contenant les produits exocellulaires d'une algue (*Scenedesmus acutus*, gracieusement fournie par le Prof. D.J. Kushner; *Stryceck et al., 1995*) ont servi de modèle complexe pour la matière organique fibrillaire.

Comme indiqué précédemment, la matière organique a peu de densité électronique puisqu'elle est composée principalement d'atomes légers (carbone, oxygène, hydrogène, azote). Les électrons la traversant sont peu déviés et l'image formée en bas de colonne est par conséquent peu affectée par la présence des fibrilles dans le spécimen. En effet un atome de ^{12}C comprend 6 protons et 6 neutrons, entourés de 6 électrons dans un volume atomique de 3,2 $Å^3$. En comparaison, un atome de ^{238}U a une composition de 146 neutrons, 92 protons et 92 électrons dans un volume atomique de 11 $Å^3$. En première approximation, la densité électronique du carbone est 4,5 fois plus faible que celle de l'uranium. Un électron traversant la colonne du microscope sera plus fortement dévié par les électrons d'un objet riche en uranium que lorsqu'il interagira avec un composé organique.

Afin d'obtenir des images suffisamment contrastées de la matière organique, il est possible d'avoir recours à des marqueurs composés d'un atome lourd, ayant une affinité particulière pour la matière organique. Ceux-ci, en se fixant sur la matière organique, renforcent localement la densité électronique et permettent d'obtenir une image de bonne qualité.

Différents types de marquage existent (*Robards et Wilson, 1993; Pottu-Boumendil, 1989*) : le marquage positif est caractérisé par l'adsorption de molécules électron-denses possédant une affinité pour le matériel à contraster; le marquage négatif, par contre, donne une image inversée ou négative de la matière organique, la molécule se déposant sur les bords de la matière organique. Une autre méthode consiste en la déposition d'une fine couche de Pt ou d'autres métaux sur la grille d'observation. L'angle de déposition permet, dans le cas d'un support fixe, de révéler la présence de tout matériel déposé, voire de déterminer son épaisseur grâce à l'ombrage produit.

L'utilisation de techniques EDS (*Schultze-Lam et Beveridge, 1994; Urrutia Mera et Beveridge, 1993*) ou EELS (*Perret et al., 1995*) permet de discerner sous le faisceau électronique la nature chimique de particules d'origines minérales. Par exemple elle permet d'identifier dans la cas de systèmes naturels une particule d'argile, de silice ou d'hydroxyde de fer ou de manganèse. Dans le cas de la matière organique, la nature chimique (polysaccharides, acides humiques ou fulviques, lipides ou peptides) ne peut être différenciée par ces techniques d'analyse.

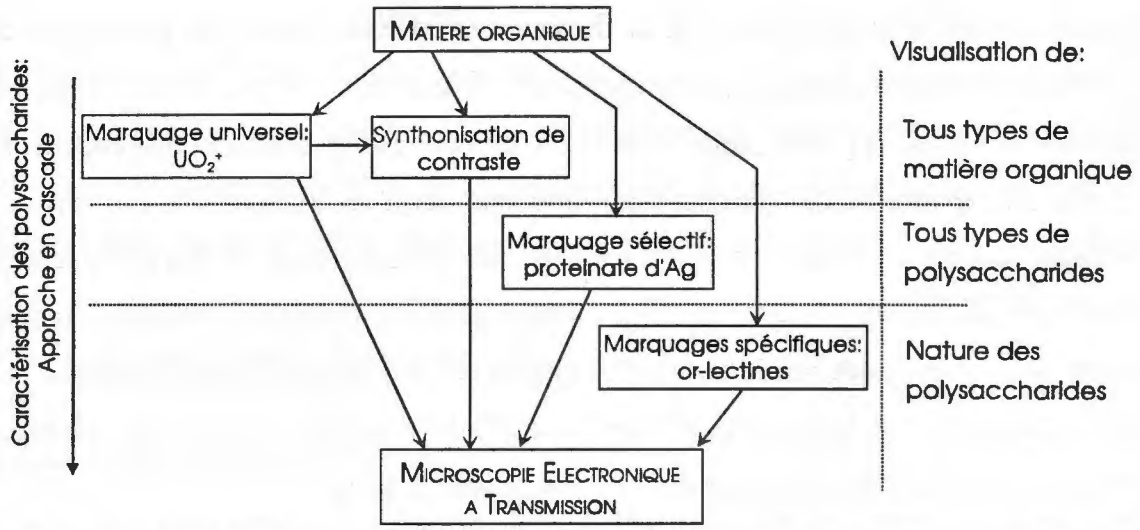


Figure 3.4: Approche en cascade de la matière organique permettant de connaître ses caractéristiques chimiques.

L'utilisation de marqueurs spécifiques à un type de matière organique est par conséquent requis et pourrait permettre de discerner les polysaccharides des autres types de matière organique. Pour la suite de ce chapitre, nous nous sommes proposé de mettre en place une approche en cascade, qui nous permettrait de visualiser la matière organique dans un premier temps, mais également de reconnaître les entités de polysaccharides par des procédures alternatives (Figure 3.4). Pour cela, nous avons opté pour:

- 1) La visualisation classique avec l'aide de l'acétate d'uranyle qui, une fois optimalisée, permettra d'observer la matière organique, quelque soit son origine. Cette partie sera développée dans le ch. 3.2.1.
- 2) La syntonisation de contraste qui permet de faire des observations fines sur des fibrilles de diamètre inférieur à 7 nm et non-révélées par la visualisation en mode conventionel. Cette étape permettra la visualisation de la totalité des espèces fibrillaires, quelque soit leur taille et leur densité électronique. Cette technique sera décrite au ch. 3.2.2.
- 3) Un marquage au proteinate d'argent, capable d'identifier les fibres de polysaccharides portant des groupements diols vicinaux caractéristiques et absents sur tout autre type de matière organique. Cette méthode sera développée au ch. 3.2.4.

L'étape suivante de cette approche en cascade consisterait en la détermination des sucres qui composent le polysaccharide, détecté d'abord à l'aide d'un marquage sélectif, puis investigué à l'aide d'un marquage spécifique. Cette dernière étape est accessible par l'utilisation de lectines liées à des grains d'or de quelques nanomètres, et ayant une spécificité pour quelques groupements sucrés uniquement (*Liener et al., 1986*). Le couplage de dif-

férentes lectines avec des grains d'or de diamètre variable mais contrôlé, permettrait de différencier la composition intime d'un polysaccharide directement au sein de l'échantillon observé. Des tests préliminaires (*Del Rio Cantero, 1994*) indiquent que cette technique sera adaptable aux préparations par ultracentrifugation, mais qu'elle requiert une meilleure connaissance de la spécificité des lectines utilisées vis-à-vis des groupes uroniques (sucres acides) présents dans les milieux naturels. En effet le principal inconvénient de cette méthode réside dans le fait que les lectines ont été développées pour des sections de spécimens biologiques et n'ont jamais fait l'objet de recherches approfondies sur d'autres carbohydrates (*Liener et al., 1986; Buffle, 1988*).

3.2.1 Optimalisation du marquage à l'acétate d'uranyle

Notre choix s'est porté sur la méthode la plus classiquement utilisée : le marquage positif à l'acétate d'uranyle ($UO_2(CH_3COO)_2$, stock de 2%, filtré sur 0,2 µm), lors duquel l'ion uranyle s'adsorbe sur la matière organique. Dans les méthodes classiques utilisant des sections de résine, la plupart des procédures sont basées sur le marquage avant ou après préparation du spécimen (méthode de post-staining) où le marqueur s'adsorbe sur la matière organique présente en surface de la section et, en fonction du temps de contact section-marqueur, de plus en plus profondément au sein de la résine. Cette procédure a pour inconvénient des temps de marquage longs suivi d'étapes de rinçage assez fastidieuses afin d'éviter tout dépôt non spécifique du marqueur. Dans le cas de nos spécimens ultracentrifugés, nous avons cherché non seulement à optimaliser le temps de marquage puisque nos échantillons ont des grandes surfaces exposées, mais également à trouver une méthode alternative permettant de contraster le spécimen avant l'ultracentrifugation.

3.2.1.1 Méthode de post-staining

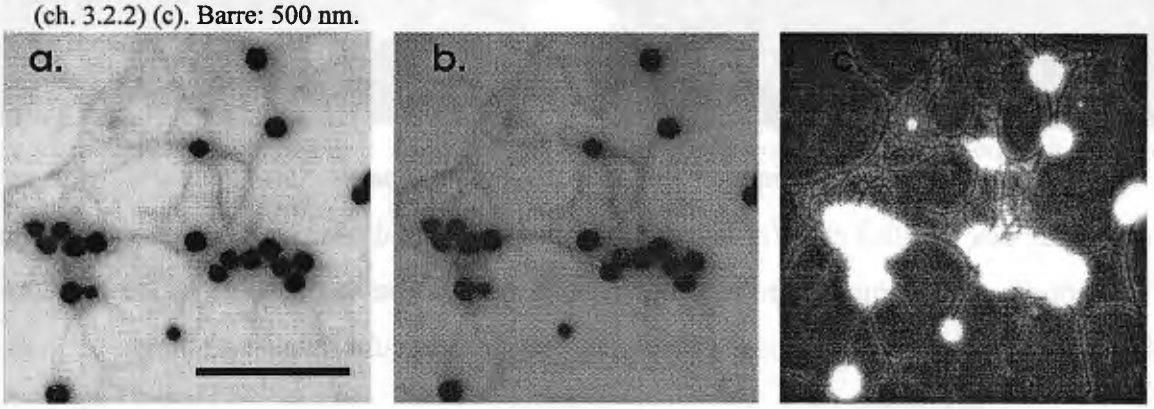
Les spécimens habituellement traités par cette méthode sont inclus dans des résines, limitant par là l'accessibilité de la matière organique qui doit être marquée. Les temps de marquage sont par conséquent longs (env. 2h.; *Robards et Wilson, 1993*) et risquent de provoquer, dans le cas de spécimens déposés sur grille par ultracentrifugation, des artefacts liés à un excès de marqueur. La méthode développée pour ces spécimens (polysaccharide utilisé: xanthane) consiste à déposer la grille sur une goutte (10 µl) d'acétate

d'uranyle, pour des temps et des concentrations de marqueur différentes. Cette étape est suivie d'un lavage effectué en déposant la grille successivement sur trois ou quatre gouttes d'eau pendant 5 minutes chacune. Nous avons déterminé que la concentration adéquate d'acétate d'uranyle est de 0,1% et le temps optimal de réaction de 2 minutes. Pour des temps inférieurs, les fibres de xanthane ne sont pas marquées en totalité ou le marquage n'est pas reproductible sur l'ensemble de la grille, alors que pour des temps plus longs des dépôts non spécifiques sont observés.

3.2.1.2 Marquage "en bloc"

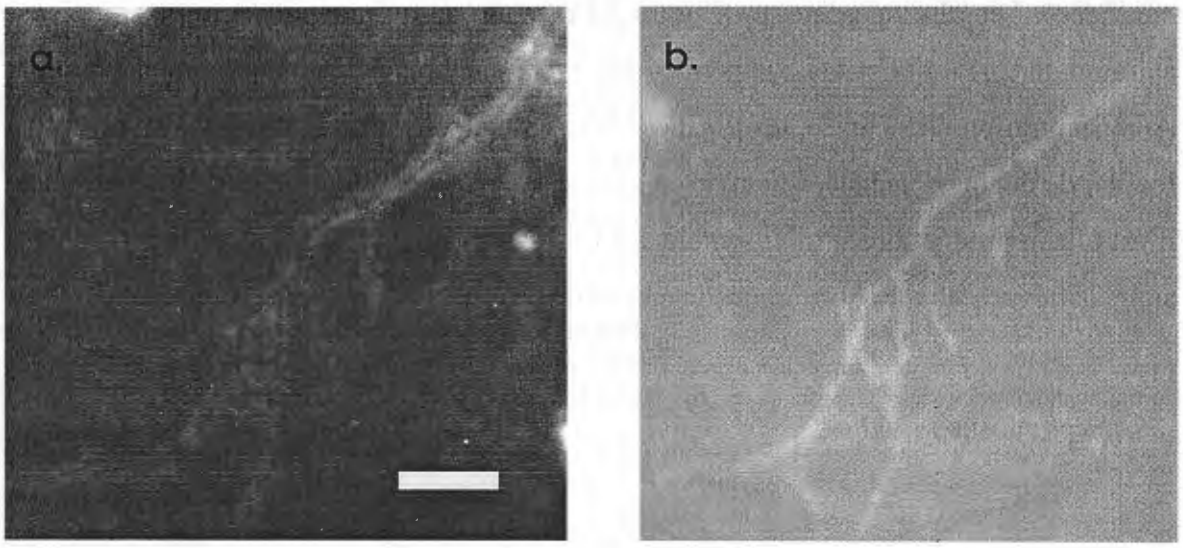
L'intérêt de cette seconde méthode réside dans la possibilité de contraster l'échantillon avant sa déposition sur grille. Si l'efficacité du marquage en suspension risque d'en être accrue, de par la très grande disponibilité de la fibrille sur la grille, un risque de coagulation des fibrilles et de précipitation d'un excès d'agent contrastant lors du séchage de la grille n'est pas à exclure. Ainsi nous avons testé différentes concentrations d'acétate d'uranyle, qui est directement ajouté à la suspension à centrifuger (polysaccharide utilisé : xanthane). Les résultats obtenus (Figure 3.5a) montrent qu'une concentration finale en solution de 0,1% est optimale et permet d'arriver au même contraste qu'en post-staining. A concentration plus élevée, les fibrilles apparaissent sous forme granuleuse avec la formation de dépôts d'acétate d'uranyle en plaques. A concentration inférieure, le marquage n'est plus reproductible sur l'ensemble des fibrilles, et dans ce cas la structure tri-dimensionelle des réseaux de fibrilles enchevétrées ne peut plus être visualisée correctement.

Figure 3.5: Micrographies d'un mélange entre fibrilles de xanthane et particules d'hématite visualisées en mode conventionel après marquage en bloc (a), en mode Zero-loss (ch. 3.2.2) (b) et en mode CT-TEM (ch. 3.2.2) (c). Barre: 500 nm.



La question de l'homogénéité et de l'efficacité du marquage en bloc s'est imposée et il nous a semblé important de vérifier que l'acétate d'uranyle se déposait exclusivement sur les fibrilles de xanthane et non pas ailleurs sur la grille. Pour cela nous avons eu recours à une méthode optimalisée par *Mavrocordatos (1997)* qui permet d'obtenir des images élémentaires ne visualisant que les éléments d'intérêt présents dans le spécimen. La méthode se base sur l'enregistrement de plusieurs images filtrées en énergie selon le principe décrit au ch. 3.2.2. L'atome d'uranium présent dans l'ion uranyle UO_2^+ peut être visualisé à son seuil d'ionisation $O_{4,5}$ (116,5 eV). L'efficacité de cette méthode a été prouvée par la grande sensibilité obtenue par *Mory et Colliex (1989)* avec un seuil de détection de 6 à 9 atomes environ. Nous avons appliqué cette technique à nos spécimens contenant des xanthanes marqués "en bloc" par l'acétate d'uranyle et obtenu des images élémentaires de l'uranium, qui ont été comparées aux micrographies des fibrilles (Figure 3.6).

Figure 3.6: Image d'un mélange de fibrilles de xanthane et d'hématite, marqué en bloc avec UO_2^+ 0,1 %; a) en mode CT-TEM à 250 eV et b) en mode ESI-TEM sur la bande $O_{4,5}$ de l'uranium. Barre : 250 nm



Il apparait clairement sur ces images que le marqueur se répartit de manière uniforme sur l'ensemble des fibrilles et qu'aucun dépôt non-spécifique d'uranyle n'est détecté sur le film support. Le marquage "en bloc" lors de la préparation des spécimens est par conséquent une alternative judicieuse à la méthode plus fastidieuse du post-staining.

3.2.2 Microscopie électronique à filtre d'énergie: Optimalisation de la syntonisation de contraste

En microscopie électronique conventionelle, l'image contrastée d'un spécimen marqué est due presque entièrement à la diffusion élastique des électrons interagissant avec le métal du marqueur, mais la distribution d'intensité est superposée à un bruit de fond plus ou moins uniforme provenant des diffusions élastiques et inélastiques de la matrice d'atomes légers, essentiellement le carbone. Le contraste est ainsi augmenté lorsque la composante inélastique du bruit de fond est soustraite de l'image. De plus les interactions inélastiques ont tendance à être plus délocalisées que les interactions élastiques, affectant ainsi la résolution d'une image inélastique (*Reimer et al., 1992*). Ainsi l'utilisation d'un filtre d'énergie est surtout valable pour les sections épaisses ou pour les échantillons contenant beaucoup d'éléments légers pour lesquels le rapport entre diffusions inélastiques et élastiques est élevé (*Bauer, 1993; Door et al., 1994; Schröder, 1992*). L'insertion d'un filtre d'énergie sur la colonne du microscope permet de séparer les électrons transmis en fonction de leur énergie et de produire ainsi des images monochromatiques.

Cette procédure a été testée avec nos échantillons (*Mavrocordatos et al., 1994*). Les images obtenues en observant uniquement les électrons transmis sans perte d'énergie (bande du zero-loss) ne montrent aucune réelle amélioration en ce qui concerne la visualisation des fibrilles de xanthane (Figure 3.5a et b).

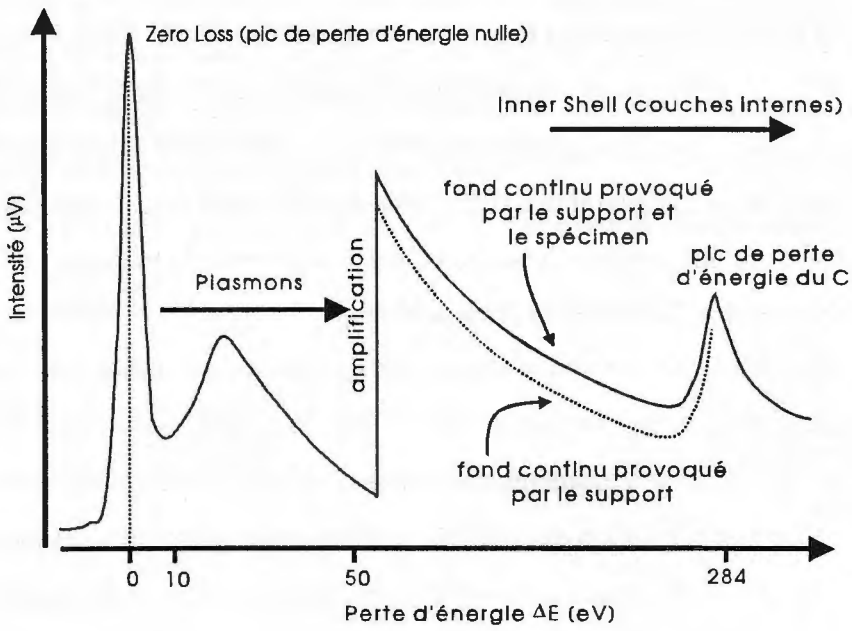


Figure 3.7: Différence de fond continu provoqué par des zones d'épaisseur et de densité électronique différente lors de l'acquisition d'un spectre de perte d'énergie électronique (EELS).

Une procédure alternative, la syntonisation de contraste (contrast-tuning; CT-TEM), consiste à enregistrer une micrographie de la matière organique dans la gamme des énergies comprises entre 20 et 300 eV. La méthode repose sur la différence de fonds continus entre des zones d'épaisseur ou de densité électronique différentes (*Reimer et al., 1992; Reimer et al., 1988*), comme décrit sur la figure 3.7.

Dans le cas de spécimens biologiques (*Sorber et al., 1990*), la syntonisation de contraste est souvent pratiquée autour de 250 eV, juste avant la bande d'ionisation K du carbone, où ce dernier contribue peu à l'intensité de l'image alors que le contraste d'autres éléments (Ca, P, S et élément de marquage) est fortement augmenté. L'avantage obtenu avec cette technique est montré dans la figure 3.5a et c, où une très nette amélioration du contraste est obtenue pour les fibrilles de xanthane reliant les particules d'hématite. Des fibrilles de diamètre inférieur à 7 nm sont mises en évidence sur cette image alors qu'elles étaient insoupçonnées en mode conventionel. Sur la micrographie obtenue par CT, les particules d'hématite apparaissent sous forme biaisée, car ces dernières, composées exclusivement de fer et d'oxygène, génèrent un fond continu très intense aux alentours de 250 eV, par opposition aux fibrilles organiques de xanthane, qui ne contiennent que des éléments légers et quelques traces d'éléments du marqueur.

L'avantage de cette technique est clairement démontré sur l'image précédente, mais il nous a toutefois paru nécessaire de déterminer l'énergie à laquelle l'augmentation de contraste est optimale. Pour cela, des images en mode de syntonisation de contraste ont été enregistrées entre 0 et 300 eV, avec une résolution énergétique de 15 eV. Des fibrilles de xanthane et les fibrilles exsudées par les algues *Scenedesmus acutus* ont été utilisées pour cette optimalisation. Pour chaque micrographie, de nombreuses mesures densitométriques (logiciel Wincam équippé avec une caméra Cybertech CS-1) ont permis de mesurer la différence de niveau de gris entre les fibrilles et le fond de l'image. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 3.8.

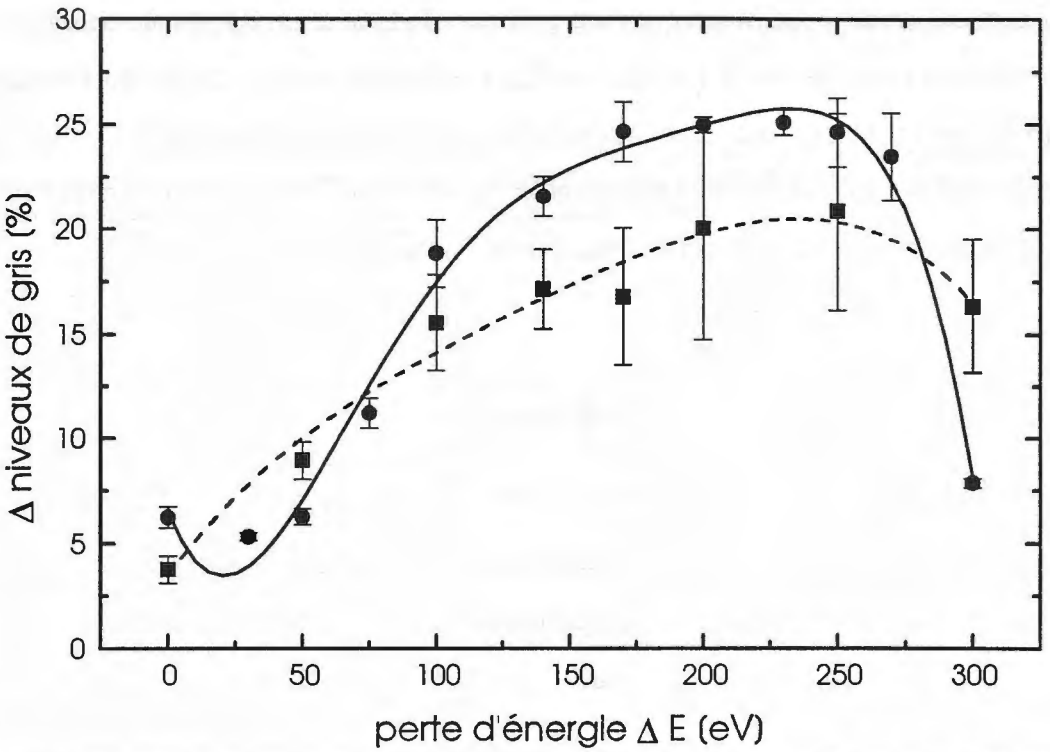


Figure 3.8: Mesures densitométriques des images CT-TEM de xanthane (symbole: carré) et de fibrilles exsudées (symbole : sphères) enregistrées à différentes énergies. Pour chaque fibrille, 3 mesures ont été effectuées sur des segments différents de la fibrille.

Les inhomogénéités mesurées sur le fond ainsi que sur les fibrilles expliquent la grande variabilité des résultats. Cependant pour les deux types de fibrilles, le contraste obtenu entre 170 et 270 eV est largement supérieur à celui d'une image obtenue en mode zero-loss. Le choix d'une énergie précise dans cette plage n'est par contre pas définissable avec les mesures effectuées en densité de gris. Dans les deux cas, une observation à 250 eV s'avère être optimale et si le choix peut se porter sur des pertes d'énergie plus faibles, les valeurs au-delà de 250 eV sont à exclure. Un second enseignement apporté par ce graphe montre que la courbe de contraste semble varier en fonction du type de fibrilles et donc que le contraste optimal devra en conséquence être recherché de cas en cas.

L'épaisseur du spécimen étant un des facteurs affectant la sensibilité de la visualisation en mode de syntonisation de contraste, nous avons vérifié si l'épaisseur du film support de collodion influençait la qualité de l'image finale. Après déposition du spécimen sur la grille, celle-ci a été visualisée en mode conventionel et en mode de syntonisation de contraste. Puis dans un second temps, le film de collodion a été dissous dans une solution d'acétate de pentyle et visualisé dans les mêmes conditions. Aucune structure supplémen-

taire n'a été observée, confirmant que dans notre cas l'élimination du film de collodion est inutile. Ceci est expliqué par le fait que nos films support de collodion (2-6 nm) et de carbone (6-10 nm) sont très minces en comparaison de l'épaisseur des fibrilles (5-10 nm) . Les épaisseurs ont été calculées en mesurant le rapport entre l'intensité du signal zero-loss et l'intensité des électrons ayant interagit avec le spécimen, en accord avec *Egerton (1986)* et *Door et al. (1991)*.

3.2.3 Combinaison entre acétate d'uranyle et syntonisation de contraste

Les résultats présentés dans les chapitres 3.2.1 et 3.2.2 indiquent que:

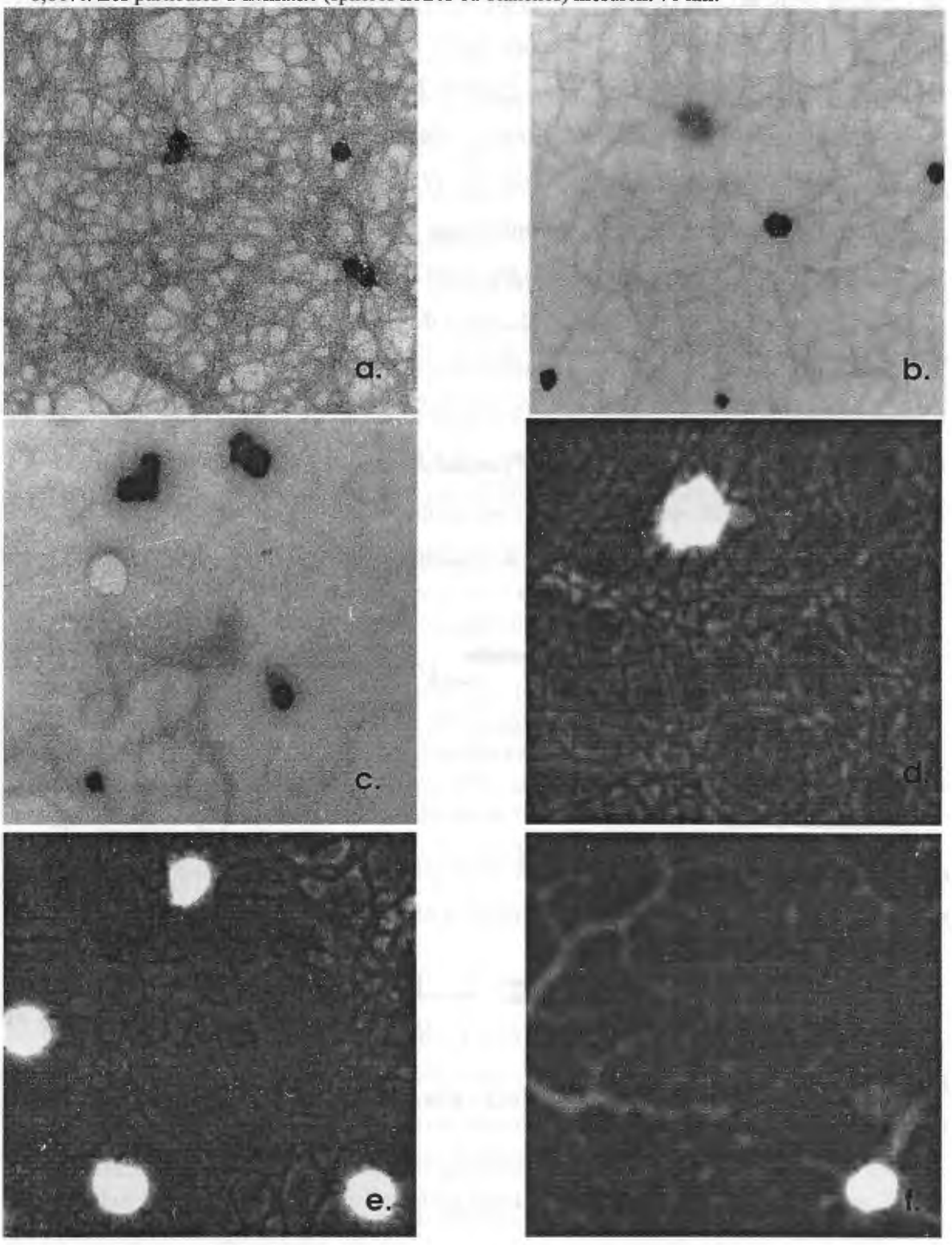
- La méthode de syntonisation de contraste est une technique très puissante pour la visualisation d'entités fibrillaires, mais que l'observation de fibrilles ultra-fines n'est pas possible sans le recours à un marqueur.
- L'acétate d'uranyle est un marqueur non-spécifique efficace pour la matière organique de type polysaccharidique. Bien que ce marqueur semble se déposer exclusivement sur les fibrilles de polysaccharides à faibles concentrations (0,1%), l'utilisation de ce marqueur dans des concentration conventionelles (1-2%) peut former des dépôts non spécifiques le long des fibrilles (*Wilkinson et al., 1995*), masquant leurs détails ultrastructuraux et leurs interactions avec des particules minérales.

Il est donc nécessaire de déterminer les conditions requises en couplant ces deux procédures, afin d'obtenir un très bon contraste pour les structures fines du matériel fibrillaire et une image dépourvue d'artefact par le dépôt parasite de précipités d'acétate d'uranyle. Pour cela nous avons visualisé des préparations contenant des fibrilles de xanthane et des particules d'hématite et ayant été marquées par des concentrations croissantes d'acétate d'uranyle, comprises entre 0,01% et 0,5%. Les résultats obtenus sont donnés dans la figure 3.9 qui montre qu'un compromis est obtenu entre 0,1 et 0,05%.

Aux concentrations plus faibles, les fibrilles sont difficilement visualisables en microscopie conventionelle et l'ultrastructure est définitivement perdue lors de la visualisation en mode de syntonisation de contraste. A des concentrations supérieures, des dépôts en

forme de grains de précipités sont observables en microscopie conventionelle, masquant la structure fine des fibrilles.

Figure 3.9: Images en mode conventionel (a à c) et en mode CT-TEM (d à f) de fibrilles de xanthane marquées avec des concentrations croissantes d'acétate d'uranyle; a: 0,2%; b et d: 0,1%, c et e: 0,05% et f: 0,01%. Les particules d'hématite (sphères noires ou blanches) mesurent 70 nm.



3.2.4 Optimalisation du marquage avec le protéinate d'argent

L'utilisation de marqueurs plus spécifiques à un type particulier de matière organique n'est pas récente. Déjà dans les années 1950, *Steedman (1950)* développait l'utilisation de l'Alcian Blue 8GX permettant de mettre en évidence le matériel possédant des entités de polysaccharides acides pour la microscopie optique. La reprise de ces travaux par Alldredge et Passow *(Alldredge et al., 1993; Passow et Alldredge, 1995)* a permis d'illustrer la proportion importante de polysaccharides dans les agrégats de neige marine (marine snow). Plus tard *Hanke et Northcote (1975)* testaient un autre marqueur spécifique des polysaccharides, le rouge de ruthénium, également très utilisé dans la littérature. Une autre méthode développée par *Thiéry (1967)* pour la ME permettait le développement de grains d'argent de quelques dizaines de nanomètres marquant la présence de polysaccharides sur des sections d'Araldite. Cette technique a d'ailleurs été reprise par *Chenu (1993)* pour marquer des fibrilles de xanthane et de scléroglucan adsorbées sur des argiles et incorporées dans le Spurr®, et par *Foster (1981)* pour des sections de sol. Nous avons repris cette technique et l'avons optimalisée afin de l'appliquer aux échantillons de fibrilles préparés par la méthode d'ultracentrifugation.

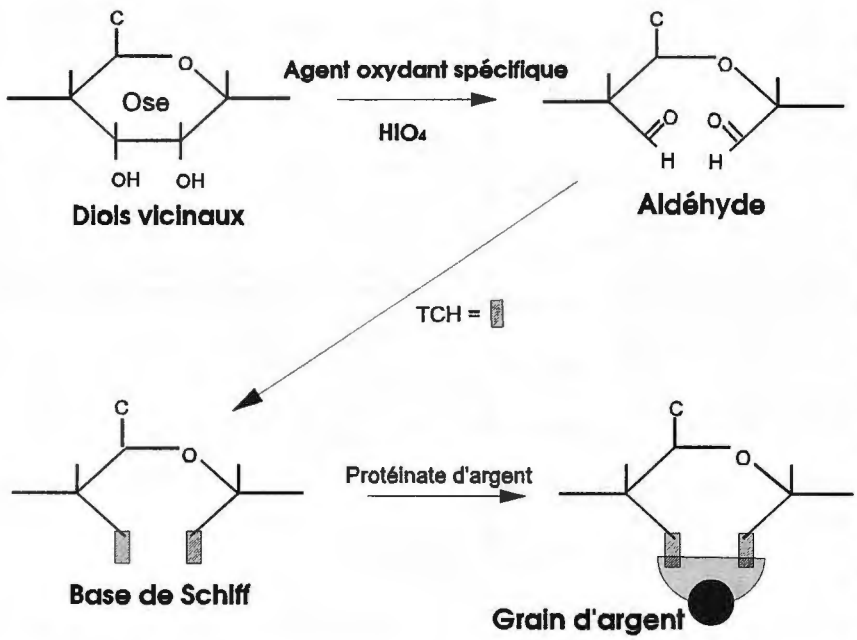


Figure 3.10: Marquage des fibrilles de polysaccharides selon la procédure de Thiéry (1967);

La méthode, dont les étapes sont illustrées dans la figure 3.10, est basée sur la réaction des diols vicinaux présents dans les fibres de polysaccharides avec l'acide periodique pour former des aldéhydes. Celles-ci réagissent ensuite avec le thiocarbohydrazide (TCH) pour former une base de Schiff. Dans un troisième temps, la base de Schiff réagit

avec le protéinate d'argent et développe un grain d'argent de la taille de quelques nanomètres. Cette dernière étape permet la réduction de l'ion Ag^+ en Ag métallique.

Par rapport à la technique initialement développée, nos spécimens ne sont pas inclus dans une résine, mais déposés sur la surface d'un film de collodion et de carbone. Leur accessibilité aux réactifs est donc plus grande. La concentration des réactifs a été maintenue comme décrit dans *Thiéry (1967)*, mais le temps de réaction entre le spécimen et les solutions a été ajusté. Il s'est rapidement avéré que la réaction avec le périodate ainsi que celle avec le protéinate d'argent n'étaient pas celles qui déterminent la spécificité et ne limitent pas la vitessse globale de la réaction. Ainsi seul le temps de contact entre le thiocarbohydrazide et le spécimen a été réduit pour obtenir un marquage adéquat.

Les différents essais effectués sur des fibres d'alginate et de xanthane en présence de particules d'hématite ont permis d'arriver au protocole décrit ci-dessous:

1) Les grilles sont mises en contact durant 20 minutes avec une goutte de 10 µl d'une solution d'HIO_4 1%; l'excès de solution est éliminé avant le rinçage dans 4-5 gouttes d'eau ultrapure.

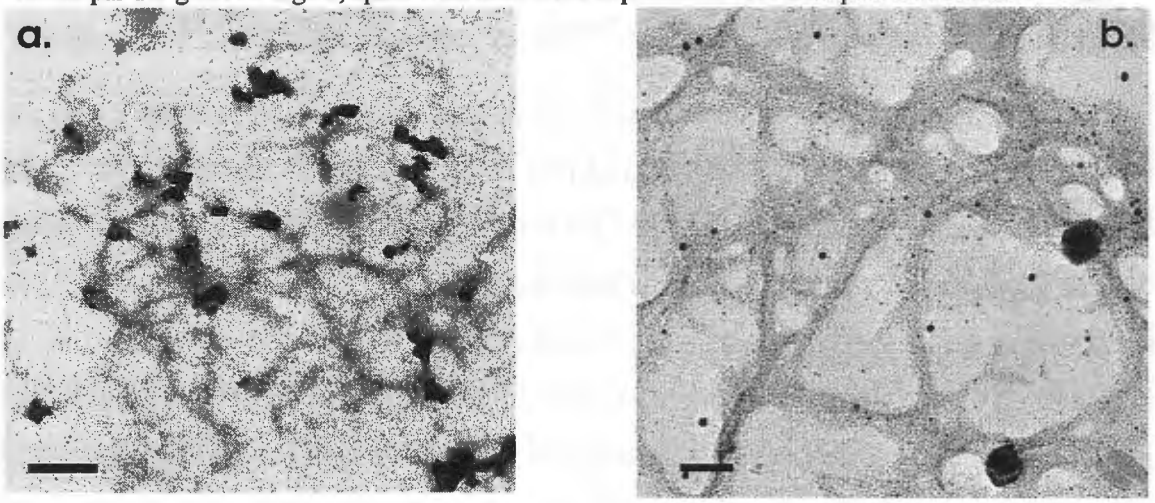
2) Une fois rincées, les grilles sont mises en contact pendant 45 minutes avec 20 µl de TCH 0,2% dilué dans l'acide acétique 20%. Cette étape est suivie de 4-5 rinçages dans des solutions d'acide acétique de concentration décroisssante (15-10-5-2-1%), puis quatre fois dans de l'eau ultrapure.

3) La dernière étape est accomplie en traitant les grilles durant 15 minutes par 20 µl d'une solution de protéinate d'argent 1%, préparée à l'abri de la lumière et filtrée avant usage. Cette étape doit être faite en chambre noire afin d'éviter toute réduction induite par la lumière et capable de développer des grains d'argent non spécifiques. Elle est suivie de 4-5 lavages dans de l'eau ultrapure avant la visualisation du spécimen.

La figure 3.11 montre le résultat obtenu avec des fibres de xanthane et d'alginate. La présence de grains d'argent démontre de façon non équivoque la localisation des fibrilles de polysacharides.

La taille moyenne des granules d'argent est plus importante dans le cas de l'alginate que pour le xanthane. Cette différence est expliquée par l'orientation des groupements diols vicinaux au sein de la molécule. En effet, comme illustré sur la figure 3.12, 100% des groupements sont en position cis dans l'alginate, ce qui a pour effet de faciliter grandement la réaction d'oxydation avec le periodate (*Carey et Sundberg, 1983*).

Figure 3.11: Image conventionelle d'un réseau de fibrilles de xanthane (a) et d'alginates de sodium (b) révélé par des grains d'argent, après traitement selon la procédure décrite auparavant.Barres: 100 nm.



Dans le cas du xanthane, seuls 20% des groupements diols sont cis alors que les autres sont trans, limitant en conséquence la première étape du marquage (*Robards et Wilson, 1993*).

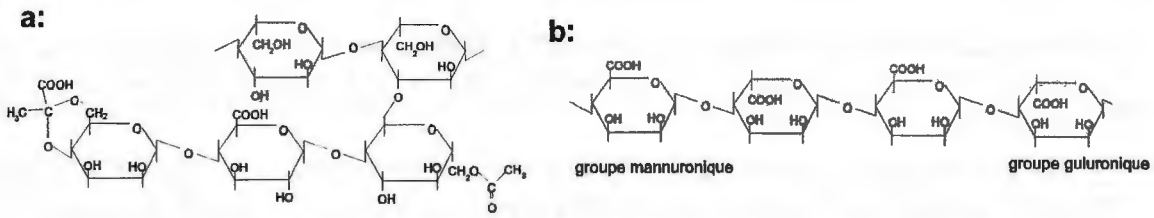


Figure 3.12: Orientation des groupements hydroxyles dans les fibrilles de xanthane (a) et d'alginate (b).

3.3 Colloïdes de fer: synthèses en laboratoires

Les particules d'hématite ou de goethite habituellement utilisées dans la littérature (*Liang et Morgan, 1990; Tipping et Cooke, 1982*) pour mimer les oxydes de fer naturels s'avèrent être des modèles très bien caractérisés et facilement contrôlables. Leurs similitudes avec les particules du milieu naturel sont par contre très discutables lors de l'étude des phases amorphes formées aux interfaces redox présentes au sein des lacs.

En conséquence, nous avons synthétisé des colloïdes amorphes riches en fer en tenant compte des conditions physico-chimiques prévalant dans les milieux naturels que nous avons étudiés. La synthèse de ce type de colloïdes, décrite dans la littérature (*Perret, 1991; Pizzaro-Konzak, 1993)* est basée sur la lente oxydation du Fe^{2+}, sous contrôle des

conditions de pH, T, [Fe^{2+}] et [O_2]. Nous avons adapté les conditions de synthèse à nos exigences, notamment en ce qui concerne les concentrations en phosphates (Lac de Lugano, cf. ch.4) et en polysaccharides (Lac de Lugano et Lac Paul, cf. ch.4 & 5).

L'étude de dix synthèses nous a permis de comprendre l'importance de l'effet de la matière organique fibrillaire sur la structure des oxyhydroxydes de fer formés. Ces synthèses nous ont également permis d'obtenir des standards extrêmement proches des espèces étudiées dans le cadre de l'étude sur le lac de Lugano, notamment pour la calibration de la spectroscopie à dispersion d'énergie (EDS). La présence de phosphates au sein des solutions de synthèse nous a permis d'étudier l'efficacité des oxydes de fer amorphe à capter les phosphates.

3.3.1 Conditions de synthèse

Afin de reproduire les conditions présentes à la chemocline des lacs stratifiés (disparition rapide de [O_2] et apparition d'un gradient de Fe^{2+}), nous avons construit un réacteur, schématisé sur la figure 3.13. Ce réacteur permet le contrôle de tous les paramètres cruciaux lors des synthèses envisagées.

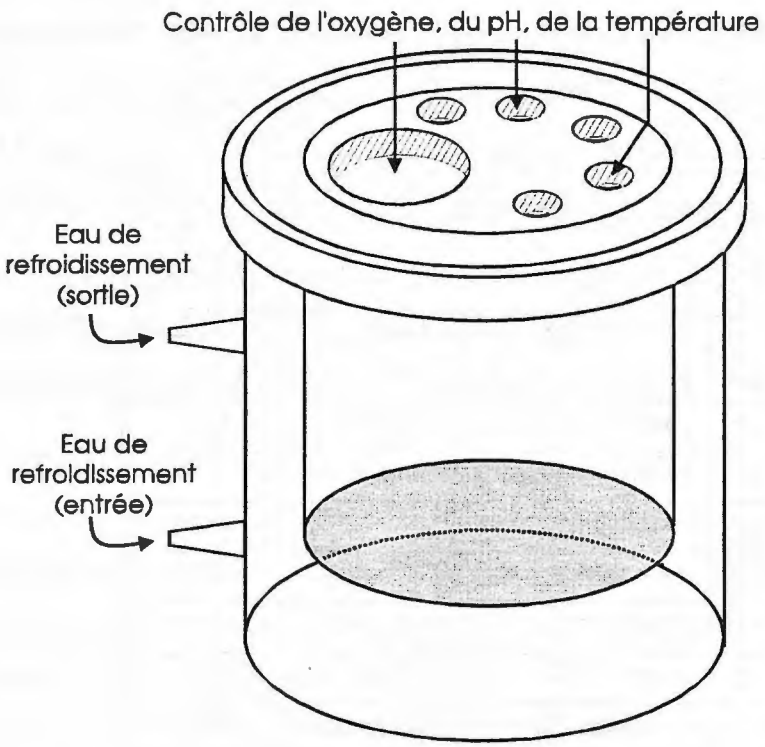


Figure 3.13: Réacteur de synthèse: Le passage d'un liquide de refroidissement au travers de l'espace compris dans le double manteau formé par les deux béchers en polycarbonate maintenus ensemble par un couvercle en plexiglas, permet de contrôler la température de la solution. Les différents accès laissés dans le couvercle permettent d'y loger une panoplie d'électrodes, contrôlant le pH, la température et la concentration en oxygène. D'autres accès permettent l'ajout en début de synthèse de Fe^{2+}, de prélever en cours de synthèse et à l'aide d'une pompe péristaltique quelques millilitres de solution afin de mesurer par absorbance avec la ferrozine la concentration résiduelle de Fe^{2+}.

Le réacteur ainsi construit permet d'autre part d'y loger, lorsque besoin est, des plaquettes de Teflon™ comme nous le verrons au ch. 3.4. La synthèse se déroule en trois étapes:

- Dans un premier temps, les solutions contenant l'électrolyte $Ca(HCO_3)_2$ 1,5mM sont dégazées jusqu'à $[O_2] < 0,1$ ppm. Des ajouts de CO_2 sont effectués afin de maintenir le pH près de 7.
- A un pH proche de 6,7 le Fe^{2+} est ajouté à la solution dégazée, un flux de N_2 est maintenu afin de conserver les conditions anoxiques.
- Après quelques heures, le pH est laissé à des valeurs proche de 7-7,5 et $[O_2]$ est augmentée. La diminution du Fe^{2+} est suivie par colorimétrie (*Stookey, 1970*), jusqu'à sa disparition totale.

Afin de limiter les paramètres variés et d'obtenir des solutions finales ayant des concentrations en fer proche de celles trouvées en milieu naturel, $[Fe^{2+}]$ a été fixée à 10^{-5} M pour toutes les synthèses. L'adjonction de phosphates a été effectuée sur le même principe avec une concentration également constante de 5 µM pour toutes les synthèses, sauf avec la synthèse n°8 où $[PO_4^{3-}]$ a été volontairement fixée à 1,25 µM. Généralement deux types de matière organique fibrillaire ont été utilisés dans des concentrations diverses, sans que la nature du polymère semble affecter la morphologie des oxydes de fer. Ainsi le xanthane et l'alginate de sodium, déjà décrits dans le chapitre 3.2, ont été choisis. Tout au long de nos expériences, une attention particulière a été prêtée au pH, puisque celui-ci contrôle la cinétique de l'oxydation du Fe^{2+} en Fe(III), (*Davison et DeVitre, 1992; Pizarro-Konzak, 1993*). Sa valeur a donc été maintenue entre 6,7 et 7,8 pour toutes les synthèses selon la procédure décrite ci-dessus. Les conditions de chaque synthèse sont données dans la table ci-après:

Table 3. 3 Conditions de synthèses pour les oxydes de fer amorphes

Synthèse:	$[Fe^{2+}]_{t=0}$	[Polysaccharides]:	$[PO_4^{3-}]_{t=0}$	$t_{Fe^{2+}=0}$
1	10^{-5} M	xanthane 1 ppm	5 µM	18 h
2	10^{-5} M	xanthane 1 ppm	5 µM	17 h
3	10^{-5} M	xanthane 1 ppm	5 µM	19 h
4	10^{-5} M	xanthane 1 ppm	5 µM	18 h
5	10^{-5} M	xanthane 1 ppm	5 µM	46 h
6	10^{-5} M	xanthane ~50 ppm	5 µM	10 h
7	10^{-5} M	xanthane 25ppm	5 µM	15 h
8	10^{-5} M	xanthane 50 ppm	1,25 µM	17 h

Table 3. 3 Conditions de synthèses pour les oxydes de fer amorphes

Synthèse:	$[Fe^{2+}]_{t=0}$	[Polysaccharides]:	$[PO_4^{3-}]_{t=0}$	$t_{Fe^{2+}=0}$
9	10^{-5} M	alginates 50 ppm	5 µM	6 h
10	10^{-5} M	alginates 50 ppm	5 µM	18 h

Les courbes de suivi des différentes conditions de synthèses sont données dans l'annexe 3.

3.3.2 Association avec la matière organique

Les caractérisations de chaque synthèse sont données dans la table 3.4.

Table 3. 4 Caractérisations des synthèses de fer amorphes

Synthèse:	$[Fe]_{part,tfin}$	Rapport $[P/Fe]_{part}$:	Piégeage du P:
1	2,3 µM	P/Fe=38% +/- 15,4 (EDS; n=8)	non mesuré
2	6,9 µM	P/Fe=50,2% +/- 8 (EDS; n=17)	60%
3	non mesuré	P/Fe=42,6% +/- 3,8 (EDS; n=8)	non mesuré
4	5,5 µM	P/Fe=41%; standard EDS, voir ch. 3.3.3	48%
5	7,6 µM	P/Fe=34%; standard EDS, voir ch. 3.3.3	57%
6	3,1 µM	P/Fe=35-50%; colorimétrie	16-20%
7	4,7 µM	P/Fe=50%; standard EDS, voir ch. 3.3.3	43%
8	1,7 µM	P/Fe=17%; standard EDS, voir ch. 3.3.3	20%
9	0,7 µM	non mesuré	non mesuré
10	1,15 µM	non mesuré	non mesuré

Pour chacune de ces synthèses, le rapport entre $[Fe]_{part}$ et $[PO_4^{3-}]_{part}$ a été mesuré soit par des mesures chimiques (PO_4^{3-} par colorimétrie et Fe par ICP; pour les standards EDS), soit par EDS directement. En connaissant la concentration de P piégée dans la phase particulaire, il a été possible de déterminer la proportion de phosphates piégée par les particules de fer. Les morphologies typiquement obtenues dans ces synthèses sont données dans la figure 3.14.

L'effet de la concentration de la matière organique fibrillaire au sein des solutions de synthèse est clairement observé sur ces trois images. Avec une concentration faible de matière organique (synthèse 4; figure 3.14a), les particules sont des sphères de 50 à 70 nm de diamètre, regroupées sur des fibrilles plus ou moins réparties dans l'espace. Lorsque cette concentration augmente, la forme en sphérules disparaît au profit d'un aspect plus floconneux et en feuillet (synthèse 6; figure 3.14b). Avec 50 ppm de matière organique, ce qui s'avère être une concentration très élevée pour les milieux lacustres, mais qui est observée

dans certains systèmes de sols (*Atteia et al., 1997*), la forme en feuillet est la seule qui soit représentée (figure 3.14c). Même si la teneur en fibrilles est très élevée, le rapport de concentration entre fer et carbone est similaire à ce que l'on peut trouver dans certains systèmes lacustres (cf. ch. 5.6).

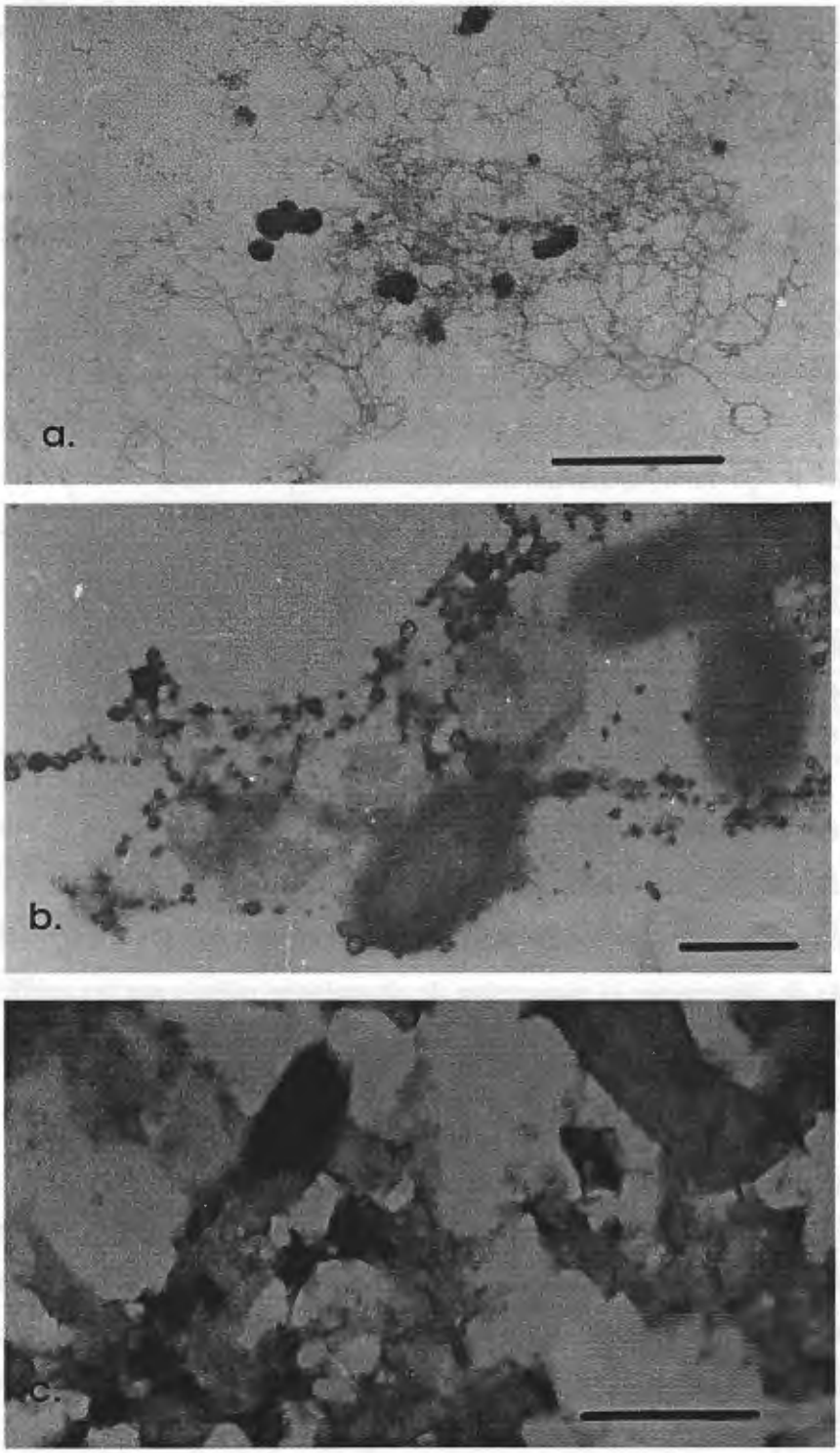


Figure 3.14: Effet de la concentration de la matière organique sur les synthèses de fer amorphe; avec 1 ppm de xanthane (a), ~50 ppm de xanthane (b) et 50 ppm d'alginates de sodium (c).
Barres : 500 nm

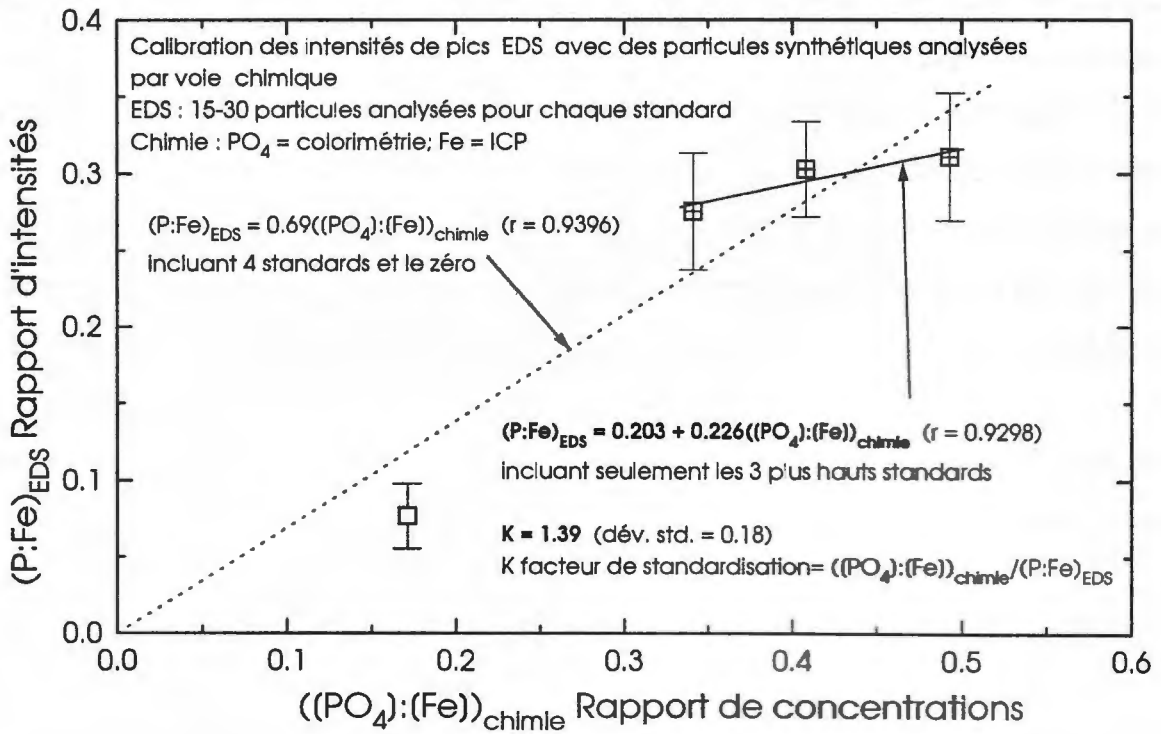
L'importance de la matière organique sur la morphologie des entités formées peut également être observée en se basant sur des mesures physiques. Ainsi par centrifugation, il est possible de séparer les phases particulaires des espèces dissoutes. La densité et la taille de la particule sont les deux facteurs qui permettent sa séparation. Dans notre cas, après la fin de la synthèse, chaque solution a été centrifugée à 20000 tours/minutes pendant une heure (67000 g) et le surnageant a été récupéré précautioneusement, puis analysé. Le matériel particulaire tel qui serait défini par ces conditions de centrifugation ($[Fe]_{suspension}$ - $[Fe]_{surnageant}$) passe de 16% (+/- 3,4%) pour [xanthane] = 25 à 50 ppm, contre 76% (+/- 5,4%) pour [xanthane] = 1 ppm. Cette observation est extrêmement intéressante puisqu'elle renseigne sur les conditions de sédimentation qui seront observées pour ces différents types de particules dans les milieux naturels. Ainsi les entités similaires à celle de la figure 3.14c, formées en présence de concentration élevée de matière organique, sont moins facilement entraînées au fond du tube de centrifugation, ou dans le cas de système naturel, vers les sédiments.

Un autre effet moins marqué qui semble être régi par la concentration des fibrilles en suspension est le piégeage des phosphates par les entités particulaires formées. En effet, la concentration de phosphates piégés diminue de plus de 60 % lorsque la concentration en matière organique est importante. Bien qu'un nombre plus élevé de synthèses soit nécessaire pour affirmer qu'un tel phénomène soit observé, ceci pourrait être expliqué par le changement de morphologie observé lorsque de grandes quantités de matière organique sont présentes. Ceci est d'autant plus probable qu'une majorité des particules contenant phosphates et fer dans les milieux naturels ont une morphologie sphérique (*Fortin et al., 1993, Pizarro-Konzak, 1993, Buffle et al., 1989; Tipping et al., 1989*), similaire à celle que nous avons lorsque de faibles ajouts de matière organique (1 ppm) sont présents en solution. A l'opposé, cette morphologie est perdue en présence de fortes concentrations en matière organique fibrillaire.

3.3.3 Caractérisations par spectroscopie EDS

Le rapport P:Fe au sein des particules s'est avéré constant et homogène lors d'une même synthèse. Ceci nous a permis d'utiliser les entités particulaires obtenues comme standard de calibration EDS pour la mesure du rapport P:Fe dans les particules de fer amorphe du lac de Lugano. Chaque rapport a été établi au préalable par la voie chimique en mesurant les concentrations de phosphates et de fer dans les phases particulaires isolées par ultra-centrifugation. Ces colloïdes modèles ont donc été visualisés et les particules produites lors des synthèses 4, 5, 7 et 8 se sont imposées comme standard en fonction des dosages colorimétriques du rapport P:Fe. Leur caractérisation par microscopie électronique a été effectuée au moyen d'une sonde EDS. La calibration a été effectuée en analysant 30 particules pour chaque standard et en intégrant les signaux EDS du Fe et du P. La corrélation entre les mesures EDS effectuées sur les particules individuelles et les mesures obtenues par voie chimique est reportée sur la figure 3.15. Cette corélation nous permet d'en tirer un facteur de standardisation K pour le rapport entre P et Fe, qui est caractéristique de la morphologie des particules analysées, du microscope utilisé et de sa configuration.

Figure 3.15: Corrélation entre le rapport molaire P/Fe (obtenu par la chimie) et le rapport de signaux EDS.



3.4 Récupération *in situ* de phases particulaires sur supports Teflon™

Les méthodes classiques de spéciation des particules dans les milieux naturels sont essentiellement basées sur les différences de taille (*Staub, 1983; Ledin, 1993*; *Perret et al., 1994*). Certaines procédures (adsorption sur résine, chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse) permettent de séparer des composés non-dissous selon des critères chimiques en utilisant la réactivité des groupements chimiques présents en surface de l'entité étudiée. Mais ces techniques sont susceptibles de modifier la morphologie des particules et sont donc difficilement transposables à la microscopie électronique.

Parmi les différentes procédures décrites dans la littérature, une méthode mise au point par *Belzile et al. (1989)* a permis de collecter des particules de fer et de manganèse fraîchement formées dans les premières couches de sédiments lacustres à la surface de plaques de Teflon™. Cette technique, basée sur la capacité à s'adsorber de certaines phases chimiques, nous a paru digne d'être transposée à la colonne d'eau des lacs méromictiques; cependant nous avons voulu préalablement cerner les différents facteurs qui influencent la déposition de matériel fraîchement formé et donc réactif, sur des plaquettes de Teflon™.

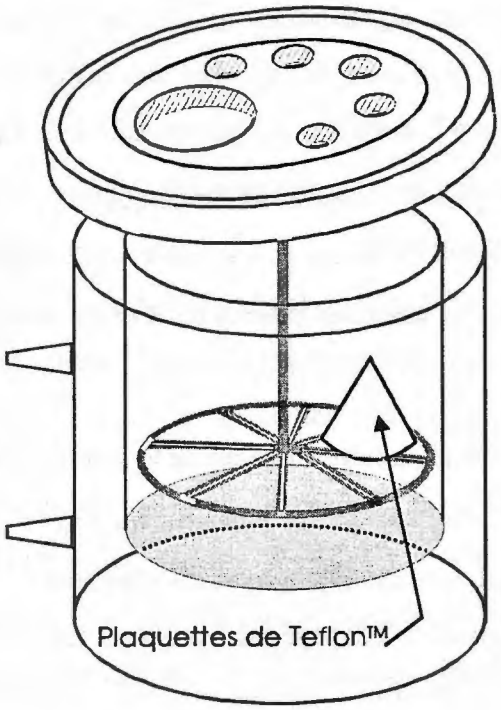


Figure 3.16: Insertion des plaquettes de Teflon™ dans le réacteur de synthèse.

Pour cela plusieurs synthèses ont été effectuées en laboratoire, dans des conditions semblables à celles décrites dans le ch.3.3 et en ajoutant verticalement dans le réacteur des plaquettes de Teflon™, selon le schéma 3.16. L'insertion verticale permet d'éviter la collecte des particules en cours de sédimentation. Deux types de plaquettes ont été testés:

- Le premier type est issu du découpage en lamelles (7,5 x 1,5 cm x 2 mm) de plaques de Teflon™ moulées par protrusion.
- Le second type provient du découpage au tour d'un cylindre de Teflon™. Le principal avantage de cette préparation réside dans la formation d'un microsillon à la surface de la plaquette, ce qui augmente en conséquence la superficie disponible pour la déposition de matériel particulaire. Un seul type de ces plaquettes a été utilisé dans les différentes expériences, bien que différentes versions puissent être produites en fonction de la vitesse de la découpe et donc de l'espacement entre chaque sillon.

Les différentes synthèses ont eu pour but de répondre aux interrogations suivantes:

-Y a-t-il déposition dans le cas de suspensions lacustres ou synthétiques?

-Quelle est la période nécessaire pour que du matériel particulaire soit déposé sur les plaques de Teflon™ et puisse y être analysé?

-La matière organique sous la forme de fibrilles de polysaccharides joue-t-elle un rôle dans l'adsorption sur les plaquettes de Teflon™?

-L'aspect de la surface a-t-il un effet sur l'adsorption de matériel sur la plaquette?

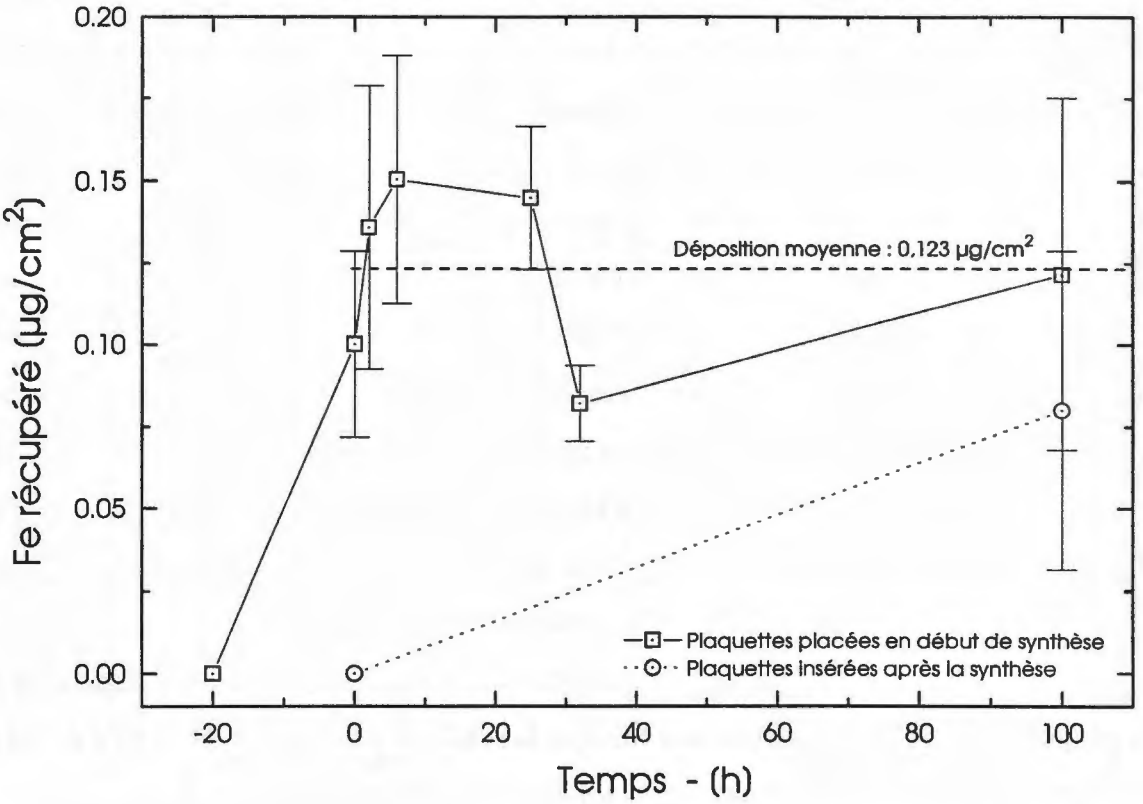
Une série de tests en laboratoire a permis de répondre à une partie des questions précédentes, alors que l'utilisation de cette approche dans le milieu naturel a permis de conclure cette mise au point et de confirmer les observations faites en laboratoires. Les résultats obtenus sur le terrain seront discutés aux ch. 4.9 (Lac de Lugano) et 5.7 (Lac Paul).

3.4.1 Plaquettes Teflon™: Approche chimique

Les tests effectués en laboratoires ont été entrepris avec une série de plaquettes obtenues par découpe au tour. La plaquette initiale de 9 cm de diamètre a été découpée en douze morceaux égaux (surface de 10,6 cm^2) pouvant être aisément insérés dans le réacteur (voir figure 3.16).

Afin de savoir si l'introduction des plaquettes devait se faire au début de la synthèse, avant l'ajout de Fe^{2+} en milieu anoxique, ou après la formation des particules d'oxyde de fer alors que la totalité du Fe^{2+} a disparu, 4 synthèses ont été effectuées; les plaquettes ont été extraites du réacteur en cours de synthèse et le matériel déposé a été analysé; les résultats moyens des 4 synthèses sont présentés dans la figure 3.17.

Figure 3.17: Evolution de la concentration de fer sur les plaquettes en cours de synthèse (2-5 plaquettes pour chaque point): Le temps t=0 correspond au moment où la synthèse est terminée et que la totalité du Fe^{2+} a disparu. Les plaquettes, à l'exception de quelques unes, sont présentes dans le réacteur depuis l'ajout du Fe^{2+} initial. La déposition moyenne est calculée pour les plaquettes insérées en début de synthèse.



Les résultats obtenus n'indiquent pas de tendance marquée en fonction du temps et semblent montrer que 80% de la matière particulaire finale adsorbée sur les plaquettes l'est déjà à t=0. En revanche, les plaquettes introduites dans la solution de synthèse après la disparition du Fe^{2+} montrent une adsorption un peu moins forte, puisque seulement 65% du matériel total observé sur les autres plaques (présentes depuis le début de la synthèse) est récupéré. En conclusion le choix du moment où la plaquette est introduite dans le système se révèle donc être moyennement important. Il a cependant été décidé d'insérer systématiquement les plaquettes au début de chaque synthèse pour les autres essais.

Aucune tendance n'est d'autre part dégagée en ce qui concerne le temps nécessaire pour que la plaquette adsorbe les entités de fer. Après 100 heures, la quantité récoltée sur les plaquettes est sensiblement la même que lorsque les plaquettes sont retirées après quelques heures. Ces deux observations tendent à montrer que l'adsorption du matériel

particulaire fraîchement formé est rapide et que 24 heures de contact Teflon™/suspension est une durée suffisante pour obtenir une adsorption significative sur le Teflon™.

La présence de matière organique durant les synthèses semble avoir une influence négligeable sur la déposition sur Teflon™ lorsque les plaques sont insérées pendant la synthèse. En effet aucune variation significative n'est notée entre les particules formées en présence de fibres de xanthane et en leur absence, même avec des proportions de matière organique assez importantes (50 ppm). Cette observation est intéressante puisque l'on devrait s'attendre à des interactions hydrophobes entre matière organique et surface de Teflon™, conduisant à un taux de récupération plus élevé en présence de xanthane. Une subtile différence est cependant observée avec les plaquettes insérées dans la solution après la synthèse. En effet, dans ce cas, le taux de récupération des particules semble plus efficace (65%) avec les synthèses contenant beaucoup de matière organique (50 ppm), qu'en présence de 1 ppm de xanthane (taux de récupération = 50%). Il est donc probable que la matière organique influence partiellement le taux de récupération des particules sur les plaquettes de Teflon™, surtout une fois que la synthèse est terminée, et que l'équilibre entre phases particulaires adsorbées et en solution n'est pas atteint.

3.4.2 Plaquettes Teflon™: Approche microscopique

Afin de caractériser par voies chimique et microscopique le matériel particulaire échantillonné *in situ*, il a été procédé à l'insertion de plaquettes Teflon™ supportant des grilles de microscopie électronique dans la colonne d'eau des lacs de Lugano (mise au point de l'approche combinée entre analyses conventionelles sur Teflon™ et analyses microscopiques sur grille TEM; ch. 4.9) et Paul (utilisation de l'approche combinée, ch. 5.7).

3.4.3 Effet de la surface des plaquettes de Teflon™ :

Afin de comprendre les différences de comportement des deux types de plaques de Teflon™, nous avons eu recours à la microscopie électronique à balayage. Les images présentées dans la figure 3.18 montrent des rugosités fondamentalement différentes entre les deux types de plaquettes.

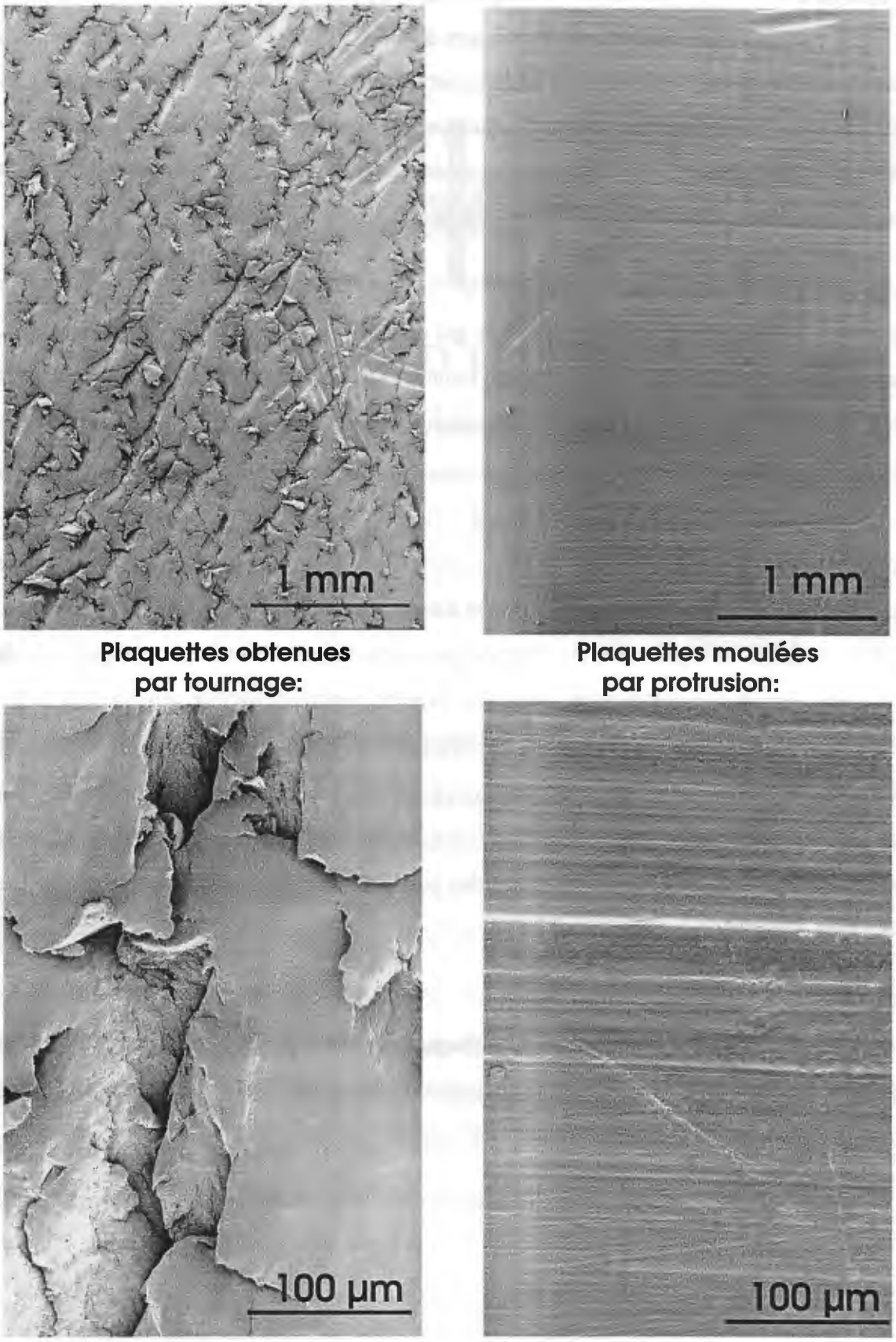
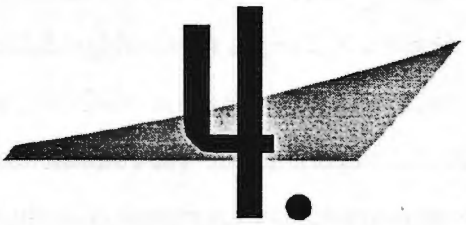


Figure 3.18: Surface des deux types de plaquettes visualisée par microscopie à balayage.

La préparation des plaquettes par découpe au tour a pour effet de multiplier la surface disponible pour les adsorptions, mais également de créer des logettes où du matériel particulaire peut être retenu. En revanche les plaquettes obtenues par protrusion présentent une surface quasi lisse. Pour déterminer l'influence de l'aspect de surface sur la déposition des particules, plusieurs synthèses ont été effectuées avec les deux types de plaquettes et nous avons mesuré la quantité de matière récupérée dans chacun des cas.

Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'adsorption des particules sur les plaquettes obtenues par découpe au tour est de 0,05 à 0,2 $\mu g/cm^2$ (n=34 mesures). La même mesure effectuée sur les plaquettes moulées par protrusion donne une adsorption de 0,003 à 0,052 $\mu g/cm^2$. On voit donc clairement par cette comparaison que la surface du Teflon™ a une grande influence sur le processus d'adsorption. Les valeurs de récupération de matériel obtenues dans le cas des deux surfaces sont beaucoup plus basses que celles données dans *Belzile et al. (1989)*; 3,6 +/- 0,3 $\mu g/cm^2$, qui a été obtenue en immergeant des plaquettes obtenue par protrusion dans une solution de fer (II) 0,1 M tamponée à pH=6 +/- 0,3 (*N. Belzile, communication personnelle*). Cette forte concentration de fer n'est pas l'unique explication puisque nos valeurs restent beaucoup plus faibles que la valeur de 1 $\mu g/cm^2$ (*Fortin et al., 1993*), trouvée lors de l'exposition des plaques de Teflon™ dans les sédiments (concentration en fer amorphe dans le sédiment non communiquée). Nos résultats, obtenus avec des solutions chimiquement proches des milieux lacustres, impliquent que la récupération des particules fraîchement formées dans les lacs s'avérera beaucoup plus faible que lors des expériences initiales les utilisant dans les sédiments.

Une comparaison entre les deux types de plaquettes dans le milieu naturel a également été effectuée en installant deux lignes de plaquettes (protrusion, découpe au tour) dans la colonne d'eau du lac Paul. Les résultats obtenus seront discutés dans le chapitre 5.7.



PREMIER CAS D'ÉTUDE: LE LAC DE LUGANO

4.1 Problématique des phosphates dans le lac de Lugano 62
4.2 Contexte de l'étude 62
4.3 Le lac de Lugano 64
4.4 Echantillonage 67
4.5 Caractérisation physico-chimique du lac 72
4.6 Résultats des analyses chimiques 76
4.7 Résultats obtenus par microscopie électronique 91
4.8 Interprétations des résultats (comparaison chimie-TEM) 109
4.9 Utilisation des plaquettes de Teflon™ 119
4.10 Rappel des résultats et lien avec le réel 123

4.1 Problématique des phosphates dans le lac de Lugano

Les études limnologiques effectuées en 1929 par *Monti* sur le lac de Lugano, ainsi que les profils de pigments algals *(Guilizzoni et al., 1983)* montrent clairement que ce lac était encore oligotrophe au début de notre siècle. Sa rapide dégradation dans les années 40 et 50 est remarquée par une décroissance des prises de pêches. Les années 60 n'apportent aucune amélioration, avec un essor économique qui entraîne une augmentation de la pollution industrielle, artisanale et domestique. La complexité du système hydrodynamique du lac de Lugano, couplée à une forte augmentation de la population (70%) dans la deuxième moitié de ce siècle (*Span et al., 1993*) le conduit à une eutrophisation avancée. En 1965, *Vollenweider* révèle une décroissance de la concentration en nitrates au profit de l'ammonium. Les eaux usées ne seront traitées qu'à partir de 1976 avec la mise en service de la station d'épuration de Bioggio, qui envoie ses rejets dans la rivière Veddegio, puis de celle de Mendrisio en 1977. L'eutrophisation due aux phosphates réduit non seulement la couche oxygénée dans laquelle la vie de la faune piscicole est possible, mais modifie également les espèces présentes. L'évolution du plancton se modifie, avec des remplacements d'espèces (*Polli et Simona, 1992*) et on observe le développement des tanches et des carpes au dépend des truites. En 1990, sur 200'000 équivalents-habitants présents sur les berges du bassin nord, 140'000 sont traités par la station de Bioggo, mais un équivalent de 60'000 s'y déverse encore, dont 83% ne sont toujours pas du tout traités (*Barbieri et Polli, 1992*).

4.2 Contexte de l'étude

Cette étude s'inscrit dans une lignée de recherches lancée par l'Institut F.-A. Forel (Versoix, Suisse) depuis huit ans. Le début des campagnes entreprises sur le lac de Lugano a eu pour cadre le sédiment et son importance dans le cycle du phosphore (*Span et al., 1992a et b; 1993*), alors que la suite des études menées a concerné la dynamique des particules au sein de la masse d'eau (*Hofmann, 1996*).

Le but de notre étude concerne la mesure des flux de phosphore au sein du lac de Lugano et la mise en évidence de l'influence des cycles du fer et du manganèse sur la spéciation du phosphore.

Afin de mener à bien pareilles tâches, il est important d'étudier le milieu naturel considéré à l'aide de plusieurs méthodes analytiques. C'est dans cette optique que cette étude est le fruit d'une mise en commun de moyens divers entre l'Institut F.-A. Forel et l'Université de Lausanne. En général les analyses chimiques de cette étude ont été entreprises à Versoix et à Lausanne, alors que les analyses microscopiques sont uniquement issues de nos laboratoires. Les principaux résultats obtenus par les deux groupes seront présentés dans ce chapitre.

4.2.1 Instrumentation

Les microscopes électroniques utilisés pour cette étude ont été décrits au ch.3.1. Les analyses chimiques de l'Institut Forel et de l'Université de Lausanne ont été effectuées avec les instruments suivants:

A l'Institut F.-A. Forel:

- Les analyses élémentaires ont été effectuées à l'aide d'un ICP-OES-MS Thermo-Jarrel Ash POEMS en mode optique; une partie des mesures a également été effectuée sur un GFAAS (four graphite) Perkin Elmer 5100 PC avec correction Zeeman du bruit de fond, muni d'un passeur d'échantillons AS-60 et d'une tête de four HGA-60.
- Les analyses par spectrophotométrie moléculaire ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Spectronic 1201 Milton-Roy, muni d'une cellule de 4 cm. Sur le terrain, un modèle Merck Mobilanalitic a été utilisé avec des cellules de 5 cm.

A l'Université de Lausanne:

- Les analyses élémentaires ont été effectuées sur un ICP-AES Perkin Elmer Plasma 1000. Cet appareil est piloté par le logiciel Plasma 1000/2000 v.1.10 installé sur un ordinateur IBM PS/2 fonctionnant sous xenix.
- Les analyses colorimétriques ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre de terrain Hach DR/2000, muni de cellules en verre de 10 et 25 ml (chemins optiques de 1,1 et 2,3 cm respectivement).
- Les analyses de carbone organique total ont été obtenues avec un analyseur de carbone Shimadzu TOC-5000 (oxydation catalytique à haute température) équipé d'un passeur d'échantillon ASI-5000.

- Les mesures de turbidité ont été effectuées avec le turbidimètre Hach 2100N dans des cellules de 30 ml.

Afin que la préparation des spécimens de microscopie électronique se fasse dans les délais les plus brefs, nous avons également utilisé une ultracentrifugeuse Beckman L7 (propriété de l'Istituto Cantonale Batteriosierologico, Lugano, Prof. R. Peduzzi), munie d'un rotor swing-out Kontron TST-28.38 (propriété de l'Institut de Chimie Thérapeutique, Université de Lausanne, Prof. B. Testa).

4.3 Le lac de Lugano

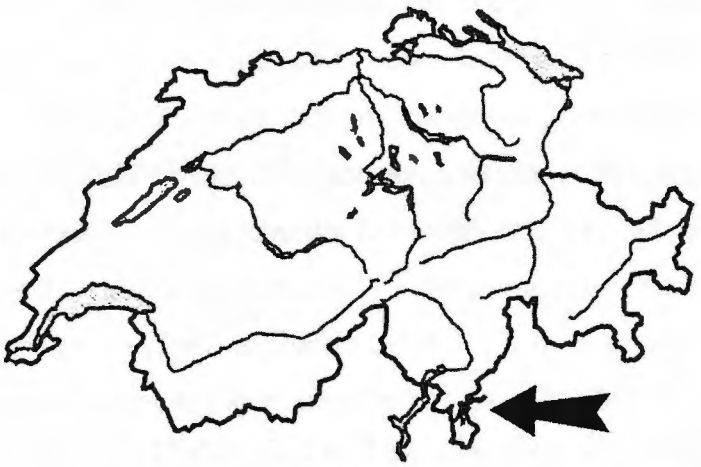


Figure 4.1: Situation géographique du lac de Lugano, situé sur le versant sud de la chaîne des Alpes.

Le lac de Lugano est situé sur le versant sud des Alpes dans la partie méridionale du Tessin (Figure 4.1) et sur la frontière entre la Suisse et la région lombarde (Italie).

Le lac de Lugano est subdivisé en trois bassins :

- Le bassin de Ponte Tresa, le plus petit, est situé comme un dernier appendice sur le chemin de l'eau puisque toutes les eaux du lac de Lugano s'écoulent par la rivière Tresa, seul exutoire de ce système complexe.
- Le bassin sud, séparé du nord par la digue de Melide, est le deuxième en importance. La rivière Vedeggio y conduit les effluents de la station d'épuration de Lugano depuis 1976.
- Le bassin nord, plus communément appelé bassin de Gandria, est le plus profond et accueille la ville de Lugano. Les eaux usées de Lugano se déversent cependant, par les caprices de l'homme, dans le bassin sud par l'intermédiaire de la rivière Vedeggio.

- Les principales caractéristiques du lac sont regroupées dans la table 4.1:

Table 4. 1: Principales caractéristiques du bassin nord du lac de Lugano

Bassin:	Profondeur maximale:	Profondeur moyenne:	Surface:	Volume:	Concentration en P moyenne	Temps de résidence:
Ponte Tresa	50 m		1,1 km^2	0,03 km^3		15 jours
Sud	95 m	55 m	20,3 km^2	1,14 km^3	89 µg/l	1,4 ans
Nord	288 m	171 m	27,5 km^2	4,7 km^3	150 µg/l	12,3 ans

Au lac de Lugano est associé un bassin versant de 614,5 km^2, drainant toute une zone de moyenne montagne dont l'altitude maximale culmine à 2116 m. Son altitude de 270,5 m lui permet d'avoir son fond situé sous le niveau de la mer dans la zone proche de Gandria. La digue qui sépare les bassins nord et sud a d'abord été construite sur la moraine de Melide en 1847, puis agrandie en 1874 pour le passage du train, puis de l'autoroute en 1970 (*Monnerat, 1995*).

Le lac de Lugano, ses trois bassins confondus, est compris entre 45°54'N et 46°02'N et entre 8°51'E et 9°07'E. Sa morphologie est indiquée sur la figure 4.2:

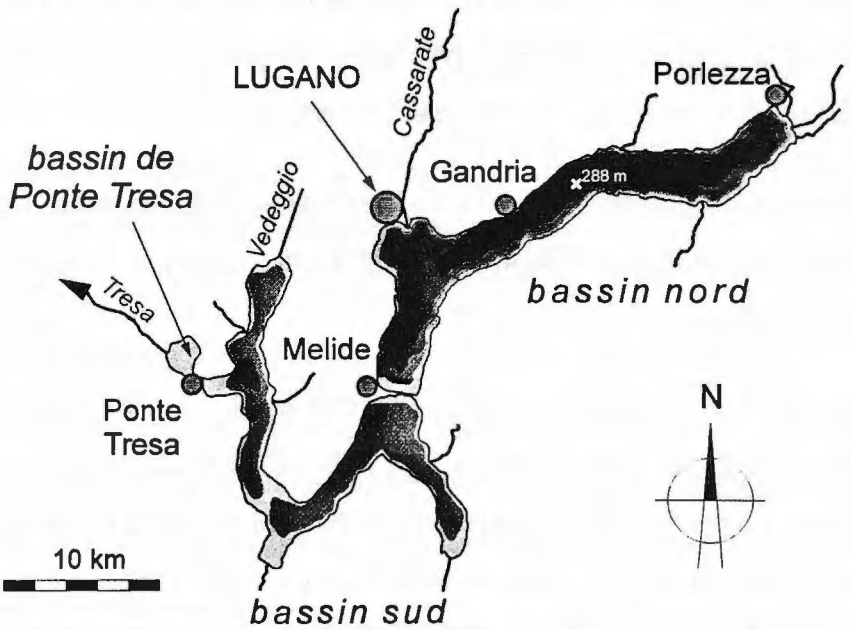


Figure 4.2: Aperçu des trois bassins du lac de Lugano, de ses principaux affluents et de son seul effluent.

Mes prédecesseurs et collègues que sont Annette Hofmann et Marc Monnerat ont effectué une thèse et un travail de diplôme respectivement qui se sont avérés de précieuses sources de renseignements pour la rédaction de ce chapitre.

4.3.1 Caractéristiques générales du bassin nord

Le bassin nord, alimenté principalement par les rivières Cassarate et Cuccio, est constamment méromictique (*Barbieri et Mosello, 1992*) avec une transition oxique/anoxique proche de 80 mètres. L'aire de son bassin versant est de 269,7 km^2 (*Barbieri et Polli, 1992*) et la surface des sédiments est de 270 km^2.

Géologiquement, le lac de Lugano repose dans une vallée résultant de l'érosion d'un canyon tertiaire, modifié par les glaciations alpines du Pléistocène. Le bassin nord se divise essentiellement en deux parties distinctes:

- La partie nord repose sur des sédiments sudalpins calcaires, riches en carbonates capables de tamponner les eaux du lac.
- La partie plus au sud repose sur des bandes de gypse, dolomie et porphyrite.

Le delta de Lugano se distingue par des avancées d'alluvions qui l'encerclent.

Son bassin versant est essentiellement cristallin au nord (bassins de la Cassarate et du Cuccio) et constitué de gneiss et schistes, avec une faible participation de roches sédimentaires carbonatées. Au sud, les roches sont essentiellement calcaires.

Une étude très détaillée (*Monnerat, 1995*) du bassin versant du lac et des sédiments, tant au niveau de la géochimie que de la minéralogie, a été menée par l'Institut F.-A. Forel avant le début de cette étude.

Une des caractéristiques importantes du bassin nord du lac de Lugano est sa seiche interne (*Salvadè et al., 1992*), se croisant avec la zone redox, avec une envergure allant jusqu'à plus de 10 mètres. La morphologie allongée et étroite de la vallée du bassin nord du lac de Lugano accroît l'effet du vent sur les eaux de surface. Le déplacement de ces eaux conduit à un réarrangement des couches plus profondes, qui se transforme en une oscillation observée le long du bassin. La difficulté liée à ce phénomène est le déplacement de la zone d'intérêt au cours du temps, non seulement durant la saison, comme on peut l'observer par l'évolution des pics de fer et de manganèse (Figure 4.3), mais également le long d'une journée de prélèvement. Cette seiche a pour effet non seulement de varier la profondeur à laquelle les espèces d'intérêt se trouvent, mais également de le faire de façon non propor-

tionelle en compressant ou dilatant certaines couches d'eau (voir les variations durant les mois d'avril et juin dans la figure 4.3).

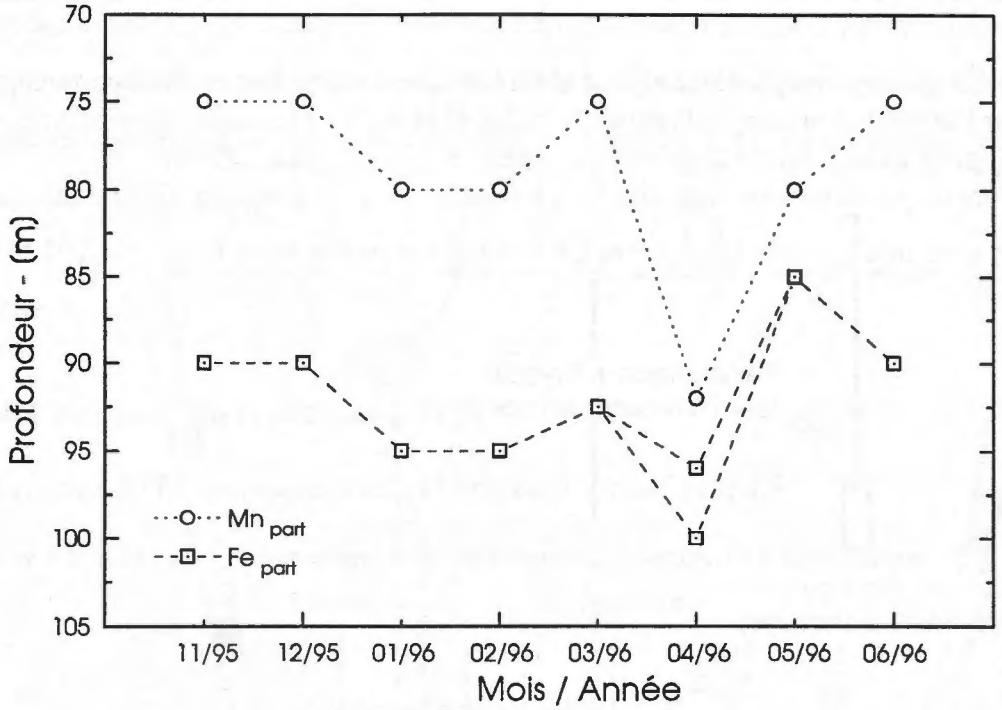


Figure 4.3: Evolution saisonnière des pics de Fe et de Mn particulaires dans le lac de Lugano

Dans la suite de ce travail, il ne sera pas fait mention de ces différences, mais il est important de noter que pour les mesures de flux au cours de la saison, une correction a été appliquée afin de limiter les effets de ces mouvements.

4.4 Echantillonnage

L'échantillonnage s'est effectué entre les mois d'octobre 1995 et de juin 1996. La fréquence des campagnes a été d'une fois par mois en début de chaque mois. Les profondeurs habituellement échantillonnées se situent entre 60 et 130 mètres pour inclure les pics de fer et de manganèse particulaire.

La stratégie de prélèvements est résumée dans la figure 4.4. L'idée développée dans ce schéma se résume à une "approche chimique classique", couplée à une étude de microscopie électronique.

- L'approche "chimique classique" a déjà été passablement utilisée dans la littérature (*Viollier et al., 1995; Taillefert et al., 1996; Koenings et Hooper, 1976*) et est basée sur la mesure des espèces dissoutes et particulaires présentes au sein de la masse d'eau.
- L'approche en microscopie électronique s'adresse directement aux espèces particulaires par l'observation morphologique de celles-ci et par leur caractérisation élémentaire (*Tipping et al., 1989; Buffle et al., 1989; Leppard et al., 1988*).

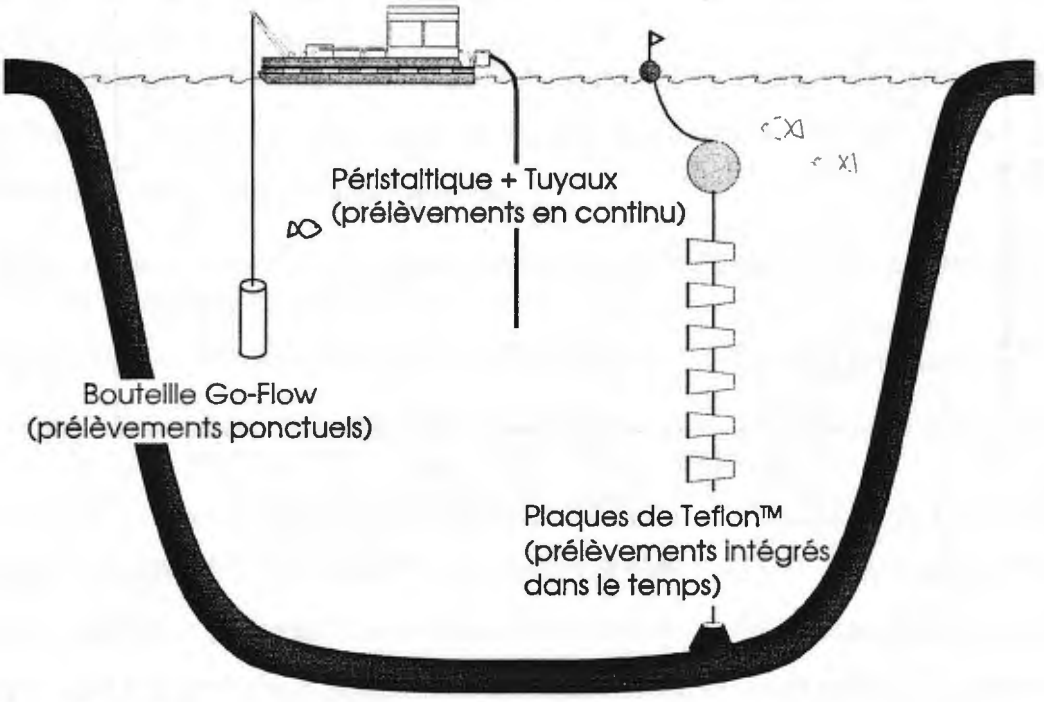


Figure 4.4: Stratégie de prélèvements dans le lac de Lugano

Une approche alternative basée sur le dépôt des espèces particulaires réactives a été envisagée en insérant verticalement des plaquettes de Teflon™ pour des délais de un à deux mois au sein de la colonne d'eau. Ces essais sont basés sur les résultats obtenus en laboratoire et décrits dans le chapitre 3.4.

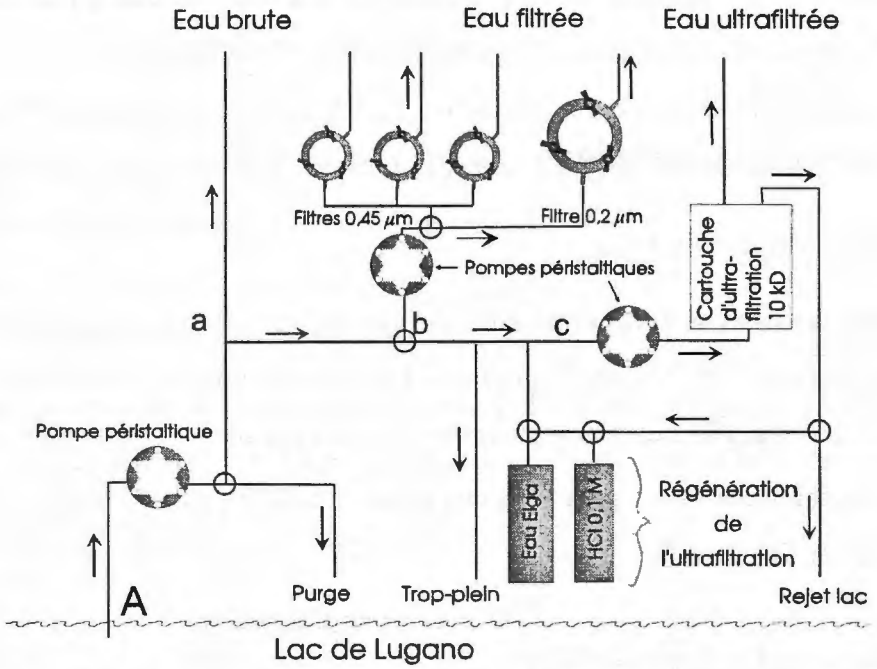
Les prélèvements d'eau ont été effectués à bord du bateau Sun Tracker 24 DL de la Fondation pour le Patrimoine Lacustre, loué par l'Institut F.-A. Forel. L'eau a été prélevée au moyen d'une pompe péristaltique (Watson Marlow 701 S/R) reliée à un tuyau immergé et connecté à une sonde Züllig Hydropolytester-D pour le contrôle des conditions de pH, O_2, température, turbidité et surtout de la profondeur. Pour la microscopie électronique, les échantillons d'eau ont été prélevés à l'aide de bouteilles Go-Flow ou de plaquettes Teflon™.

Avant chaque journée de prélèvements, nous avons enregistré au moyen de la sonde Züllig un profil de turbidité/température/oxygène/pH entre 0 et 150 m afin de connaître la position des espèces particulaires. Le détail des appareils de mesure couplés sur cette sonde est amplement décrit dans *Hofmann (1996)*. Puis le tuyau de prélèvement a été accouplé à la sonde et descendu à la profondeur maximale de prélèvement. Avant chaque prélèvement, le système tuyau-pompe a été purgé durant 4 à 10 minutes (volume du tuyau variable entre 10 et 30 litres, débit de la pompe entre 3,4 et 4,2 litres/minute) avec l'eau de la profondeur d'intérêt.

4.4.1 Schéma de fractionnement

Le schéma de fractionnement adopté est décrit sur la figure 4.5 :

Figure 4.5: Schéma de fractionnement et de régénération de la cartouche d'ultrafiltration.



a) L'eau amenée par la pompe péristaltique, en A et sous conditions anoxiques, est prélevée à l'état brut dans des tubes pré-acidifiés. Ces prélèvements permettent de connaître la concentration totale des espèces en solution.

b) L'eau est ensuite dirigée vers les membranes de 0,2 µm en nitrate de cellulose (Schleicher et Schuell [S+S]). Avec cette porosité, seules les espèces colloïdales de taille inférieure à 200 nm peuvent être récupérées dans des tubes également pré-acidifiés.

c) L'eau brute est ultrafiltrée à 10 kD à l'aide d'une cartouche en polysulfone (Millipore), ce dernier fractionnement permet de mesurer les espèces dissoutes ou de taille inférieure à environ 2 nanomètres.

Le schéma de fractionnement permet d'obtenir les espèces suivantes:

- Espèces particulaires: [Eau brute] - [Eau filtrée sur 0,2 µm]
- Espèces colloïdales: [Eau filtrée sur 0,2 µm] - [Eau ultrafiltrée sur 10 kD]
- Espèces dissoutes: Eau ultrafiltrée sur 10 kD

La détermination des espèces particulaires a d'autre part été effectuée selon la procédure suivante: Après filtration d'un volume contrôlé d'eau brute sur membrane 0,45 µm en nitrate de cellulose (S+S), la membrane est récupérée et le matériel déposé est minéralisé ($H_2NOH{\cdot}HCl$ 0,1 M + HNO_3 3%, 24 h. à $T_{amb.}$); la solution obtenue permet le dosage de $Fe_{part.}$ et $Mn_{part.}$ (ICP). Pour la mesure des phosphates particulaires, une membrane est traitée de façon similaire, mais la solution de digestion est HCl 0,1 M étant donné que l'hydroxylamine perturbe l'analyse colorimétrique des phosphates. Cette approche permet de concentrer la masse particulaire de plusieurs litres d'eau (environ 2 l. dans notre cas) dans un volume restreint de solution de minéralisation (10 ou 20 ml).

4.4.2 Méthodologie analytique

Mesure du fer total (Fe_{tot})

Le dosage du fer total se fait par mesure de son émission atomique en ICP-AES aux longueurs d'onde de 238,204 et 259,940 nm. Les échantillons de la colonne d'eau sont acidifiés par HNO_3 à 3%. Les membranes de filtration qui ont récolté le matériel particulaire sont préalablement immergées dans une solution de $NH_2OH{\cdot}HCl$ 0,1 M et HNO_3 3%, avant mesure sur l'ICP-AES.

Mesure du fer ferreux (Fe(II))

Le Fe(II) est mesuré par colorimétrie à l'aide d'un spectrophotomètre de terrain par la méthode utilisant la ferrozine (10^{-2} M en solution aqueuse; *Stookey, 1970*). Après ajout d'un tampon pH=5,5 (CH_3COOH/CH_3COONa, 5M) l'absorbance du complexe Fe(II)-(ferrozine)$_3$ est mesurée à 562 nm après cinq minutes de réaction (ε^{562nm}: 2,5-3·10^{-4} l/mol·cm). Les échantillons récoltés sur le terrain sont acidifiés à pH=2 avec HCl lors du prélèvement pour stabiliser le Fe(II) en présence d'oxygène.

Mesure des phosphates (PO_4^{3-})

La détermination des ortho-phosphates est obtenue par dosage colorimétrique à l'aide du spectrophotomètre de terrain. La méthode (*APHA, 1976;* H_2SO_4 2,5M/ $K(SbO)C_4H_4O_6$ 70 mM/ $(NH_4)_6Mo_7O_{24}{\cdot}4H_2O$ 25 mM) repose sur la formation d'un complexe bleu mixte entre le molybdène et le phosphore, de structure inconnue. Son absorbance se mesure à 710 nm ($\varepsilon^{710\,nm}$: $1\text{-}2{\cdot}10^4$ l/mol·cm). Les échantillons prélevés sur le terrain sont acidifiés avec HCl à pH=2 pour être conservés avant analyse. Pour le matériel récolté sur les membranes de filtration, celle-ci sont préalablement immergées dans une solution de HCl 0,1 M ou 1M, et agitées pendant 16 heures environ, avant mesure par colorimétrie ou sur l'ICP-MS de l'Institut F.-A. Forel.

Mesure des sulfures (S(-II))

La mesure des sulfures se fait par colorimétrie à 665 nm après 10 minutes de réaction (ε^{665nm}: $2{\cdot}10^4$ l/mol·cm). Le sulfure d'hydrogène réagit avec le dichlorhydrate de N,N'-diméthyl-1,4-phénylènediamine. Le produit formé s'oxyde en présence de Fe(III) pour former du bleu de méthylène.

Mesure du manganèse total (Mn_{tot})

Le dosage du manganèse total se fait par mesure de l'émission atomique en ICP-AES à la longueur d'onde de 257,610 nm. La préparation des échantillons sur le terrain est similaire à celle employée pour le fer total.

Mesure du carbone organique total (COT)

La mesure du carbone organique total est effectuée à l'aide d'un analyseur de carbone fonctionnant par combustion à 680 °C sur un catalyseur de Pt. Le CO_2 dégagé par la combustion est mesuré par IR dans une cellule à double corps.

4.5 Caractérisation physico-chimique du lac

Le lac de Lugano subit comme tout système naturel le cycle des saisons, même si les eaux profondes sont constamment stratifiées au cours de l'année et ne subissent plus le retournement dû à l'homogénéisation de la densité de la masse d'eau. La composition des couches profondes varie du fait de la sédimentation et de la redissolution de particules biogéniques ou minérales provenant des couches supérieures. Deux séries de profils ont été mesurées lors de chaque campagne à l'aide de la sonde Züllig, l'une en début de journée et l'autre après les prélèvements. En parallèle, une bouée-station RadioBuoy 701 Profiler (Idronaut Sarl, Milano) a été utilisée par le Prof. F. Zamboni (Laboratorio di Fisica Terrestre, Canobbio) entre les mois de décembre 1995 et juin 1996.

Les paramètres mesurés lors des campagnes (pH, température, oxygène dissous, turbidité) sont discutés dans les chapitres 4.5.1 à 4.5.4 ci-dessous.

4.5.1 Mesure de la température:

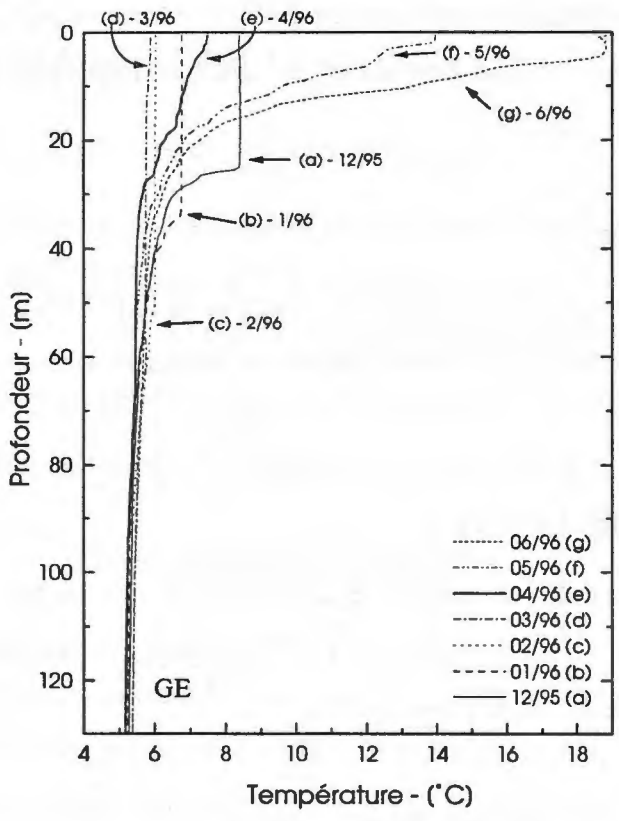
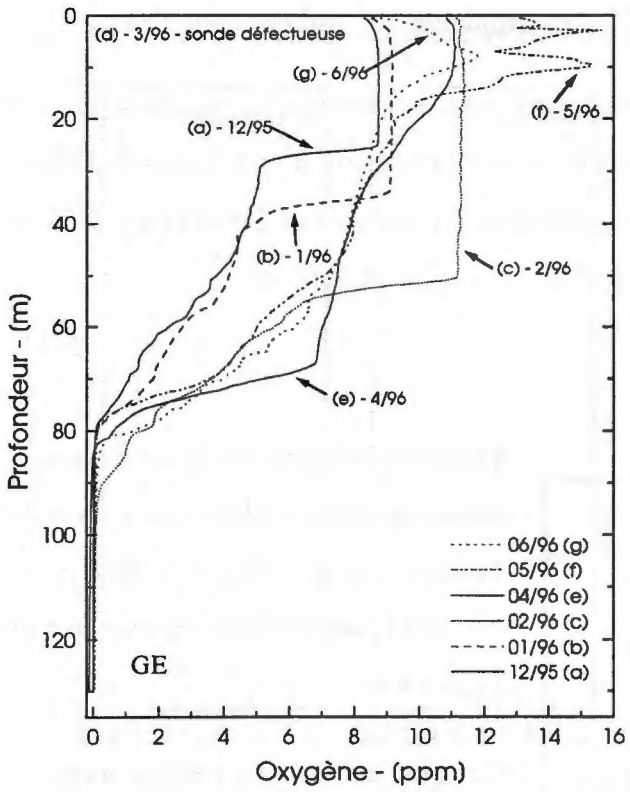


Figure 4.6: Profils de température entre décembre 1995 et juin 1996

La variation de la température en fonction de la saison (Figure 4.6) est particulièrement importante dans les couches de surface. Les premières mesures effectuées entre décembre et mars montrent que le brassage hivernal, dû à l'homogénéisation des températures, débute. En décembre, la couche est homogène jusqu'à 25 m environ. Ce phénomène se poursuit jusqu'à 33 m en janvier, puis à 50 m en février. En mars, la température des masses d'eau est quasi homogène de la surface au fond ($\Delta T < 1°C$). D'avril à juin, la situation s'inverse, les eaux de surface se réchauffent graduellement, conduisant à un gradient de température de plus en plus prononcé.

4.5.2 Mesure de l'oxygène dissous:



Les profils d'oxygène dissous (Figure 4.7) évoluent durant la saison parallèlement au profil de température, sans toutefois conduire à une réoxygénation des couches d'eau profondes.

En décembre, la strate de surface est homogène jusqu'à 25 m, l'oxygène n'est pas encore à saturation dans une eau à 8,4 °C. Puis la couche homogène s'étend jusqu'à 34 m en janvier et 50 m en février, comme dans le cas de la température. L'eau de surface est alors plus froide (6°C), avec une concentration proche de 12 ppm en oxygène atteignant la saturation.

Figure 4.7: Profils d'oxygène entre décembre 1995 et juin 1996.

En mars la tendance est inversée en surface où la productivité primaire permet la production de l'oxygène, selon la réaction de photosynthèse:

$$106\ CO_2 + 16\ NO_3^- + HPO_4^{2-} + 18\ H^+ + 122\ H_2O\ (+ \text{éléments traces}) + h\nu \longrightarrow C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P + 138\ O_2$$

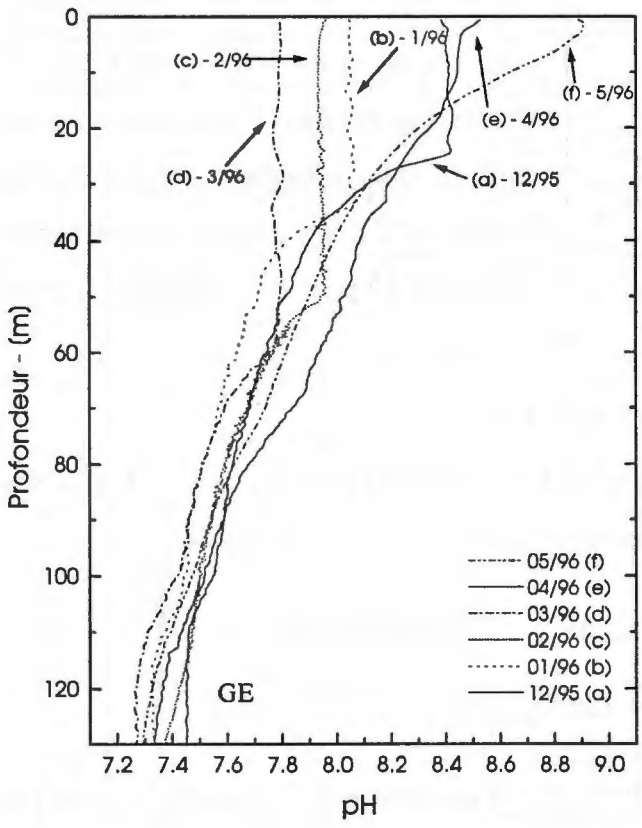
Le profil d'oxygène, qui montre une $[O_2]$ plus faible en surface qu'à la profondeur du pic d'oxygène, peut être expliqué par deux mécanismes distincts:

- Les échanges avec l'atmosphère sont rapides en surface ou les strates supérieures sont en contact avec l'atmosphère, au contraire des plus grandes profondeurs où le transport d'oxygène est limité par son coefficient de diffusion.

- Le rayonnement solaire intense contribue à détruire les organismes photosynthétiques de surface (les organismes photosynthétiques présents dans les couches plus profondes étant protégés puisque les radiations U.V. sont rapidement absorbées dans l'eau).

Ce phénomène est accentué au cours du printemps, avec des sursaturations allant jusqu'à 140 % en mai. Nous n'avons pas de valeurs pour mars en raison d'une panne de l'électrode à oxygène. Ces explications sont en accord avec les mesures de *Lami et al. (1992)* qui montrent une productivité maximale à 1,25 m dans le lac de Lugano.

4.5.3 Mesure du pH:



La variation du pH au cours de la saison est en étroite relation avec la concentration d'oxygène dissous, comme nous pouvons le voir sur la Figure 4.8.

Ceci est en accord parfait avec la réaction de photosynthèse, dans laquelle des protons sont consommés (voir ch. 4.5.2). Ainsi au printemps, le pH en surface croît, comme nous l'observons dès le mois d'avril. Pour les mois de décembre, janvier, février et mars, les observations sont similaires à celles effectuées pour la température et l'oxygène.

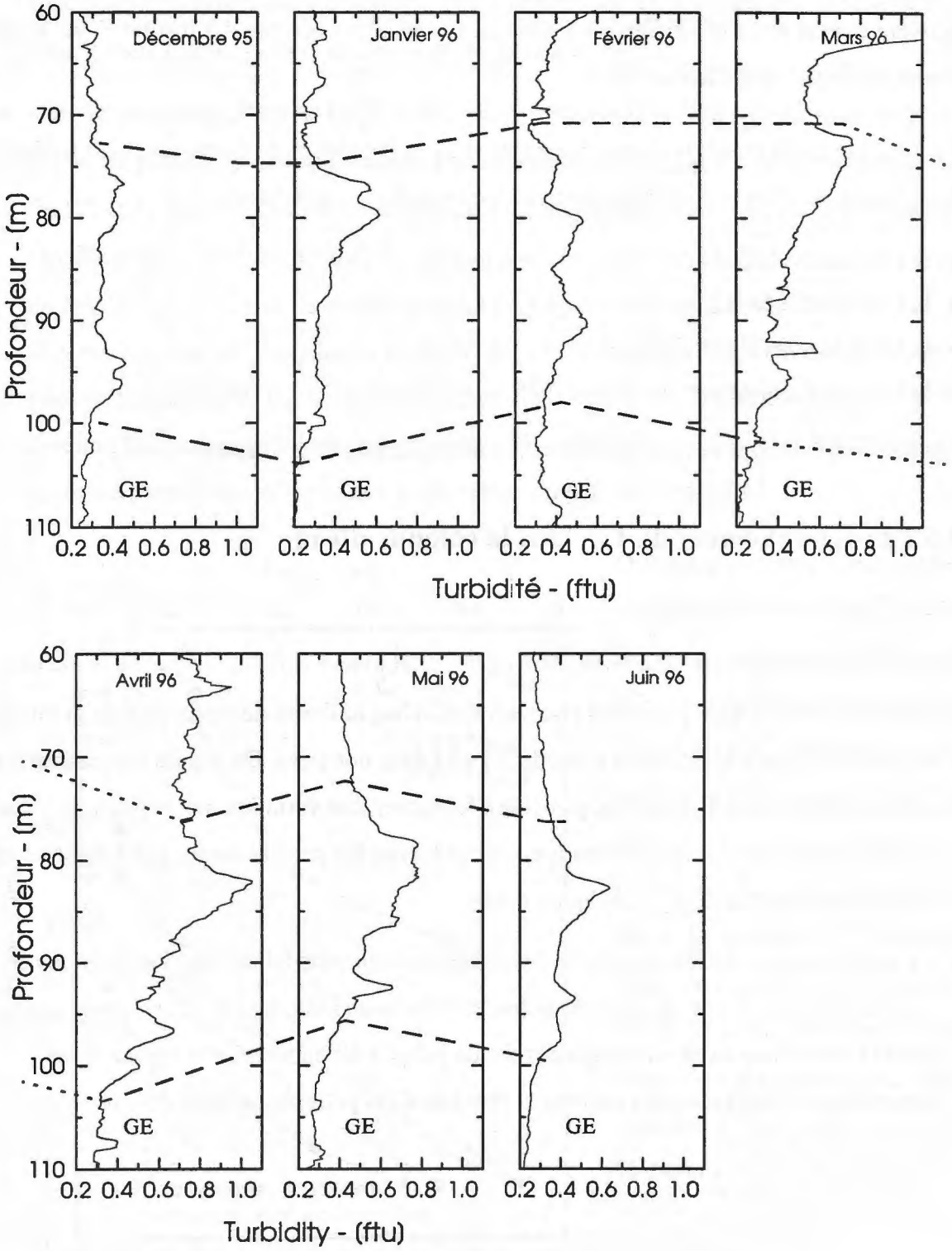
Figure 4.8: Profils de pH entre décembre 1995 et juin 1996

4.5.4 Mesure de la turbidité:

Dans le cas de la mesure de turbidité, nous avons ciblé notre intérêt sur la zone de l'interface oxique/anoxique, afin d'observer les principales couches d'eau contenant une charge élevée en particules. Les résultats de ces investigations sont donnés dans la Figure 4.9, où

l'on peut suivre l'évolution des pics particulaires, tant au niveau de la charge en particules au cours de la saison, que de leur mobilité le long de la colonne d'eau.

Figure 4.9: Profils de turbidité entre décembre 1995 et juin 1996.



4.6 Résultats des analyses chimiques

Dans ce chapitre, nous avons regroupé tous les résultats obtenus par voie chimique. Nous présenterons tour à tour les élements mesurés, puis nous chercherons les corrélations qui peuvent exister entre ces différents éléments. Les résultats obtenus à l'Institut F.-A. Forel seront distingués par l'indice GE.

En fonction de la stratégie de prélèvements et de la procédure de fractionnement utilisée, les mesures de chaque élement seront subdivisés entre quatres fractions:

- la fraction brute (B)
- la fraction filtrée (F)
- la fraction ultrafiltrée (UF)
- la fraction récoltée sur membrane (M)

Les profils obtenus pour tous les éléments sont regroupés dans l'annexe 4.

4.6.1 Fractionnement du fer dans la colonne d'eau

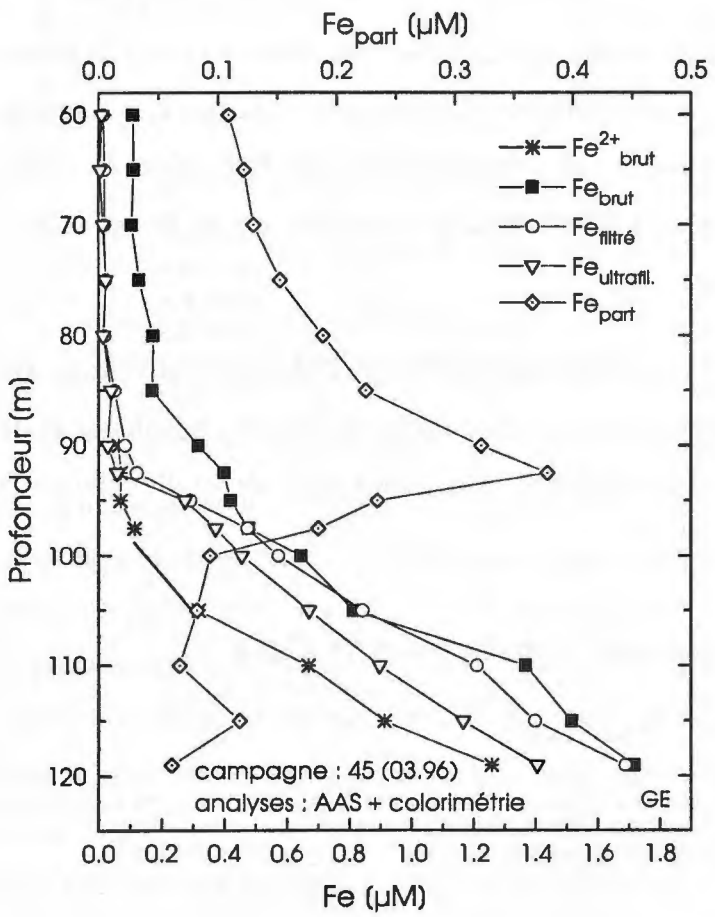
4.6.1.1 Fer ferreux

La mesure du fer ferreux dans le lac de Lugano s'est avérée difficile de par sa faible concentration ($[Fe^{2+}] < 1\mu M$) dans les couches profondes, la limite de sensibilité de la méthode colorimétrique à la ferrozine étant de 0,1 µM dans notre cas. Du fait de ces mauvaises conditions de mesure, il n'est pas possible d'observer une variation saisonière significative. Généralement les mesures sont en accord avec les profils de fer total dissous et quelques tendances se dégagent (Figure 4.10):

- Le profil du mois de février exhibe des concentrations plus faibles que les autres mois. A cette période de l'année, la zone redox est très basse (env. à 120 mètres), provoquée par la chute d'eau riche en oxygène et froide jusqu'à 50 mètres. Cette tendance est observée pour la totalité des espèces et provient d'un petit phénomène de brassage observé à cette date.

- Souvent, la présence d'un pic de fer particulaire génère un problème lors du fractionnement du Fe(II). Ceci est expliqué par le fait que le Fe(II) est susceptible de s'adsorber sur les colloïdes de fer déposés sur la membrane lors de la filtration et modifie ainsi la spéciation observée dans la colonne d'eau. Les artefacts de filtration ont largement été décrits dans *Perret (1991)* et *Buffle et al. (1992).*

- Couramment, une phase de Fe(II) colloïdal est mesurée ($[Fe(II)]_F$ - $[Fe(II)]_{UF}$), dans le pic de fer particulaire, ce qui tendrait à indiquer que le $Fe_{colloïdal}$ est en fait constitué de Fe(III) et de Fe(II). Cette observation a déjà été mentionnée dans une étude précédente (*Buffle et al., 1989*) où 50% du fer présent dans des colloïdes analysés s'est avéré être du Fe(II) . Un problème de fractionnement peut également être à l'origine de cette observation, soit par l'oxydation du Fe(II) dans la cartouche d'ultrafiltration, soit par l'adsorption de Fe(II) sur les colloïdes retenus par la membrane d'ultrafiltration. Ce dernier phénomène semble être le plus plausible puisque la spéciation du Fe(II) dans sa globalité semble être affectée aux profondeurs du pic de fer colloïdal.



Quelques investigations ont été effectuées sur le matériel récolté sur les membranes de filtration afin de déterminer si les particules de fer contenaient du Fe(II). La précision des résultats obtenus ne permet pas d'exclure totalement la présence de Fe(II) dans le matériel colloïdal récupéré entre 85 et 120 mètres. En fonction des limites de détection de la mesure, nous pouvons affirmer que plus de 70 % du fer est sous forme ferrique.

Figure 4.10: Fractionnement du fer dans le lac de Lugano (mars 96).

4.6.1.2 Fractionnement par filtration / ultrafiltration

La faible concentration du fer dans le lac de Lugano a imposé l'utilisation de l'absorption atomique à four graphite (Institut F.-A. Forel). Les tendances observées sont similaires à celles dégagées avec le fer ferreux, en ce qui concerne la faible concentration mesurée tout au long de la saison et celle particulièrement basse du profil du mois de février. La spéciation du fer donne par contre deux classes de particules selon le schéma de fractionnement (Figure 4.10):

- Au dessus du pic de $Fe_{part.}$, défini par le maximum de matériel récolté sur les membranes, le fer est sous forme particulaire (Ø > 450 nm), avec une concentration pour cette classe variant entre 0,1 et 0,2 µM.
- En dessous du pic de fer particulaire, la forme majoritaire est colloïdale (10 nm < Ø < 450 nm) et sa concentration varie entre 0,1 et 0,3 µM.

4.6.1.3 Fer récolté sur les membranes

Dans le cas du matériel récupéré sur les membranes, une nette variation au cours de la saison est observée (cf. table 4.4). Différentes porosités de filtres entre 0,45 µm et 0,1 µm ont été utilisées sans remarquer de variation significative sur la quantité de matériel récupéré. Cette observation tend à montrer que les colloïdes de fer se regroupent en des entités de plus grandes dimensions sur le filtre.

Au mois d'avril, un double pic de $Fe_{part.}$ est observé à 96 m et 100 m respectivement. Ce phénomène est en concordance avec les profils de concentrations de phosphates et de manganèse qui montrent des tendances similaires, et qui nous permettront d'expliquer la présence de ces deux pics au ch. 4.6.2.1.

4.6.2 Fractionnement du manganèse dans la colonne d'eau

4.6.2.1 Fractionnement par filtration / ultrafiltration

La répartition du manganèse dans ces différentes phases est beaucoup moins constante dans le temps par rapport à celle du fer. Deux tendances se dégagent (Figure 4.11):

- Entre janvier et avril, deux classes de taille se trouvent réparties le long de la colonne d'eau. Des particules de Mn (Ø > 200 nm) se trouvent dans les couches supérieures au pic de fer particulaire, avec un maximum de concentration centré sur le pic de manganèse récolté sur membranes. Du manganèse colloïdal (10 nm < Ø < 200 nm) est présent en dessous du pic de $Fe_{part.}$.
- Entre mai et juin, la classe particulaire est toujours présente, avec une importance qui va décroissante, mais la composante colloïdale a disparu des couches profondes.

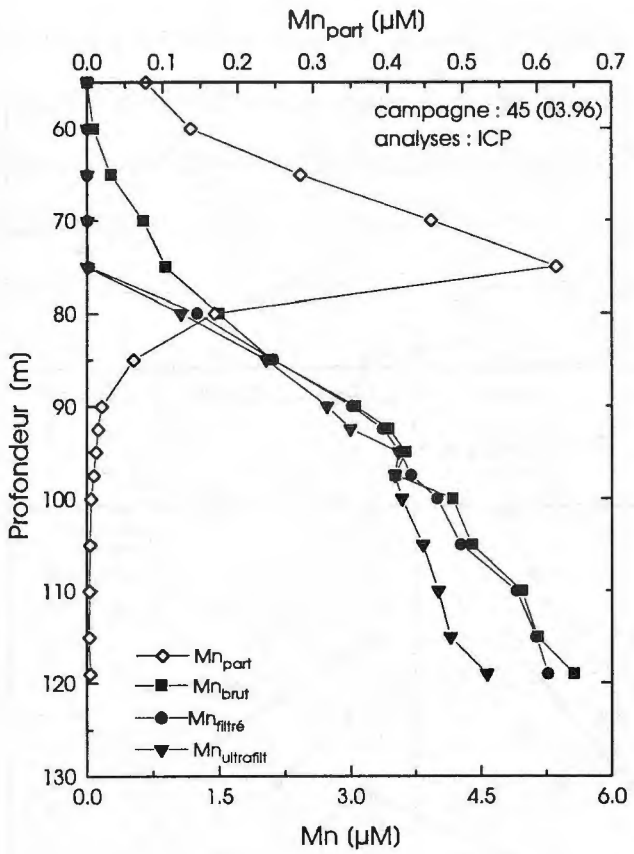


Figure 4.11: Fractionnement du Mn (03/ 96).

La concentration de l'espèce particulaire varie au cours de la saison, avec un maximum en mars et avril. Cette observation a déjà été faite par *Hofmann (1996)* et est également démontrée dans la figure 4.12 pour l'année 1996. Les maxima de concentration du pic de manganèse en fonction de la saison sont donnés dans la table 4.2 au ch. 4.6.2.2 en comparaison avec les valeurs obtenues sur les membranes directement.

Au mois d'avril, le profil du manganèse prend une allure singulière (Figure 4.13), avec une forte poussée de manganèse dissous à 98 m provoquant un pic de Mn^{2+}. Ce phénomène est très probablement lié à la sédimentation et à la dissolution des espèces digitiformes, formées en fortes concentrations dans les strates supérieures dans le courant du mois d'avril. Cette hypothèse est corrélée par le fait qu'à cette même profondeur un double pic d'oxydes de fer est observé et est en concordance avec une forte décroissance du pic de Mn particulaire. Cette observation indique qu'une partie des particules de manganèse, en cours de sédimentation, est probablement consommée par une réaction redox entre Mn(IV) et le Fe^{2+} des couches inférieures, selon le modèle décrit par *Davison et De Vitre (1992)*

[$MnO_x + Fe^{2+} \rightarrow Mn^{2+} + FeOOH$]. C'est en effet pendant ce mois et le mois de juin que les couches de formation des particules de fer et de manganèse sont les plus proches, créant ainsi un gradient redox très prononcé dans cette zone.

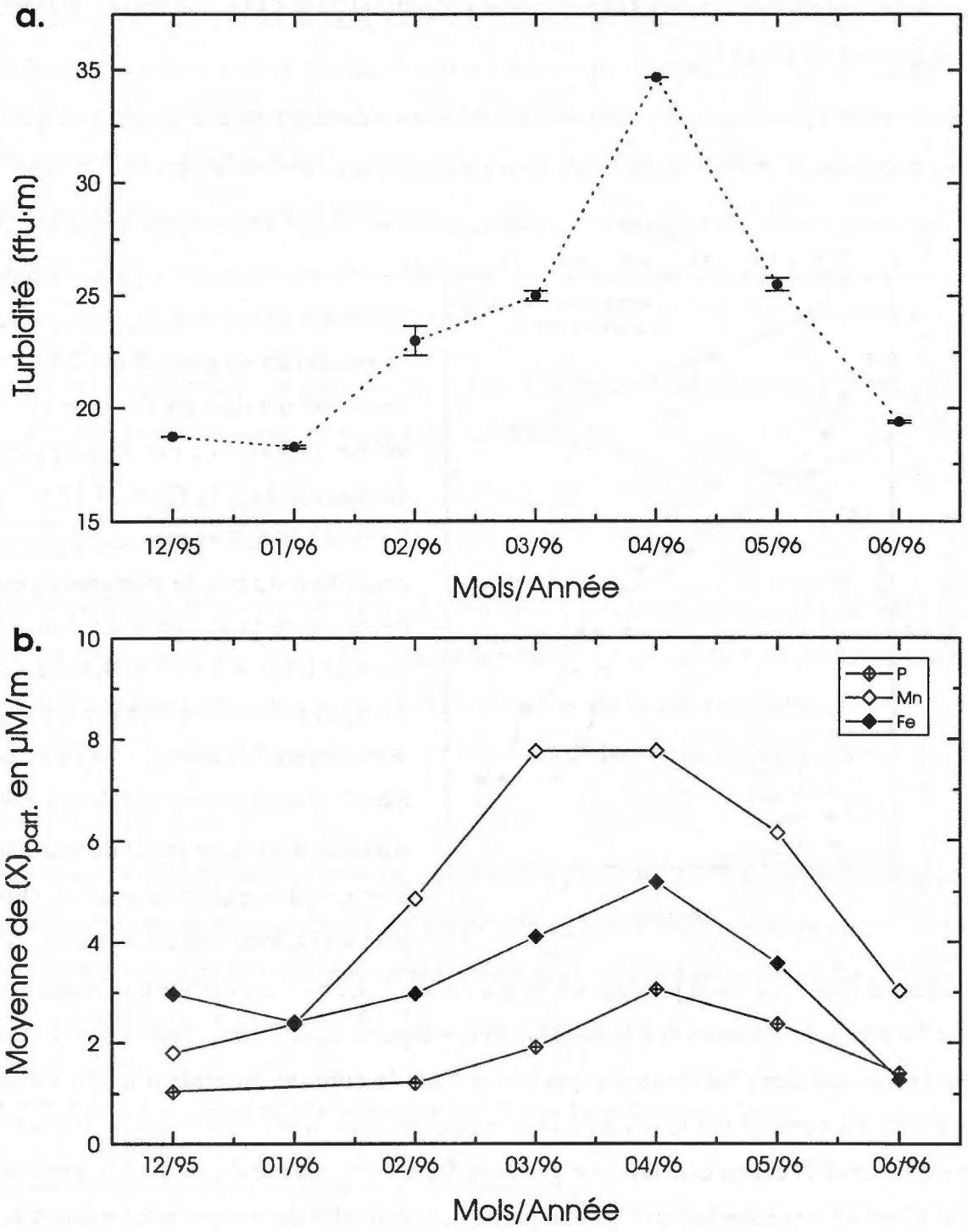


Figure 4.12 a et b: Evolution saisonnière des pics de turbidité (a) pour une couche de 60 mètres encerclant les pics particulaires, et des concentrations dans la colonne d'eau de $Fe_{part.}$, $Mn_{part.}$ et $P_{part.}$ (b) intégrées sur 20 m (dans le cas du Fe ou P) ou 30 m (Mn) et normalisées par rapport à cet intervalle.

Une espèce colloïdale présente dans les couches profondes entre les mois de janvier et avril, est observée avec des concentrations maximales de 1 µM en février. Cette espèce peut être du MnS (pK_{sp}= 13,5; $MnS = Mn^{2+} + S^{2-}$), la présence de $MnCO_3$ (pK_{sp}= 9,7; $MnCO_3 = Mn^{2+} + CO_3^{2-}$) étant peu probable puisque $MnCO_3$ n'a jamais été identifié dans les fractions particulaires des lacs anoxiques (*DeVitre et Davison, 1992*). Une étude sur le lac Fukami-ike (*Yagi, 1988*) a montré que 40% du manganèse dissous était en fait présent sous une forme organique avec un poids moléculaire compris entre 1000 et 50000 daltons. La formation de ces espèces peut également être provoquée dans notre cas par un artefact d'ultrafiltration, puisque de fortes préconcentrations dans la cartouche d'ultrafiltration peuvent favoriser la formation d'une espèce non présente dans l'environnement étudié.

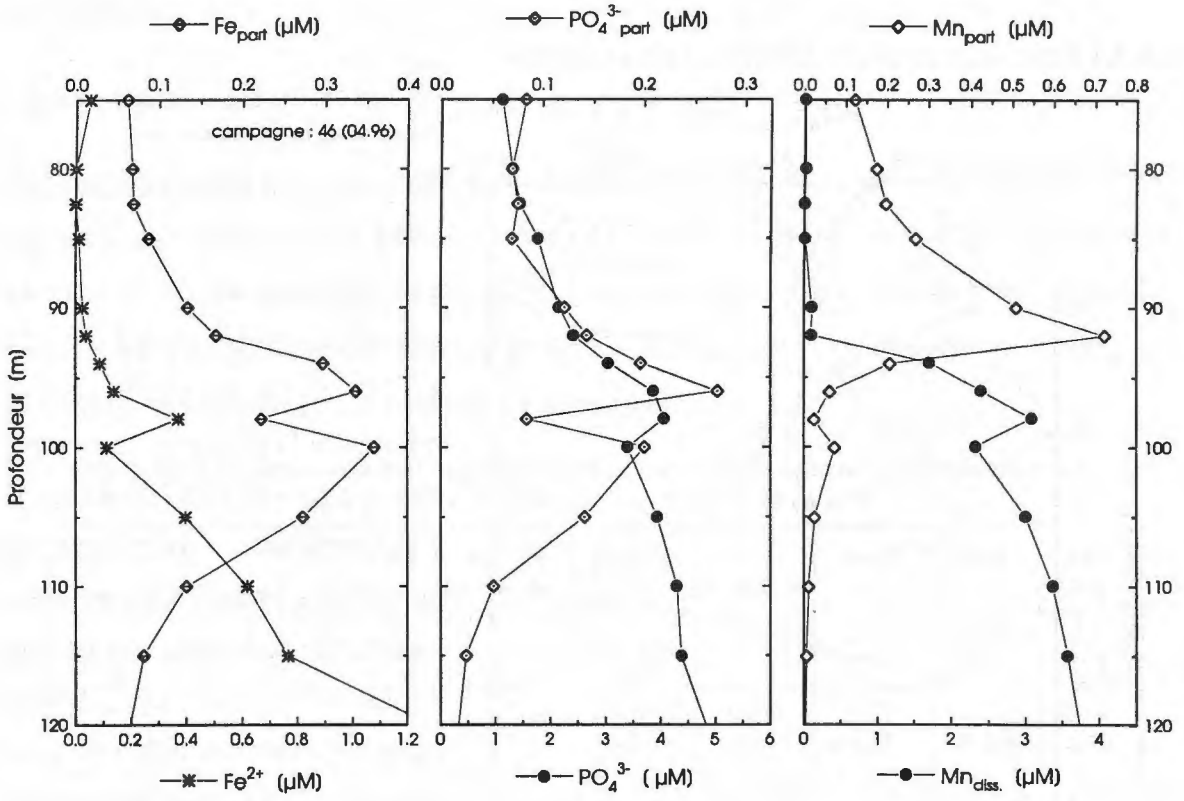


Figure 4.13: Profils de Fe, phosphates et Mn totaux et particulaires au mois d'avril 1996.

4.6.2.2 Manganèse récolté sur les membranes

La même tendance est observée pour le manganèse récupéré sur les membranes (Figure 4.12) que pour le fer, avec une forte croissance des espèces particulaires entre mars et avril. Les concentrations mesurées en fonction du temps sont données dans la table 4.2.

Table 4. 2: Concentrations du pic de manganèse particulaire au cours de la saison

Concentration:	Décembre 96	Janvier 96	Février 96	Mars 96	Avril 96	Mai 96	Juin 96
par spéciation [µM]	-	0,2-0,3	0,3-0,4	0,6-0,9	0,8	0,3-0,4	0,3
sur les membranes [µM]	0,2	0,15-0,2	0,25-0,35	0,5-0,6	0,7-0,8	0,35-0,45	0,25

On remarque que les deux méthodes de mesure permettent d'arriver à des résultats similaires.

4.6.3 Fractionnement des phosphates dans la colonne d'eau

4.6.3.1 Fractionnement par filtration / ultrafiltration

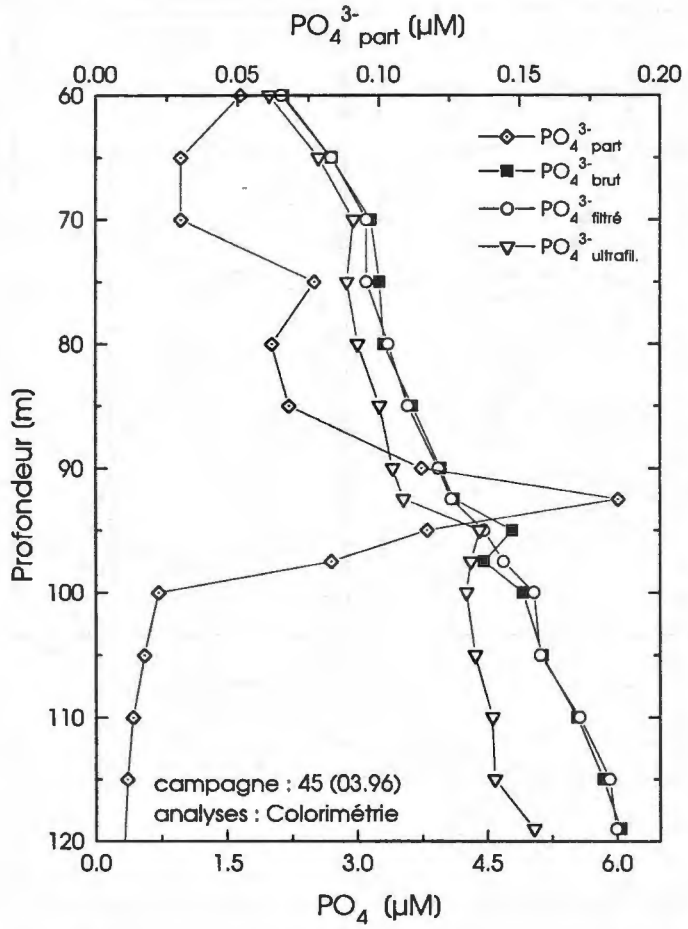


Figure 4.14: Fractionnement des phosphates dans la colonne d'eau.

La première observation concerne la forte concentration des phosphates dans le lac de Lugano, comprise entre 5 et 6 µM à 120 m. La forme dissoute représente la plus grande proportion des phosphates (80-85%). Il s'est rapidement avéré que les phosphates non-dissous existent sous forme colloïdale tout le long de la colonne d'eau. Deux gammes de concentrations sont observées, qui varient au cours du temps et qui sont réparties de part et d'autres du pic de fer particulaire, avec une concentration plus forte pour l'espèce se situant sous le pic de fer. Les valeurs mesurées sont données dans la table 4.3.

Nous remarquons donc que la présence du pic de fer particulaire semble affecter la répartition colloïdale des phophates, sans pourtant la contrôler complètement. La différence entre les deux classes est plus importante entre février et avril.

Table 4.3: Concentrations de phosphates colloïdaux en fonction du pic de fer particulaire

	Janvier 96	Février 96	Mars 96	Avril 96	Mai 96	Juin 96
Au dessus du pic de Fe: [µM]	0,5	0,3-0,5	0,2-0,3	0,1	0,2	0,2
En dessous du pic de Fe: [µM]	0,7-1,4	0,7-1	0,7-1,2	0,3-0,8	0,3-0,4	0,2-0,4

Durant janvier, février, mai et juin (Figure 4.15) un décrochement est observé dans les profils de PO_4 en dessous du pic de fer. Ce phénomène est souvent associé à la formation d'une espèce particulaire en train de sédimenter et est bien illustré par *DeVitre et Davison (1993)*.

4.6.3.2 Phosphates récoltés sur les membranes

Une corrélation est observée entre le fer et les phosphates récupérés sur les membranes, comme illustré sur la figure 4.16. Au cours de la saison, le pic de phosphates particulaires correspond à la forme du pic de $Fe_{part.}$, particulièrement pour les mois de mars à juin. La concentration de l'espèce particulaire en fonction de la saison est donnée sur la table ci-dessous et est comparée avec celle du fer particulaire.

Table 4. 4: Concentrations maximales des pics de fer et de phosphates particulaires sur les membranes au cours de la saison; concentrations en µM

	Décembre 96	Janvier 96	Février 96	Mars 96	Avril 96	Mai 96	Juin 96
Fer particulaire:	0,15	-	0,1-0,15	0,3-0,4	0,35	0,25-0,3	0,1-0,2
Phosphates particulaires:	0,09 GE	0,08 GE	0,06-0,09 GE	0,11-0,18 GE	0,18-0,25 GE	0,14-0,18	0,16-0,23

Le mois d'avril se caractérise par la présence d'un double pic de phosphate particulaire, ce qui est en parfait accord avec le double pic observé pour le fer particulaire. Si l'on considère l'explication donnée au ch.4.6.2.1 pour justifier la présence de ces deux pics, il est important de noter que quelque soit la réaction de formation de l'oxyde de fer (par oxyda-

tion en présence d'oxygène ou par réaction redox avec le Mn[IV]), les deux mécanismes conduisent à l'incorporation de phosphates au sein des colloïdes de fer.

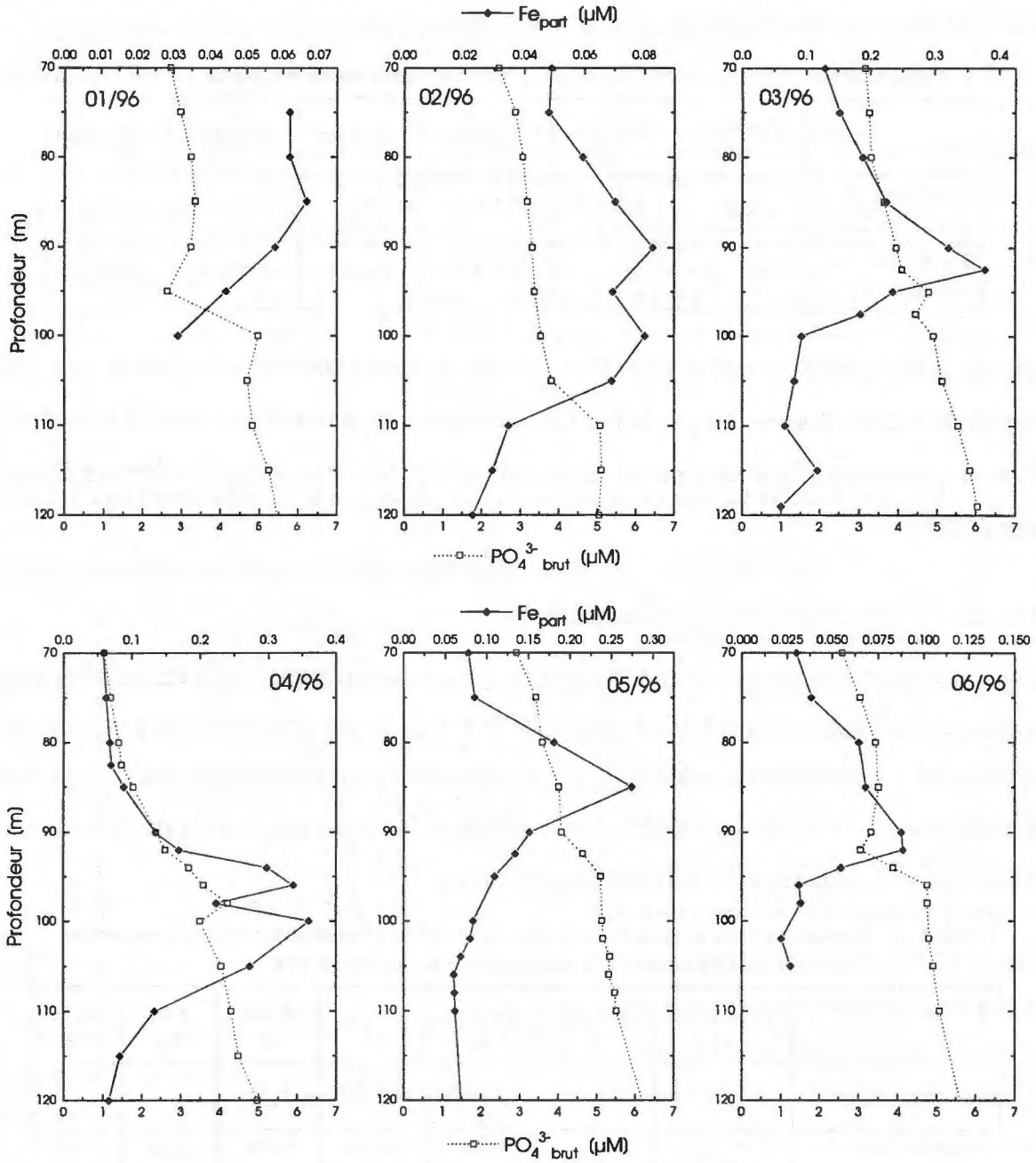
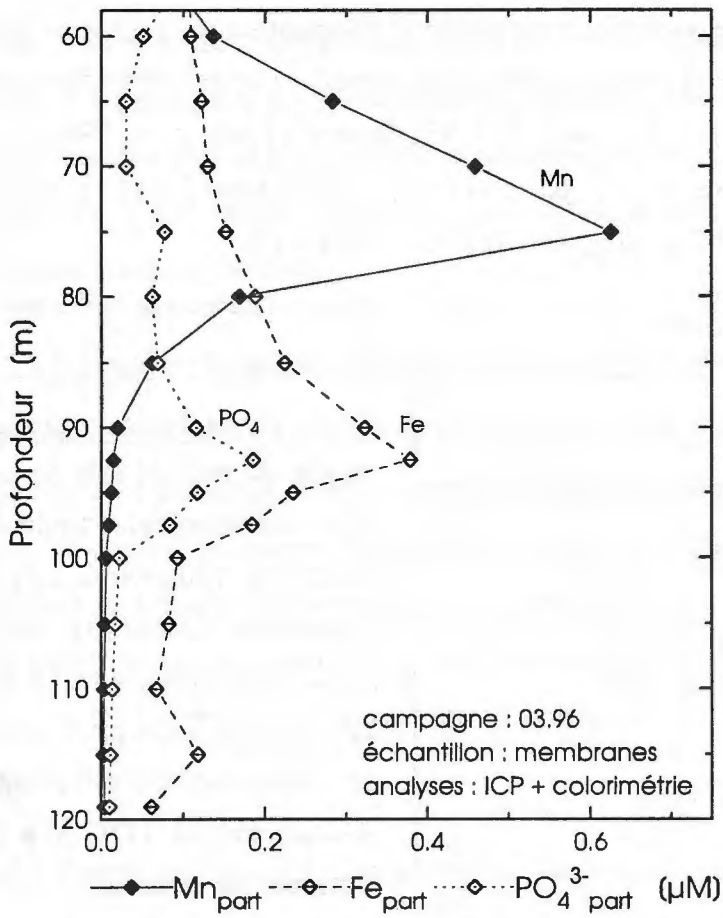


Figure 4.15: Profils de $Fe_{part.}$ et de $PO_4^{3-}{}_{brut}$ en fonction du temps (fractionnement par filtration/ultrafiltration).

Une interrogation quant au schéma de spéciation est posée par ces résultats. En effet comme nous l'avons vu au ch. 4.6.3.1, la grande majorité du phosphore non-dissous est sous forme colloïdale ([filtré-ultrafiltré]>[brut-filtré]). Or il s'avère que nous récupérons

une quantité non-négligeable de phosphates particulaires sur les membranes. Deux explications peuvent justifier nos observations:

Figure 4.16: Profils de Fe, Mn et phosphates particulaires récupérés sur les membranes de filtration.



•Il est possible qu'en fonction de la faible concentration des phosphates particulaires, ceux-ci ne soient pas déterminés par le schéma de fractionnement classique;soit une forte concentration des autres espèces présentes provoque un effet masque, soit la faible fraction d'intérêt est noyée dans la marge d'erreur de l'analyse.

•Il est d'autre part possible que le filtre, en accumulant du matériel, crée une trame de porosité inférieure à sa porosité nominale. Ainsi les petits colloïdes peuvent être piégés sur la membrane, alors que leur taille est inférieure à la taille des pores, générant ainsi une concentration anormalement élevée en phosphates particulaires. Ce phénomène a déjà été longuement décrit dans la littérature (*Buffle et al., 1992*).

4.6.4 Mesure des sulfures, du carbone organique total et autres observations

L'importance des sulfures dans le cycle du manganèse et du fer a été démontrée par de nombreux auteurs (*Davison et DeVitre, 1992; DeVitre et al., 1988; DeVitre et Davison, 1993; Aller et Rude, 1988; Luther, 1990*). Ainsi pour le manganèse, MnO_x est réduit par les sulfures et l'ion Mn^{2+} formé est capable de réagir avec les mêmes sulfures pour former du MnS si son pK_s de 13,5 est dépassé. En présence de Fe^{2+}, l'espèce noire FeS est attendue dès que son produit de solubilité est dépassé. En fonction de ces con-

sidérations, nous avons mesuré les concentrations de sulfures dans la colonne d'eau du lac de Lugano. La tendance observée est proche de celle du profil de Fe^{2+}, avec une apparition des sulfures à 90 mètres pour le mois de mai et une concentration de 3 µM à 120 m. La disparition du pic de manganèse particulaire correspond à l'apparition des sulfures. Le calcul du produit de solubilité de FeS permet de prévoir la formation de colloïdes dès la profondeur de 110 mètres (K_{sp}=18,1; $FeS \rightarrow Fe^{2+} + S^{2-}$; *Stumm et Morgan, 1981*); ceci permettrait d'expliquer la croissance de la phase colloïdale dès la zone des 110 mètres où une partie des colloïdes est peut-être composée de FeS (Figure 4.17).

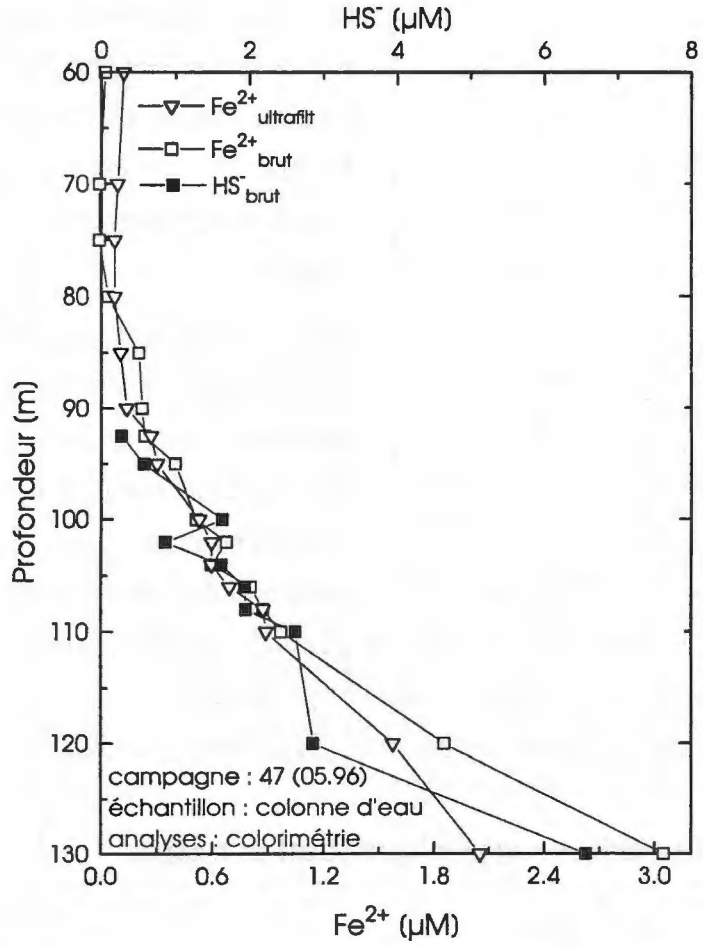


Figure 4.17: Profils de Fe^{2+} et HS^-.

En début des campagnes, un profil de carbone organique total a été mesuré afin de connaître les principales tendances entre 60 et 120 mètres. La concentration du carbone organique total s'est avérée être constante avec la profondeur, oscillant entre 0,9 et 1,1 ppm. Aucun profil TOC n'a été remesuré par la suite.

L'Institut F.-A. Forel a procédé à l'analyse du calcium et de l'aluminium sur les membranes de filtration récupérées pendant la période de prélèvements. La faible teneur en Al (Al < 0,09 µM) nous permet d'affirmer que peu d'argiles sont présentes dans la colonne d'eau du lac de Lugano, alors que la charge en calcium augmente fortement entre les mois de mai et juin (Ca: 0,45 → 3 µM), avec une grande quantité de particules ayant une taille comprise entre 100 et 400 nm. Cette observation est en parfait accord avec le travail d'Annette *Hofmann (1996),* qui montre que le flux vertical de calcite est fortement accru entre les mois d'avril et juin, avec un maximum pour le mois de juin.

4.6.5 Rapport P:Fe

Nous avons indiqué que Fe et P sous leurs formes particulaires sont corrélés; il est intéressant d'étudier comment cette corrélation se comporte en fonction de la profondeur et de la saison. Lors de notre fractionnement, deux classes de tailles de particules ont été mises en évidence. La première est particulaire et se mesure selon [brut]-[filtré] ou directement avec le matériel déposé sur les filtres et récupéré par minéralisation. La seconde classe est colloïdale et s'obtient selon [filtré]-[ultrafiltré]. Nous nous proposons d'étudier le rapport P:Fe dans ces deux fractions.

4.6.5.1 Rapport molaire P:Fe mesuré sur la fraction particulaire

La première corrélation est montrée dans la figure 4.18a entre les concentrations de fer et de phosphates particulaires obtenues par la spéciation. On ne remarque aucune tendance nette. Un rapport molaire P:Fe de 1,12 ± 1 est obtenu en considérant le rapport moyen entre P et Fe à chaque profondeur et pour toutes les dates. Un rapport plus faible, 0,54 (± 0,6), est obtenu en reportant les concentrations trouvées sur les membranes de filtration (Figure 4.18b). Cependant la variabilité est proche de 100% comme dans le cas du rapport obtenu par spéciation.

4.6.5.2 Rapport molaire P:Fe mesuré sur la fraction colloïdale

Le calcul du rapport entre fer et phosphates dans la phase colloïdale s'avère peu fiable si l'on considère les résultats obtenus par la spéciation. En effet la majorité du fer semble exister sous forme particulaire entre 60 et 95 mètres. En dessous de cette couche particulaire, le fer existe sous forme principalement colloïdale, avec une concentration légèrement croissante en fonction de la profondeur. Les phosphates sont eux majoritairement colloïdaux, en plus faible concentration au-dessus du pic de fer qu'en dessous. Il apparaît donc peu opportun de corréler les espèces colloïdales puisque la spéciation tend à montrer que le comportement du fer est différent de celui des phosphates dans la colonne d'eau. La corrélation entre P et Fe mesurée dans les colloïdes a néanmoins été représentée sur la figure 4.18c. La dispersion des points est très élevée et comme dans le cas des espèces particulaires obtenues par spéciation, aucune corrélation réelle n'est observée. Il est intéressant de noter que la majorité des points présents sur ce graphe représente des entités fortement

chargées en phosphore, alors que les concentrations de fer restent toujours assez faibles. Cette observation est confirmée par le rapport P:Fe obtenu pour chacun des couples profondeurs-dates et qui donne une moyenne élevée de 21,6 moles de phosphates (± 51) pour une mole de fer. La variabilité très élevée tend à confirmer qu'aucune corrélation n'existe dans la phase colloïdale entre Fe et P, mais que la majorité des phosphates minéraux se retrouvent dans la phase colloïdale.

Figure 4.18a: Concentrations en P *versus* Fe mesurés par différence $[Fe]_{tot}$ - $[Fe]_{filtré}$.

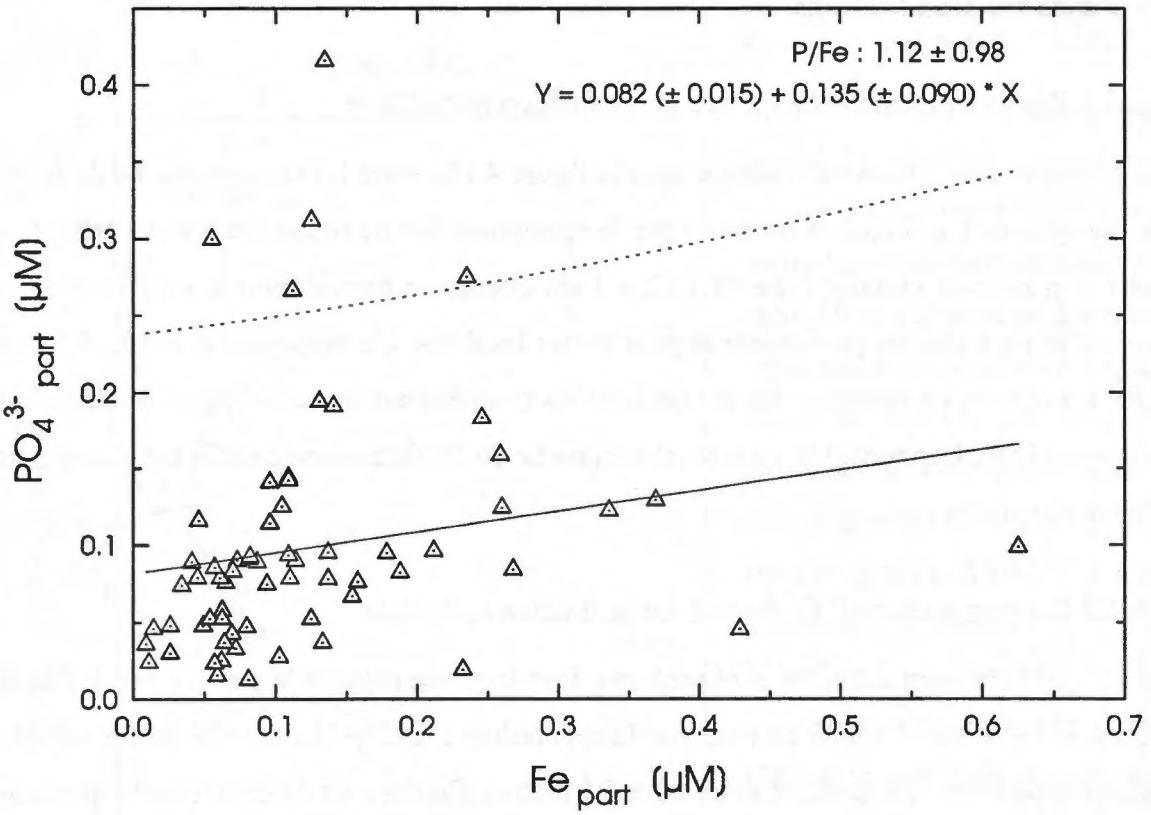


Figure 4.18b: Concentrations en P *versus* Fe mesurés sur les particules récoltées sur les filtres.

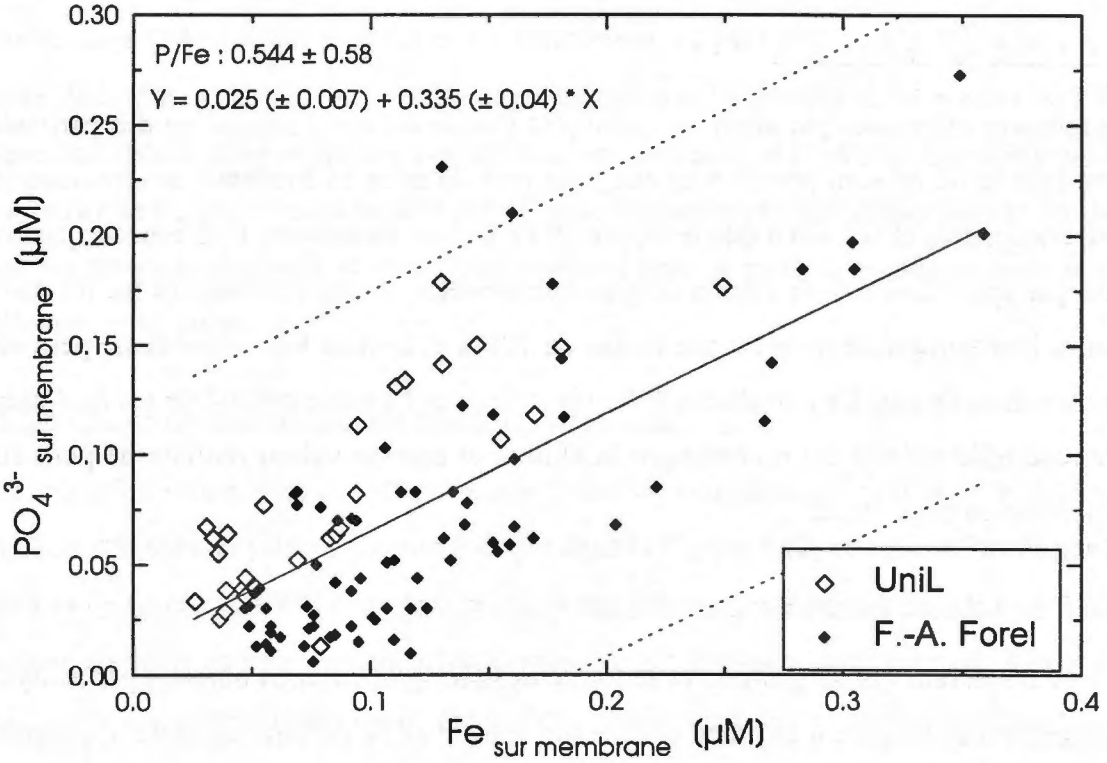
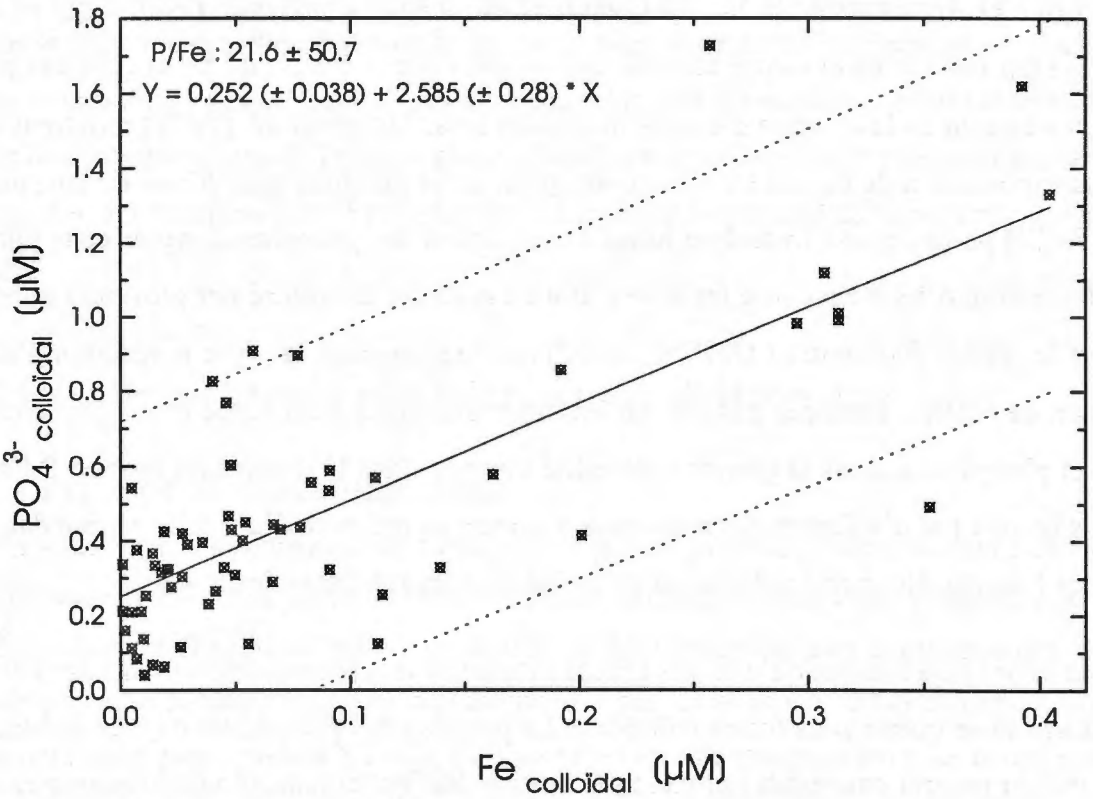


Figure 4.18c: Concentrations en P *versus* Fe mesurés par différence $[Fe]_{filtré}$ - $[Fe]_{ultrafiltré}$



4.6.6 Rappel des résultats obtenus selon l'approche chimique

4.6.6.1 Critique des résultats

Les mesures effectuées par analyses chimiques classiques après séparation des particules selon leur taille ne sont pas du tout adaptées pour la mise en évidence des interactions entre phosphates et fer. Bien que le rapport P:Fe obtenu en mesurant les espèces particulaires par spéciation soit de l'ordre de grandeur de celui obtenu directement sur les membranes, leur variabilité n'en est pas moins de 100% et aucune valeur fiable ne peut être discutée dans ce cas. La corrélation P:Fe obtenue pour l'espèce colloïdale est également douteuse telle qu'elle est obtenue par la chimie et aucune valeur réaliste ne peut être avancée après cette étude.

4.6.6.2 Corrélation entre fer et phosphates

En ne considérant que la position et la forme des pics particulaires obtenus par analyses des membranes (Figure 4.16), une corrélation entre P et Fe est envisageable. Ce résultat est en accord avec de nombreux travaux (*Leppard et al., 1988; Buffle et al. 1989; Stauffer et Armstrong, 1986; McQueen et al., 1986; Lijklema, 1980; Sigg et al., 1987*) qui mettent en évidence un nette corrélation entre la chimie du fer et celle des phophates au sein de la colonne d'eau de nombreux lacs. *Mayer et al. (1982)* montrent que sous exposition à de faibles teneurs en oxygène, le fer précipite sous forme de phosphate de Fe(III) partiellement hydrolysé jusqu'à épuisement des phosphates. Après cette phase, la formation d'hydroxyde de fer a lieu. Il a en effet été démontré par plusieurs auteurs (*Buffle, 1988; Davison et DeVitre, 1992*) que le phosphate catalyse la réaction d'oxydation de Fe(III). Tous ces travaux tendent donc à certifier l'existence d'une phase entre fer et phosphates, mais la grande variabilité obtenue dans la mesure du rapport P:Fe ne nous permet pas d'affirmer que nous nous trouvons en présence d'une telle espèce dans le lac de Lugano. Nous reviendrons sur ce problème important dans le ch. 4.8.

Nous avons déjà indiqué qu'une très grande proportion des phosphates présents dans le lac de Lugano se trouve sous forme colloïdale. La partition des phosphates dépend fortement du milieu naturel concerné; par exemple dans le lac Vallentunasjön (profondeur maximum: 4 mètres) qui est constamment oxygéné durant la saison (*Löfgren et Boström,*

1989), les phosphates sont essentiellement sous forme organique (60%), avec un faible pourcentage (14%) associé au fer et à l'aluminium, et 18% avec le Ca. Dans une autre étude (*Stauffer et Armstrong, 1986*), il est montré que le phosphore est surtout lié à une phase colloïdale riche en acides humiques ayant une taille de 0,4 µm. Ces deux études montrent que les phosphates ne sont pas systématiquement en association avec le fer dans tous les systèmes naturels, et que les interactions avec la matière organique sous forme colloïdale sont fortes.

4.6.6.3 Evolution saisonnière des espèces particulaires

Une variation saisonnière des stocks particulaires de manganèse, de fer et de phosphates est observée avec la saison, comme indiqué dans la Figure 4.12, et est confirmée par les mesures de turbidité. Cette observation a déjà été faite par *Hofmann (1996)*, essentiellement en ce qui concerne le manganèse. Ce résultat est expliqué, dans le cas du Mn, par la sédimentation, après la période de fleur d'eau printanière, de matériel organique facilement assimilable pour les bactéries présentes à l'interface redox et responsables de l'oxydation du manganèse, mais aucune explication d'ordre biologique ne permet d'expliquer *a priori* la variation des phosphates et du fer. De plus un léger décalage temporel est observé entre le maximum des concentrations de manganèse (fin février-début mars) et le maximum des concentrations de fer et de phosphates (fin mars-début avril), montrant par là un comportement similaire entre Fe et phosphates, mais probablement différent entre le Fe et le Mn.

4.7 Résultats obtenus par microscopie électronique

4.7.1 Principe de l'échantillonnage

- Prélèvements : Les échantillons d'eau utilisés pour la préparation de spécimens de microscopie électronique sont prélevés à l'aide de bouteilles Go-Flow plongées aux différentes profondeurs d'intérêt. 500 ml d'eau sont transférés sous azote dans des récipients en polyéthylène (prélavés à l'acide et purgés au préalable) et conservés sous azote (Sac à gants modèle X27-27, I^2R) jusqu'à l'arrivée au laboratoire. Le temps compris entre le premier prélèvement et l'arrivée au laboratoire est toujours inférieur à l'heure.

- Ultracentrifugation : Dans le sac à gants, la turbidité de l'échantillon est mesurée et les tubes de centrifugation sont préparés selon la technique décrite au chapitre 3.1. Pour tous les prélèvements, le volume centrifugé varie entre 4 et 10 ml en fonction de la turbidité mesurée. La température du rotor est maintenue à 4°C et les conditions de centrifugation sont adaptées au volume centrifugé selon la table 4.5 :

Table 4. 5: Conditions de centrifugation, RCF: Force centrifuge relative

Volume:	Vitesse (tours/minute)	Temps:	RCF G_{min}	RCF G_{max}
4 ml	21000	1h45min	68035	73951
4 ml	28000	1h	120951	131469
8 ml	21000	2h45min	62612	73951
8 ml	28000	1h45min	111310	131469
10 ml	21000	3h15min	59900	73951
10 ml	28000	2h	106490	131469

- Pour chaque profondeur, deux grilles de cuivre sont préparées. En fin de centrifugation, les tubes sont réintroduits dans un sac à gants sous azote, le surnageant est délicatement retiré et les grilles sont récupérées.
- Post-protection: Afin de limiter les artefacts dus au séchage du matériel sur la grille, mais également pour éviter toute oxydation du Fe(II) encore présent sur la grille humide après évacuation du surnageant, certaines grilles sont recouvertes d'un film de Nanoplast™ (*Perret et al., 1991*). La polymérisation de la résine a lieu sous azote jusqu'à immobilisation complète du spécimen.

Un résumé des profondeurs prélevées en fonction des dates est donné dans la figure ci-dessous.

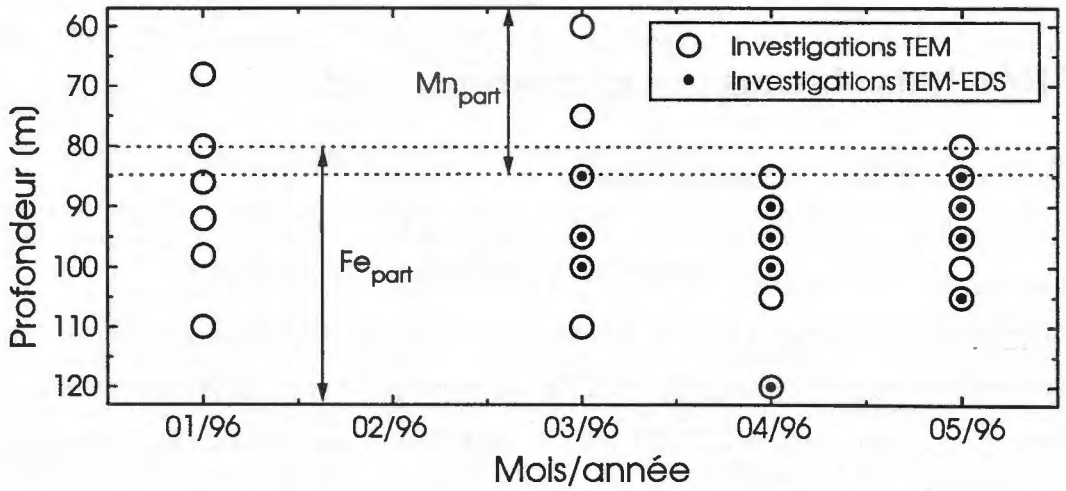


Figure 4.19: Profondeurs prélevées pour ultracentrifugation pour visualisation et analyses.

Chaque préparation a été systématiquement observée à l'aide du microscope électronique Zeiss EM-10 afin de déterminer l'aspect des particules et colloïdes présents sur la grille. Cette première phase de nos observations est discutée dans le chapitre 4.7.2 où la morphologie des entités observées est décrite le long de la colonne d'eau. A partir de ces observations, un ensemble de profondeurs et de dates a été choisi pour l'analyse physico-chimique des entités présentes sur les grilles. Cette seconde étape de caractérisation sera discutée au chapitre 4.7.3. Pour la morphologie, étant donné que nous nous intéressons aux pics de fer et de manganèse particulaires, nous avons fixé notre attention sur les espèces les plus fréquentes et donc les plus représentatives de la profondeur étudiée. Il s'est avéré, suite à l'analyse physico-chimique, que les espèces les plus fréquemment observées dans la zone des pics particulaires étaient bien celles du fer et du manganèse.

4.7.2 Analyse morphologique

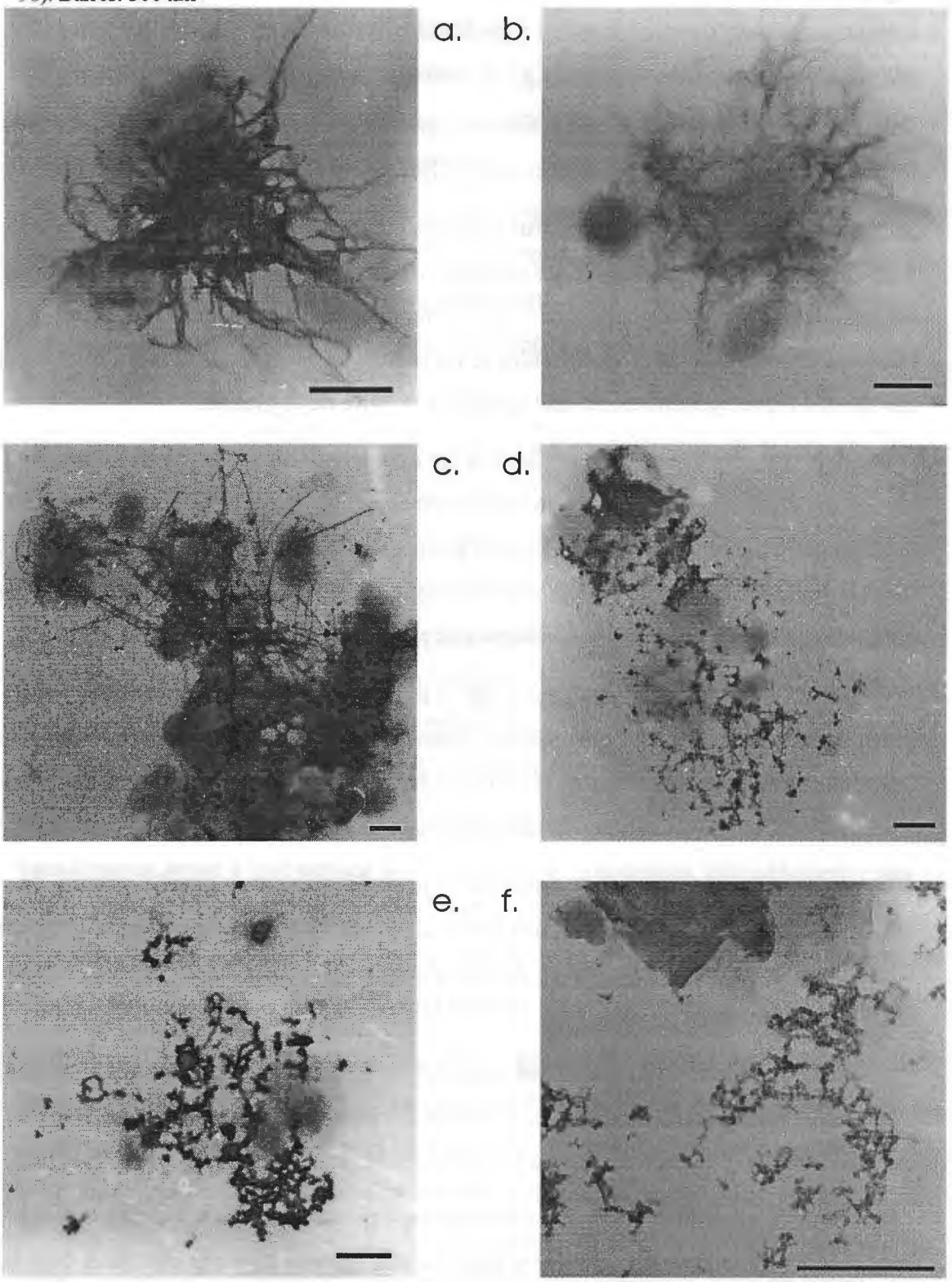
Lors de la visualisation des spécimens de microscopie électronique, une procédure a été adoptée et conservée tout au long de l'analyse des différents jeux profondeurs/dates. Systématiquement, les grilles non recouvertes de Nanoplast™ ont été observées, puis parmi celles pouvant contenir un artefact dû à l'oxydation ou au séchage de la grille, le spécimen recouvert de Nanoplast™ a été observé. Il est important de noter que dans la presque totalité des cas, le recours à une grille recouverte de Nanoplast™ n'a pas été nécessaire. Ceci est expliqué par le fait qu'un très faible volume de solution reste déposé sur la grille après l'élimination du surnageant et que cette eau résiduelle a été chaque fois éliminée par succion sur un papier KimWipes™. Aucune coloration à l'acétate d'uranyle n'a également été nécéssaire, puisque la densité électronique du matériel organique présent dans les eaux naturelles s'est révèlée être suffisante. Dans un second temps l'ensemble de la grille a été visualisé, afin de reconnaître les entités majoritaires et représentatives présentes à la profondeur considérée. Puis une série de micrographies a été prise à différents agrandissements, en privilégiant quelques vues d'ensemble.

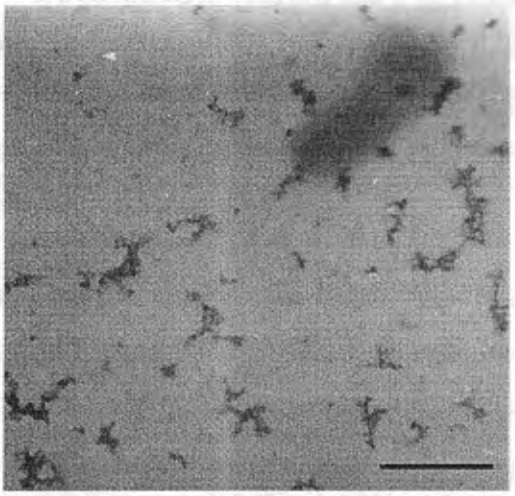
Les résultats obtenus par cette approche ont permis d'obtenir une image représentative de la colonne d'eau, les espèces d'intérêt sont illustrées sur la figure 4.20:

- 60 mètres : Le matériel observé à cette profondeur est assez hétérogène, majoritairement composé de gros flocs provenant des couches supérieures en cours de sédimentation et d'entités dendritiques de type similaire à la morphologie du *Metallogenium*. La concentration en nombre/ml de ces entités, qui s'avèrent être la forme la plus fréquente des oxydes de manganèse dans ce lac, a été estimé par comptage à environ $1,7 \cdot 10^3$ par ml de solution. Ce chiffre est assez peu élevé en comparaison du nombre total de bactéries comptées par épifluorescence à cette même profondeur ($5,6 \cdot 10^5$ bact./ml; M. Tonolla, communication personelle). Ceci est expliqué par la grande diversité des bactéries présentes à cette profondeur, cette valeur étant en parfait accord avec les comptages effectués dans d'autres lacs sur les mêmes entités (*Klaveness, 1977; Maki et al., 1987*).
- 68 mètres : La concentration en nombre/ml de l'entité dendritique de forme *Metallogenium* est encore plus élevée à cette profondeur, s'élevant à $2,6 \cdot 10^3$ formes comptées par ml. C'est l'espèce la plus fréquente, même si du matériel sans structure de type flocculé et provenant des strates supérieures est toujours visualisé. *Klaveness (1977)* totalise entre 10^3 et 10^4 entités de type *Metallogenium* par ml dans le lac Nordbytjern (Norvège) alors que *Maki et al. (1987)* en compte entre 0,2 et $2,8 \cdot 10^3$ par ml en fonction de la saison dans le lac Washington. Les entités trouvées dans le lac Washington sont par contre de plus grande taille avec des diamètres compris entre 10 et 20 µm.
- 75 mètres : L'aspect des entités dendritiques se modifie, laissant apparaître des cellules bactériennes, ayant à leur surface des films peu électron-denses, probablement composés d'oxyde de manganèse. D'autres entités sont fortement engainées et ne laissent plus percevoir de matériel biologique. La concentration en nombre/ml de ces espèces est par contre moins importante qu'à 68 mètres.
- 80 mètres : Quelques entités dendritiques sont encore observées à cette profondeur, mais en nombre décroissant, avec une tendance forte en faveur de bactéries portant des filaments sur leur surface, qui sont plus ou moins recouverts de films d'oxyde manganifère. Quelques particules de plus petite taille s'apparentant à des colloïdes rassemblés en nuage, se trouvent également à cette profondeur; ce sont les premiers oxydes de fer. Cette profondeur de transition n'exhibe pas d'espèce dominante, mais on observe toujours quelques particules provenant de la sédimentation des couches supérieures.

- 85 mètres : A cette profondeur, des colloïdes en grappes et associés à de la matière organique fibrillaire sont observés. Ces colloïdes sont très souvent proches, ou même associés aux entités dendritiques de type *Metallogenium*. Cette association provient probablement de l'effet catalytique du Mn(IV) pouvant se réduire en présence de Fe^{2+} pour former des oxydes de Fe(III) (*Davison et DeVitre, 1992*). Le diamètre des colloïdes de fer est proche de 75 nm (mesures TEM, n=50 entités)
- 90 mètres : Quelques restes très diffus d'entités dendritiques de type *Metallogenium* sont encore observés, associés à des colloïdes de fer de diamètre de 70-75 nm. La concentration en nombre des colloïdes de fer devient importante et représente en fait la classe la plus nombreuse. Ces colloïdes se présentent en grappes circulaires, reliées par des fibrilles, avec généralement une bactérie au centre de la grappe.
- 95 mètres : La dominance des colloïdes de fer est très nette, mais une variabilité au niveau de leur diamètre et de leur morphologie apparaît. Des sphérules de 70 nm sont constamment observées, accompagnées d'entités plus petites de diamètre proche de 40 nm. La grandeur des agrégats formés par ces colloïdes est dans une fourchette comprise entre 450 et 1450 nm (n=20 entités mesurées par TEM).
- 100 mètres : Les sphérules de diamètre de 70 nm ont presque entièrement disparu au profit de colloïdes plus fins, possédant une morphologie moins nette et un contour plus évasif. Leur taille oscille entre 20 et 30 nm et ils sont regroupés en chapelets de tailles comprises entre 200 et 1400 nm (n=20 entités).
- 105 mètres : Cette profondeur se distingue des précédentes par la grande quantité de bactéries observées. Les colloïdes très fins sont systématiquement agrégés; la structure de la sphérule a disparu au profit de formes amorphes. La taille de ces agrégats varie entre 220 et 660 nm.
- 110 mètres : Les tailles et aspects des colloïdes de cette profondeur sont très similaires à ce qui est trouvé à 105 mètres. La concentration en nombre du matériel sur la grille est plus faible, reflétant la fin du pic particulaire, comme observé par voie chimique.
- 120 mètres : Les colloïdes sont systématiquement amorphes, mais les agrégats résultants semblent plus courts, comme des fractions des espèces trouvées plus haut dans la colonne d'eau, leur taille variant de 110 à 350 nm.

Figure 4.20: Micrographies des particules observées dans la colonne d'eau du lac de Lugano; a: 60 m (03/96); b: 75 m (03/96); c: 85 m (05/96); d: 90 m (05/96); e: 95 m (03/96); f: 100 m (04/96); g: 120 m (04/96). Barres: 500 nm





g.

4.7.3 Résultats de l'analyse morphologique :

Les principales observations ressortant de la visualisation par microscopie électronique de la colonne d'eau montrent :

- La présence d'entités dendritiques entre 60 et 85 mètres. Cette espèce est initialement constituée de bactéries formant à leur surface des films d'oxyde de manganèse. Cette entité a été maintes fois décrite dans la littérature pour de nombreux systèmes naturels (*Jacquet et al., 1982; Klaveness, 1977; Maki et al., 1987*), et bien que sa structure soit controversée (*Emerson et al., 1989; W.C. Ghiorse, communication personnelle*) il est important de faire le point sur le problème. La forme observée dans le lac de Lugano a une structure similaire à celle décrite pour le *Metallogenium*, mais il serait erroné de l'apparenter au *Metallogenium* décrit par *Dubinina (1978b)*, où les dendrites renferment une excroissance cytoplasmique reliant les différentes cellules entre elles. La présence de fibres biologiques sur les extensions de l'entité est également remarquée par *Klaveness (1987)*, sans pour autant que l'origine biologique soit confirmée. Par contre la nature bactérienne de l'espèce observée dans le lac de Lugano semble incontestée, puisque les micrographies exhibent des cellules bactériennes au sein d'entités encore peu recouvertes d'oxydes de manganèse (voir ch. 4.8.1). La formation d'entités plus grosses et fortement électron-denses est très probablement le fruit d'une oxydation chimique du manganèse (*Maki et al., 1987*), catalysée par la couche d'oxyde formée initialement.

- La présence de colloïdes de fer intimement connectés à des fibrilles organiques est observée entre 80 et 120 mètres. Ces entités fibrillaires sont probablement des produits exocellulaires des bactéries observées aux même profondeurs.
- Ces colloïdes de fer sont associés de façon relativement systématique aux entités plus grosses d'oxydes de Mn dans les strates où cette espèce est encore présente. Plus profondément, les colloïdes de fer sont couramment associés à des bactéries. Les associations permettent d'expliquer les résultats de la spéciation du fer obtenue par voie chimique. La présence de colloïdes de fer avec des fibrilles organiques (10 nm < ∅ < 450 nm) et avec des bactéries (∅ > 0,45 μm) peut créer deux fractions de taille, particulaire et colloïdale, dans les couches d'eau proches du pic de fer particulaire.
- Une diminution de la taille des colloïdes individuels est observée, passant de 75 nm à 80 mètres à ~20 nm dans la zone des 120 mètres. La morphologie et la taille des entités, formées par l'agglomération de ces colloïdes au sein d'une matrice organique fibrillaire, est également modifiée avec la profondeur. Des colloïdes aux contours nets et formant des agrégats de l'ordre du micromètre sont observés à 80 m alors que des entités aux contours flous mesurant une centaine de nanomètres sont observés à 120 m.

4.7.4 Analyse physico-chimique

Le but initial de cette étude était d'étudier l'influence du cycle du fer et éventuellement celui du manganèse sur la spéciation du phosphore dans la colonne d'eau. En fonction des résultats obtenus par voie chimique, il a été démontré que le cycle du fer était certainement le principal responsable d'une interaction avec les phosphates, et que les particules de manganèse jouaient un rôle mineur. Pour les analyses physico-chimiques effectuées à l'aide du microscope électronique, nous avons donc porté nos efforts essentiellement sur les particules de fer. Les profondeurs analysées ont été choisies autour du pic de $Fe_{part.}$ (voir figure 4.19).

Pour chacun de ces ensembles profondeur/date, 100 analyses EDS ont été effectuées sur des groupes de particules individuelles (taille de la sonde: 400 nm) et seules les particules générant un signal de fer ont été analysées. Les argiles et autres particules non spécifiques de cette partie de la colonne d'eau ont donc été ignorées pour une plus grande lisibilité des

résultats. Il est important de spécifier qu'une partie des spectres contient tout de même des signaux provenant du silicium et/ou de l'aluminium, car certains de ces colloïdes sont associés à d'autres substrats (argiles, frustules de diatomées, matière organique), soit par agrégation entre particules, soit parce que le substrat peut servir de noyau de nucléation pour la croissance de $Fe_{part.}$.

Les élements analysés sont donnés dans la table ci-dessous avec l'énergie de la bande Kα caractéristique:

Table 4. 6: Eléments analysés et énergie de la bande Kα correspondante

Eléments:	Al	Si	P	S	Cl	Ca	Mn	Fe
Energie Kα (keV):	1.486	1.739	2.013	2.307	2.621	3.690	5.894	6.398

- **Conditions d'analyse:**

Les analyses physico-chimiques des particules et colloïdes présents dans la masse d'eau du lac de Lugano ont été effectuées sur un microscope électronique à transmission Philips CM-12, muni d'un détecteur SUTV avec une résolution de 149,2 eV sur la raie Kα du Mn.

Les conditions d'analyse, retenues après divers tests effectués sur les particules du lac de Lugano, sont les suivantes:

Angle de tilt: 20°; Agrandissement: 19500x; taille de la sonde: 400nm; temps d'accumulation: 30 secondes de temps de vie.

L'interprétation des spectres, la soustraction du bruit de fond et leur traduction en fichiers lisibles sous d'autres applications Windows s'est fait avec la version 2.11 du logiciel, prêtée par la maison Philips.

- **Rapport P/Fe:**

Pour la mesure du rapport molaire P:Fe au sein des entités colloïdales présentes entre 85 mètres et 120 mètres, nous avons synthétisé en laboratoire dans des conditions proches de celles du lac de Lugano des oxydes de fer en présence de phosphates. Leur caractérisation est présentée au chapitre 3.3. Ces colloïdes modèles ont également été caractérisés par microscopie électronique, dans les même conditions que celles utilisées pour les colloïdes de fer du lac, et ont servi de standards pour la détermination du rapport molaire P:Fe. Il

s'est avéré que la concentration en phosphates au sein des particules synthétisées au laboratoire est très proche de celle trouvée dans les colloïdes du lac de Lugano. Le facteur de standardisation est donné par l'équation suivante:

$$[P]/[Fe] = K \cdot (P)_{EDS}/(Fe)_{EDS}$$

[P], [Fe]: concentrations molaires

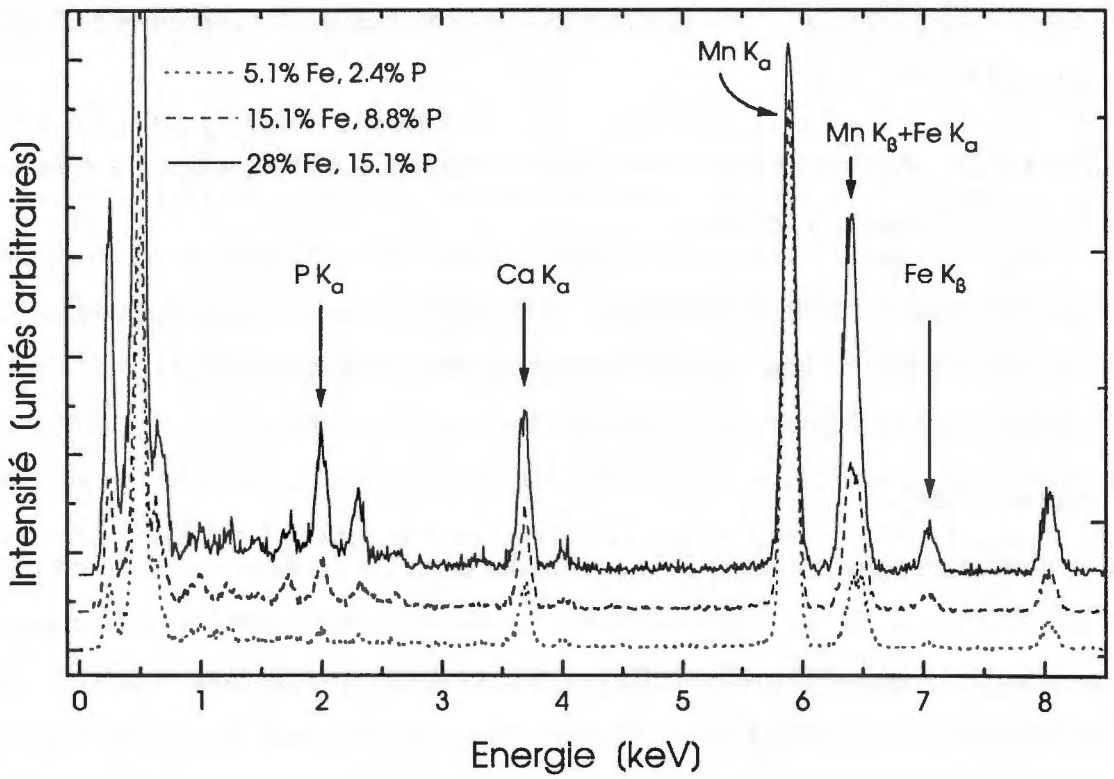
$(P)_{EDS}$, $(Fe)_{EDS}$: intensités des pics Kα sur les spectres EDS

Avec les standards synthétisés en laboratoire, on trouve K= 1,39 ± 0,18 (voir Figure 3.15). Pour les autres éléments présents dans les colloïdes de fer, aucune standardisation n'a été effectuée et les discussions se feront à partir des intensités de signaux EDS.

- **Entités du Mn:**

Bien que la littérature et notre étude chimique associent la chimie du phosphore à celle du fer, nous avons analysé un nombre restreint d'entités riches en manganèse, afin de déterminer dans quelle mesure cet élément est impliqué dans le piégeage des phosphates.

Figure 4.21: Spectres EDS effectués sur trois particules de Mn contenant des quantités variables de Fe et présentes dans le lac de Lugano.



Comme nous l'avons vu dans le chapitre 4.7.2, la plupart des particules de manganèse apparaissent comme des entités floconneuses et dendritiques, qui semblent être associées à des bactéries. L'analyse physico-chimique des ces entités révèle en effet le Mn comme élément majeur, mais le fer y est couramment détecté. Ceci est illustré sur la figure 4.21 qui montre trois particules contenant des quantités croissantes de Fe et de P. Ces spectres, pour lesquels la raie K_α du Mn a été normalisée, montrent clairement que l'influence du Mn sur le piégeage des phosphates est quasi nulle. Les concentrations respectives de Mn, de P et de Fe sont données dans la table 4.3. Les rapports P:Mn et P:Fe obtenus avec ces analyses montrent de façon évidente que le P n'est pas relié au Mn dans les structures analysées. Sur la figure 4.21, il est également clairement observé que la variation du pic du phosphore n'est relié qu'à la variation identique du pic de fer, prouvant par là l'importance du cycle du fer sur la partition des phosphates. Le rapport déterminé au sein des des particules de fer associées aux entités de Mn est identique à celui obtenu avec les particules non associées à Mn_{part}, il s'agit donc probablement des mêmes particules de fer.

Table 4. 7: Concentrations de Mn, de P et de Fe dans quelques agrégats riches en Mn.

% Mn (atom.)	% Fe (atom.)	% P (atom.)	P/Mn (%)	P/Fe (%)
82,2	5,1	2,4	2,9	47
75,1	9	4,8	6,4	53
68,9	12,9	6	8,7	47
65,1	15,1	8,8	13,5	58
56,9	19,8	10,8	19	55
56,1	19	12,1	21,6	64
43,4	28	15,1	34,8	54

4.7.5 Interprétation des résultats EDS:

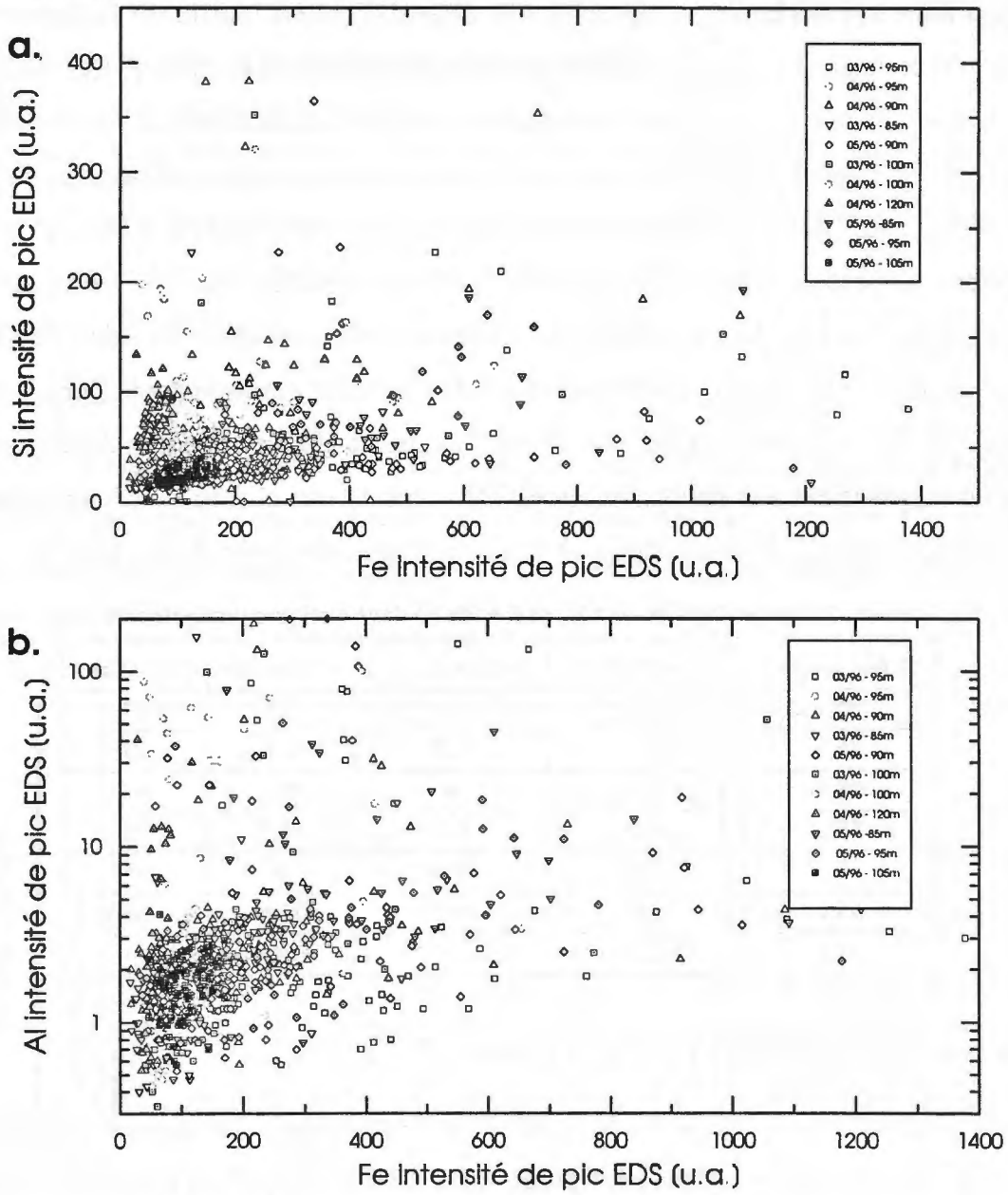
Les corrélations éventuelles entre les différents éléments présents dans les particules riches en fer, sont données dans les figures 4.22, 4.23, 4.24, 4.25 en intensités de pics EDS.

- Silicium, aluminium et fer:

Une différence est observée dans l'intensité des pics EDS de Si et d'Al. En ne considérant que les signaux dépassant une intensité de pic de 5 unités arbitraires (en dessous de cette valeur, la majorité des points ne constitue que l'intégration du bruit de fond et le signal n'a

plus de signification analytique; rapport signal/bruit < 3), des proportions non négligeables d'aluminium et surtout de silicium sont présentes dans les particules analysées.

Figure 4.22: Intensités de pics EDS entre Fe et Si (a) et entre Fe et Al (b).



La présence d'aluminium, corrélée à un signal de Si, (70 particules sur 1096 analysées) s'explique par l'agglomération d'argiles sur les colloïdes de fer; cette faible proportion de signaux mixtes entre Al et Si nous permet d'affirmer que les argiles sont en quantité assez faible dans cette strate particulaire et ne sont pas associées aux oxydes de fer dans le lac de Lugano. Une forte majorité de particules contient en revanche une concentration non nulle

de silicium. Si aucune réelle corrélation n'apparait entre le silicium et le fer, une explication sur l'incorporation du silicium dans les colloïdes de fer doit être cherchée ailleurs.

Ainsi, 37% des particules riches en fer analysées par *Leppard et al. (1988)* dans un lac eutrophe contenaient du Si; *Schwertmann et Thalmann (1976)* montrent que la présence de silicium dans les solutions de synthèse provoque la formation de ferrihydrite aux dépends de la lépidocrocite. Jusqu'à 4,4% de silicium est incorporé dans ces colloïdes, ce qui constitue 83% du silicium présent dans les solutions de départ et un rapport Si:Fe de 13%. Aucune limite d'incorporation n'est atteinte dans cette expérience, laissant supposer que de plus grandes concentrations de silicium peuvent être incorporées dans les particules de fer. De plus la désorption par voie chimique en modifiant le pH semble être sans effet, indiquant probablement que le Si est adsorbé irréversiblement ou incorporé dans la structure de la particule. L'analyse par infra-rouge de ces entités montre une bande de stretching Si-O à 940 cm^{-1}, indiquant des liaisons Si-O-Fe. Une autre étude (*Fortin et al., 1993*), effectuée sur des particules récoltées sur des plaques de Teflon™ incorporées dans des sédiments lacustres, montre des teneurs en Si variant entre 3 et 18% dans 8 lacs sondés. Ces auteurs indiquent également que l'adsorption ne suffit pas à expliquer la forte teneur en silicium de ces colloïdes de fer. Si les observations effectuées sur le lac de Lugano ne permettent pas d'expliquer les phénomènes d'incorporation du silicium au sein des colloïdes de fer, la concentration de 1 ppm de Si dissous à 100 m permet, en accord avec les exemples tirés de la littérature, de supposer que du silicum est incorporé dans les colloïdes de fer.

- Calcium et fer:

Trois tendances apparaissent (Figure 4.23) en ce qui concerne le rapport entre le fer et le calcium. Une majorité des colloïdes (60%) ne contiennent pas de calcium, avec des signaux inférieurs à 5 unités arbitraires. Durant toutes les campagnes, seules les profondeurs de mars (100 m), avril (100 et 120 m) et mai (85 m) se sont avérées contenir du calcium, les rapports de signaux EDS entre Ca et Fe variant entre 23% et 100%. Aucune explication ne permet d'expliquer cette variabilité, la même diversité étant observée par *Fortin et al.*

(1993) qui ont mesurés des teneurs variant entre 0,35 et 11 % en calcium au sein de colloïdes de fer prélevés à l'aide de collecteurs Teflon™.

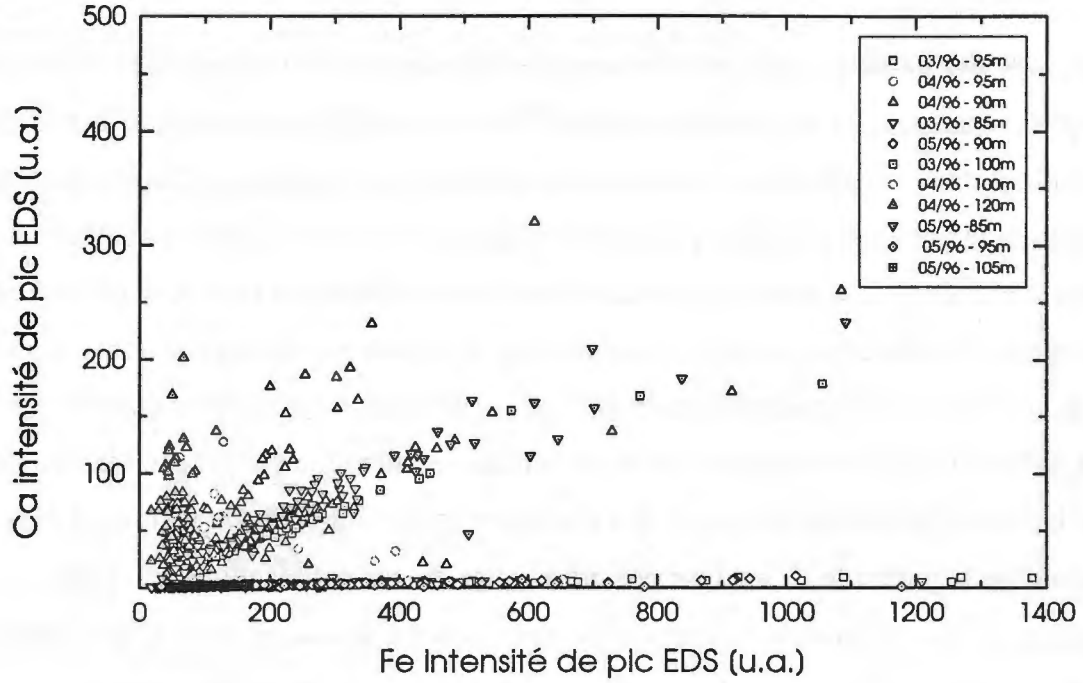


Figure 4.23: Intensités de pics EDS entre Fe et Ca.

Une étude similaire (*Perret, 1991*), menée sur le lac de Bret pendant la saison estivale, a montré que de petits colloïdes de taille inférieure à 40 nm avaient une composition différente de celle des colloïdes de taille supérieure à 40 nm, avec des rapports molaires P:Fe variant de 0,09 ± 0,04 (taille < 40nm) à 0,25 ± 0,06 (taille > 40 nm) et Ca:Fe de 0,65 ± 0,63 à 0,19 ± 0,05. Ces analyses, bien qu'effectuées sur un très petit nombre de particules, supposent que les petits colloïdes pourraient être enrichis en calcium essentiellement.

- Phosphore et fer:

Le cas du phosphore est le plus intéressant avec une corrélation très forte avec le fer (Figure 4.20). En utilisant le facteur de standardisation donné dans le chapitre 4.7.4, le rapport molaire entre phosphore et fer au sein des particules analysées est de 0,48 ± 0,11 (n=1096) toutes profondeurs et dates confondues. En observant l'évolution du signal avec la profondeur, on peut voir que les profondeurs situées dans le pic particulaire produisent les signaux EDS les plus intenses alors que plus on s'éloigne du pic, plus l'intensité des signaux P:Fe diminue. Cette tendance est expliquée par la densité des colloïdes présents sous le faisceau de 400 nm de diamètre lors des analyses. Comme nous l'avons observé sur les

micrographies, la taille des colloïdes et des entités formées par ces derniers diminue avec la profondeur, diminuant en conséquence la masse particulaire analysée sous le faisceau électronique. Il est également intéressant de noter qu'aucune variation temporelle et spatiale dans le rapport P:Fe n'est observée dans la colonne d'eau, ce qui signifie que les phosphates ne se trouvent jamais en facteur limitant lors des associations avec le fer. En effet si l'on compare le rapport trouvé dans les particules de fer avec la concentration en P total moyen dans lac de Lugano (150 µg/l), et la concentration totale et moyenne du Fe (140 µg/l; *Barbieri et Mosello, 1992*), il est évident que le phophore est jusqu'à deux fois en excès dans le lac par rapport au fer. Si l'on considère le flux de phosphates montant dans la colonne d'eau, il est donc fort probable que ce flux soit freiné par la formation de particules de fer, mais qu'il ne soit pas stoppé.

En fonction du rapport constant (0,48 ± 0,11) trouvé par microscopie électronique au sein des particules contenant Fe et P, la question suivante revient à savoir si les phosphates sont adsorbés sur les colloïdes de fer ou s'ils sont incorporés dans la phase amorphe qui constitue ces colloïdes. La très forte corrélation entre Fe et P, ainsi que la concentration particulièrement élevée de phosphates dans les particules de fer, nous permet d'avancer l'idée qu'une phase stoechiométrique, plutôt qu'un phénomène d'adsorption, est responsable du piégeage des phosphates dans les particules de fer.

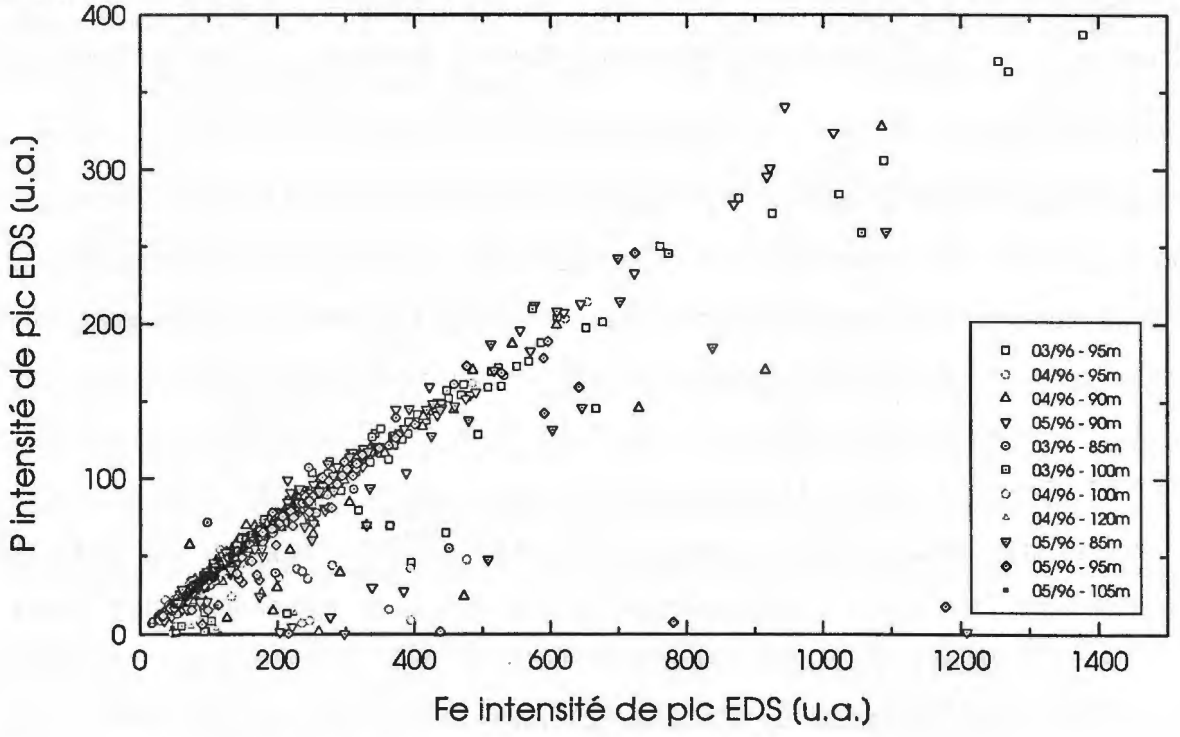


Figure 4.24: Intensités de pics EDS entre Fe et P.

Cette hypothèse a déjà été mentionnée lors des expériences de *Tessenow* en 1974, qui montre qu'une précipitation stoechiométrique de phosphates inorganiques de fer est attendue à partir du moment où le rapport molaire P:Fe est inférieur à 0,5 dans la fraction dissoute initiale. La composition chimique de la phase minérale attendue est $Fe_2(OH)_3PO_4$ avec une compétition entre les phosphates et les ions hydroxyles à pH élevé. Cette structure donne un rapport P:Fe de 0,5, qui est en accord avec nos résultats pour la phase particulaire. Des mécanismes de formation des oxydes de fer et l'éventuelle incorporation des phosphates au sein des arrangements atomiques sont également discutés par *Rose et al. (1997)* et *Lijklema (1980)*, où une incorporation des phosphates est deux fois plus efficace lorsque les oxydes de fer sont formés en présence de phosphates, contrairement à une situation où la particule est formée dans un premier temps puis mise en présence de phosphates.

La même conclusion est obtenue par différents auteurs ayant travaillé sur des oxydes de fer synthétiques (*Tipping et al., 1989*) ou naturels (*Fortin et al., 1993; Buffle et al., 1989*). Ainsi pour *Tipping et al. (1989)*, entre 5 et 13% des phosphates mis à disposition ont été incorporés lors de la formation des colloïdes alors que *VonGunten et Schneider (1991)* arrivent à un rapport P:Fe de 0,25 avec des colloïdes synthétiques ayant un diamètre entre 2 et 40 nm, et des groupements phosphates recouvrant jusqu'à 45% de la surface totale.

Le même rapport molaire moyen (P:Fe=0,25) est obtenu dans un petit lac stratifié par *Buffle et al.(1989)*, ce rapport étant indépendant de la saison et de la profondeur, tendant une fois de plus à la conclusion que les phosphates ne sont pas adsorbés à la surface des colloïdes, mais probablement co-précipité ou inclu dans une phase mixte entre Fe et phosphates. Des expériences menées par *Rose et al.(1996, 1997)* révèlent par des mesures EXAFS (Extended X-Rays Absorption Fine Structure) que la polymérisation du fer par hydrolyse en présence de phosphates en solution est très différente de l'hydrolyse de Fe en solution pure. Cette même étude montre que les tétraèdres du phosphate sont déja présents dans les oligomères de fer initiaux et font de ce fait partie de la structure amorphe des oxyhydroxydes. Cette hypothèse, appliquée sur le milieu naturel, est également renforcée par nos résultats, qui montrent après l'examination des 1096 rapports Fe:P mesurés sur les

particules qu'une très forte majorité (90%) des points est située exactement sur la droite P:Fe ~ 0,5.

Dans un second temps, nous observons que la presque totalité des points situés en dehors du rapport P:Fe~0,5 sont présents en dessous de ce dernier alors qu'aucun ne l'est en dessus. Ce résultat montre clairement que, dans le cas du lac de Lugano, aucune phase de phosphates de fer n'est possible avec un rapport supérieur à un atome de P pour deux atomes de Fe. Ceci est également renforcé par le fait que notre valeur du rapport molaire P:Fe de 0,48 se situe en dessus des différents rapports trouvés dans divers milieux naturels.

Tessenow (1974) trouve également lors de ses synthèses de laboratoire que le rapport molaire P:Fe dans les précipités n'est jamais supérieur à 0,5. Ces résultats sont confirmés par *Gupta et al. (1979),* qui montrent qu'après introduction de $FeCl_3$ dans des solutions d'ortho-phosphates, 100% des phosphates ne sont piégés à partir du moment où le rapport molaire P:Fe au sein de la solution est égal ou inférieur à 0,5 quel que soit le pH. Finalement *Mayer et al. (1982)*, en milieu naturel, montrent que le rapport P:Fe n'excède pas 0,455 dans le bas de l'hypolimnion. Ces observations sont d'autant plus frappantes que la concentration en P dans le lac de Lugano est en excès par rapport au Fe. Il serait donc possible de former des entités riches en fer contenant plus de P. Ces expériences tendent donc à montrer que si une phase mixte entre phosphates et Fe(III) est possible en milieu naturel, le rapport maximal entre P et Fe sera de 0,5, selon une formule chimique proche de $Fe_2(OH)_3PO_4$.

- Chlore, soufre et fer

Aucune corrélation ne se dégage entre les quantités mesurées de chlore et de soufre (Figure 4.25). Les colloïdes de fer prélevés en avril entre 100 et 120 mètres contiennent une quantité plus importante de soufre et de chlore, mais également une phase enrichie en silicium, calcium et aluminium pour les colloïdes prélevés à 120 mètres.

Ces observations sont à modérer en fonction des conditions d'analyse, car si le faisceau d'électrons reste toujours le même, la taille du matériel concerné sous la surface irradiée (0,13 μm^2) varie avec la profondeur, comme nous l'avons déjà mentionné. *Fortin et al.*

(1993) montrent également que des concentrations très variables en ions chlorures (1,2 à 5,7%) peuvent être trouvées au sein de colloïdes de fer. En ce qui concerne le soufre, il est possible que pour les profondeurs de 110 et 120 mètres, un début de précipitation de FeS soit observé. Cette tendance a déjà été relevée au ch. 4.6.4.

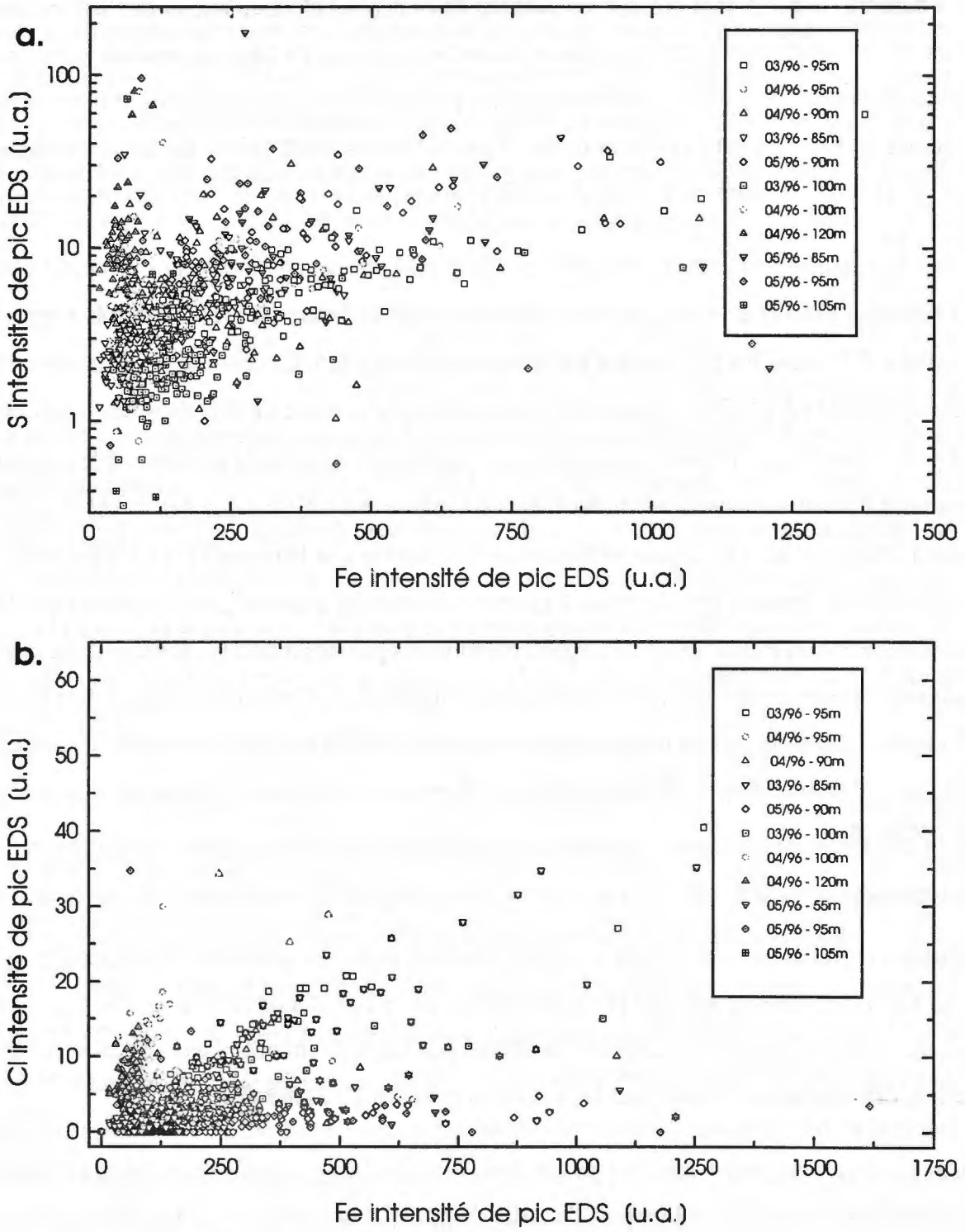


Figure 4.25: Intensités de pics EDS entre Fe et S (a), respectivement Fe et Cl (b).

En se basant sur l'étude de *Fortin et al. (1993)*, qui montrent que la présence de chlorures et de calcium pourrait être principalement dirigée par l'adsorption alors que sulfates et phosphates sont plutôt inclus dans les oxydes de fer, il est possible d'expliquer la plus forte concentration des chlorures au sein des entités présentes à 100 et 120m. En effet si ces colloïdes ont des tailles nominales plus faibles que les colloïdes observés dans le pic de fer particulaire (20-30 nm, respectivement 75 nm), leur surface spécifique s'en trouve accrue et l'adsorption nette est susceptible d'augmenter.

4.8 Interprétation des résultats (comparaison chimie-TEM)

4.8.1 Les entités du manganèse

L'observation des entités dendritiques de manganèse au cours de la saison et le long de la colonne d'eau nous a permis d'observer plusieurs étapes dans la formation d'une espèce digitiforme, de densité électronique élevée et similaire à l'espèce *Metallogenium*. Sa similitude avec cette espèce est à prendre avec précaution puisque son origine biologique semble controversée. En effet, plusieurs tentatives d'identification (*Klaveness, 1977; Emerson et al., 1989*) n'ont pas permis de déceler la présence de matériel biologique au sein d'entités dendritiques provenant de différents milieux lacustres. Dans notre cas et en se référant à nos observations, la formation de l'entité présente dans le lac de Lugano semble être induite par une bactérie, présente au centre d'entités encore peu recouvertes de MnO_x, et formant probablement rapidement (par catalyse chimique, voir ch.2.2) une concrétion fortement électron-dense. Cette évolution est présentée sur la figure 4.26 où la bactérie est représentée par une sphère grisâtre présente dans les trois premières micrographies. Il reste cependant à savoir si cette bactérie survit lorsqu'elle est intégralement recouverte d'une couche dense d'oxyde de Mn, formée probablement par la réaction d'autocatalyse du MnO_x. Non seulement l'hypothèse d'une survie est incertaine par le fait que les échanges avec l'extérieur se trouvent certainement très limités, mais il est également pro-bable que les produits de marquage pour microscopie optique conventionellement utilisés par les microbiologistes, tel que le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) n'arrivent pas à traverser une couche si dense pour atteindre le matériel cellulaire de la bactérie (*Dr. M. Tonolla, communication personelle*).

La forme en feuillet (sheath) des précipités riches en Mn est à mettre en relation avec les observations de *Hem (1981)*, qui montre que la formation chimique d'oxyde de manganèse synthétique est induite par la perte de molécules d'eau avec formation d'un précipité qui se met en feuillet. En tenant compte:

- 1) de la composition des produits exocellulaires excrétés par les bactéries, qui sont un mélange complexe entre polysaccharides, peptides et lipides (*Ghiorse, 1984*),
- 2) des micro-gradients de pH (valeurs jusqu'à pH=10) mesurés par micro-électrode, présents à la surface des bactéries et pouvant favoriser l'oxydation indirecte du Mn^{2+} (*Nealson et al., 1988*),

il est possible d'estimer que la présence de structures biologiques favorise ce phénomène d'oxydation chimique et que les produits observés sont formés autour de la bactérie sans que celle-ci en tire un quelconque profit. L'association serait alors fortuite et pourrait conduire à la mort de l'organisme qui serait dégradé tandis que la croissance chimique se poursuivrait sur la coque formée. La microscopie électronique montre également que des particules digitiformes sont en association avec des colloïdes de fer (dans les couches se situant entre la zone de formation des oxydes de manganèse et le maximum du pic du fer). Cette association peut avoir deux origines:

- La première consiste en la réaction redox entre le $Mn(IV)_{part}$ et le Fe^{2+}, où la présence d'oxyde de manganèse peut catalyser la formation des oxydes de fer (*Davison et DeVitre, 1992*). Ce phénomène a déja été invoqué lors de l'analyse chimique et est parfaitement illustré par les profils chimiques du mois d'avril (voir figure 4.13).
- Il est d'autre part possible que la bactérie encroûtée d'oxydes de manganèse excrète des polysaccharides libres susceptibles de servir de centres de nucléation pour la production de particules riches en fer, en accord avec la littérature (*Manns, 1988; Degens et Ittekkot, 1982*).

En conclusion, ainsi que nous l'avons mentionné aux ch. 4.6.6.2 et 4.7.5, il nous est possible de prouver que les phosphates sont bien associés avec le fer et que les associations avec le manganèse sont fortuites. Cette observation est renforcée dans le cas de la microscopie électronique puisque, à l'échelle des particules individuelles de MnO_x, les rapports P:Mn ne sont pas du tout corrélés, tandis que les rapports P:Fe le sont fortement.

Ceci peut être expliqué par un phénomène d'adsorption ou de coprécipitation/adsorption de phosphates de fer sur MnO_x, étant donné que leurs charges sont opposées au pH régnant dans le milieu naturel (*Hem, 1981*).

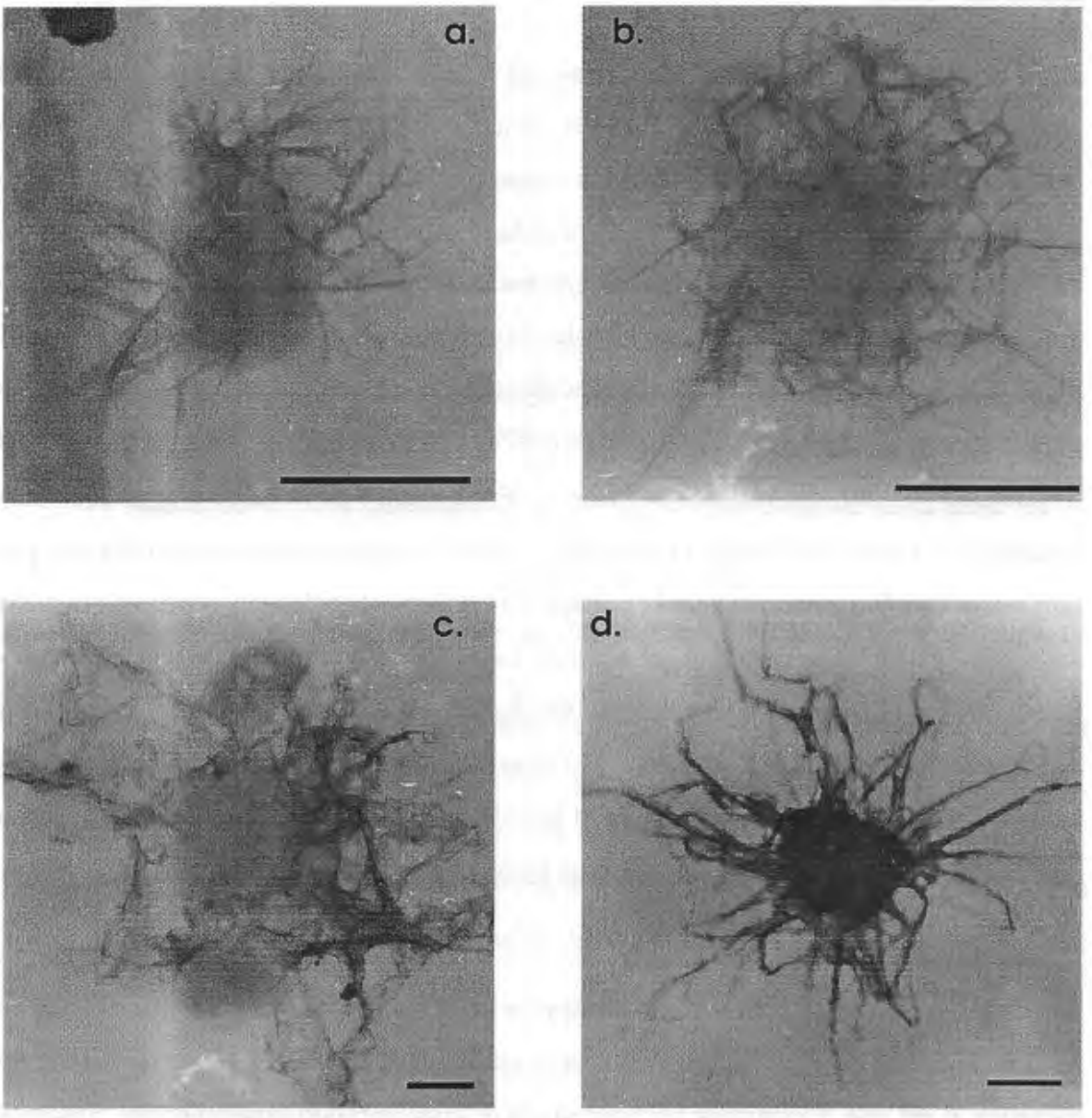


Figure 4.26: Evolution possible (a → b→ c→ d) de la structure proche de *Metallogenium* et donnant lieu à un produit final, dont les caractéristiques vivantes sont encore très contestées. Barres: 500 nm.

4.8.2 Les entités du fer

Au niveau des entités particulaires riches en fer, la microscopie électronique permet d'obtenir des informations qui ne nous sont pas accessibles à l'aide des analyses chimiques seules.

Ainsi la microscopie démontre l'importance de réseaux fibrillaires connectant les entités contenant du fer et du phosphate. En effet, chacune des sphérules analysées est presque systématiquement associée à de la matière organique, dans des entités particulaires de plusieurs micromètres. Ceci se reflète également dans le spectre EDS (Figure 4.27), où le pic du C (0,277 keV) est présent systématiquement en proportion importante. La quantification de ce dernier est par contre impossible puisque le support du spécimen est composé d'une couche de collodion et d'une couche de carbone. L'association entre C et Fe est en parfait accord avec *Koenings et Hooper (1976)*; *Tipping et al. (1981)* et *Stauffer et Armstrong (1986),* qui mettent en évidence l'importance de la matière organique colloïdale sur la partition du fer et des phosphates. La même observation est faite par *Ghiorse (1984)* qui montre que la présence de polysaccharides est systématiquement associée à la déposition de fer, et qui explique ce fait par une attraction de type électrostatique entre les charges négatives des polysaccharides et la charge de surface positive des oxyhydroxydes de fer. En précurseur, *Tessenov (1974)* émet l'hypothèse que des bactéries participent dans la formation et la précipitation de phosphate de Fe(III) parce qu'elles accélèrent l'oxydation du Fe^{2+} sous les conditions de pH et d'oxygène favorables.

L'importance de ces bactéries est probablement sous-estimée dans la littérature en ce qui concerne la catalyse de la formation des oxydes de fer. En accord avec *Hofmann (1996)* et le fait que les oxydes de fer sont systématiquement regroupés en amas autour de bactéries, il est aisé d'expliquer le changement de concentration saisonnier des colloïdes de fer. En effet cette évolution peut essentiellement être ramenée à la variation saisonière de la population bactérienne. Les mois de mars et avril correspondent à une importante population de diatomées (*Lami et al., 1992*) dans l'épilimnion. Cette croissance est relayée par d'autres espèces dès le mois de mai, accompagnée d'une sédimentation massive de diatomées, créant une source de matières organiques facilement assimilables dans

la zone de 70 à 100 mètres. Cet apport de matériel biologique favorise la croissance des bactéries présentes à l'interface oxique/anoxique.

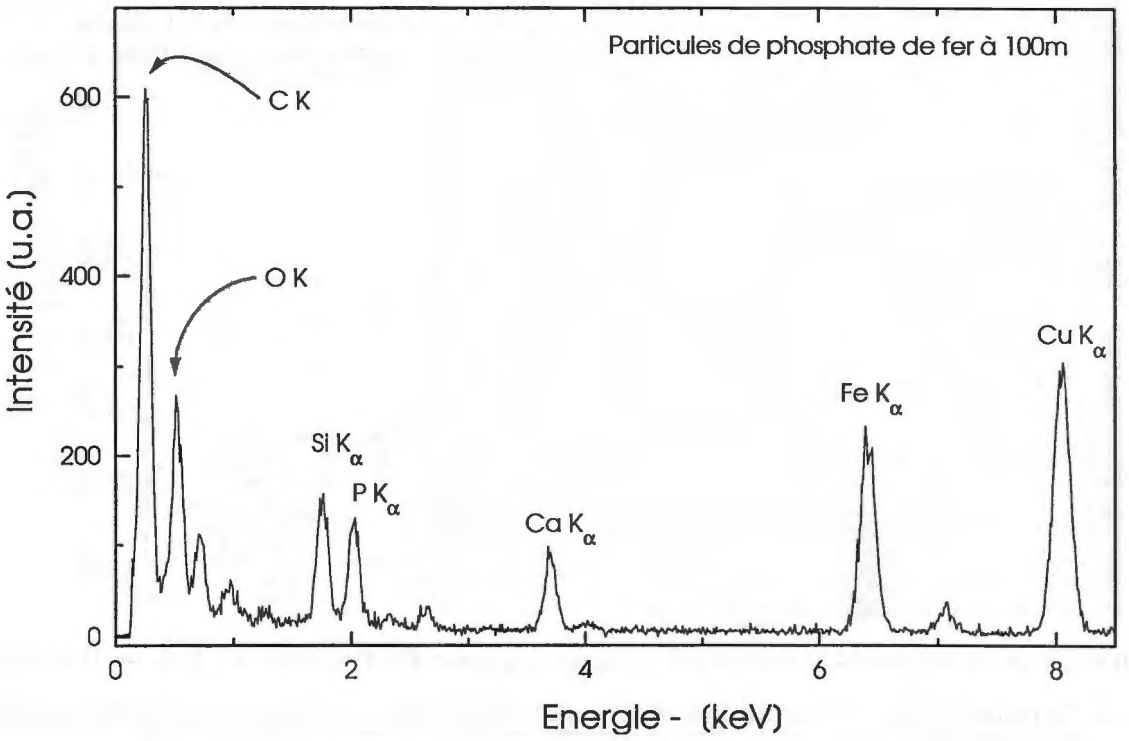


Figure 4.27: Spectre EDS de granules de fer présents à 100m et montrant la présence de C et d'O en grande quantité.

La présence soudaine de fibrilles de matière organique dans la périphérie des bactéries présentes à cette profondeur n'est pas un fait nouveau puisque certains auteurs (*Leppard, 1995; Cowen et Silver, 1984*) montrent des faits similaires dans les milieux naturels. Des investigations menées dans l'épilimnion du lac de Lugano montrent également une grande quantité de fibrilles présentes à ces profondeurs, fibrilles qui ne sont révélées que par syntonisation de phase (Figure 4.28).

Le mécanisme par lequel les bactéries peuvent influencer la croissance des oxydes de fer n'est pas connu. Cependant il est probable que l'oxygène des groupes carboxyles et hydroxyles des polysaccharides puisse servir dans la structure de formation du premier monomère de fer, comme l'ont postulé *Manns (1988)* et *Degens et Ittekkot (1982)*. L'augmentation du nombre potentiel de sites d'oxydation, par la croissance de bactéries produisant des exopolymères, est donc susceptible de favoriser son oxydation.

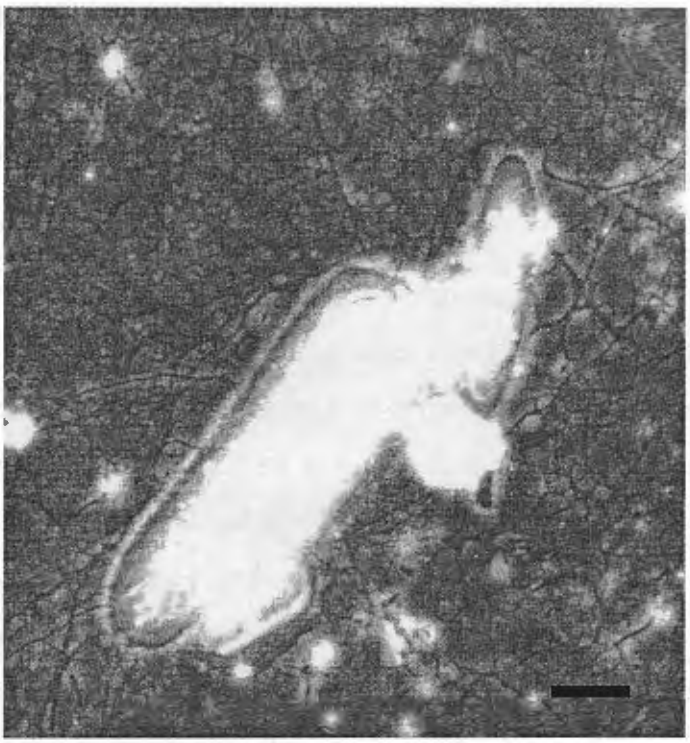


Figure 4.28: Micrographie en mode de syntonisation de phase montrant la grande quantité de fibrilles présentes autour de bactéries dans l'épilimnion du lac de Lugano, et invisibles en mode conventionnel. Barre: 600 nm.

Un autre point concerne la différence entre les rapports P:Fe trouvés à l'aide de la chimie et de la microscopie électronique. Alors que le fractionnement par tailles ne permet d'obtenir que des valeurs P:Fe élevées et à forte variablité, la microscopie montre sans équivoque un rapport P:Fe extrêmement constant tout au long de la saison et pour toutes les profondeurs.

La corrélation entre Fe et P est donnée sur la figure 4.29, telle qu'elle est obtenue par les analyses chimiques sur les membranes, ainsi que par analyse EDS sur les particules individuelles. Bien que les résultats obtenus sur les membranes soient meilleurs que ceux obtenus par spéciation ([brut]-[filtré]; [filtré]-[ultrafiltré]), la corrélation est moins bonne que celle obtenue par EDS. De plus la valeur du rapport molaire P:Fe sur les membranes est de 0,544 +/- 0,58 possède une variabilité beaucoup plus élevée que celle obtenue par la microscopie. Cela peut être expliqué par le fait que du phosphate dissous s'adsorbe probablement sur les membranes lors de l'étape de filtration, augmentant de façon significative le rapport entre P et Fe. Des expériences menées en laboratoire (*Perret, 1991*) ont montré que les phosphates pouvaient être retenus à la surface des membranes de filtration supportant un film d'oxyhydroxydes de fer synthétiques, et cela jusqu'à 30% de la concentra-

tion initiale filtrée. Cette étude a également montré que cette rétention était fonction du volume filtré et de la masse de fer présente sur la membrane.

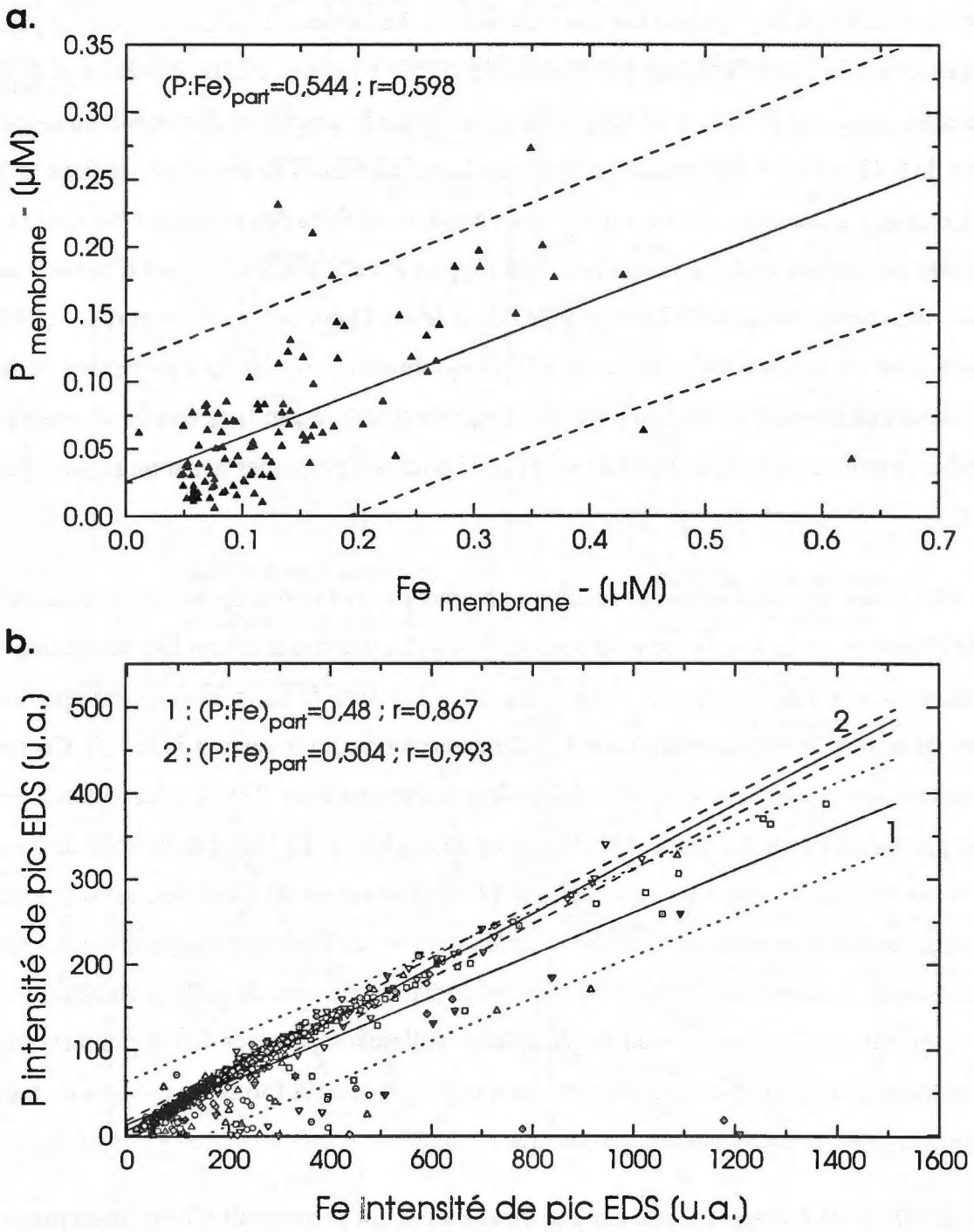


Figure 4.29: Corrélations P:Fe telles qu'elles sont obtenues par la voie chimique (a: matériel particulaire récupéré sur les membranes) et à l'aide de la microscopie électronique (b: rapports de signaux EDS).

Bien que cet effet se soit révélé négligeable pour les études de terrain menées par l'auteur, il est probable que la grande concentration de phosphates dans le lac de Lugano induise une rétention non négligeable sur nos membranes. Les résultats, présentés pour la partie microscopique dans la figure 4.29, sont regroupés sous deux corrélations 1 et 2. La première prend en compte tous les points présents sur le graphique et conduit au rapport P:Fe de 0,48, tel qu'il est mesuré sur l'ensemble des particules de fer présentes dans le lac de Lugano. La seconde droite est obtenue en considérant 90% des particules présentes (en prenant en compte tous les points ayant un rapport P:Fe > 0,32) et permet d'obtenir une meilleure corrélation (r=0,993 contre 0,867 dans le cas 1) qui donne un rapport de 0,504 ± 0,046 avec un intervalle de confiance (95%) extrêmement réduit. Les particules de fer, présentant ce rapport, possèdent probablement une structure similaire à celle obtenue par synthèses et déterminée par *Rose et al. (1997)* pour des particules ayant un rapport P:Fe de 0,5.

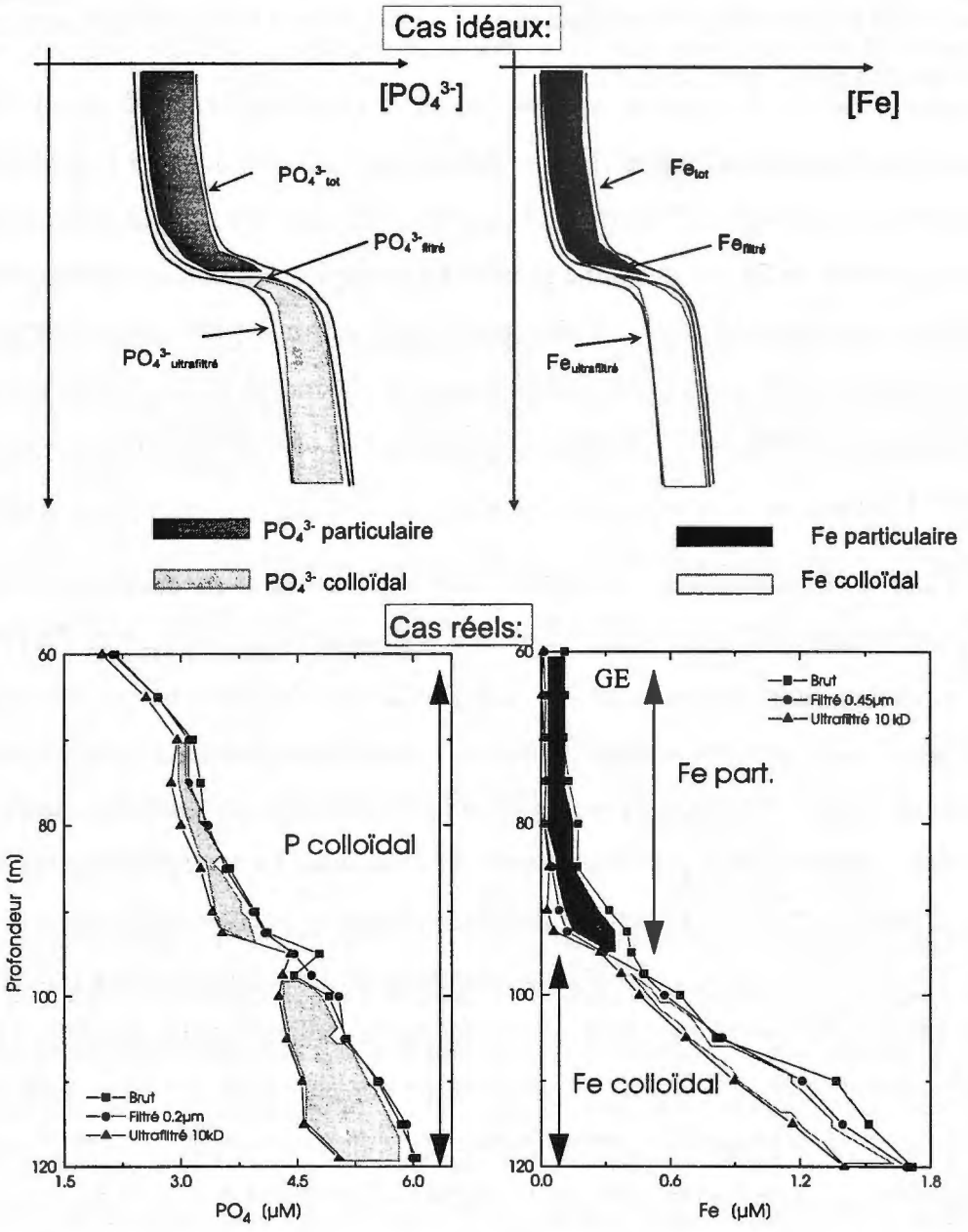
La différence marquée entre les résultats obtenus par la microscopie électronique et la voie chimique après fractionnement nous amène à discuter des artefacts liés au schéma de fractionnement. En effet cette procédure sépare des classes de taille, et ne permet pas toujours de trouver les associations entre les éléments comme nous venons de le voir. Ceci est démontré dans le cas de notre étude où la valeur du rapport entre P et Fe et sa variabilité ne sont pas valides avec les méthodes classiques de la chimie. La phase colloïdale de phosphate de fer(III) regroupé en amas sur des fibrilles et autour de bactéries, est une entité particulaire extrêmement bien définie selon les résultats de l'analyse spectrométrique sous microscope. Au contraire, l'approche utilisant le fractionnement de taille porte, au dessus de 95 m, sur une forte proportion de phosphates colloïdaux pour une faible proportion de fer colloïdal, ce dernier étant principalement regroupé sous la forme de grappes de taille particulaire (Figure 4.30) à cette profondeur.

Le cas du lac de Lugano est très éloigné du cas idéal qui permettrait d'obtenir un rapport entre phosphates et fer par la comparaison des classes de taille; si l'on regarde en dessous de 95 m, le fractionnement regroupe :

- des entités colloïdales riches en phosphates, mais ne contenant certainement pas de fer (qui sont probablement les mêmes que les colloïdes des couches supérieures),

- des entités colloïdales riches en soufre et en fer telles qu'elles sont révélées par la microscopie électronique, mais ne contenant probablement que peu de phosphates,
- des entités qui contiennent fer et phosphates et représentant l'espèce d'intérêt.

Figure 4.30: Cas idéaux et cas réels pour la comparaison des phases particulaires et colloïdales de Fe et de PO_4^{3-}.



Le regroupement et la non différenciation de ces particules d'origines diverses présentes dans toute la colonne d'eau pour la mesure du rapport molaire P:Fe créent artificiellement un rapport colloïdal élevé et mal corrélé, provoqué par la forte concentration de phosphates colloïdaux présents entre 70 et 120m. Le rapport obtenu sur la phase particulaire est

faussé par la faible concentration des phosphates particulaires. L'erreur sur la mesure analytique devient donc importante et les problèmes de fractionnement sont inévitables, regroupant une partie de la phase colloïdale sur la membrane censée séparer les particules des autres phases. On peut donc en conclure que l'approche chimique n'est pas assez sélective et que la séparation des particules et colloïdes devrait être basée sur la nature des entités présentes plutôt que sur leur taille.

Un dernier point concerne la modification de structure des colloïdes de fer observée en fonction de la profondeur. Les entités individuelles trouvées dans le pic particulaire ont des tailles proches de 75 nm avec une structure sphérique bien déterminée, regroupées dans des amas autour de bactéries. A plus grande profondeur, les colloïdes de fer ont une taille beaucoup plus petite, de l'ordre de 25 nm, avec une morphologie spongieuse, beaucoup moins bien définie, la "structure-mère" regroupant colloïdes, fibrilles et bactéries étant perdue.

Ceci peut être expliqué par la sédimentation d'oxyhydroxydes de fer dans des couches de plus en plus réductrices, conduisant lentement à la dissolution de ces entités. Des expériences menées dans notre laboratoire (*Del Ruiz Cantero, 1996*) montrent en effet que lorsque des oxydes de manganèse et de fer sont immergés dans des conditions réductrices, une altération de la morphologie se produit: Les particules ayant initialement une structure fine et précise prennent un aspect fangeux et mal déterminé. Cette explication est en parfait accord avec les mesures effectuées dans les sédiments en dessous du site prélevé au large de Gandria (*Span et al., 1992a*), qui montrent que des concentrations inférieures à 0,1 % en Mn sont mesurées au sein du sédiment, ce qui indique que les conditions réductrices provoquant la dissolution de la quasi totalité des phases de Mn avant leur arrivée dans le sédiment. Les phosphates présents dans les sédiments sont également en très faibles concentration, et seulement 30% sont associés à des phases de fer ou de manganèse, ce qui amène la concentration de P associé au fer à moins de 1‰ dans les sédiments. De plus le profil des phosphates dans le sédiment est droit, indiquant par là qu'un état d'équilibre est atteint, sans accumulation de P sur le fond du sédiment. Il est donc fort probable que les entités P:Fe soient également et graduellement réduites lors de la sédimentation et relarguent PO_4^{3-} et Fe^{2+} sous forme dissoute, sans atteindre le sédiment.

4.9 Utilisation des plaquettes de Teflon™

Les investigations sur le lac de Lugano nous ont également permis de terminer la mise au point d'une nouvelle méthode de prélèvement. La procédure, basée sur la récupération de phases authigènes sur des plaques de Teflon™ insérées verticalement dans une suspension où des particules sont fraîchement synthétisées, a été adaptée dans nos laboratoires et est décrite au ch. 3.4. Les premiers mois ont été une période de test où de nombreux problèmes liés aux conditions *in situ* se sont révélés importants. Parmi les différentes innovations qui nous ont permis d'appliquer par la suite cette procédure sur le lac Paul, il est important de noter ici les progrès effectués:

- Les grilles de microscopie électronique en cuivre sont à proscrire pour l'étude des milieux naturels à l'aide des plaquettes Teflon™. Il s'est avéré dès le premier essai que les plaques insérées dans la zone anoxique ne permettaient pas de récupérer les grilles, celles-ci étant dégradées par les conditions chimiques des eaux profondes. Des grilles en or ont alors été utilisées avec succès. Elles sont retenues sur la plaque de Teflon™ par deux fines lamelles de bande adhésive (~1mm) double-face (voir figure 4.31).
- Le système de fixation de la plaque de Teflon™ sur la corde porteuse a maintes fois été revu et corrigé. Finalement, la fixation de la plaque a été assurée par un o-ring d'un diamètre de 4,4 cm, qui s'enchasse sur la plaque maintenue sur la corde, comme décrit dans la figure 4.31.
- La durée d'immersion des plaques de Teflon™ dans la colonne d'eau semble dans le cas du lac de Lugano être assez élevée. Il est difficile de donner une règle permettant de relier turbidité et temps nécessaire à l'accumulation de matériel particulaire, par le fait que la variation des stocks colloïdaux et particulaires de fer et de manganèse varient eux-même dans la période d'investigation. Cependant pour le lac de Lugano, exhibant des turbidités inférieures à 1 ftu, le temps de séjour nécessaire est de deux mois. Cette période permet de récupérer entre 5 et 12 µg de matériel particulaire par plaque (ϕ=8 cm) en période de charge faible, jusqu'à environ 28-35 µg pour les mois de mars et avril.

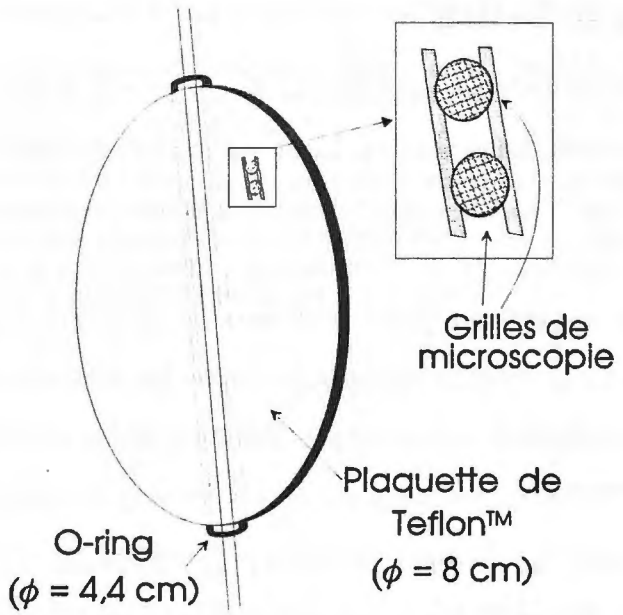


Figure 4.31: Mise en place des plaquettes Teflon™ sur la corde, et positionnement des grilles TEM.

En se basant sur ces observations, 20 plaques ont été insérées au sein de la colonne d'eau aux profondeurs décrites dans la table ci-dessous:

Table 4. 8: Investigations avec les plaques Teflon™ dans la saison; c = investigations chimiques; t = investigations par microscopie électronique; - = pas de plaque à cette profondeur

Profondeur:	4/10-2/11/ 95	1/11-15/12/ 95	15/12-7/2/ 96	12/1-29/2/ 96	29/2-4/4/ 96
45 m	c/t	-	c	-	c
65 m	c/t	c/t	c/t	c	c
68,5 m	c	c	c	c	c
72 m	c/t	c/t	c/t	c	c
75,5 m	c	c	c	c/t	c
79 m	c/t	c/t	c/t	c/t	c
82,5 m	c	c	c	c/t	c
86 m	c/t	c/t	c/t	c	c
89,5 m	c	c	c	c/t	c
93 m	c/t	c/t	c/t	c/t	c
96,5 m	c	c	c	c/t	c
100 m	c/t	c/t	c/t	c	c
103,5 m	c	c	c	c/t	c
107 m	c/t	c/t	c/t	c	c

Table 4. 8: Investigations avec les plaques Teflon™ dans la saison; c = investigations chimiques; t = investigations par microscopie électronique; - = pas de plaque à cette profondeur

Profondeur:	4/10-2/11/ 95	1/11-15/12/ 95	15/12-7/2/ 96	12/1-29/2/ 96	29/2-4/4/ 96
114 m	c	c	c	c/t	c
139 m	c/t	c	c	-	c

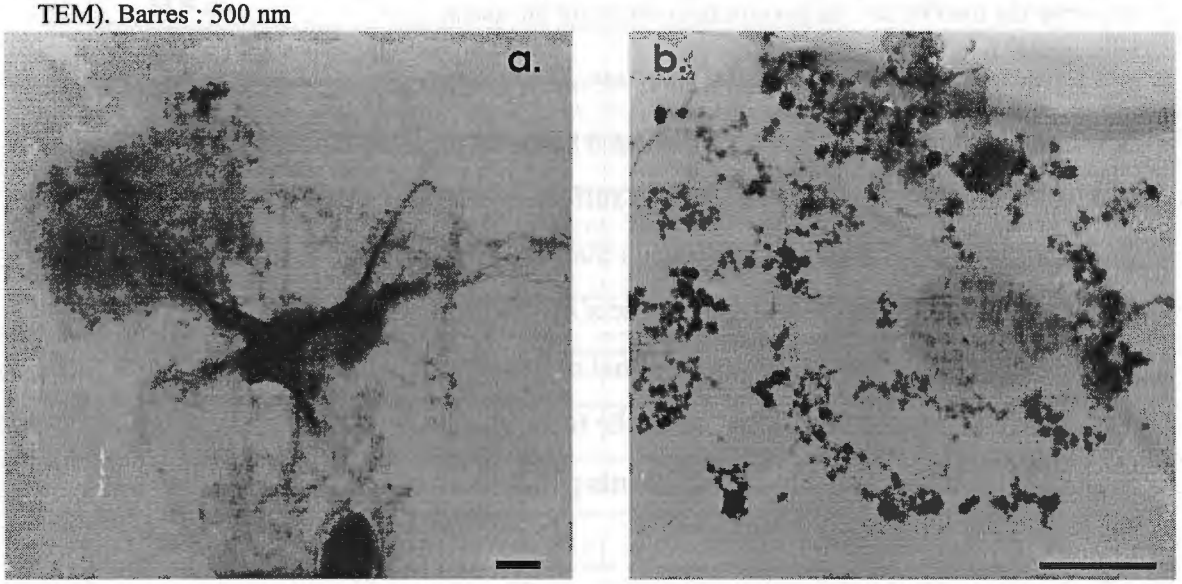
Les profils chimiques obtenus avec ces plaques sont donnés dans l'annexe 4.2; différentes observations peuvent être faites à partir de ces profils:

- La concordance au niveau de la profondeur entre les pics de matériel récolté sur les membranes de filtration et le dépôt de matériel sur les plaques de Teflon™ est bonne. Il est important de souligner toutefois que la procédure ayant recours aux plaques de Teflon™ est une intégration dans le temps et que cela s'avère être un désavantage dans le cas du lac de Lugano et de sa seiche interne.
- Malgré des périodes d'exposition des plaques de Teflon™ de durée variable au cours de la saison, une variation des stocks de fer et manganèse colloïdaux et particulaires au cours du temps est observable. En effet la quantité récupérée sur les profils du 15/12/95 au 7/2/96 est très faible (2,5-6 µg/mois) alors que 14-18 µg/mois sont récupérés entre le 12/01 et le 29/2/96. Dans la période du 29/2 au 4/4/96, une quantité encore plus importante de Mn (35 µg/mois) est récupérée. Donc comme dans le cas des membranes, on observe un maximum de production au mois de mars.
- A 139 mètres et pour le profil du 15/12/95 au 7/2/96, la plaque ressortie du lac est noirâtre, et la mesure du matériel déposé à sa surface donne une forte concentration en fer. Nous sommes donc en présence de sulfure de fer qui visiblement n'est observable qu'en dessous de 114 mètres, puisque la plaquette présente à cette profondeur n'en contient pas. Le but de nos investigations ne s'adressait pas à cette zone de la colonne d'eau, mais cette observation nous permet d'envisager que l'étude des sulfures de fer est également possible avec cette nouvelle technique de prélèvement. Cette observation avait déjà été effectuée dans les sédiments par *Belzile et al. (1989).*

- Des tests effectués avec les premières plaques immergées en milieu naturel ont permis de confirmer que seules les particules formées *in situ* étaient récupérées sur le Teflon™. Aucune trace significative de calcium, de silicium et d'aluminium n'a en effet été mesurée dans les solutions de minéralisation des plaques, alors que des signaux importants en Mn et en Fe étaient observés. Cette tendance est confirmée par l'analyse des grilles de microscopie présentes aux profondeurs autres que celles où le fer et le manganèse sont oxydés, et qui montrent une absence de matériel déposé. L'analyse par microscopie électronique analytique révèle que la composition des colloïdes présents sur les plaquettes Teflon™ à la profondeur du pic de fer particulaire est identique à celle des entités récupérées par ultracentrifugation.

Les grilles de microscopie déposées sur les plaques de Teflon™ ont été visualisées par microscopie électronique. En fonction de la faible charge particulaire du lac de Lugano en dehors des mois de mars et avril, peu de matériel est observé. Malgré cela, quelques colloïdes de fer et une ou deux entités dendritiques de manganèse sont observées aux profondeurs correspondant à la formation de ces phases réactives capables de s'adsorber sur le Teflon™ ou sur les grilles de microscopie. Aux mois de mars et avril, ces deux espèces sont présentes en plus grande concentration sur les grilles de microscopie, comme illustré sur la figure 4.32.

Figure 4.32: Espèces du Mn (a - prélevé à 75,5 m) et du Fe (b - prélevé à 96,5m) récupérées *in situ* (grilles TEM). Barres : 500 nm



La morphologie de ces entités est exactement identique à celle des particules ou colloïdes présents dans la couche d'eau où baigne la plaque. La présence marquée de bactéries à certaines profondeurs quelle que soit la saison suggère que le matériel biologique est probablement le plus apte à trouver ancrage sur les plaquettes de Teflon™ par l'intermédiare de polysaccharides acides (*Fletcher et Floodgate, 1973*). Il est alors intéressant de noter que la plupart des entités contenant du fer ou du manganèse sont associées à des bactéries, et qu'il est probable que les polysaccharides soient en partie responsables de l'adhésion sur les plaques de Teflon™. Cette explication n'est cependant pas la seule puisque le sulfure de Fe est également présent dès 130 mètres sur les plaques de Teflon™ et que lors des synthèses effectuées en laboratoire, la présence de la matière organique semblait avoir une importance assez faible sur le taux de récupération des particules.

En ce qui concerne le dépôt de matériel, des concentrations maximales de 0,35 µg/ cm^2·mois sont observées. Ce chiffre est à comparer aux valeurs semblables trouvées lors des synthèses de fer amorphe (cf. ch.3.4).

4.10 Rappel des résultats et lien avec le réel

Le lac de Lugano, oligotrophe au début de ce siècle, a vu la qualité de ses eaux baisser très rapidement dans la deuxième moitié de notre siècle. Plusieurs efforts importants ont été consentis afin de restaurer la qualité des eaux du lac. Ainsi en 1976, les premières stations d'épuration réduisent fortement le déversement des phosphates. En 1986, l'interdiction des phosphates dans les lessives réduit encore la charge en phophates dans les eaux d'entrée en station d'épuration. Depuis 1982, la concentration de phophates au sein de la masse d'eau s'est stabilisée, avec même une décroissance des phophates dans la couche de 0 à 100 m. Malgré cela, la concentration de l'oxygène continue de baisser de façon plus rapide depuis 1989 que la concentration des substances réductrices (*Barbieri et Mosello, 1992).*

Notre étude a montré que le rapport $[P]_{part.}$:$[Fe]_{part.}$ maximal trouvé dans les entités capables de piéger les phophates était de 0,5. Ce rapport apparaît comme une limite (voir discussion dans ch.4.7.5) ne pouvant être dépassée. Le rapport $[P]_{tot}$:$[Fe]_{tot}$ (~ 10) dans la

colonne d'eau étant plus élevé que le rapport $[P]_{part.}$:$[Fe]_{part.}$ dans les particules individuelles, l'excès de phosphate dissous est donc susceptible de passer au travers du "filtre" particulaire de FeOOH saturé en PO_4^{3-}, vers les couches d'eau supérieures.

En se basant sur les études effectuées précédemment et sur nos propres résultats, il est possible d'envisager une modélisation de la réaction des lacs à l'ajout massif de phosphates.

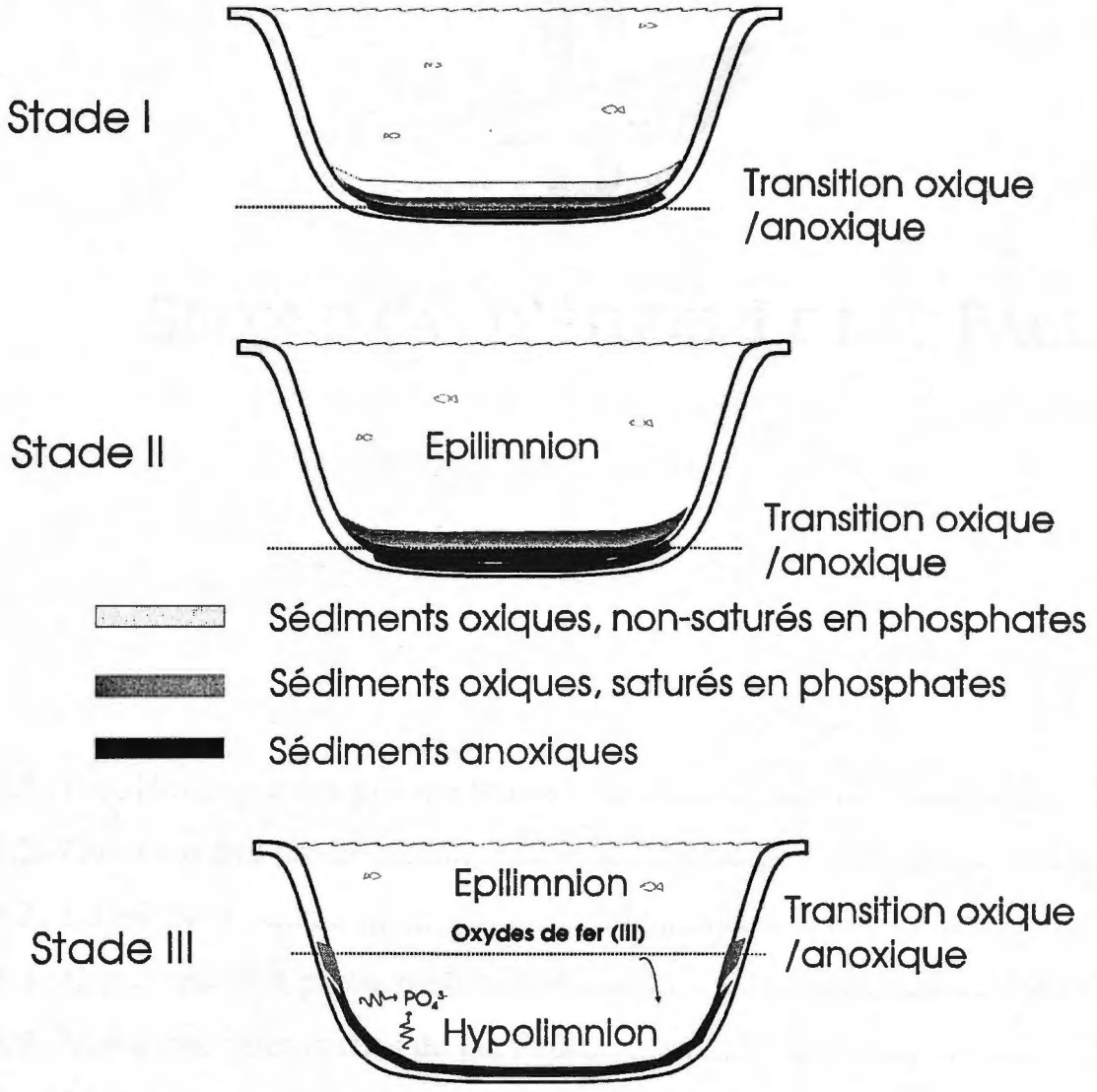
Un lac est constitué de sa colonne d'eau reposant sur le sédiment. Le phénomène d'eutrophisation commence par le fond du lac, où le sédiment profond devient anoxique (stade I, Figure 4.33). Cette frontière oxique/anoxique monte alors dans le sédiment (stade II), puis se propage dans la colonne d'eau (stade III). Les sédiments riches en fer sont donc capables de fournir la première "barrière" à la montée des phosphates dissous dans la colonne d'eau. L'étape de saturation partielle des sédiments est donnée dans un modèle similaire développé dans *Löfgren et Boström, (1989)* et *Lijklema (1980)*. Dans ce cas, deux couches se superposent (stades I et II), l'une constituée d'hydroxyde de fer saturé en phosphates, couvert par une couche d'hydroxyde de fer frais prêt à recevoir le flux de phosphates dissous montant des couches profondes du sédiment. L'effet tampon maximal de sédiments dans le lac Ontario est proposé par *Manning et Jones (1982)* qui émet également l'hypothèse que la saturation des phases de fer du sédiment mène à l'eutrophisation des eaux. Une fois que le sédiment est complètement anoxique, le cycle des particules de fer dans la colonne d'eau prend le relais, stoppant par leur sédimentation le flux de phophate (stade III).

Ce système à double couche tampon repose cependant sur des paramètres chimiques, qui règlent l'efficacité du piégeage des phosphates par les hydroxydes de fer.

Le facteur de première importance est bien sûr la concentration en fer. Typiquement, le lac de Lugano est déficient en fer, bien que son pH soit optimum pour le piégeage des phosphates. Cette déficience est compensée en mars et avril par une augmentation de la vitesse du cycle du fer, favorisant l'oxydation du fer sur les fibrilles des bactéries. La sédimentation massive de bactéries piégées dans un réseau tri-dimensionnel de fibrilles portant des oxydes de fer arrive à compenser le flux montant des phosphates. Cette aptitude du fer dans le cas du lac de Lugano est également observée par *Span et al. (1992b)*, qui mon-

trent que les sédiments au large de Figino s'avèrent être un piège à phosphate efficace par leur grande concentration en fer.

Figure 4.33: Modélisation de la réaction d'un système lacustre à l'eutrophisation par les phosphates.





SECOND CAS D'ÉTUDE: LE LAC PAUL

5.1 Problématique des métaux traces 128
5.2 Contexte de l'étude 130
5.3 Le lac Paul 132
5.4 Caractérisation physico-chimique 136
5.5 Variations temporelles du lac Paul 139
5.6 Méthode de prélèvement et conditions d'analyse 141
5.7 La colonne d'eau : voyage en TEM 146
5.8 Etude du manganèse dans la colonne d'eau du lac Paul 151
5.9 Etude du fer dans la colonne d'eau du lac Paul 165
5.10 Echantillonnage *in situ* avec plaques Teflon^{TM} 179
5.11 Rappel des résultats et lien avec le réel 185

5.1 Problématique des métaux traces

Le destin des apports en élements traces dans les systèmes aquatiques doit être compris dans le but d'évaluer leurs effets à long terme sur les écosystèmes et leur impact direct sur la biosphère.

Déjà au milieu de notre siècle, le rôle des oxyhydroxydes de fer et de manganèse était compris et reconnu pour le piégeage des métaux lourds dans les milieux marins (*Krauskopf, 1956*). Plus récemment *Cowen et Bruland (1985)* démontrent la présence dans les océans de capsules de bactéries contenant du Fe et du Mn et mettent en évidence leur capacité à piéger des métaux traces. Ce n'est que récemment que la réactivité des oxyhydroxydes de Fe et de Mn a été expliquée. Elle résulte de l'existence d'une logette formée par les extensions hydroxyles (Fe-OH, Mn-OH), dont les atomes d'oxygène coïncident avec le polyhèdre de coordination des métaux lourds (*Manceau et al., 1992*). Mais cette forte affinité ne permet pas de simplifier les interactions entre métaux traces et leur environnement à un couple oxyhydroxyde de Fe/Mn-métal. Les éléments traces introduits dans les systèmes aquatiques subissent de nombreuses transformations en fonction des conditions physico-chimiques du milieu naturel concerné. Ces paramètres vont déterminer la spéciation des métaux et l'activité des espèces assimilables dans le milieu. Ainsi, dans le but de connaître l'importance globale du piégeage des métaux traces par les phases minérales de fer et de manganèse, il est opportun d'étudier divers milieux naturels et d'y déterminer le comportement et les associations entre les différentes espèces.

Dans ce chapitre, nous nous limiterons à l'étude du Pb et du Co. Le cobalt est présent sous les états d'oxydation (+I), (+II) et (+III) dans les milieux naturels. Le Co(II) existe sous forme dissoute et en phase solide (carbonates et sulfures). Le Co(III) peut exister en présence d'agents complexants forts et à haut pH ou dans les phases d'oxydes et d'hydroxydes. C'est également sous cette forme (Co(III)) qu'on le retrouve dans les nodules de ferromanganèse marins et lacustres (*Halbach et al., 1982*). En faible concentration, le cobalt est un oligo-élément essentiel pour les organismes vivants, alors qu'en plus forte concentration (> quelques µM), le cobalt devient toxique; mais ces concentrations sont rarement observées dans les milieux naturels (cf. tableau 5.1). Son importance envi-

ronnementale provient du fait que le ^{60}Co est un produit d'activation issu des réacteurs nucléaires, et est ainsi identifié comme un polluant prioritaire par le département américain de l'énergie. Il est également relargué par la combustion des produits fossiles et est dispersé de ce fait par les voies atmosphériques. *Forstner et Stoffers (1981)* ont montré qu'entre 45 et 83 % du Co présent dans les sédiments pélagiques de l'océan Pacifique est associé aux oxyhydroxydes de fer et de manganèse.

Le Pb, avec sa structure [Xe] $4f^{14}5d^{10}6s^26p^2$, est capable de libérer 2 ou 4 électrons et de se retrouver sous les formes Pb(+II) et Pb(+IV). Les deux formes sont toxiques, Pb^{2+} étant l'espèce la plus répandue, où la paire d'électrons résiduelle joue un rôle structural et chimique important (*Cotton et al., 1987*). Le Pb^{2+} est probablement transporté dans les cellules biologiques par l'intermédiaire du chemin emprunté par le Ca^{2+} (rayons ioniques similaires; *Pelletier, 1995*) et son caractère toxique est renforcé par les nombreuses formes organo-métalliques facilement ingérées par les organismes vivants.

Le plomb est un des polluants anthropogéniques les plus déversés (par exemple: 695 t/an déversées par le Rhin en mer du Nord, 1835 t restant fixées sur les sédiments du lit du Rhin; *DeGroot et Allersma, 1973*). L'augmentation des concentrations en Pb dans l'environnement est largement due à la combustion des carburants de type "Super" contenant l'additif $Pb(C_2H_5)_4$. Dans les milieux naturels, *Filipek et al. (1982)* observent une affinité du Pb décroissant dans l'ordre oxydes de fer > le matériel organique > oxydes de manganèse.

Table 5. 1. Concentrations de Pb et Co dans les mileux naturels (selon Martin et Whitfield, 1981):

	Roches continentales	Sols continentaux	Rivières, formes dissoutes	Rivières, formes particulaires	Océans
Co	13 µg/g	8 µg/g	0.2 µg/l	20 µg/g	0.05 µg/l
Pb	16 µg/g	35 µg/g	0.1 µg/l	100 µg/g	0.003 µg/l

5.2 Contexte de l'étude

Le but de ce chapitre concerne la spéciation des métaux traces au sein du lac Paul en relation avec les phases particulaires de Fe et de Mn, dont la morphologie est influencée par la matière organique. L'étude s'inscrit dans le cadre général de la compréhension de problèmes environnementaux, et plus particulièrement dans le cadre de la spéciation des métaux traces dans les sytèmes aquatiques.

Dans le cas du lac Paul, notre étude n'a débuté qu'après une première saison de mesures effectués par le groupe du Prof. J.-F. Gaillard (Université de Northwestern, Evanston, IL, USA). Cette étude préliminaire a permis de mettre en évidence des tendances fortes entre les profils chimiques de certains éléments traces (Pb, Ba, Sr et Co) et les profils chimiques des éléments à comportement redox (Fe et Mn).

Le but de notre étude a été de confirmer ces tendances en utilisant la microscopie électronique analytique et en caractérisant les particules à l'échelle individuelle. Cette approche nous a permis d'appréhender les caractéristiques des particules de Fe et de Mn. L'importance du biota sur la morphologie de ces oxydes étant importante, nous avons également porté notre intérêt sur la matière organique et ses origines dans les strates d'eau considérées.

5.2.1 Collaboration

Cette étude est le résultat d'une étroite collaboration durant les étés 1995 et 1996. Ce chapitre regroupera les résultats de deux groupes de recherche: le groupe du Prof. J.-F. Gaillard et le GCAE (Groupe de Chimie Analytique Environnementale) à l'Université de Lausanne. Généralement, les analyses chimiques des éléments majeurs ont été effectuées aux Universités de Notre-Dame (Indiana) et de Northwestern (Illinois). Les analyses chimiques des éléments traces ont été effectuées par Martial Taillefert (groupe du Prof. J.-F. Gaillard).

Etant donné que nous nous sommes intéressés à deux problèmes majeurs que sont les interactions éventuelles des phases particulaires de Mn et de Fe avec les métaux traces, nous avons consacré les deux chapitres principaux aux particules de Mn (ch. 5.8) et aux

particules de Fe (ch. 5.9) en regroupant tous les résultats obtenus à l'aide des différentes techniques. Au préalable, nous présenterons les moyens analytiques à disposition (ch. 5.2.2 et 5.2.3) et la façon dont nous avons procédé pour les échantillonages et les analyses (ch. 5.6). Après une présentation du lac Paul (ch. 5.3) et de ses caractéristiques physico-chimiques (ch. 5.4), nous définirons les strates à étudier à l'aide de la microscopie électronique. Finalement, les investigations menées à l'aide des plaquettes Teflon™ seront reportées dans le ch. 5.10.

5.2.2 Instrumentation

Une majorité des appareils analytiques utilisés lors de cette étude sont propriétés des Universités de Notre-Dame et de Northwestern. En effet, afin de traiter le plus rapidement les échantillons prélevés, la plupart des analyses ont été effectuées directement après les collectes sur le terrain.

A l'Université de Notre-Dame, les analyses de spectrométrie atomique ont été effectuées sur un ICP-MS VG-Plasma Quad2-STE, après calibrage par un standard d'eau de rivière SLRS-2 du National Research Council of Canada et ajout d'un standard interne. Une partie des mesures ont également été effectuées sur un AAS Varian SpectrAA-20 pour les analyses du Fe et du Mn. Les analyses des principaux cations et anions ont été effectuées par électrophorèse capillaire (CE Waters).

A l'Université de Northwestern, un spectromètre d'absorption atomique GFAAS Varian 800 à four graphite équipé d'un correcteur de bruit de fond Zeeman a été utilisé.

Les mesures de turbidité, de carbone organique total, de spectrophotométrie moléculaire et atomique effectuées par le GCAE, ont été obtenues avec le matériel déjà décrit dans le chapitre 4.2.1.

Les spécimens de microscopie électronique ont été préparés selon deux procédures. En 1995, les échantillons ont été centrifugés avec une centrifugeuse HLM (International Equipment Co.). Les temps de centrifugation étant très longs avec ce modèle, nous avons utilisé une centrifugeuse Beckman Optima™ TLX équipée d'un rotor Beckman TLS-55 pour l'année 1996.

5.2.3 Méthodologie analytique

Les méthodes analytiques décrites au ch. 4.4.2 restent valables pour la presque totalité des élements mesurés lors des deux campagnes de 1995 et 1996 sur le lac Paul. Les phosphates ont par contre été mesurés par électrophorèse capillaire en raison de leur très faible concentration dans le lac Paul. Les procédures permettant la mesure des métaux traces par ICP-MS et GFAAS dans la colonne d'eau du lac Paul sont décrites en détail dans *Taillefert (1997)*.

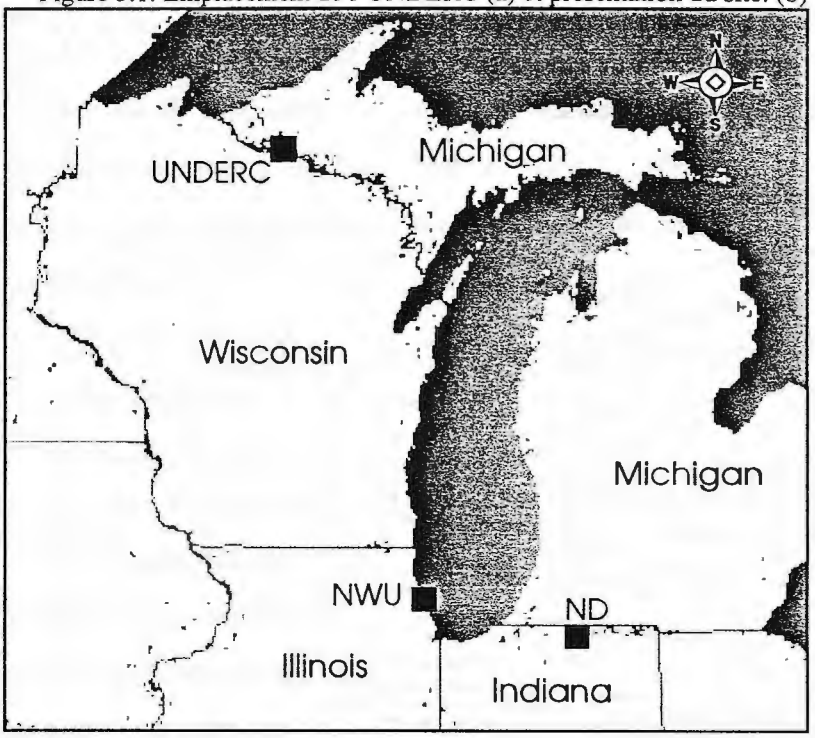
En revanche, le MnO_x a été mesuré par colorimétrie à l'aide d'un spectrophotomètre de terrain selon la technique mise au point par *Kessick et al. (1972)*. Elle repose sur la formation du crystal violet, mesuré à 590 nm ($\varepsilon_{max}^{590nm}$: $4\text{-}5 \cdot 10^4$ l/mol·cm), par la réaction du MnO_x avec le leuco crystal violet ($C_{25}H_{31}N_3$; 4,4',4"-methylidynetris(N,N-dimethylaniline); 0,01g dans 10 ml $HClO_4$ 10^{-1}M fraîchement préparé) en milieu tamponné pH=4 (CH_3COOH/CH_3COONa, 6M).

5.3 Le lac Paul

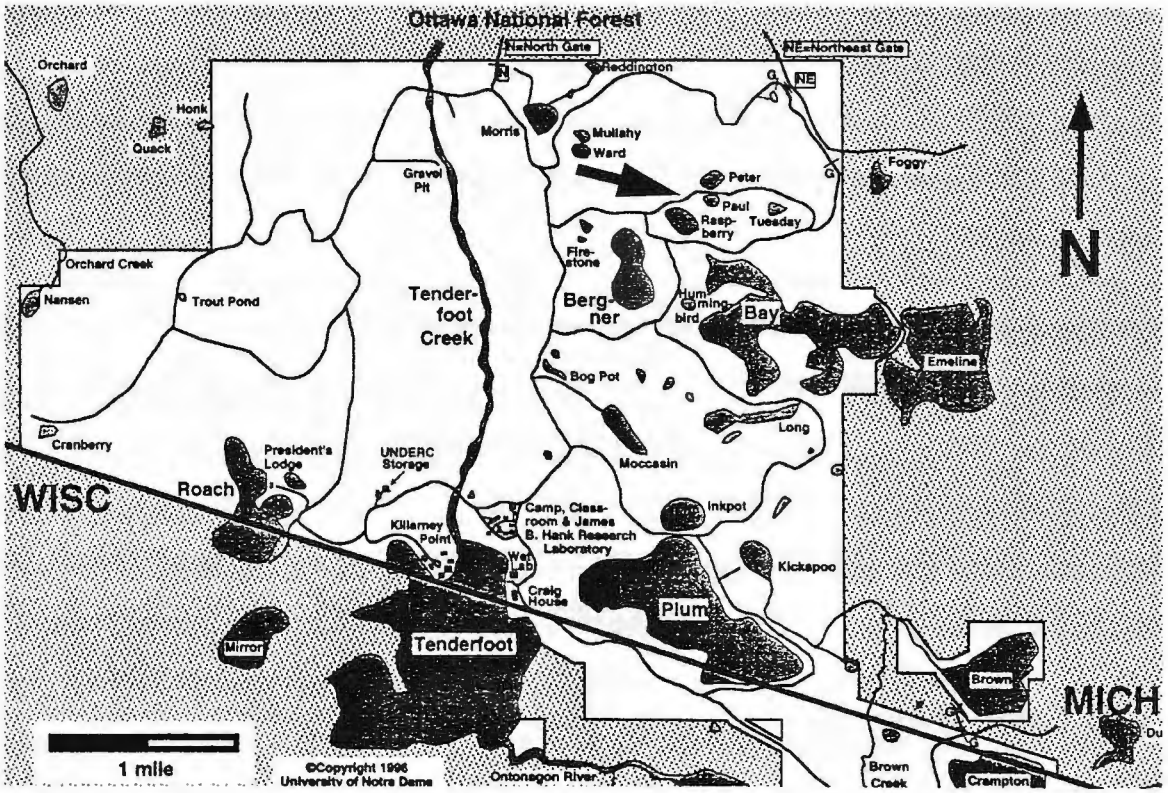
Le lac Paul est situé dans le Centre de Recherche Environnementale de l'Université de Notre Dame (UNDERC), à la frontière entre le Wisconsin et la péninsule nord du Michigan aux Etats-Unis. L'UNDERC est une propriété de 2975 hectares, dont 490 hectares sont recouverts de lacs et marais. Vingt-six des trente lacs sont intégralement sur la propriété (voir figure 5.1) et trois ruisseaux la traversent. Appartenant à l'Université de Notre-Dame depuis les années 1940, la propriété est fermée au public, afin d'éviter toute perturbation des activités de recherche. Cette propriété a comme position 46°13'N et 89°32'W, et se situe entre 500 et 520 mètres d'altitude. Le lac Paul, au nord de la propriété, jouxte le lac Peter; ces deux lacs sont séparés par une digue depuis 1951. Les eaux du lac Paul se déversent dans le lac Peter et aucun affluent n'est connu pour le lac Paul. Les entrées d'eau sont donc atmosphériques et probablement également sous-terraines. La forme conique du lac, liée à sa situation au bas d'une petite colline et entouré de nombreux conifères et feuillus qui le protègent des assauts du vent, limitent le brassage de ses eaux.

Figure 5.1: Emplacement de l'UNDERC (a) et présentation du site. (b)

a.



b.



5.3.1 Caractéristiques générales du lac

Le lac Paul a une profondeur maximale de 12 mètres et une profondeur moyenne de 6 mètres; sa surface est de 1 hectare. Le relevé bathymétrique du lac est représentée sur la figure 5.2.

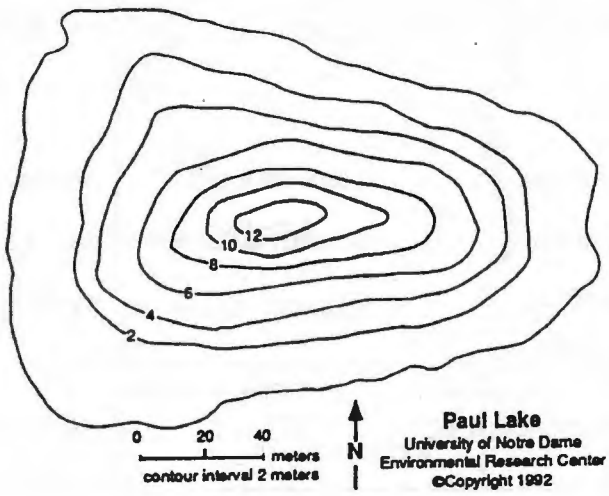


Figure 5.2: Relevé bathymétrique du lac Paul.

Géologiquement, le nord des Etats-Unis est séparé en plusieurs provinces. La propriété de l'UNDERC est située sur la province du Northern Highland, qui est l'extension la plus au sud du bouclier canadien. La roche-mère est constituée de deux couches superposées, accumulées par les différentes périodes de glaciation. La première couche est composée de Pré-Cambrien (roches ignées et métamorphiques) recouverte par une couche fine de sédiments laissée par les mers paléologiques. La seconde est un dépôt mixte laissé par les glaciers du Wisconsin de l'ère du Woodfordian et du Valderan. Le lac Paul repose sur des dépôts glaciers (argile et moraine) recouverts d'une couche de sédiments riches en matière organique.

Chimiquement, le lac Paul est classé comme mésotrophe (*StAmmand, 1990*) et reste stratifié tout au long de l'année en raison d'une méromixité biogénique (*Carpenter et Kitchell, 1993*). En hiver, la totalité de la surface gèle (maximum: 82 cm), parfois jusqu'au début de mai. Les températures de janvier oscillent entre -10 et -20°C, alors que juillet se caractérise par des températures variant entre 16 et 21°C. Au printemps, des gelées sont observées en moyenne jusqu'à début juin.

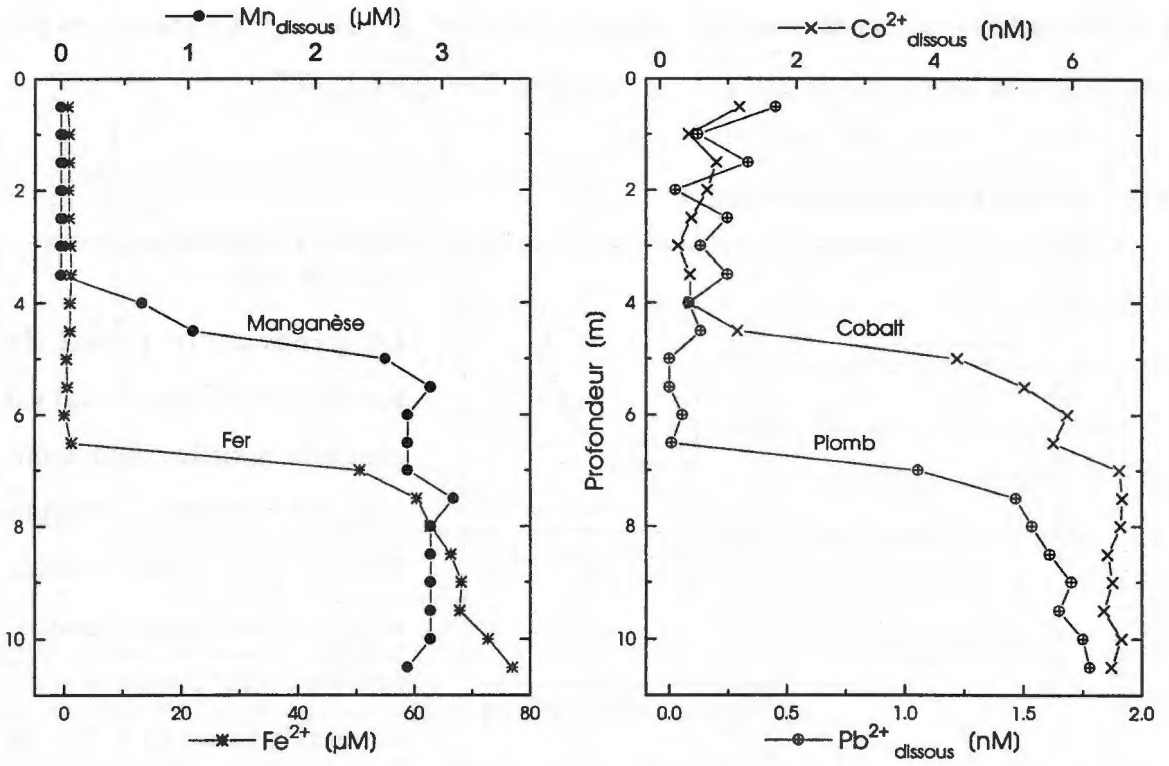
5.3.2 Comportement des métaux traces dans le lac Paul

Les premiers profils de métaux traces effectués sur le lac Paul (*Taillefert et al., 1997*) présentent un important gradient près de l'interface oxique/anoxique. Ces travaux prélimi-

naires ont permis de déceler que l'augmentation de la concentration de la forme mobile, et donc dissoute, de Pb étaient fortement influencée par la présence d'oxydes de fer (Figure 5.3).

Parallèlement, cette étude a montré que le profil du Co était indifférent de la chimie du fer dans la colonne d'eau du lac Paul, mais que l'allure de la courbe de sa forme dissoute était très proche de celle du Mn.

Figure 5.3: Profils de Fe^{2+}, $Mn_{diss.}$, $Co_{diss.}$ et $Pb_{diss.}$ obtenus lors des campagnes préliminaires effectuées par Taillefert et al. (1997) en 1994.



Ces similitudes ont permis de poser l'hypothèse d'un contrôle de la spéciation du Pb par la chimie du fer, respectivement du Co par le manganèse. En se basant uniquement sur l'allure des profils, il est cependant impossible d'affirmer que la chimie était interdépendantes. Pour cette raison, des études de microscopie électronique ont été entreprises afin d'étudier les associations éventuelles entre éléments au niveau des particules individuelles. Le présent chapitre développe cette étude microscopique, complétée des études chimiques nécessaires à la compréhension du système. L'étude basée sur les analyses chimiques des métaux traces, ainsi qu'une caractérisation plus complète du lac Paul, sont à rechercher dans *Taillefert (1997)*.

5.4 Caractérisation physico-chimique

Les caractéristiques physico-chimiques du lac Paul ont été étudiées à l'aide d'une sonde portable CTD-pH-O_2 (Scout, Hydrolab). Un profil a été mesuré en moyenne tous les deux jours. L'étalonnage de la sonde de pH est effectué à bord de la barque avec des solutions tampons de pH 4 et 7. L'étalonnage de la sonde à oxygène est effectué par standardisation au laboratoire après titrage Winkler à deux profondeurs prélevées par l'intermédiaire de la pompe péristaltique immédiatement après le profil. Les profils obtenus sur le lac sont donnés dans l'annexe 5, et un profil représentatif par année est illustré dans les figures 5.4 à 5.7. Les profils des cations et anions majeurs (Ca^{2+}, Na^+, K^+, HCO_3^{2-}, Cl^-) ne seront pas présentés dans cette étude et sont à rechercher dans *Taillefert (1997)*.

5.4.1 Mesure de la température

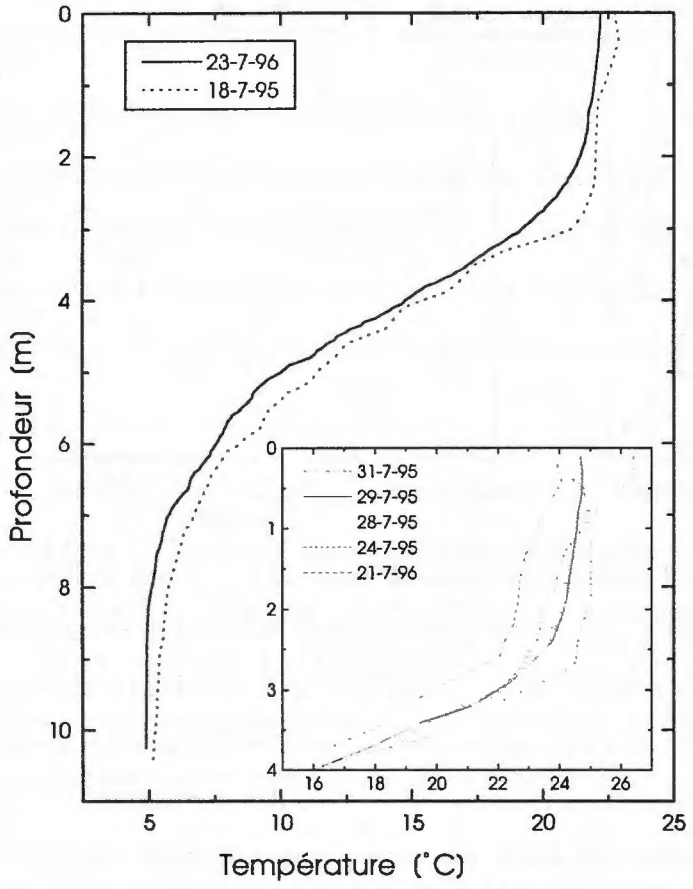


Figure 5.4: Profils de température dans le lac Paul.

En général, le profil de température (Figure 5.4a) est similaire pour les deux campagnes. On distingue l'épilimnion de 3 m de profondeur avec une température avoisinant les 20-25°C et en dessous un métalimnion (3 à 7 m de profondeur) avec un fort gradient de température passant de 20 à 6-7°C, puis l'hypolimnion (de 7 m au sédiment) avec une température constante de 5°C.

Cette forte stratification est illustrée par la série des profils du 18 juillet au 2 août 1995 (voir encart dans figure 5.4a). Entre ces deux dates, deux événements météorologiques

(une période de chaleur intense et une vague de froid) influencent la température de l'épilimnion, mais aucun des deux ne parvient à modifier le profil au delà des 3-4 m.

5.4.2 Mesure de l'oxygène

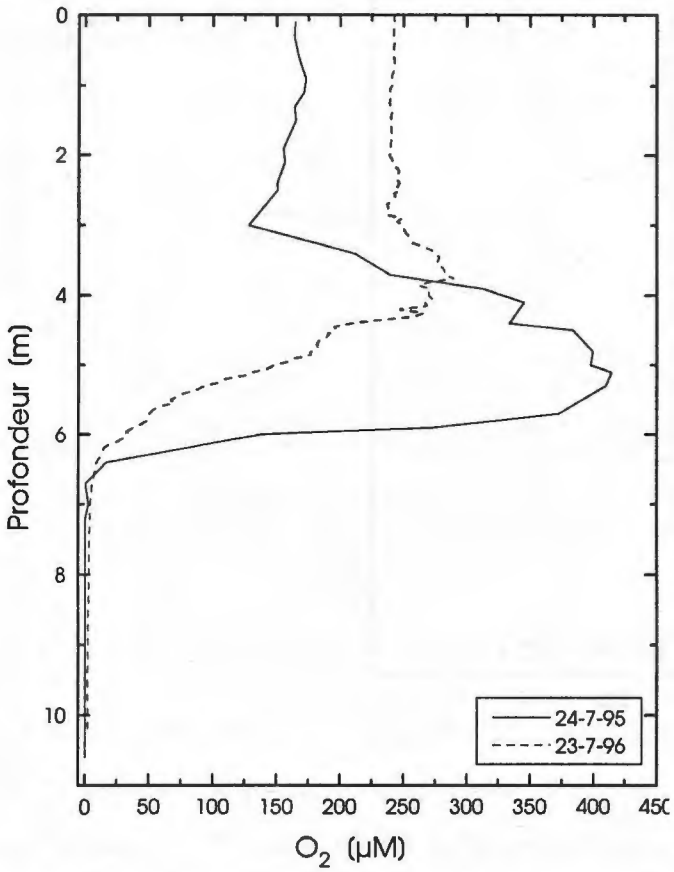


Figure 5.5: Profils d'oxygène dissous le long de la colonne d'eau.

La mesure de l'oxygène est révélatrice d'une différence importante entre les deux campagnes: la fleur d'eau (algal bloom) observée en 1995 est absente en 1996. Bien que la sonde ait été sujette à plusieurs défectuosités durant la campagne 1996, aucun profil ne révèle (Figure 5.5) des concentrations supérieures à 300 µM. En revanche, des valeurs proches de 400 µM sont mesurées à 5 m en 1995, provoquant un très fort gradient de $[O_2]$ entre 5 et 6 m. Cette forte concentration d'oxygène (~119 % de saturation) se propage vers le bas, favorisant des conditions oxiques jusqu'à environ 7 m en fin de campagne.

5.4.3 Mesure du pH

Comme dans le cas de l'oxygène, des valeurs de pH beaucoup plus extrêmes sont enregistrées en 1995, témoignant d'une forte activité photosynthétique à 5 m (Figure 5.6). Le pH du lac est tamponné par le système carbonate (H_2CO_3/HCO_3^-), amenant les eaux équilibrées à une valeur de 6,3 au-dessus du sédiment et en surface. Dans la zone des 4-6 m, le pH est régulé par la productivité primaire, consommant des protons selon la réaction de photosynthèse, ce qui a pour effet de monter le pH jusqu'à 6,6 en 1995. La matière organique produite est dégradée dans les couches plus profondes par respiration, ce qui abaisse le pH à 5,4 en 1995, contre 5,8-5,9 en 1996.

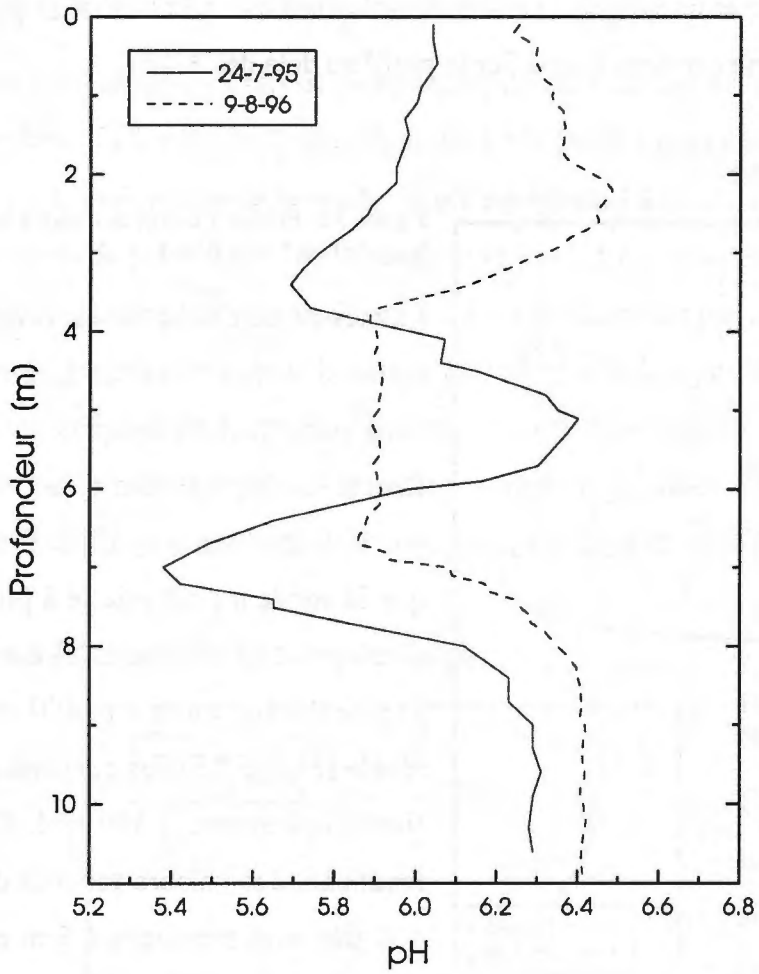


Figure 5.6: Profils de pH dans la colonne d'eau du lac Paul.

5.4.4 Mesure de la turbidité

Les mesures de turbidité sont reportées dans la figure 5.7. Une grande stabilité est observée jusqu'à 7 m sur tous les profils mesurés. Leur allure se caractérise par une faible turbidité dans les couches de surface (< 1 ftu) jusqu'à 5,5 m, puis par un pic situé entre 7 et 7,5 m avec des valeurs très élevées (~11-13 ftu); ce pic varie peu, tant en profondeur qu'en intensité, ce qui semble indiquer une couche stable à cette profondeur. En dessous de ce pic, la zone comprise entre 8 et 9,5 m présente de fortes variations au cours du temps. Nous mesurons durant l'été 1995 des valeurs élevées présentant des pics secondaires de turbidité. Dès 9,5 m des valeurs stables de turbidité (~4 ftu) sont mesurées jusqu'à l'interface eau-sédiment.

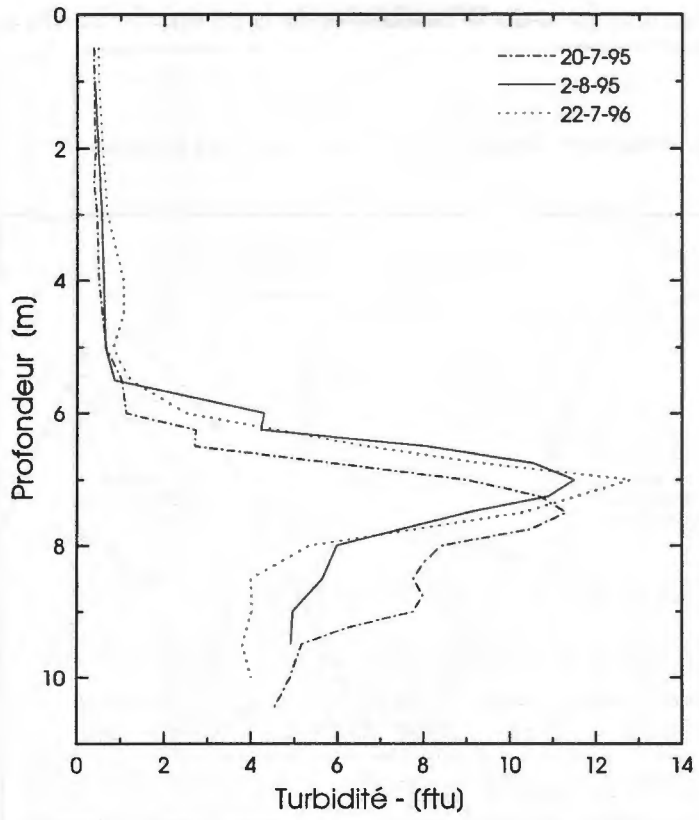


Figure 5.7: Profils de turbidité mesurés dans la colonne d'eau du lac Paul.

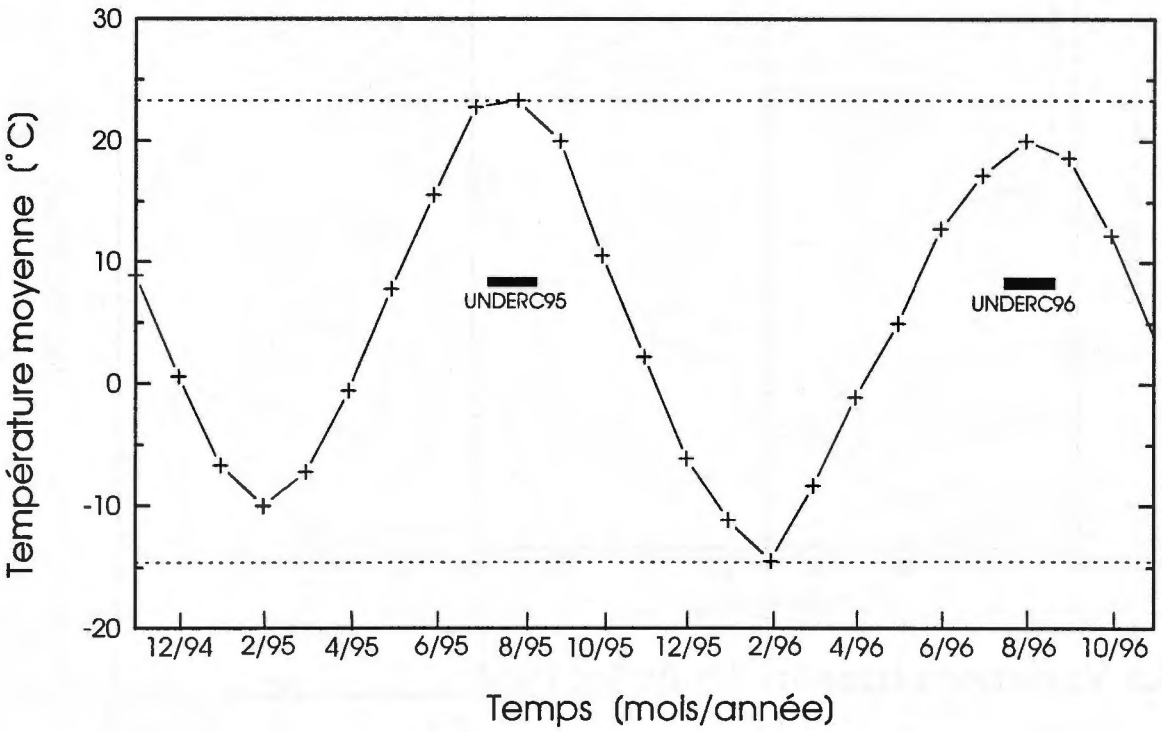
5.5 Variations temporelles du lac Paul

Les résultats présentés dans ce chapitre découlent de deux situations fort différentes entre 1995 et 1996. Présents sur le terrain à ces deux périodes, nous avons subi un été 1995 chaud et un été 1996 très pluvieux et passablement froid. Les paramètres physico-chimiques, les spéciations du fer et du manganèse (ch.5.8 et 5.9), ainsi que les espèces observées par microscopie électronique révèlent des différences notables entre les deux campagnes de prélèvement que nous ne pouvons pas expliquer uniquement par la chimie.

Afin de pouvoir situer nos observations dans le temps, et dans le but d'expliquer les fortes différences qui ont affecté les deux campagnes, nous avons cherché à connaître les facteurs qui pouvaient influencer la chimie du lac Paul. Ayant observé que beaucoup de phénomènes que nous étudions ont un lien plus ou moins étroit avec la biologie, nous nous sommes rendu compte que les conditions météorologiques pouvaient avoir un effet marqué sur la chimie du lac. Dans ce contexte, nous avons cherché à connaître les conditions de température et de précipitations habituellement observées sur le lieu de prélèvements; le site web du National Climatic Data Center (http://www.ncdc.noaa.gov) nous a permis

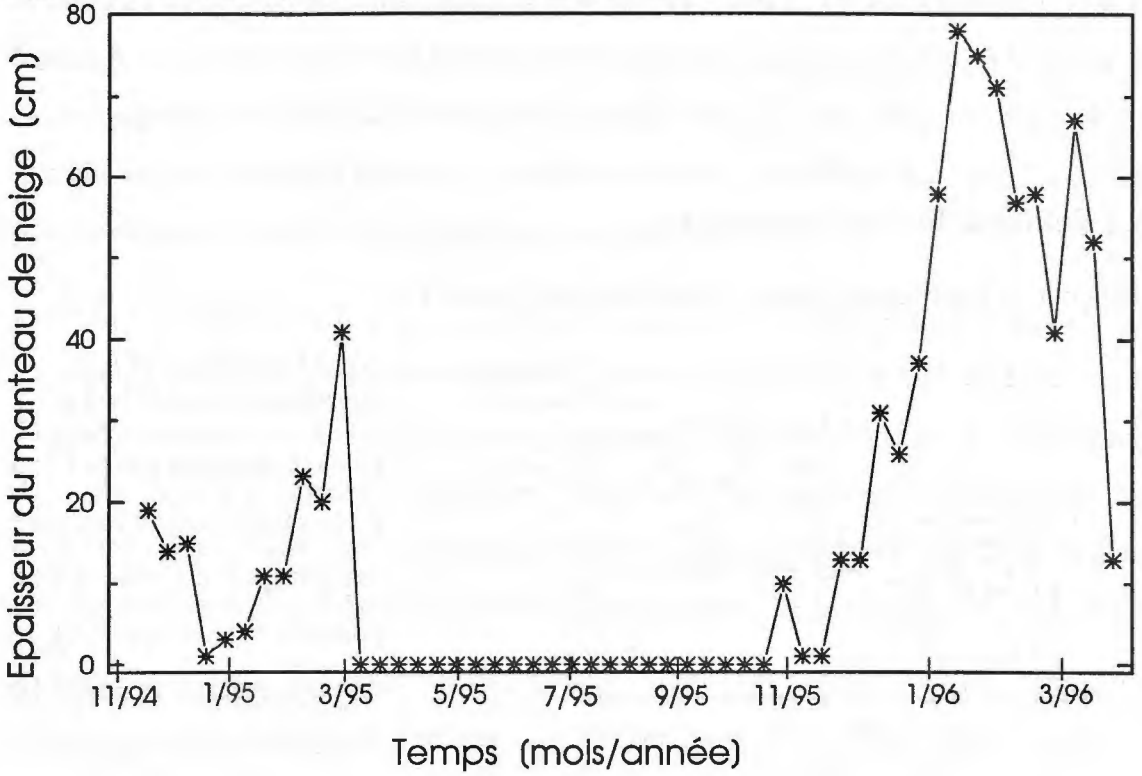
d'obtenir des informations ciblées sur la région du Wisconsin et de la péninsule du Michigan.

Figure 5.8: Moyenne des températures observées entre décembre 1994 et octobre 1996 à Rhinelander.



L'année 1995 est considérée comme chaude et pluvieuse dans la région du Wisconsin, alors que 1996 est considéré comme très pluvieuse. Sur un classement effectué depuis 1895, 1995 représente la 49ème année la plus froide et la 31ème la plus pluvieuse. Sur un siècle de mesure, 1995 se situe donc dans la moyenne. En revanche, l'année 1996 représente la 9ème la plus froide et la 39ème la plus pluvieuse; c'est donc une année que nous considérerons comme exceptionelle au niveau de la température. La figure 5.8 montre la température moyenne à Rhinelander, aéroport distant de 62 km au sud du site de prélèvement, alors que la figure 5.9 donne la couverture de neige présente à Park Falls (469 m d'altitude), situé à 73 km à l'ouest du site de l'UNDERC. L'épaisseur du manteau de neige sera un facteur dont nous tiendrons compte plus tard (ch. 5.9.1) lors de la spéciation du fer.

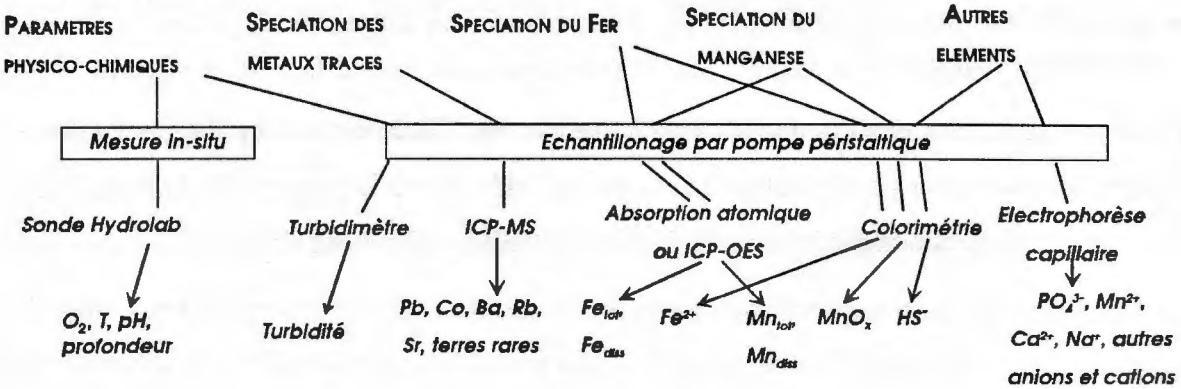
Figure 5.9: Couche de neige mesurée à Park Falls entre décembre 1994 et avril 1996.



5.6 Méthode de prélèvement et conditions d'analyse

Lors des deux périodes de prélèvements (étés 1995 et 1996), la totalité de la colonne d'eau a été étudiée de 0 à 10 m de profondeur par intervalles de 50 cm. Dans les couches de formation des oxydes de manganèse (4,5 à 5,5 m) et de fer (6,5 à 8 m), une résolution de 20-25 cm a été choisie pour la collecte d'échantillons. La stratégie de prélèvements et d'analyses a été similaire à celle développée pour le lac de Lugano. Les paramètres chimiques mesurés sont résumés dans la figure 5.10 ci-dessous.

Figure 5.10: Aproche chimique sur le lac Paul: Le mode d'analyse et la méthode de prélèvement sont indiqués pour chaque espèce.



Les prélèvements ont été effectués à partir d'une barque amarrée au-dessus du point le plus profond du lac Paul. Une ligne flottante traversant le lac dans sa largeur a permis l'amarrage, mais également la fixation de lignes de Teflon™ lors des deux campagnes.

5.6.1 Schéma de fractionnement

Le schéma de fractionnement est résumé dans la figure 5.11.

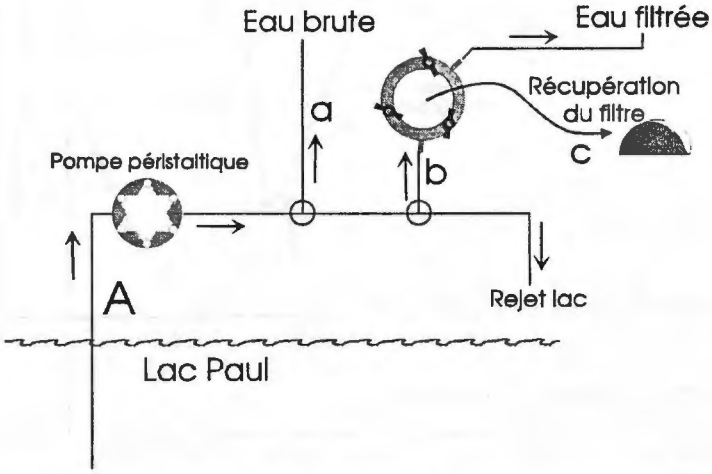


Figure 5.11: Schéma de fractionnement appliqué sur le lac Paul.

Dans un premier temps l'eau de la profondeur concernée est pompée à l'aide d'une pompe péristaltique (A), le tuyau est purgé pendant 10 minutes avant de prélever l'eau (a) dans des tubes pré-acidifiés pour la fraction brute ou directement dans les seringues de prélèvement. Ensuite, l'eau est filtrée (b) au travers de la cellule de filtration en ligne (été 1996 seulement) et, après mesure du volume de filtrat, le filtre est récupéré (c).

Cette procédure permet de distinguer la fraction particulaire de la fraction dissoute, selon les équations ci-dessous:

- [Fraction brute] = Espèces totales
- [Fraction brute] - [Fraction filtrée] = Espèces particulaires
- [Fraction filtrée] = Espèces "dissoutes" (définition opérationnelle)
- [Fraction récupérée sur le filtre] = Espèces particulaires concentrées (volume de digestion/volume filtré)x.

En fonction de la définition opérationnelle, la fraction filtrée est susceptible de contenir également les espèces colloïdales de dimension inférieure à la porosité de la membrane (0,2 ou 0,45 µm) et non piégées sur le film de particules récupérées sur la membrane.

5.6.2 Echantillonage pour analyses chimiques

Les analyses chimiques présentées dans ce chapitre ont été effectuées sur deux saisons (étés 1995 et 1996). Bien que le lac Paul soit considéré comme méromictique et donc stratifié tout au long de l'année, les concentrations des différentes espèces, dissoutes ou particulaires, se sont révélées différentes d'une campagne à l'autre.

L'échantillonage a été effectué au moyen d'une pompe péristaltique (Cole Parmer Masterflex, débit: 790 ml/min) alimentée par une batterie portable et connectée à un tuyau de Tygon®, préalablement lavé à l'acide et abondamment rincé par l'eau de la profondeur d'intérêt. Tous les récipients utilisés pour les prélèvements sont systématiquement lavés avec HNO_3 (trace metal analysis grade) et de l'eau ultrapure Millipore. En fonction du devenir des échantillons, la procédure de collecte est modifiée:

- Les échantillons pour la mesure des espèces majeures et des métaux traces sont collectés directement dans des seringues (HSW) en polyéthylène équipées de piston en polypropylène, sans contact avec l'oxygène. Une fraction brute est récupérée dans des tubes en polypropylène (Falcon) acidifiés. L'échantillon est ensuite filtré (filtres 0,45 µm Acrodisc LC-PVDF Gelman) et récupéré dans des tubes acidifiés.
- Les échantillons pour la mesure de H_2S, sulfates, MnO_x, phosphates par colorimétrie et pour les cations et anions sont conservés dans les seringues préalablement obturées et emmenées au laboratoire pour analyse dans les deux heures.
- En 1996, la filtration a été effectuée à l'aide d'une cellule, qui permet de filtrer en ligne directement à la sortie de la pompe péristaltique (voir figure 5.11). Cette procédure permet également la récupération des filtres après mesure du volume du filtrat et l'analyse du matériel particulaire. Les filtres sont collectés dans des tubes en polypropylène de 50 ml. 10 ou 20 ml d'une solution contenant HNO_3 (5%) et $NH_2OH{\cdot}HCl$ (0,1 M) sont ensuite ajoutés à la membrane. Les tubes sont agités pendant 16 heures avant analyse.

5.6.3 Echantillonage et conditions pour les analyses microscopiques

Comme dans le cas des analyses chimiques, les investigations par microscopie électronique ont été effectuées sur deux saisons (étés 1995 et 1996). L'ensemble de la colonne

d'eau a été échantillonnée dans le but de dresser l'inventaire des types de particules présentes aux différentes profondeurs. L'analyse microscopique fine des oxydes de manganèse résulte des échantillonages de 1995, tandis que les oxyhydroxydes de fer ont été étudiés à l'issue des prélèvements de 1996.

L'eau des profondeurs auquelles les échantillons ont été prélevés a été collectée à l'aide de la pompe péristaltique et directement conservée dans des seringues de 50 ml. Leur transport immédiat vers le laboratoire, sous sac à gants (Modèle X-27-27, I^2R) purgé à l'azote, a permis leur transfert dans les tubes de centrifugation en moins de 30 minutes. La procédure de centrifugation, décrite au ch.3.1.2, a été effectuée dans les conditions suivantes:

- En 1995, les échantillons ont été centrifugés à 4000 tours/minutes pendant 14 heures.
- L'utilisation de la centrifugeuse Beckman Optima™ TLX pour les échantillons de l'année 1996 a permis de raccourcir cette étape à 1h30 min en ultracentrifugeant à 55000 tours/minutes.

Après centrifugation et sous sac à gants, les grilles TEM des échantillons provenant des profondeurs anoxiques ont été recouvertes d'une couche protectrice de Nanoplast™ pour la moitié d'entre elles; la polymérisation de la résine est effectuée sous atmosphère d'azote.

Les analyses élémentaires ont été effectuées sur un microscope Hitachi HF-2000 (CIME, EPFL), équipé d'une sonde EDS fine (env. 2 nm) avec détecteur au germanium (fenêtre en Norvar). Les éléments analysés, ainsi que leurs énergies d'émission X sont donnés dans la table 5.2:

Table 5. 2. Eléments analysés, raies concernées et énergies

Eléments:	**Al**	**Si**	**P**	**S**	**Pb**	**Ca**	**Mn**	**Fe**	**Co**	**Pb**
Raies:	Kα	Kα	Kα	Kα Kβ	Mα M_{ab}	Kα	Kα Kβ	Kα Kβ	Kα Kβ	Lα Lβ
Energies [keV]:	1,486	1,739	2,013	2,307 2,464	2,342 2,484	3,690	5,894 6,489	6,398 7,057	6,924 7,648	10,55 12,62

Pour la campagne 1995, les analyses EDS ont été entreprises entre 4 et 9 m, afin de déterminer la composition des entités particulaires présentes dans la colonne d'eau. La même

approche a été effectuée en 1996 sur les échantillons prélevés entre 6 et 7,5 m; généralement, 30 analyses ont été effectuées pour chaque couple profondeur/date. Dans les deux cas, les analyses EDS n'ont eu lieu qu'après visualisation complète de toutes les grilles de microscopie préparées pour chaque profondeur. Les conditions d'analyse sont résumées dans la table 5.3:

Table 5. 3. Conditions d'analyse

Temps d'aquisition	**Taille de la région analysée:**	**Courant du faisceau**	**Agrandissement:**
80-300 secondes	3-5 nm^2	10^9 e^-/nm^2	$7 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^5$ (1995) $1{,}5 \cdot 10^5$ (1996)

Le recouvrement des raies du Fe, du Mn et du Co ($K\alpha^{Fe}$ avec $K\beta^{Mn}$, $K\beta^{Fe}$ avec $K\alpha^{Co}$) nous a obligé à recourir à une déconvolution spectrale. Cette dernière a été effectuée en ajustant des gaussiennes multiples sur le spectre composite, centrées sur les énergies théoriques des raies Kα et Kβ du Fe, Mn et Co. Pour chaque raie, la largeur obtenue par ajustement est d'environ 145 eV, ce qui est en parfait accord avec la résolution théorique du détecteur, telle qu'elle est déterminée sur des standards de Mn (146 eV).

Pour le Mn et le Co, les rapports quantitatifs ont été obtenus par quantification sans standard (*Reed, 1993*), alors que les autres rapports molaires ont été obtenus en utilisant la version MBTS (Metallurgical Biological Thin Sections) du logiciel Noran Voyager. Cette procédure a été testée à l'aide des standards de phosphates de fer préparés chimiquement dans nos laboratoires (ch. 3.3) et est en parfait accord avec les déterminations chimiques obtenues.

5.7 La colonne d'eau : voyage en TEM

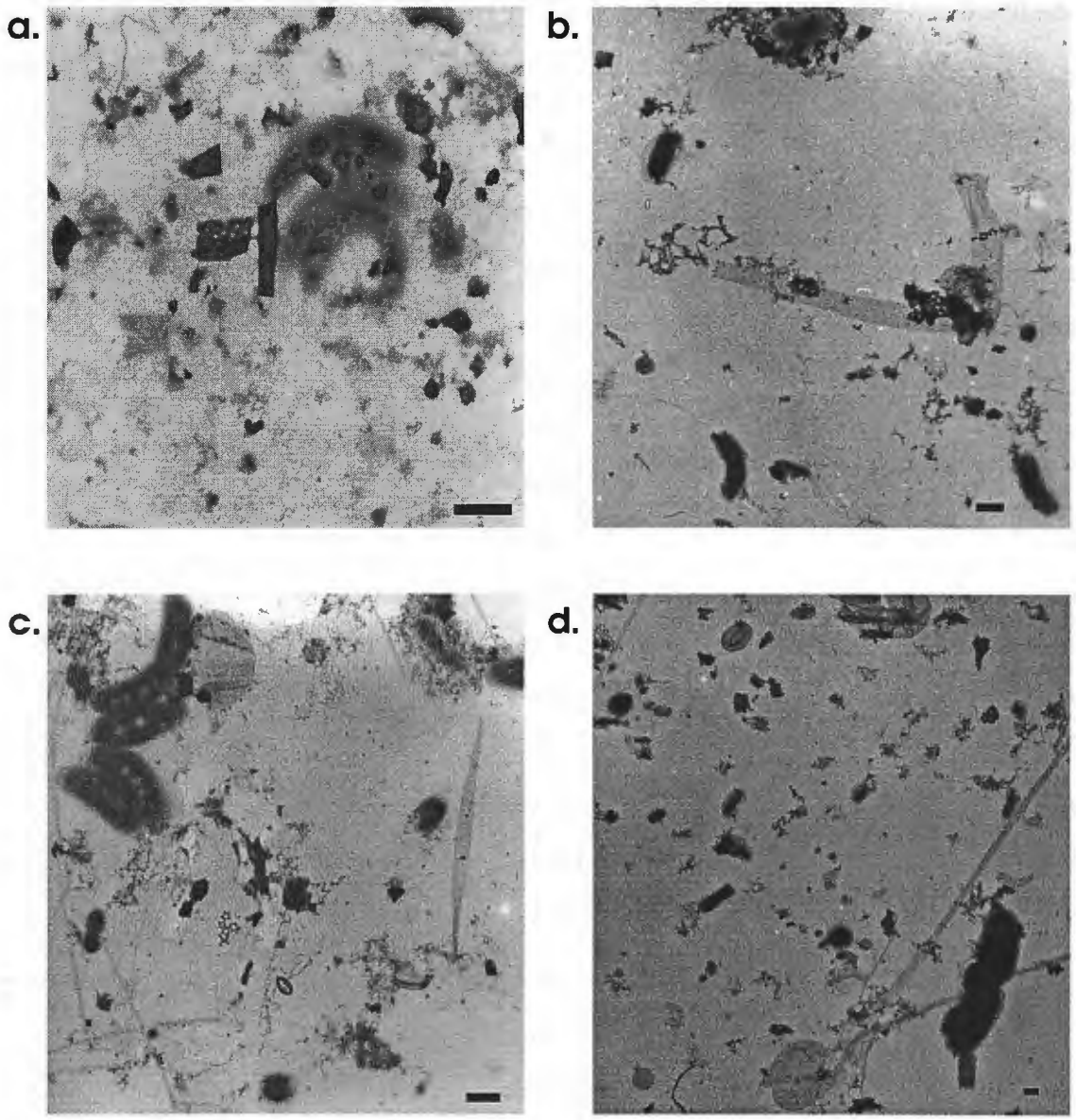
La même procédure que lors de la visualisation des spécimens de microscopie électronique du lac de Lugano a été adoptée pour le lac Paul. Dans un premier temps, les grilles TEM non recouvertes de Nanoplast™ ont été observées, puis certains spécimens recouverts de résine ont été visualisés. Dans un second temps chacune des grilles a été visualisée dans son ensemble, afin de reconnaître les entités majoritaires et représentatives présentes à la profondeur étudiée. Etant donné que la différence entre les deux périodes de prélèvements se remarque également dans la diversité et la concentration des constituants particulaires, deux rubriques seront insérées pour les profondeurs où la différence est fortement marquée. La préparation des grilles de microscopie est a été effectuée de manière quantitative par les mesures de turbidité effectuées avant l'ultracentrifugation; elle permet donc une comparaison quantitative des spécimens entre chaque profondeur.

Les observations issues de cette approche sont résumées ci-dessous et se regroupent essentiellement en cinq strates (Figure 5.12):

- Couche située entre 0,5 et 4 m: Le matériel observé à ces profondeurs est assez hétérogène, des fibrilles (Ø = 1-5 nm) organiques, très peu contrastées, tapissent le spécimen. Leur visualisation n'est possible que parce qu'elles sont probablement recouvertes d'une fine couche électron-denses de fer. Le matériel est essentiellement composé de débris aux contours très nets, provenant de la déposition atmosphérique et de déchets végétaux. Entre 2,5 et 4 m, la présence de diatomées et des déchets associés annonce une strate biologique. En 1995 on observe l'espèce *Synura spinosa* qui est facilement reconnaissable par sa forme en raquette.
- Strate allant de 4,5 à 5,25 m: Le matériel est toujours diversifié à ces profondeurs, la prédominance des fibrilles fines (Ø = 3-4 nm) et plus épaisses (Ø = 10 nm environ) est perceptible. Une différence marquée est observée pour ces profondeurs entre 1995 et 1996. Des cellules de bactéries sphériques sont présentes pour les deux années, mais celles de 1995 (Figure 5.12e) seulement sont recouvertes d'une coque noirâtre s'avérant être constituée d'oxydes de manganèse (analyse EDS, voir ch. 5.8.4), alors qu'en 1996 (Figure 5.12f) aucun dépôt minéral n'est observé à leur surface. Leur nombre est d'autre part plus élevé à 5 m en 1995 avec un regroupement en colonies, alors

qu'en 1996, le plus grand nombre de bactéries sphériques similaires à celle de 1995 se retrouve à 5,25 m et les bactéries sont essentiellement individuelles. A ces profondeurs en 1995, des algues *Synura spinosa* sont également présentes, alors qu'aucune d'elles n'est observées dans toute la colonne d'eau en 1996.

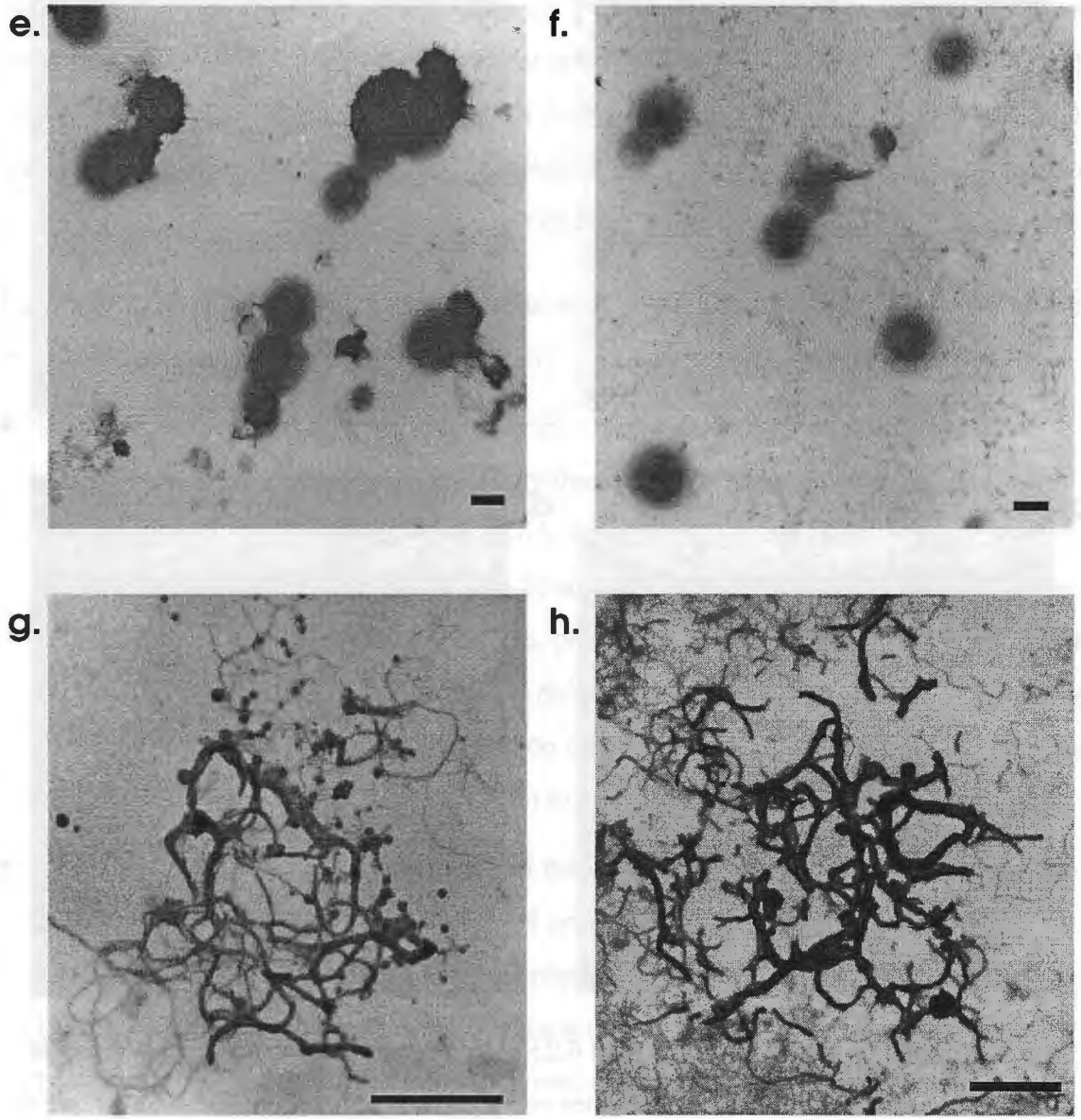
Figure 5.12: Micrographies de la colonne d'eau du lac Paul à différentes profondeurs: (a): 0,5 m - 1996; (b) 1 m - 1995; (c) 3 m - 1995; (d) 4 m - 1995; Barres : 500 nm.



- Zone de transition située entre 5,5 m et 6,25 m: On remarque une présence accrue de fibrilles toujours associées à des bactéries ou en pelotes, et une diversité plus grande du matériel observé. Le diamètre des fibrilles varie légèrement entre 7-9 nm et un maximum de 20 nm. Des chaînes de diamètre de 400-500 nm et d'une longueur de plusieurs

dizaines de microns sont observées à cette profondeur et en-dessous. Ces agrégats semblent être essentiellement composés de fibrilles et pourraient être les principales sources des nombreuses fibrilles observées à toutes les profondeurs. Par leur forme et leur morphologie, il est possible de les assimiler à *Leptothrix* déjà décrite par *Gounot et Di Ruggiero (1991)* et *Emerson et Ghiorse (1993)* comme une structure tubulaire de fibrilles (Ø = 6,5 nm) condensées.

Figure 5.12 (suite): Micrographies de la colonne d'eau du lac Paul à différentes profondeurs: (e) 5 m - 1995; (f) 5,25 m - 1996; (g) 6,5 m - 1996, (h) 7 m - 1996; Barres : 500 nm



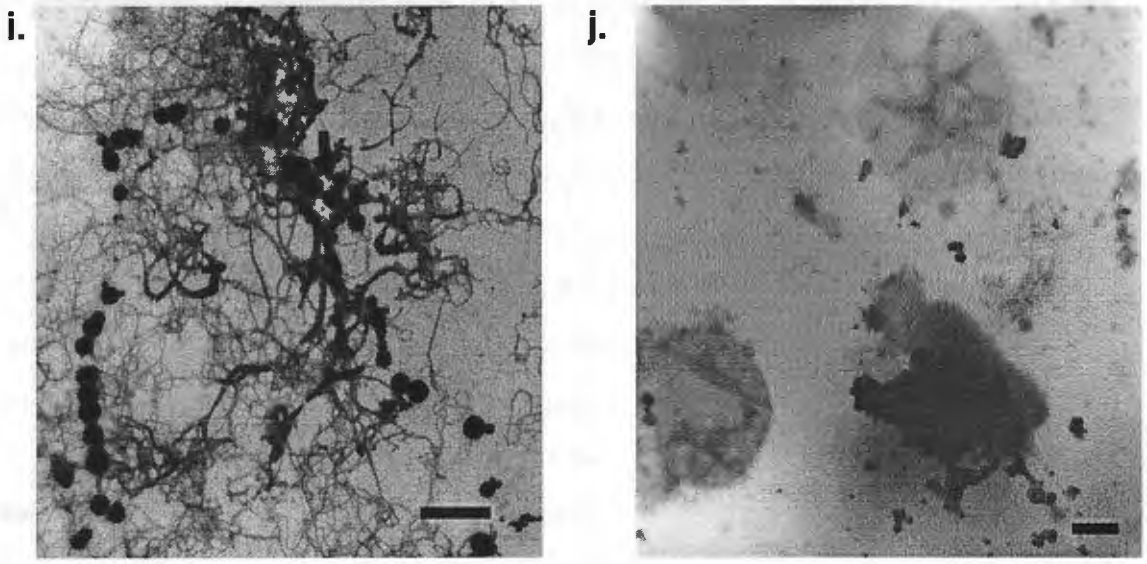
- Zone de formation des oxydes de fer allant de 6,5 à 7,5 m: De nombreuses bactéries associées à des pelotes de fibrilles sont présentes à ces profondeurs. Quelques sphérules électron-denses sont déjà présentes à 6,5 m (Figure 5.12g), ainsi que des fibrilles larges

observées, marquant le début du pic de fer particulaire. A 6,75 m, une présence assez importante de l'espèce proche de *Leptothrix* est remarquée, probablement source de nombreuses fibrilles lorsque ces structures se désagrègent. Le pic du fer particulaire est révélé par l'observation de grosses fibres gainées de fer (Ø = 20-25 nm à 6,5 m / 35-40 nm à 6,75 m / 40-60 nm à 7 m / 40-50 nm à 7,5 m) et de sphérules. De grosses bactéries (ϕ = 3-4 μm) sont intégralement recouvertes d'une couche denses de fer et sont observées à 6,75 m en 1996. Les mêmes espèces ont été visualisées près des couches du fond (~8 m) en 1995, probablement après une sédimentation rapide . A 7 m, le maximum du pic du fer particulaire est atteint; de grosses fibrilles (Ø = 40-60 nm) sont observées à coté des fibrilles initiales (Ø = 5 nm) pas encore recouvertes de fer. Le matériel présent à cette profondeur est extrêmement électron-dense, renforcé par une couche d'oxyde de fer omniprésente. Les sphérules et les fibrilles gainées de fer sont parfois associées à des masses sombres et empâtées, constituées probablement de pelotes de fibrilles dans lesquelles ont précipité des oxydes de fer. Les même espèces sont observées à 7,25 m, mais leur nombre décroît; les agrégats de fer semblent plus condensés en 1996 qu'en 1995. A 7,5 m le diamètre des gaines de fer a atteint son maximum et en 1996, le fer n'est déjà plus l'espèce dominante à cette profondeur, bien que de grosses fibres soient encore observées. En 1996 et partout à cette profondeur, les fibrilles fines ne sont plus homogènement marquées par le fer, mais par des points et des plaques plus ou moins électron-denses. Cette étape illustre probablement la première phase dans le recouvrement des fibrilles par les oxydes de fer, qui, une fois passée avec les premiers sites de nucléation formés, donnera naissance aux fibrilles fortement engoncées de fer, comme observé dans les profondeurs supérieures.

- Zone de sédimentation située à partir de 8 m: Les espèces du fer laissent place à des bactéries abondantes dans toutes les couches du lac, mais de nouveau majoritaires à cette profondeur. De nombreux détritus hétérogènes provenant de la sédimentation des couches supérieures sont observés dans cette dernière strate. Le matériel commence à être agrégé au milieu de pelotes de fibrilles. De ce fait, une perte de l'indivi-dualité des particules s'effectue au dépend de flocs et d'agrégats comprenant des mélanges de

toutes les couches supérieures. On observe encore des grosses entités de fer qui ont dû sédimenter rapidement sans être dégradées par les conditions réductrices régnant au fond du lac.

Figure 5.12 (suite): Micrographies de la colonne d'eau du lac Paul à différentes profondeurs: (i) 7,25 m - 1996; (j) 10 m - 1995; Barres : 500 nm.



5.7.1 Résultats de l'analyse morphologique

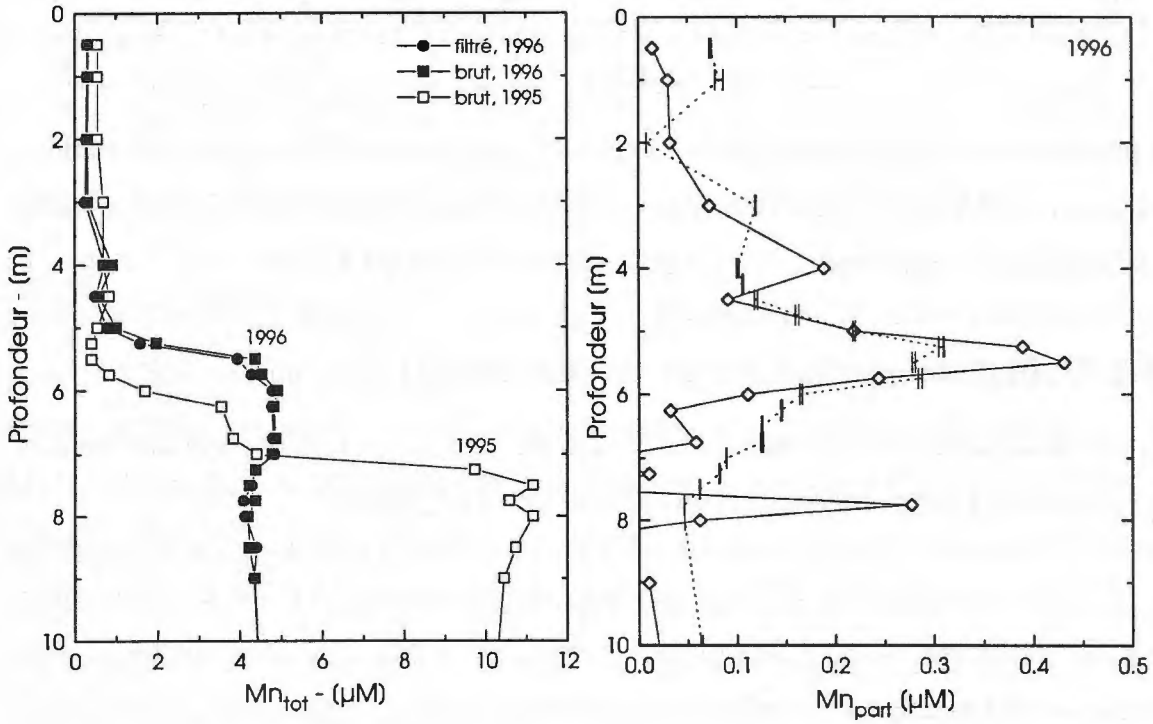
Bien que la colonne d'eau du lac Paul, prise dans son ensemble, présente une diversité élevée de matériel particulaire, on note d'une part la prédominance de fibrilles organiques et de bactéries à toutes les profondeurs et d'autre part que la colonne d'eau se divise en cinq strates bien définies. Les espèces riches en Mn et en Fe sont présentes dans deux strates bien séparées dont l'étude est développée ci-après.

5.8 Etude du manganèse dans la colonne d'eau du lac Paul

5.8.1 Profils chimiques du manganèse

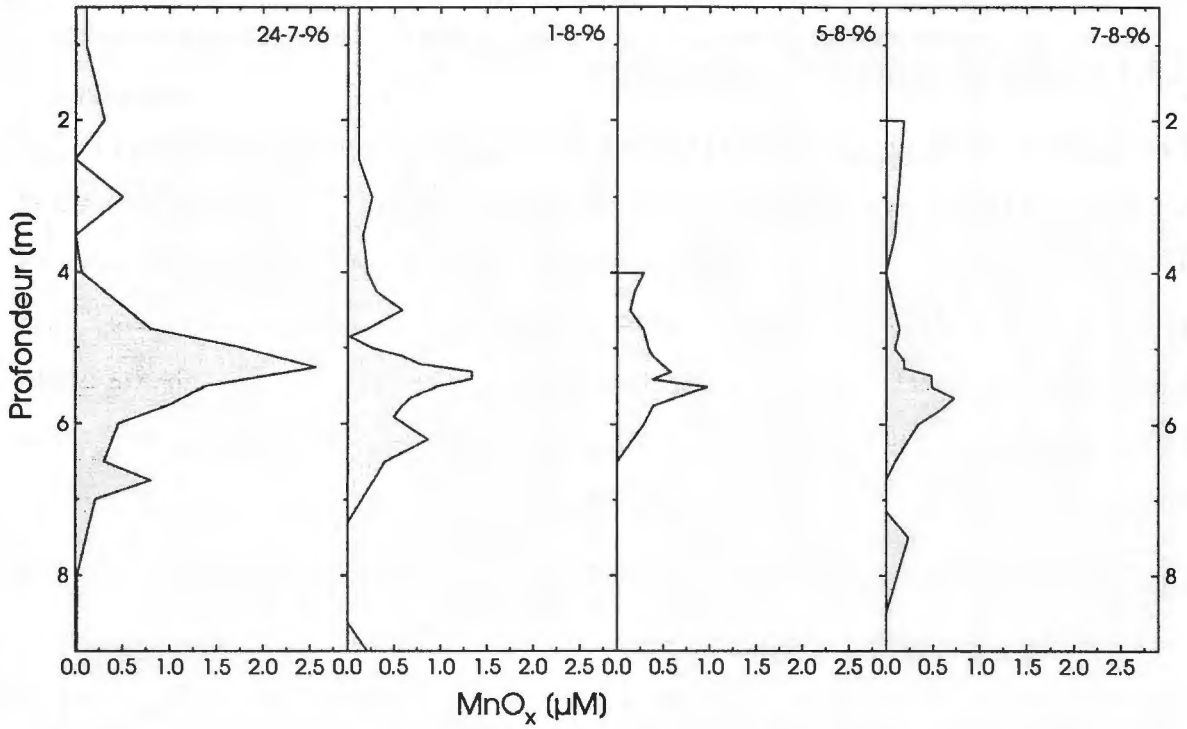
Les concentrations particulaires et totales de manganèse sont reportées dans la figure 5.13. On remarque que les concentrations totales sont fort différentes entre 1995 et 1996; aucun profil de $Mn_{part.}$ n'a été obtenu en 1995 pour des raisons analytiques. Sur les profils obtenus en 1996, de très faibles concentrations de $Mn_{part.}$, variant fortement dans le temps, sont observées; le maximum du pic de $Mn_{part.}$ se situe entre 5 et 6 m de profondeur. Les résultats obtenus par différence $[Mn]_{tot}$ - $[Mn]_{filtré}$ sont similaires à ceux obtenus directement sur le matériel récolté par filtration.

Figure 5.13: Profil du $Mn_{tot.}$, $Mn_{diss.}$, et $Mn_{part.}$ obtenu par différence (trait plein) ou sur membranes (pointillés).



Les mesures effectuées par colorimétrie, afin de doser le MnO_x réactif formé dans la colonne d'eau en 1996, sont données dans la figure 5.14. Les mesures présentent une forte décroissante avec le temps passant de 2,5 µM à 0,6 µM en deux semaines. Cette diminution de la concentration de MnO_x dans la colonne d'eau est accompagnée d'un enfoncement du pic particulaire vers les couches anoxiques du lac. Cette situation correspond à la réduction dissolutive des oxydes de Mn dans la colonne d'eau.

Figure 5.14: Profils de MnO_x obtenus par la méthode colorimétrique de *Kessick et al. (1972)*.



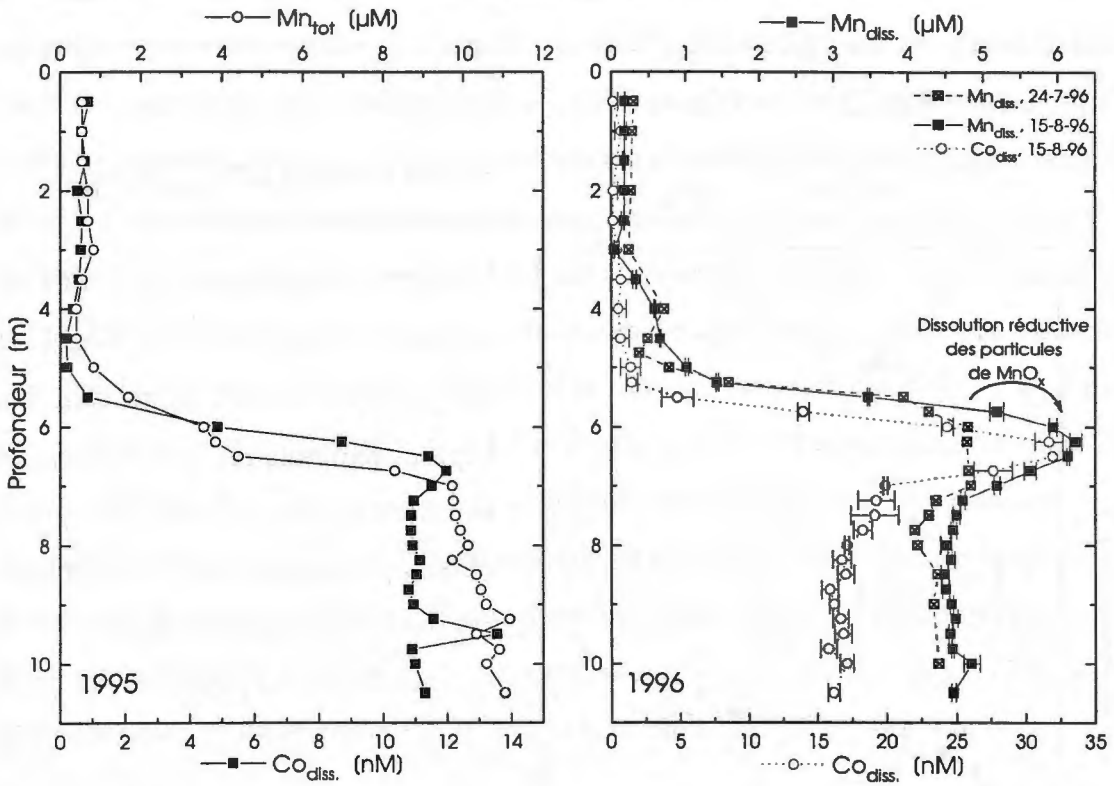
Ce phénomène de réduction a également été suivi par l'augmentation des concentrations de Mn_{diss} et de Co_{diss} à 6 m provoquée par la sédimentation des particules de MnO_x suivie de la réduction de ces entités à la chemocline (Figure 5.15, ch.5.8.2).

5.8.2 Profil chimique du Co et association avec le Mn

Les profils de Co et de Mn sont donnés dans la figure 5.15, où l'on observe une concordance similaire à celle observée en 1994 (*Taillefert et al., 1997*).

En 1996, les concentrations de $Mn_{diss.}$ et $Co_{diss.}$ atteignent un pic à 6,5m. Ce phénomène est habituellement observé lorsque des particules de Mn formées dans les strates supérieures sédimentent à l'interface oxique-anoxique et s'y décomposent, libérant ainsi du Mn^{2+} (*Davison et DeVitre, 1992*) à la profondeur de dissolution. Cette observation étant également valable pour le Co et particulièrement marquée en 1996; nous pouvons par conséquent penser que Co et Mn suivent une chimie similaire dans la colonne d'eau du lac Paul.

Figure 5.15: Profils de $Mn_{diss.}$ et $Co_{diss.}$ dans la colonne d'eau du lac Paul en 1995 et 1996.



L'excès de concentration de l'espèce dissoute, compris entre le maximum du pic et sa concentration dans le bas de la colonne d'eau, représente entre 84 et 91% de la concentration totale de $Co_{diss.}$ au fond du lac. En revanche le même calcul effectué pour le Mn donne un excès représentant 34 % de sa concentration dissoute au fond du lac. Si l'on attribue cet excès de concentration à la dissolution des particules de MnO_x à l'interface, il est possible de déterminer le rapport entre Co et Mn de la phase solide ayant sédimenté et s'étant dissociée. Le surplus de 14-15 nmole/l de Co par rapport à un excès de 1,55 µM de Mn représente un rapport de $8,9\text{-}9,8 \cdot 10^{-3}$, qui est très proche des valeurs obtenues par dosage sur les membranes pour le rapport Co:Mn dans les phases particulaires en 1996 (voir table 5.4).

En fonction des résultats encourageants concernant la chimie du Co et du Mn, nous avons complété nos échantillonages en 1996 en récupérant les filtres et en analysant chimiquement le matériel déposé. La concordance entre les pics particulaires de Mn et de Co est parfaitement illustrée dans la figure 5.16. Ce profil nous permet d'exclure la participation du Fe dans le piégeage du Co, puisqu'une corrélation évidente est mise en

évidence par la corrélation de $Mn_{part.}$ et $Co_{part.}$, alors que de faibles valeurs de $Co_{part.}$ sont observées dans la zone du pic de $Fe_{part.}$ et ne suivent pas la tendance observée pour le profil de $Fe_{part.}$ entre 7 et 7,5 m (voir figure 5.20).

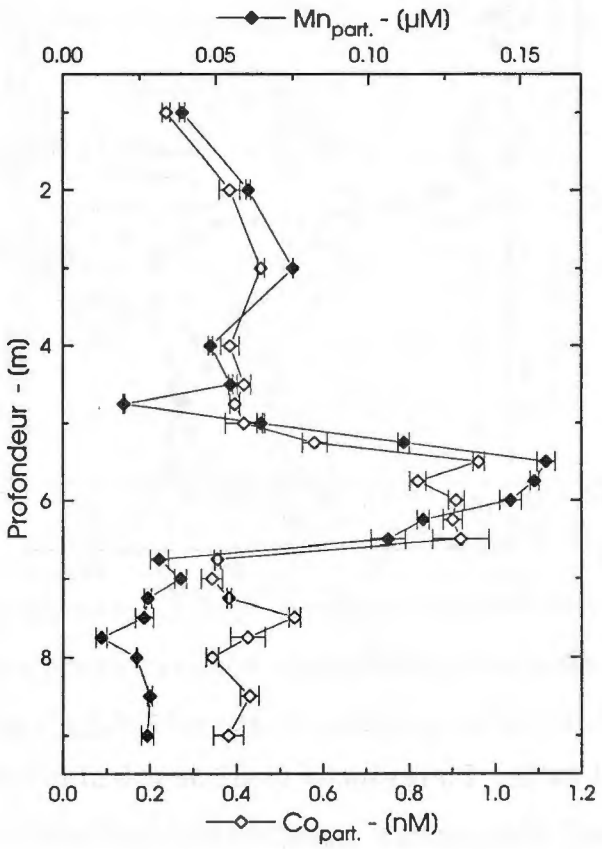


Figure 5.16: Profils de $Mn_{part.}$ et $Co_{part.}$ récupérés sur membranes en 1996.

Un profil plus fin nous a permis de mesurer le rapport entre $Co_{part.}$ et $Mn_{part.}$ (voir table 5.4) au sein des espèces particulaires de Mn retenues sur filtre et de confirmer le rapport obtenu par microscopie électronique (voir ch. 5.8.4) pour l'année 1995 (*Lienemann et al., 1997b*).

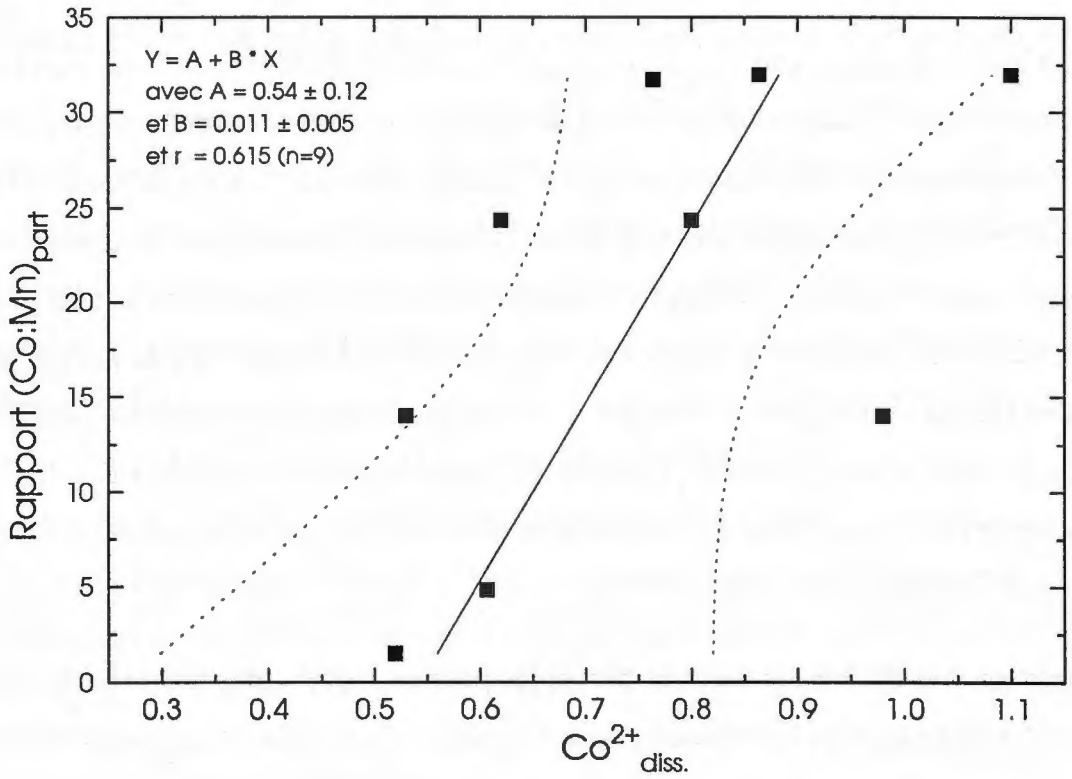
Table 5. 4. Rapports Co:Mn obtenus par analyse du matériel récupéré sur les membranes de filtration lors de deux expériences concurrentes.

Profondeur 1: 3-8-96, [m]	5,25	5,5	5,75	6	6,25	6,5
Rapport Co:Mn: [%]	0,52	0,607	0,53	0,62	0,764	0,864
Profondeur 2: 8-8-96, [m]	5,2	5,4	5,6	5,8	6	6,5
Rapport Co:Mn: [%]	0,66	0,6	0,91	0,98	0,8	1,1

Il est intéressant de noter que ces valeurs (toutes profondeurs confondues Co:Mn = 0,746% +/- 0,18) sont très proches du premier rapport extrapolé pour l'espèce particulaire responsable des excès de concentrations dissoutes à la chemocline. Une telle concordance entre ces valeurs confirme l'existence d'interactions entre Co et Mn_{part} et l'hypothèse de la

dissolution des particules de MnO_x à l'interface oxique-anoxique. Il est important de remarquer que le rapport Co:Mn dans la phase particulaire est plus élevé que celui mesuré entre les concentrations dissoutes proches du sédiment pour l'année 1996 ($3{,}6 \cdot 10^{-3}$), indiquant qu'un enrichissement en Co est observé dans la phase particulaire. Les valeurs de la table 5.4 indiquent une augmentation du rapport Co:Mn entre 5,2 m et 6,5 m (de 0,52 à 0,86 dans le premier profil et de 0,66 à 1,1 dans le second). Il est difficile d'accorder beaucoup de crédibilité à quelques mesures effectuées sur deux profils, mais on constate toutefois que les oxydes de Mn présents à 5,2 m se trouvent dans une eau contenant ~8 nM de $Co_{diss.}$ alors que les oxydes présents à 6,5 m sont en présence d'une concentration de $Co_{diss.}$ supérieure à 30 nM. En se basant sur nos travaux qui montrent un enrichissement du rapport Co:Mn dans la phase particulaire par rapport à la phase dissoute, il est raisonnable de penser que le rapport Co:Mn augmente dans les oxydes de Mn en fonction de la concentration de Co libre en solution. Cette hypothèse est renforcée par la figure 5.17 qui montre une augmentation du rapport Co:Mn avec la concentration de $Co_{diss.}$.

Figure 5.17: Relation existant entre $(Co:Mn)_{part.}$ et $Co_{diss.}$ dans la colonne d'eau du lac Paul.



5.8.3 Approche par microscopie électronique: Les particules de manganèse et leur association avec les bactéries

Une différence importante a été notée entre 1995 et 1996 dans la strate d'eau contenant des phases particulaires de manganèse (4,5 - 5,25 m): En été 1995, l'importante population de bactéries sphériques mentionnées précédemment apparaît systématiquement recouverte d'une couche électron-dense, qui s'avère être riche en Mn d'après les analyses TEM-EDS (voir ch. 5.8.4). A l'inverse, en été 1996, les prélèvements pour la microscopie électronique ont été effectués à partir de la fin du mois de juillet, après la réduction dissolutive des oxydes de Mn (voir ch. 5.8.1), les bactéries observées ne portent pas de croûte riche en Mn, ce qui a été confirmé par les analyses TEM- EDS.

Cette observation est intéressante par le fait qu'une concentration non-négligeable de MnO_x est mesurée en 1996 par analyses chimiques. Ceci met en évidence le fait qu'une espèce particulaire présente en faible concentration (< 0,5 µM) dans la colonne d'eau ne sera pas forcément détectée en microscopie électronique.

Le fait qu'une bactérie soit nécessaire pour l'oxydation du Mn^{2+} confirme les observations d'autres auteurs effectuées dans presque tous les milieux naturels (*Balikungeri et al., 1985; Klaveness, 1977; Maki et al., 1987; Cowen et al., 1986; Ehrlich, 1983*). Dans notre cas (été 1996) cependant, il semble que la présence de cellules bactériennes ne soit pas suffisante pour le développement d'une phase minérale de Mn. *Ghiorse et Hirsch (1979)* avaient déjà montré que la présence de cellules mortes de bactéries permettait la formation d'oxydes de fer, alors que l'oxydation du Mn^{2+} n'était possible qu'avec des cellules vivantes. Dans notre cas, les cellules observées sont vivantes, mais leur métabolisme ne semble pas permettre la formation de MnO_x à cette période du prélèvement.

En fonction des différentes théories proposées pour expliquer l'oxydation bactérienne du Mn^{2+} en MnO_x, trois hypothèses peuvent expliquer la non détection d'oxyde de Mn sur les bactéries dans le lac Paul lors de l'été 1996:

- 1. Il a été montré (*Sternbeck, 1996; Balikungeri et al., 1985*) que certaines espèces bactériennes n'exhibent une activité oxydante qu'après une phase de croissance exponentielle. Etant donné que peu de données sont disponibles sur les différentes populations bactériennes du lac Paul entre les années 1995 et 1996, il est probable que la ou les souches responsables de l'oxydation du Mn^{2+} n'aient pas atteint leur maturité lors de l'été 1996. Les mesures de pH et d'$[O_2]$ montrent en effet une situation similaire à celle du mois de mai en 1995 (M.Taillefert, communication personnelle) et sont donc les témoins d'un retard dans l'évolution saisonière du lac.
- 2. Certains auteurs (*DeVrind et al., 1986; Sternbeck, 1996*) affirment que les bactéries responsables de l'oxydation du Mn^{2+} nécessitent la présence d'oxygène pour la formation de MnO_x. Les études effectuées par *Tebo et Emerson (1985)* montrent que plus $[O_2]$ est élevée, plus la vitesse d'oxydation du Mn^{2+} est grande. En se basant sur ces travaux, une différence notable de $[O_2]$ est observée entre 1995 (~ 300 µM) et 1996 (~ 60 µM) à la profondeur de 5 m - 5,5 m, ce qui permettrait d'expliquer une diminution de la vitesse d'oxydation du Mn^{2+} en MnO_x.
- 3. D'autres auteurs (*Dubinina, 1978a et b; Kono et Fridovich, 1983*) expliquent la formation d'oxyde de Mn en réaction de défense de certaines bactéries vis-à-vis de la production de peroxydes formés par leur métabolisme. Ces bactéries permutent leur catalase comme une peroxydase, capable d'utiliser H_2O_2 comme un oxydant et de produire du MnO_x. La présence d'une période de fleur d'eau (bloom), favorable à la croissance aérobique des bactéries, serait donc favorable pour la formation de MnO_x par l'intermédiaire de l'excès de H_2O_2 formé. Il est probable que les bactéries présentes en 1995 aient utilisé ce mécanisme dans le but de détoxifier leur micro-environnement. En 1996, des concentrations faibles en nutrients organiques ont limité la croissance bactérienne et par là même la production de MnO_x.

- De plus, *Sternbeck (1996)* mentionne que l'oxydation du Mn^{2+} est observée uniquement dans une zone très fine de 25-50 cm, ce qui est en accord avec nos observations. En fonction des trois points décrits ci-dessus, il est nécessaire que les concentrations de Mn^{2+}, mais également de H_2O_2 ou d'O_2, soient suffisantes dans cette fine couche de la colonne d'eau, conditions qui ne semblent pas satisfaites en 1996.

5.8.4 Interactions entre cobalt et manganèse

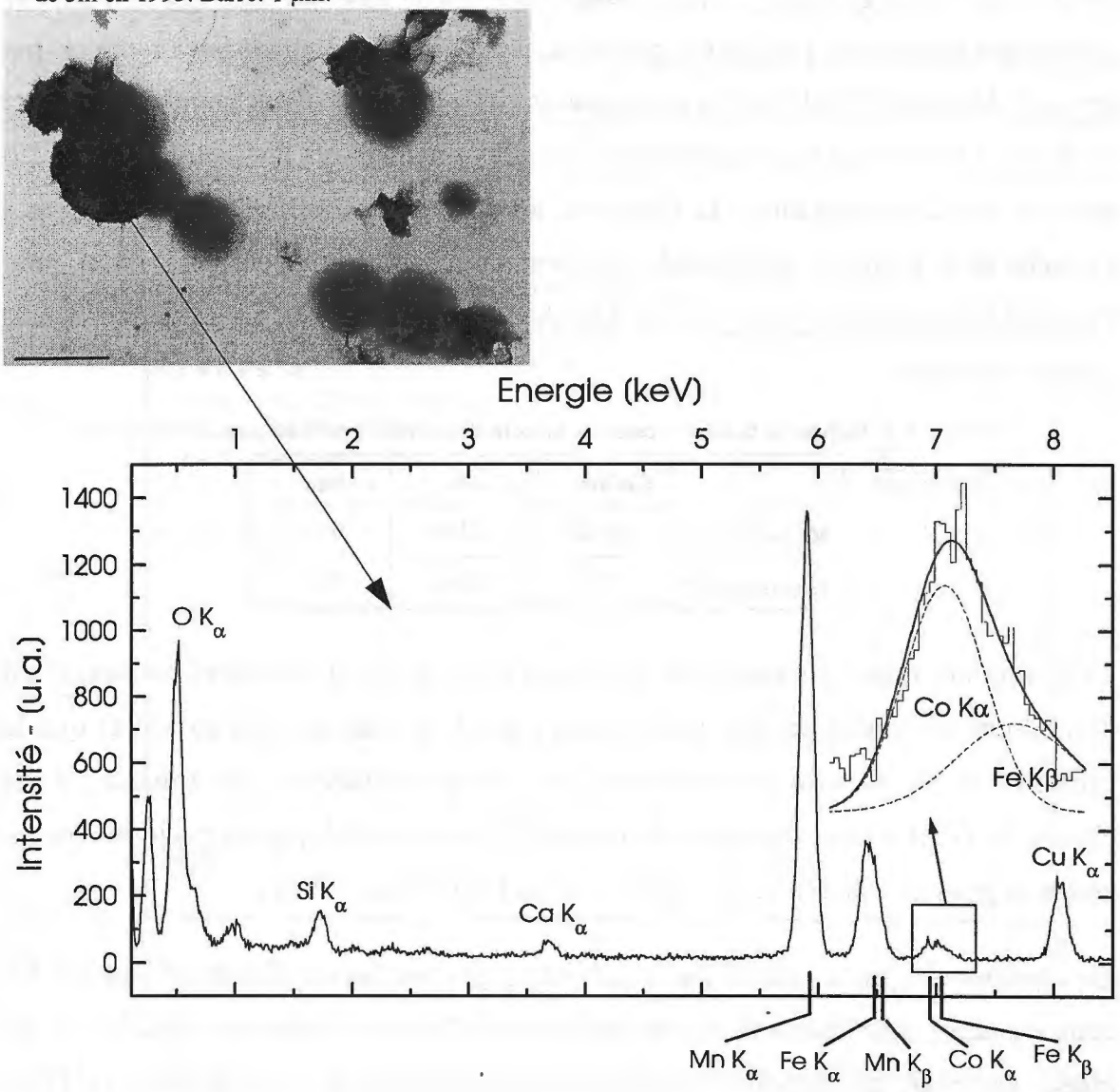
Plusieurs travaux dans la littérature décrivent les associations chimiques pouvant exister entre Co et Mn (*Lee et Tebo, 1994; Santschi, 1988; Knauer et al., 1982; Murray, 1975; Ehrlich et al., 1973*), mais aucune étude n'a permis jusque là la détermination directe du cobalt au sein de particules individuelles de manganèse. De nombreux artefacts intervenant lors de l'échantillonage, tels le colmatage des membranes ou la redissolution de matériel particulaire, peuvent modifier le schéma de spéciation des espèces dissoutes et particulaires (*Honeymann et Santschi, 1988; Buffle et al., 1992*). D'autre part, les limites de détection des techniques d'analyse conventionelles des métaux traces requièrent souvent une étape de préconcentration pour la détermination des espèces présentes dans les milieux naturels. En conjugaison, l'analyse directe de micro-particules environnementales à l'aide de la microscopie électronique reste une méthode à développer (*Leppard, 1992*).

De ce fait, le comportement des métaux traces dans les milieux naturels est souvent déduit d'études en laboratoires effectuées avec des concentrations bien plus élevées que celle rencontrées dans les systèmes aquatiques (*Stumm, 1993*), et basées sur les concepts théoriques de la chimie de l'interface eau-particule (*Stumm, 1992*).

Pour cette étude, nous avons choisi de nous focaliser sur la caractérisation des particules de MnO_x échantillonnées dans la colonne d'eau du lac Paul, après que l'étude chimique ait montré un comportement similaire entre les profils des espèces dissoutes de Mn^{2+} et de Co^{2+}. Les oxydes de Mn ont été identifiés par les analyses EDS dans une couche comprise entre 5 et 5,5 m.

Les spectres (voir un exemple dans la figure 5.18) présentent des particularités intéressantes dans la région située entre 5,5 et 7,5 keV. Le premier pic, situé à ~5,9 keV est composé de la raie Kα du Mn exclusivement, alors que le second pic, à ~6,4 keV, est une superposition entre la raie Kβ du Mn et la raie Kα du Fe. Le dernier pic compris dans cette série (~7keV) est une superposition entre Kβ du Fe et Kα du Co, tel qu'il est résolu par la déconvolution spectrale. Bien que le rapport signal/bruit soit assez faible dans cette région (~4-6 fois la limite de détection 3σ), il est facile d'identifier le pic du Co; cette observation s'est trouvée répétée sur les différents spectres enregistrés aux profondeurs de 5 et 5,5 m.

Figure 5.18: Spectre EDS obtenu sur la croûte de Mn observée sur les bactéries du lac Paul à la profondeur de 5m en 1995. Barre: 1 μm.



Une participation non négligeable, mais aléatoire du signal du fer est observée dans les spectres obtenus sur les oxydes de Mn analysés en 1995. Etant donné que plusieurs auteurs (*Balistrieri et al., 1992 b; Viollier et al., 1995*) associent parfois la chimie du Fe et celle du Co, nous avons voulu vérifier que la présence du fer dans les oxydes de Mn n'était pas corrélée aux pics du Co. Dans cette optique, nous avons déterminé les rapports molaires à l'aide de la méthode sans standard (*Reed, 1993;* voir ch. 2.3) entre Co:Mn et Fe:Mn au sein des phases particulaires analysées.

Les concentrations de $Mn_{part.}$ en 1995 et celle de $Co_{part.}$ en 1995 et 1996, déterminée par la différence $[X]_{total}$ - $[X]_{filtré}$, étant au-dessous des limites de détection des techniques employées lors de ces périodes, il est difficile d'obtenir ces rapports par analyse chimique globale. Si les investigations menées en 1996 ont permis de mesurer un rapport Co:Mn au sein des phases minérales retenues sur les membranes de filtration, des artefacts dus à la filtration ne sont pas à exclure et les mesures à l'échelle de la particule individuelle représentent une alternative élégante. Ainsi, pour l'ensemble des spectres contenant du Mn, du Fe et du Co (n=9), les rapports mesurés sont les suivants:

Table 5. 5. Rapports molaires calculés au sein des entités particulaires de Mn (1995)

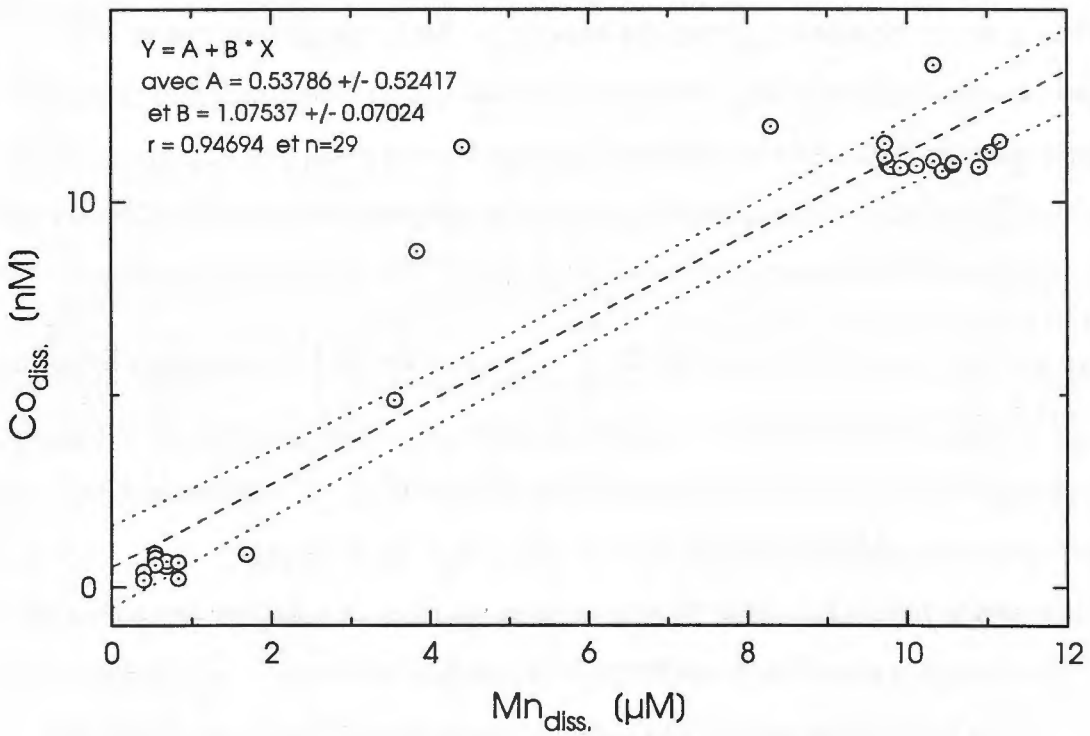
	Co/Mn	Co/Fe	Fe/Mn
Rapport:	$2{,}0 \cdot 10^{-2}$	0,106	0,33
Incertitude:	35%	128%	88%

Une première remarque concerne le rapport entre le Co et les autres phases; il est clairement démontré par ces trois valeurs que le Co est corrélé au Mn et que la présence du Fe au sein de ces entités est tout à fait fortuite. En fonction de la chimie du Fe et du Mn présentée dans le ch.3, il est normal que les bactéries recouvertes de précipités de Mn piègent également du Fe (*Ghiorse, 1984*).

En considérant que la totalité du cobalt est piégé dans les oxydes de Mn, et que les deux éléments sont libérés de façon concomitante lors de la réduction dissolutive des phases de MnO_x, un rapport Co:Mn peut être extrait pour la phase dissoute en 1995. Une droite de régression obtenue avec les concentrations dissoutes de Mn et de Co

est présentée dans la figure 5.19, pour laquelle on obtient un rapport Co:Mn $2{,}6 \cdot 10^{-3}$ pour l'année 1995. Le rapport trouvé au sein des entités particulaires est donc approximativement dix fois supérieur, indiquant un enrichissement en Co dans les entités comprenant bactéries et oxydes de Mn. Les observations effectuées par analyse chimique globale en 1996 donnent un rapport inférieur, mais proche de 10^{-2}, soit la moitié de celui mesuré par la microscopie en 1995. Une comparaison peut être donnée entre ces deux valeurs en considérant que le rapport trouvé sur les oxydes de Mn par microscopie électronique est basé sur un nombre relativement restreint de particules (n=9), au contraire des filtres qui récoltent toutes les particules présentes à la profondeur considérée. Lors de l'analyse par microscopie électronique, nous avons porté notre attention sur les particules contenant du Co de façon évidente, et le rapport de $2 \cdot 10^{-2}$ est obtenu pour des spectres dont le rapport signal/bruit sur le pic Kα du Co est de 4 à 6. Une valeur moindre du signal Co Kα risque donc de disparaître dans le bruit de fond du spectre aux alentours de 7 keV et peut ne pas être considérée.

Figure 5.19: Relation entre $Co_{diss.}$ et $Mn_{diss.}$ dans la colonne d'eau du lac Paul (1995).



Dans les deux cas cependant, la valeur trouvée est supérieure à celle du rapport entre les phases dissoutes et une pré-concentration du Co dans les particules est évidente par les

deux méthodes. Cette observation est en accord avec les expériences de *Fukai (1968)* qui utilise les oxydes de Mn afin de concentrer le Co dans les eaux marines.

Si l'on s'interroge sur la présence du fer et du cobalt sur les spectres de MnO_x, chacun des deux éléments doit être considéré séparement. La présence fortuite de Fe peut être expliquée de plusieurs façons:

- La plupart des bactéries responsables de l'oxydation du Mn^{2+} peuvent également oxyder le Fe^{2+} (*Galionella, Leptothrix spp, Leptothrix discophora, Shewanella putrefaciens*; Gounot, communication personelle; *Ehrlich, 1996*). Le cas d'*Arthrobacter siderocapsulatus* est particulièrement intéressant puisque cette bactérie produit du H_2O_2 en période de forte croissance, qu'elle dégrade en utilisant du Mn^{2+} et sa catalase. Il a été montré que cette bactérie est également capable de se servir du Fe^{2+} pour cette réaction (*Dubinina, 1978b*).
- Des études de laboratoire ont d'autre part mis en évidence que le $Fe(III)_{part.}$ fraîchement formé a un effet catalytique sur l'oxydation du Mn^{2+} (*Hem, 1978*). La forte concentration de $Fe_{part.}$ dans les eaux du lac Paul expliquerait donc la présence du fer dans les spectres de MnO_x. De plus, au pH présent à 5 m (5,9-6,6), les oxydes de Fe(III) et ceux de Mn présentent des charges opposées (*Buffle, 1988, pp. 332*) et l'interaction électrostatique entre ces deux entités permettrait de former des agrégats mixtes.

En ce qui concerne la présence de Co dans les oxydes de Mn, plusieurs hypothèses peuvent être formulées:

- Des expériences menées avec la souche bactérienne SG-1 ont montré que cette bactérie est capable d'oxyder le Mn^{2+} en MnO_x dans les milieux marins (*Mandernack et al., 1995*). La même bactérie mise en présence de solutions de Co^{2+} exclusivement est capable d'oxyder ce dernier en CoOOH (*Lee et Tebo, 1994*). Une médiation bactérienne permettant l'enrichissement de Co dans les oxydes de Mn n'est donc pas à exclure.

- Des investigations récentes sur la structure cristalline de γ-MnO_2 par EXALFS ont permis de montrer des assemblages de tunnels présentant de nombreux défauts structuraux (*Godart et al., 1992; Ferris et al., 1987; Turner et Buseck, 1981*). Cet oxyde est le plus proche structurellement des oxydes de Mn formés à la surface des bactéries. De par sa structure en tunnels, habituellement remplis avec des molécules d'eau et des cations, cet oxyde serait capable d'héberger l'ion Co^{2+} et de favoriser son oxydation en Co^{3+}, dont le rayon ionique est quasi identique à celui de Mn^{4+} (Co^{3+}(low spin) = 0,53 Å; Mn^{4+} = 0,54 Å; *Burns, 1976; Manceau et al., 1992*).

5.8.5 Résumé des résultats obtenus concernant le manganèse dans la colonne d'eau du lac Paul

Les résultats obtenus par les analyses chimiques de Co et Mn particulaires indiquent clairement une forte affinité entre les deux composés. Les membranes récupérées en 1996 montrent que le Co est fortement associé au Mn, mais que le fer n'intervient pas dans sa spéciation.

Un enrichissement du rapport Co:Mn au sein des particules de MnO_x est mesuré sur les filtres. Il est toutefois important de noter que la filtration peut engendrer des artefacts par l'adsorption de $Co_{diss.}$ sur les particules de MnO_x déposées sur le filtre et par là même fausser la valeur du rapport Co:Mn. Cette situation ne semble cependant pas s'être produite puisque le rapport Co:Mn obtenu au sein de particules individuelles par la microscopie électronique en 1995 est supérieur (voir ch. 5.8.4) à celui obtenu par l'analyse chimique des échantillons prélevés en 1996. La diminution de la concentration de MnO_x en fonction du temps, conjuguée à l'augmentation de concentration de $Co_{diss.}$ observée à la chemocline lorsque ces particules sédimentent et se réduisent confirment également cet enrichissement puisqu'une valeur similaire du rapport Co:Mn est obtenue en mesurant le rapport des excès de concentrations produits par la réduction dissolutive des oxydes de Mn à la chemocline.

Les investigations menées en 1995 ont permis de montrer par microscopie que le Co était quantitativement associé aux oxydes de Mn exclusivement. Ces résultats ont été confirmés

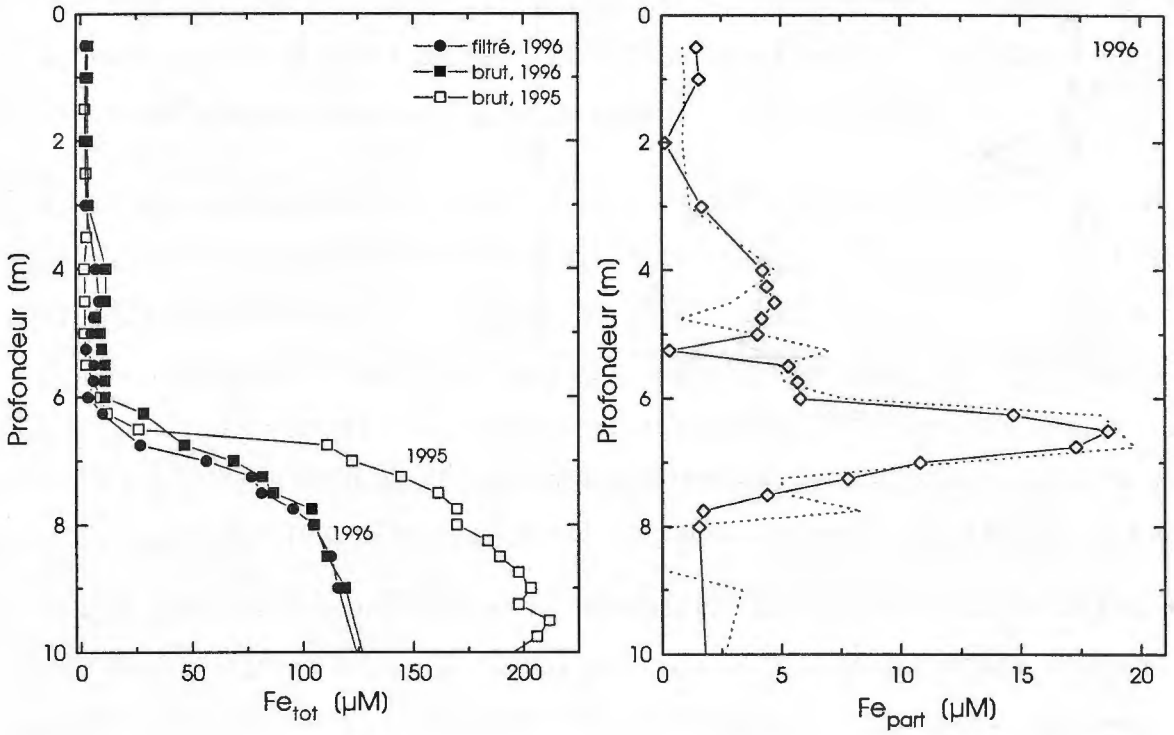
par analyses chimiques des membranes de filtration en 1996, montrant des pics de Co et de Mn particulaires parfaitement corrélés au niveau de la profondeur. L'enrichissement du Co dans la phase particulaire de Mn a également été mis en évidence avec ces deux techniques. Le rapport Co:Mn trouvé dans notre étude (Co : Mn ~ $2 \cdot 10^{-2}$ par EDS [1995] et $1 \cdot 10^{-2}$ par analyses chimiques [1996]) est proche des valeurs trouvées dans la croûte terrestre ($2,6 \cdot 10^{-2}$) et dans les eaux marines ($2,5 \cdot 10^{-2}$; *Whitfield et Turner, 1987*). Il peut être comparé aux récentes valeurs de rapport Co:Mn observées dans la colonne d'eau d'autres lacs anoxiques. Ainsi, *Kepkay (1985)* montre que des valeurs Co:Mn de 1,1-$1,2 \cdot 10^{-2}$ sont obtenues en considérant les particules d'oxyde présentes sur les sédiments du lac Charlotte, alors qu'en considérant de plus grosses concrétions ce rapport chute à 10^{-3}. Finalement, en utilisant les valeurs trouvées par *Viollier (1995)* dans des trappes à sédiment, le rapport particulaire varie entre $1,5 \cdot 10^{-3}$ et $2,8 \cdot 10^{-3}$.

5.9 Etude du fer dans la colonne d'eau du lac Paul

5.9.1 Spéciation chimique du fer

Les concentrations totales et particulaires de Fe sont reportées dans la figure 5.20 pour les échantillonages de 1995 et 1996. Ces données mettent en évidence une grande variation de concentrations au cours du temps, comme nous l'avons mentionné précédemment. Le $Fe_{part.}$, avec des concentrations maximales situées entre 6 et 7 m de profondeur, est présent (2-3 µM) dans toute la colonne d'eau.

Figure 5.20: Spéciation du Fe dans la colonne d'eau du lac Paul; pour les données de 1996, le profil en point-illés ($Fe_{part.}$) est obtenu par différence $[Fe]_{tot}$ - $[Fe]_{filtré}$, alors que le profil en trait plein est obtenu par analyse du matériel déposé sur les membranes.



Les concentrations de Fe^{2+} mesurées (Figure 5.21) sont en concordance avec le profil de Fe_{tot}, et reflètent également la différence marquée de concentrations d'une saison à l'autre (déja mentionnée dans le cas du Mn). Nous constatons que le schéma de fractionnement produit des résultats cohérents: les mesures obtenues par différence $[Fe]_{total}$ - $[Fe]_{filtré}$ sont identiques aux analyses obtenues directement sur les filtres. Lors de chaque campagne, de nombreux profils de concentration des espèces du fer ont été enregistrés; ces profils présentent une grande cohérence et, bien qu'un biais systématique ne puisse être exclu

(par exemple artefact de filtration; *Buffle et al., 1992*), nous pouvons conclure que l'approche analytique adoptée (spéciation multi-méthodes) est reproductible. Par conséquent, les variations de stocks du fer observées entre 1995 et 1996 ne peuvent pas être imputées à des erreurs de méthodologie analytique.

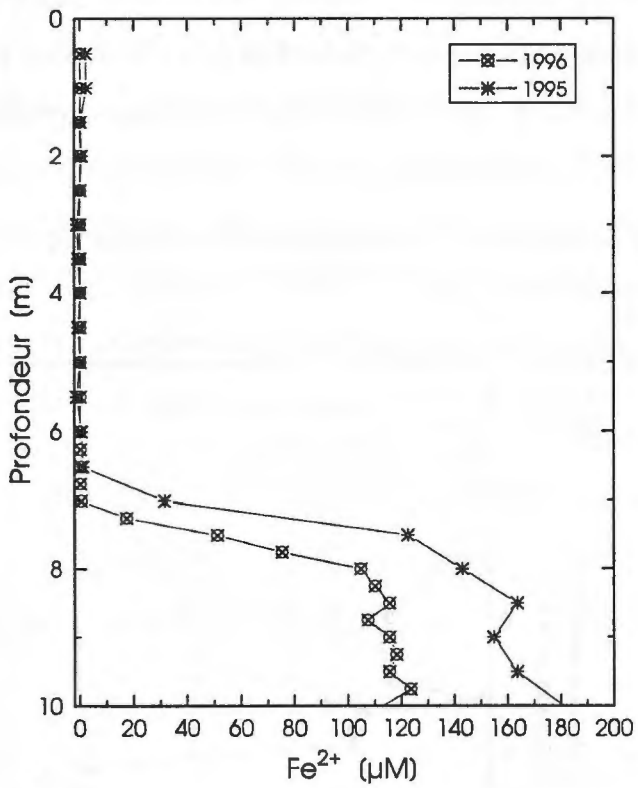


Figure 5.21: Profils de Fe^{2+} pour 1995 et 1996.

En revanche, deux hypothèses prenant en compte la totalité du système eau-sédiment peuvent élucider la forte différence en concentrations qui affecte les profils de Fe_{tot}:

- Le système du lac Paul n'a aucune entrée d'eau connue (rivières ou sources), mais un caniveau qui permet aux eaux en excès de s'écouler dans le lac Peter; ceci laisse supposer que des sources souterraines alimentent le lac. Aucune étude n'a jusqu'à présent permis de mettre en évidence ces éventuelles entrées et leurs apports chimiques dans le lac. L'importante couche de neige et de glace qui recouvre la région pendant l'hiver constitue à elle seule une masse d'eau susceptible d'être intégrée au lac et dont il faut tenir compte à la fin du printemps. En estimant que la couche de neige hivernale peut se transformer en 20 cm de glace, la fonte de cette couche sur un périmètre de 100 m autour du lac représente un volume d'eau équivalent à 33 % du volume du lac. Si ces

infiltrations se font sur les cotés du lac à différentes profondeurs, il est alors facile d'expliquer la variation des concentrations totales de Fe et des autres éléments par un effet de dilution survenant au printemps.

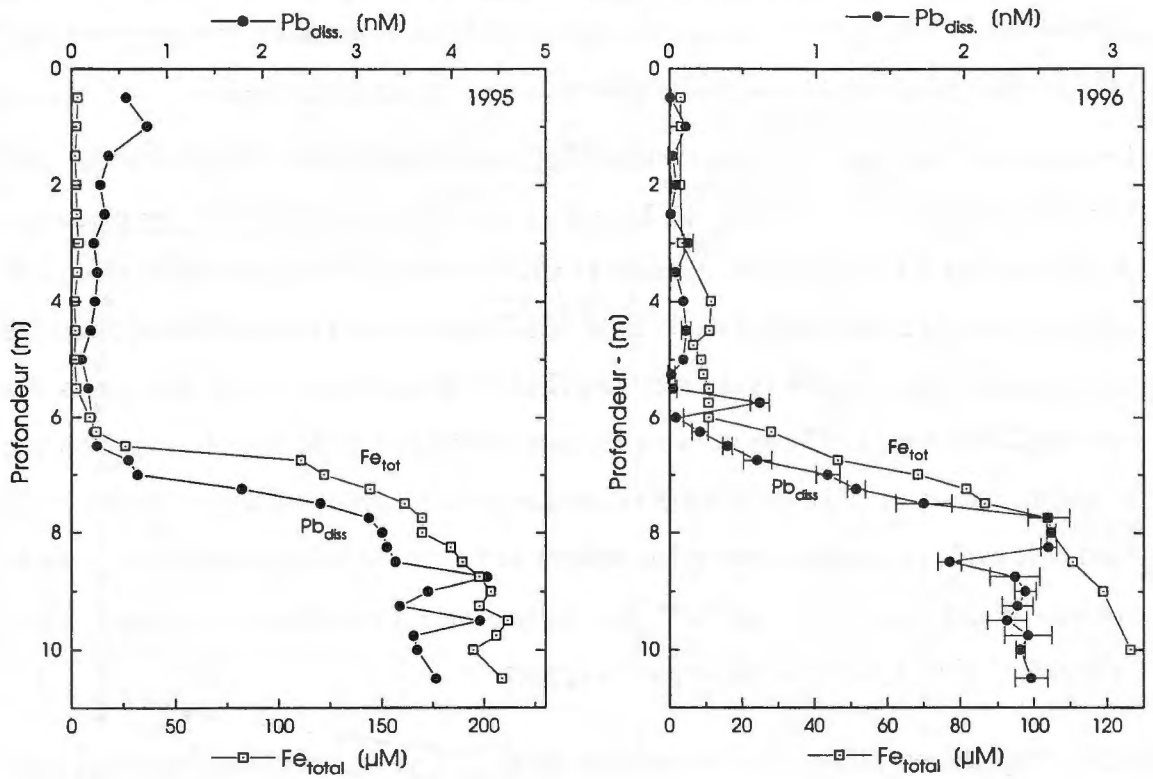
- Le système du lac Paul doit être considéré dans son ensemble avec le sédiment qui contient les particules ayant sédimenté. Lors d'un été très productif (1995), les particules de fer formées à l'oxycline sédimentent et s'accumulent à l'automne sur le sédiment, appauvrissant la concentration en fer dans la colonne d'eau. Pendant l'hiver, l'activité microbienne étant ralentie (gradients de pH et de température moins prononcés dès octobre; *Taillefert, 1997*), ce stock de fer reste à la surface du sédiment. Au printemps, la sédimentation massive de matière organique renforce les conditions réductrices du fond et le cycle reprend son cours; les espèces du fer sont réduites et relarguées dans la colonne d'eau sous forme de Fe^{2+}, qui diffuse vers l'oxycline. La colonne d'eau "s'enrichit" alors à nouveau en fer par cet apport.

Ces deux hypothèses, reliées aux observations du ch. 5.5, permettent d'expliquer les variations de concentration du Fe d'une saison à l'autre. Les fortes concentrations de l'été 1995 sont en effet justifiées par un hiver 1994/1995 particulièrement clément avec des chutes de neige assez faibles (voir figure 5.9), suivi d'un été assez chaud et productif. L'activité microbienne en surface est donc peu ralentie lors de l'hiver 1994/1995 et les effets de dilution sont moindres au printemps 1995. A l'opposé, l'hiver 1995/1996 est particulièrement rigoureux avec de fortes chutes de neige (~1 m) et l'été 1996 est assez froid. Les profils physico-chimiques présentés au ch. 5.4 montrent une productivité en surface ralentie par rapport à 1995.

5.9.2 Profil chimique du plomb

La figure 5.22 montre une corrélation entre les profils de Fe et de Pb pour les années 1995 et 1996. Le calcul du rapport ($Pb_{diss.}^{1996}/Pb_{diss.}^{1995} = 0,64$) moyenné sur les profondeurs situées entre 8 et 10 m, est égal au rapport entre les concentrations totales de Fe, respectivement de Mn au fond de la colonne d'eau entre 1995 et 1996. Cette observation permet de renforcer l'idée qu'une dilution générale est observée dans la colonne d'eau en 1996, affectant la concentration du Fe, du Mn et du Pb dans la même proportion.

Figure 5.22: Corrélations observées entre $Pb_{diss.}$ et Fe_{tot} dans la colonne d'eau du lac Paul.



La faible concentration de Pb dans la colonne d'eau du lac n'a pas permis d'obtenir un profil du $Pb_{part.}$, la différence entre les deux fractions (Pb_{total} et $Pb_{filtré}$) étant inférieure aux incertitudes analytiques. La procédure utilisant le matériel particulaire sur les membranes de filtration n'a également fourni aucune indication sur l'éventualité d'un pic de $Pb_{part.}$.

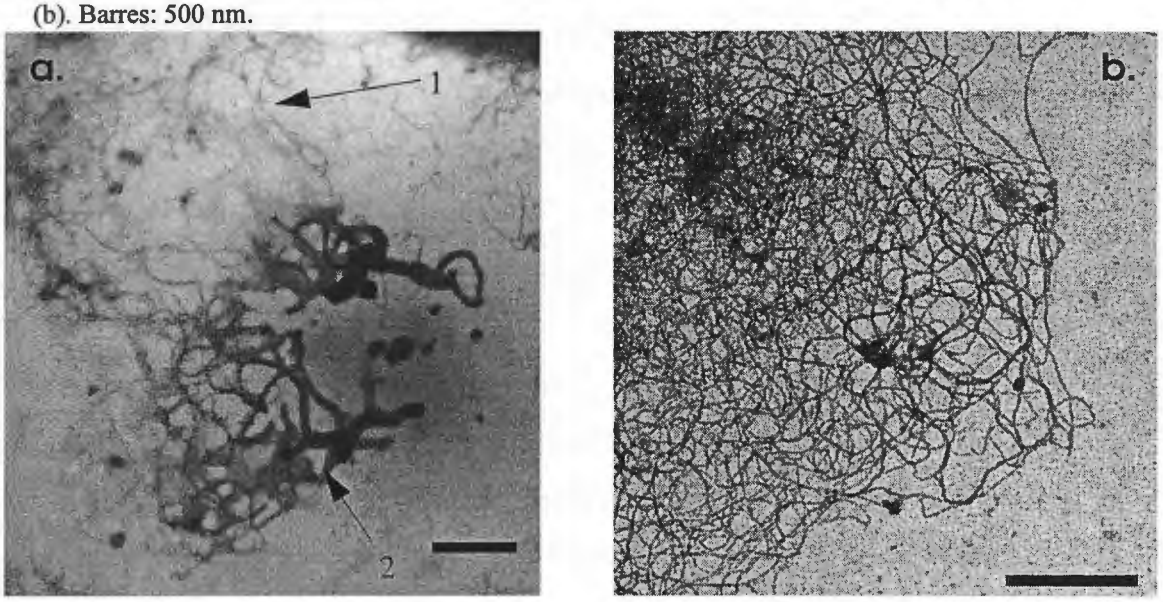
Une discussion plus approfondie sur la spéciation du Pb est à rechercher dans *Taillefert (1997)*, qui présente les différentes formes attendues du Pb en fonction de la chimie de la colonne d'eau du lac Paul.

5.9.3 Colloïdes de Fe: magma fibrillaire

L'analyse morphologique commencée en 1995 a révélé la grande importance des fibrilles organiques dans la zone de turbidité maximale. Le matériel organique est par essence peu électron-dense et peu visible lors de la visualisation en microscopie électronique. Le cas du lac Paul est surprenant par le fait que la concentration des fibrilles est très importante et que ces dernières sont facilement visualisées en mode de transmission. L'analyse physico-chimique (ch. 5.9.7), couplée aux observations de microscopie, a permis de montrer que

des fibrilles organiques (segment 1 sur Figure 5.23a) étaient recouvertes d'une couche d'oxyde de fer, pouvant former des gaines (segment 2 sur Figure 5.23a) de diamètre (40-50 nm) jusqu'à 10 fois supérieur au diamètre de la fibrille originelle (1-5 nm). L'inspection des différentes couches de la colonne d'eau montre que les micro-fibrilles commencent à être recouvertes de fer à 7,5 m en 1996 (voir figure 5.23b), profondeur à laquelle l'oxygène n'est quasi pas présent, tandis que de fortes concentrations de Fe^{2+} (55 µM) sont observées. Le dépôt de fer sur les fibrilles est alors observé sous forme de plaques électron-denses, créant une base sur laquelle la gaine se développe. Cette observation est en accord avec les hypothèses émises par *Manns (1988)* et *Degens et Ittekot (1982)*. De nombreuses études ont permis de montrer que la matière organique est souvent le siège d'une précipitation d'oxyde de fer (*Fortin et al., 1996; Cowen et Silver, 1984*; ch.4 de cette étude) ou de manganèse (*Mandernack et al., 1995; Cowen et Silver, 1984*; ch. 4 de cette étude), mais il n'a jamais été mis en évidence que la morphologie de ces précipités est dictée par la présence de la matière organique agissant en tant que centre de nucléation.

Figure 5.23: Aspect des entités organo-minérales observés dans le lac Paul à 7m - 1995 (a) et à 7,5 m - 1995 (b). Barres: 500 nm.



Dans le but de comprendre ce comportement, nous avons synthétisé des oxydes de fer en laboratoire (cf. ch. 3.3) dans des conditions similaires à celle du lac Paul. Les résultats montrent qu'avec de très fortes concentrations de matière organique, la morphologie des précipités change, affectant leurs propriétés physiques. Mais aucune de ces synthèses n'a permis d'obtenir des fibrilles engainées telle que nous les avons observées sur le lac Paul.

Afin de mettre en évidence l'origine de cette différence, nous avons indiqué dans la table ci-dessous les cations susceptibles d'être complexés par les fibrilles organiques, dans le cas des synthèses et dans le lac Paul:

Table 5. 6. Concentrations des cations en synthèse et dans le lac Paul à 7m:

Cations:	NH_4^+	Mg^{2+}	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Total:
Synthèse: [µM]	20	0	0	250	1500	10	0	1780
Lac Paul: [µM]	5	25	20	15	80	150	4	299

Dans le lac Paul, on constate que le Fe^{2+} représente environ 50% des cations susceptibles d'être complexés par la matière organique, alors que dans le cas des synthèses, cette proportion n'est que de 0,56%. Il est donc fort probable que la morphologie finale des oxydes synthétiques de fer soit influencée par la différence de concentrations existant entre les cations présents dans les conditions initiales de synthèses. Ces approximations ne tiennent pas compte des constantes de complexation définissant l'affinité des cations pour les groupes chimiques de la fibrille complexante, et la concentration des cations en solution ne représente qu'une condition minimale pour que cette complexation ait lieu. A notre connaissance, aucune constante de complexation n'est connue pour ces différents cations, même avec un groupement monosaccharide simple.

5.9.4 Carbone organique dissous

Les concentrations de carbone organique dissous [COD] dans le lac Paul sont données dans la figure 5.24. On remarque que la concentration est élevée entre la surface et 6 m (environ 3 fois supérieure à celle du lac de Lugano). Une augmentation assez marquée de [COD] est observée à partir de 7 m, pour atteindre 0,5-0,6 mM au fond du lac. Il est important de noter que les mesures de carbone organique total se sont révélées systématiquement moins élevées que les valeurs de COD et que des mesures effectuées sur le matériel particulaire récolté par filtration sur des membranes en fibre de verre n'ont pas donné de résultats satisfaisants. L'augmentation de la concentration de COD dans la zone des 7 m correspond aux observations faites sur les spécimens de microscopie électronique (ch. 5.7), révélant une forte présence de matériel fibrillaire organique à partir de cette profondeur.

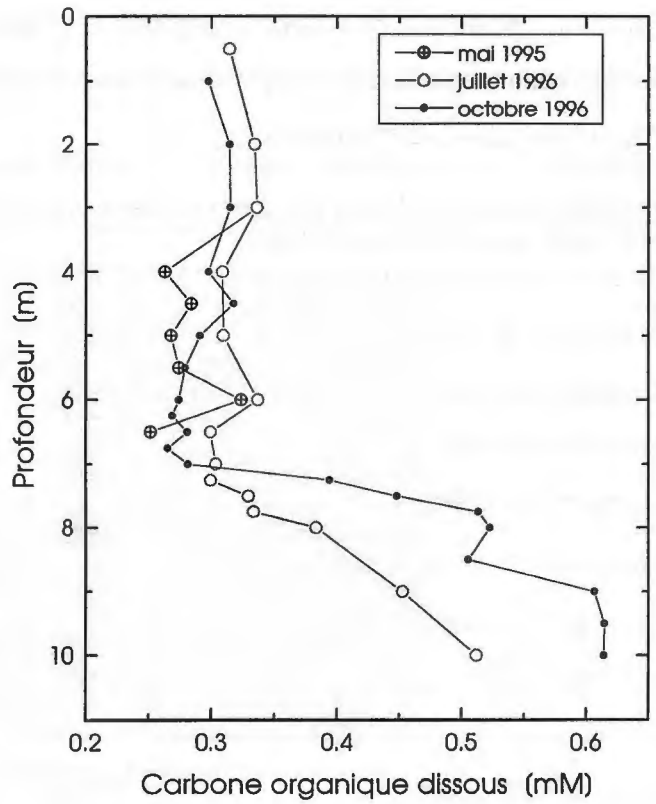


Figure 5.24: Profils de Carbone Organique Dissous mesurés dans la colonne d'eau du lac Paul.

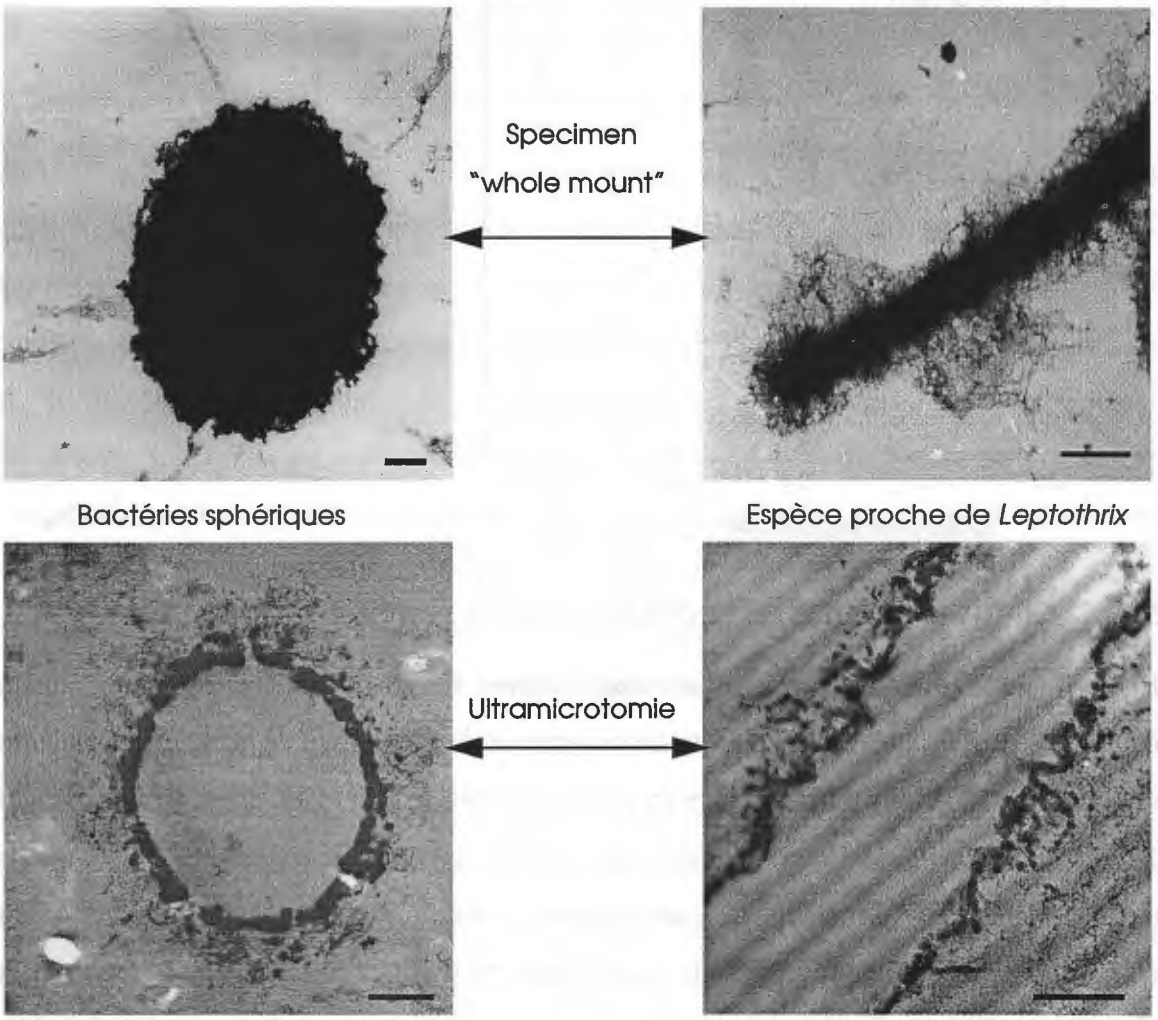
5.9.5 Résultats obtenus avec des sections de Nanoplast

Etant donné le grand nombre d'espèces particulaires fortement recouvertes d'une couche dense de fer amorphe, nous avons étudié la nature réelle des agrégats présents dans la zone du pic de $Fe_{part.}$. Nous nous sommes en particulier intéressés à deux espèces présentes en 1996, l'une décrite comme une grosse bactérie (∅ = 3-4 µm) intégralement recouverte d'une couche dense de fer lors de l'analyse morphologique, l'autre étant l'espèce proche de *Leptothrix*. Pour cela nous avons centrifugé 5 ml d'eau prélevée à 7 m et récupéré la phase particulaire au fond du tube. Sous conditions anoxiques, ce culot a été introduit dans de la résine Nanoplast™ et polymérisé selon la procédure décrite au ch. 3.1.2. Des sections de 140-420 nm d'épaisseur ont ensuite été préparées. Les deux espèces sont présentées sur la figure 5.25 telles qu'elles sont observées après ultracentrifugation sur grille ("whole mount") et dans les sections d'ultramicrotomie.

La préparation par "whole mount" présente des entités très denses, qui auraient donc tendance à sédimenter rapidement. Au contraire, les sections présentent des croûtes de fer amorphe assez fines (~100 - 120 nm) encapsulant un vide, probablement occupé par une

bactérie initialement présente. Ces entités ont une densité beaucoup plus proches de celle de l'eau et leur sédimentation sera de ce fait beaucoup plus lente que ce que laissaient suggérer les observations effectuées sur des préparations par "whole mount".

Figure 5.25: Aspect de deux espèces fortement concrétionnées dans le lac Paul; observation avec des préparations par ultracentrifugation ("whole mount") et en sections. Barres : 500 nm.

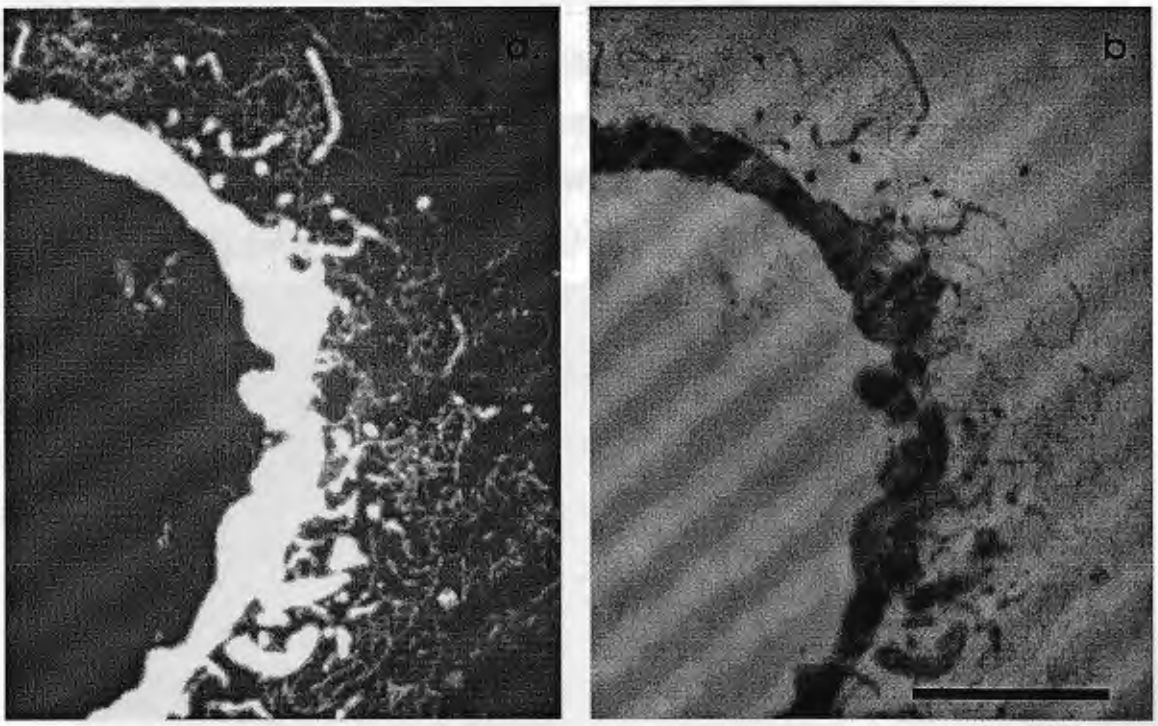


D'autre part, les structures montrent des fibrilles fortement recouvertes par le fer amorphe à l'intérieur de l'entité, alors que des fibrilles quasi-libres de concrétions de fer peuvent être visualisées sur la surface extérieure de la coque. Cette observation est en parfait accord avec de nombreux travaux qui montrent que les bactéries peuvent créér des micro-gradients de conditions chimiques capables de modifier leur environnement (*Richarson et al., 1988*), ou de former une capsule de polysaccharides dans le but de se créer un micro-environnement plus favorable à leur croissance (*Leppard, 1995; Decho, 1990*). Dans les deux cas, la grande quantité de polysaccharides susceptibles de servir de centre

de nucléation, ainsi que les conditions chimiques favorisant la précipitation des oxyhydroxydes de fer, donnent naissance aux coques de fer amorphe observées dans le lac Paul.

Dans le but de visualiser les éventuelles fibrilles de matière organique présentes dans les entités riches en fer, mais non recouvertes de fer et donc peu électron-denses, ainsi que les résidus d'organelles pouvant indiquer la présence de bactéries au sein de ces entités, nous avons tenté de visualiser les sections d'ultramicrotomie en mode de syntonisation de phase (ch. 3.2.2). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 5.26. Aucune structure supplémentaire n'est observée entre les deux micrographies, ce qui indique que la totalité des fibrilles sont recouvertes de fer et suffisament électron-denses pour être observées en mode conventionel. Cette information renforce l'hypothèse selon laquelle le Fe^{2+} est capable par sa forte concentration dans le lac Paul d'être présent sur 50% des sites complexants de la matière organique. Le fait qu'aucune structure interne ne soit observée en mode de syntonisation de phase permet également de renforcer l'hypothèse que ces capsules sont des résidus de bactéries, plus communément appelés fantômes (ghosts) et observés dans divers milieu naturel (*Cowen et Silver, 1984*).

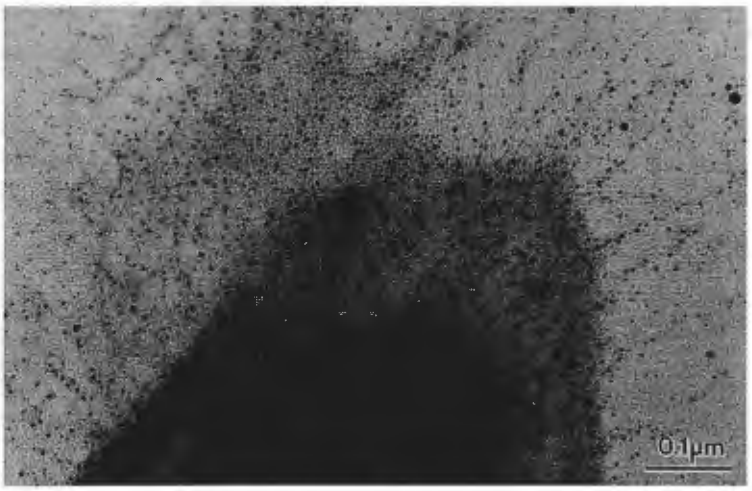
Figure 5.26: Observation en mode de syntonisation de phase (a) et en mode conventionel (b) des sections de Nanoplast. Barres : 500 nm.



5.9.6 Mise en évidence des polysaccharides

L'importance de la matière organique fibrillaire révélée par les investigations microscopiques nous a contraint à déterminer la nature chimique de ces entités mixtes. Afin d'identifier les exopolysaccharides, nous avons appliqué la méthode de marquage basée sur le développement de grains d'argent sur les polysaccharides (voir ch. 3.2.4). Seules les profondeurs de 6,25 et 7 m (maximum du pic de fer particulaire) ont été marquées. Les réactions de marquage ont été effectuées sur des grilles fraîchement préparées et encore humides, selon le protocole établi au ch. 3.2.4.

Les résultats obtenus sont donnés dans la figure 5.27; ils montrent clairement que les fibrilles observées entre 6 et 8 m par microscopie (ch. 5.7) sont d'origine polysaccharidiques. La production de fibrilles par des bactéries a déjà été plusieurs fois mise en évidence à l'aide de la microscopie électronique dans la littérature (*Leppard et al., 1977*) et leur composition chimique a été déterminée selon d'autres types d'analyses (*Burnison et Leppard, 1983*) après extraction. Dans le cas de notre étude, la figure 5.27 montre une bactérie entourée de sa capsule de polysaccharides fortement marquée par des grains d'argent, laissant exsuder des polysaccharides individuels dans la solution. Contrairement à la caractérisation chimique des EPS après extraction (*Burnison et Leppard, 1983*), l'approche que nous avons adoptée (protéïnate d'argent) ne nécessite ni cultures de bactéries ni extraction; nous pouvons donc affirmer sans ambiguïté que les fibrilles observées dans leur état natif sont des polysaccharides et qu'elles ne résultent pas d'une éventuelle dénaturation provenant de la préparation des spécimens. Ces marquages nous ont permis de montrer à l'échelle microscopique que les fibrilles sont à l'origine de la morphologie des oxydes de feret que leur origine est bactérienne. L'importance des polysaccharides dans la colonne d'eau du lac et l'observation, à de nombreuses profondeurs (5,5 à 7,5 m), des structures tubulaires apparentées à *Leptothrix* renforcent cette idée puisque les travaux d'*Emerson et Ghiorse (1993)* ont montré que la gaine de *Leptothrix* était composée de 34-35% de polysaccharides.



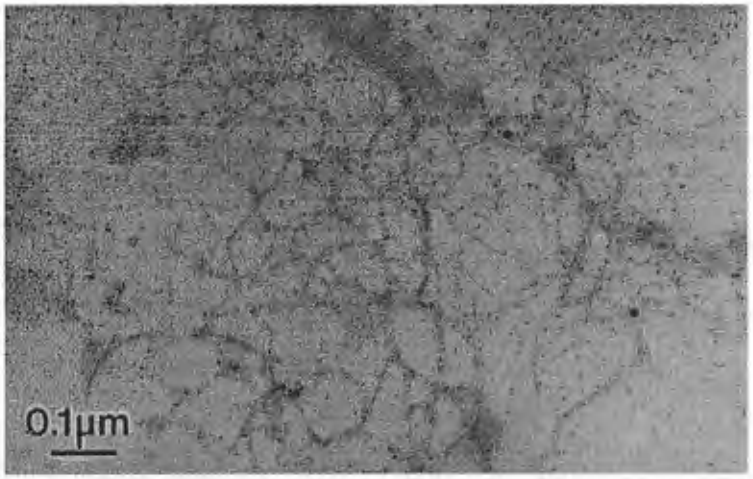
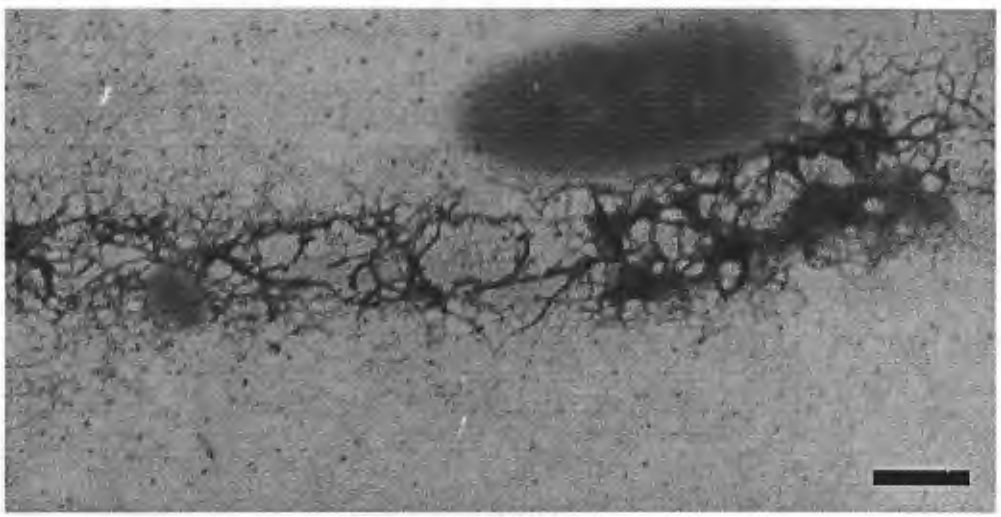


Figure 5.27: Marquage selon Thiéry (1967) sur les fibrilles présentes entre 6 et 8 m du lac Paul

D'autre part, *Adams et Ghiorse (1987)* ont montré que l'espèce *Leptothrix* possède des propriétés oxydantes (avec Mn^{2+}) et que l'enzyme responsable de l'oxydation est conjuguée à des extraits riches en polysaccharides. Certaines observations effectuées par microscopie électronique indiquent que ces entités tubulaires se désagrègent dans la colonne d'eau (Figure 5.28) en formant des structures similaires à celles décrites comme des agrégats de fibrilles dans notre travail. Il est donc fort probable que ces entités tubulaires soient à l'origine de la grande quantité de fibrilles présentes dans la colonne d'eau du lac Paul.

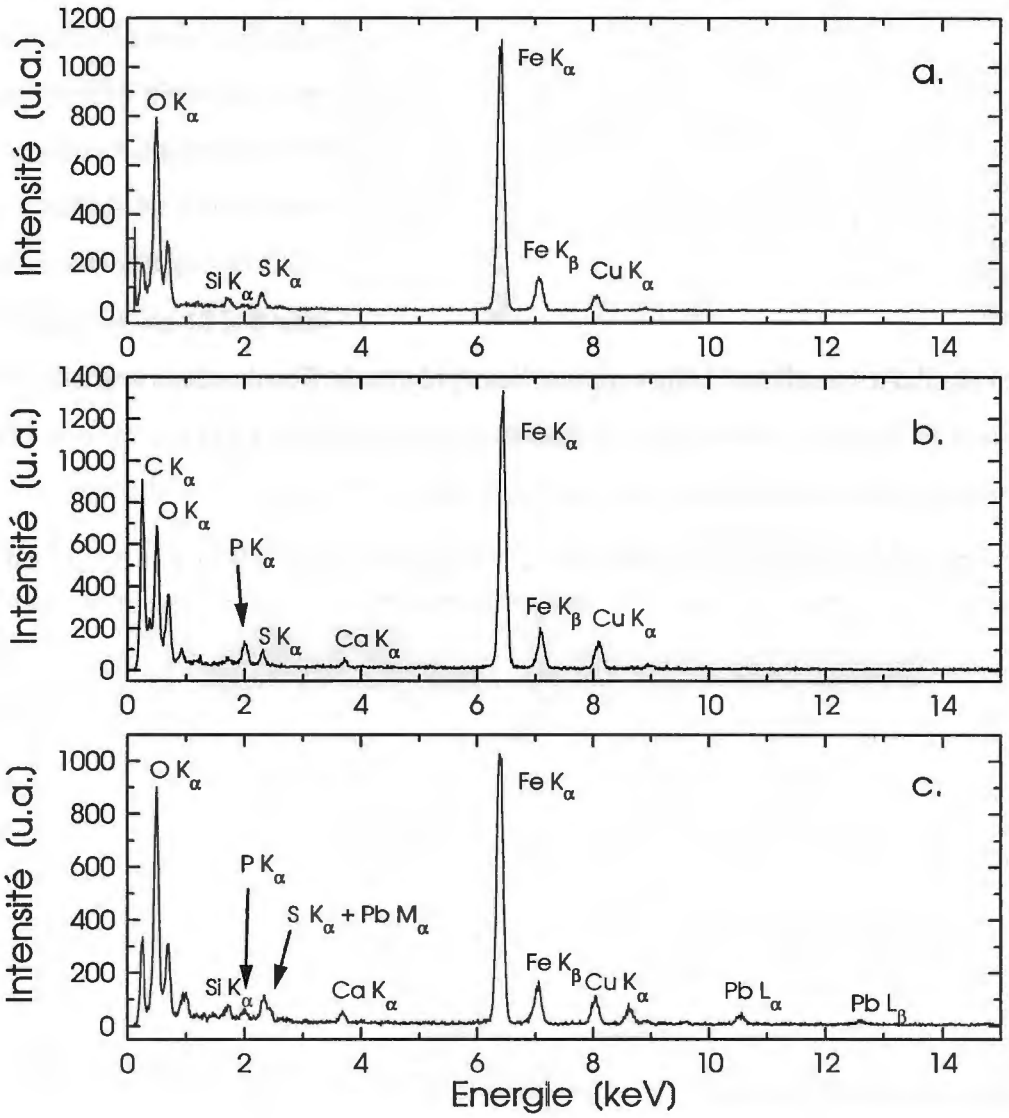
Figure 5.28: Désagrégation de l'espèce "*Leptothrix*" (voir figure 5.22) dans le lac Paul. Barre: 500 nm.



5.9.7 Interactions entre plomb et fer; analyses par microscopie électronique analytique

Les analyses EDS effectuées sur les particules du lac Paul révèlent une présence importante du fer le long de la colonne d'eau. Cette observation est en accord avec la forte concentration de Fe observée dans ce système et particulièrement aux profondeurs proches de 7 m (pic de $Fe_{part.}$). En fonction des profils de Pb fortement corrélés à ceux du Fe et de la matière organique lors des deux étés, nous avons cherché une éventuelle présence du Pb dans les oxyhydroxydes mixtes entre fer et fibrilles de polysaccharides. Les spectres obtenus en 1995 (voir figure 5.29) ne montrent aucune trace de Pb, alors qu'une faible présence de Si et S peut être remarquée.

Figure 5.29: Spectres EDS obtenus sur les entités organo-minérales de fer et de polysaccharides à 7 m - 1995 (a), sur les particules témoins (particules cristallines de fer) en 1996 (b) et à 7 m - 1996 (c).



En revanche, les spectres effectués sur les particules échantillonées en 1996 (voir figure 5.29) montrent de fortes contributions de Pb, avec 3 signaux EDS situés à 2,48 (L_{IIab} superposée à la K_{ab} du S), 10,55 (Lα) et 12,61 keV (Lβ).

Les intensités de pics étant élevées, nous avons également fait des analyses sur des particules cristallines de fer (motif de diffraction) et sur d'autres particules (oxydes de titane, argiles, silices) dans le but d'écarter l'hypothèse d'une contamination des spécimens de microscopie électronique par le Pb; les spectres témoins montrent de faibles teneurs en Pb, voir même aucun signal. Certains spécimens recouverts d'une couche de résine de Nanoplast, ou inclus en résine et préparés en sections présentent également des teneurs en Pb quasi-nulles.

L'extrapolation du rapport Pb:Fe avec la version MBTS du programme Voyager, à partir de la moyenne du rapport des intensités de pics (n = 184) entre Pb et Fe, donne une valeur de environ 5% (poids/poids) pour le Pb dans les oxydes de fer. Si l'on considère cette valeur comme étant représentative des échantillons de la colonne d'eau du lac Paul, $[Pb]_{part.}$ devrait être proche de la micromole/l, concentration qui n'est jamais atteinte. Il est par conséquent évident que nos spécimens ont subi une contamination générale, probablement provoquée par les efforts importants consacrés en 1996 pour tenter de déterminer la spéciation du Pb dans ce lac.

Il est cependant intéressant de noter que cette contamination semble être spécifique aux particules de fer amorphe puisque les particules cristallines de fer ou les argiles, silices ou autres oxydes analysés sur les spécimens contaminés n'ont pratiquement pas de Pb. Cette affinité a déjà été décrite dans la littérature par *Gadde et Laitinen (1973,1974)* sur des expériences de laboratoire, qui montrent que le Pb a une très forte affinité pour les oxydes de fer amorphe et que le rapport $(Pb:Fe)_{part.}$ peut atteindre 28% avec des oxydes de fer amorphe. Dans les milieux naturels, *Sigg et al. (1987)* ont montré que dans le lac de Zürich le Pb se lie préférentiellement au Fe, présent sous forme d'agrégats avec du matériel d'origine biologique. L'hypothèse d'une contamination sélective est renforcée par le fait que les échantillons recouverts ou immergés dans le Nanoplast® ont des concentrations très faibles voire nulles de Pb. Il est donc fort probable qu'une concentration assez

faible de Pb soit présente par contamination dans nos échantillons initiaux et que le Pb s'adsorbe spécifiquement sur les oxyhydroxydes de fer présents sur la grille TEM; en présence de Nanoplast®, l'échantillon est fixé assez rapidement et le $Pb_{diss.}$ disponible sur la grille reste disséminé en faibles concentrations sur la totalité de la surface.

5.9.8 Résumé des résultats obtenus sur le fer dans la colonne d'eau du lac Paul

Nous avons constaté des différences importantes de concentrations de Fe, Mn et Pb entre les campagnes de 1995 et 1996; à 10 m, un déficit d'environ 65% est observé en 1996 par rapport à 1995. Le fait que ces trois espèces se comportent similairement tend à renforcer l'hypothèse que les eaux du lac Paul sont diluées par les apports de neige en période hivernale et que les particules sont enfouies dans le sédiment. Cependant, il serait nécessaire de mesurer ces espèces de manière systématique sur une longue période pour confirmer l'hypothèse.

Les analyses chimiques effectuées dans le lac Paul montrent que le Fe est en fortes concentrations, avec une composante particulaire présente tout le long de la colonne d'eau ($[Fe]_{part} > 2\text{-}3$ µM) en 1996. Les résultats de microscopie électronique ont permis de révéler la présence de très nombreuses fibrilles présentes sur la totalité de la colonne d'eau. Celles-ci sont recouvertes de Fe dans toute la colonne d'eau, et plus particulièrement dans le pic de $Fe_{part.}$.

La microscopie a d'autre part pu démontrer que ces fibrilles étaient composées de polysaccharides, qui semblent servir de substrat pour la génèse d'oxyhydroxydes de fer. Leur origine biologique a été démontrée par la mise en évidence de structures bactériennes recouvertes d'une capsule de polysacharides, de laquelle s'échappent de nombreuses fibrilles individuelles. La désagrégation de formes tubulaires proches de *Leptothrix* permet également de former des conglomérats de fibrilles fortement recouvertes d'une gaine de fer amorphe. Les mixtures intimes entre fibrilles et oxydes de fer amorphe semblent être la conformation idéale pour la déposition du Pb; une forte affinité a été mise en évidence entre ces structures mixtes et des contaminations de Pb par l'analyse de particules individuelles en microscopie électronique.

5.10 Echantillonnage *in situ* avec plaques Teflon™

Les investigations menées avec les plaquettes de Teflon™ se sont déroulées pendant les deux étés de prélèvement. Lors de la saison 1995, des mises au point ont essentiellement été effectuées avec des prototypes des plaquettes, produites par protrusion et par "tournage". Un différence notoire ayant été observée, les deux types de plaquettes, déjà décrits au ch. 3, ont été utilisés pour la suite des expériences. En 1996, la technique ayant été éprouvée sur le lac de Lugano, trois séries de profils ont été obtenues entre le mois de juillet et le mois d'octobre. Les conditions d'utilisation des plaquettes dans la colonne d'eau du lac Paul sont données dans les tables 5.7, 5.8 (année 1995) et 5.9 (année 1996):

Table 5. 7. Profils des prototypes des plaquettes Teflon™ introduites en 1995; c = analyses chimiques; t = investigations par microscopie électronique. Les plaquettes utilisées pour ces profils sont obtenues par tournage (cf. ch.3).

Profondeur:	16/7-22/7/95	Profondeur:	19/7-3/8/95
3 m	c/t	3,5 m	c/t
4 m	c/t	4,5 m	c/t
5 m	c/t	5 m	c/t
6 m	c/t	5,5 m	c/t
10 m	c/t	6 m	c/t
		6,5 m	c/t
		7 m	c/t
		7,5 m	c/t
		8 m	c/t
		9 m	c/t

Table 5. 8. Profils des plaques Teflon™ moulées par protrusion et introduites entre le 28/7 et le 3/8/95. Aucune grille TEM n'y est ajoutée.

3,9 m	5 m	6,2 m	7,4 m	8,4 m	9,5 m
4,1 m	5,3 m	6,55 m	7,6 m	8,7 m	9,7 m
4,4 m	5,6 m	6,8 m	7,9 m	9 m	9,95 m
4,7 m	5,9 m	7,1 m	8,2 m	9,2 m	10,2 m

Table 5. 9. Profils des plaques Teflon™ introduites en 1996; la série du 4 au 10/8/96 est composée de 2 lignes (protrusion + tournage), les autres sont les plaquettes obtenues par tournage; c = investigations chimiques; t = investigations par microscopie électronique.

Profondeur: [m]	23-31/7/96	Profondeur: [m]	4-10/8/96	Profondeur: [m]	14-20/10/96
3	c	4	c	4,8	c
3,5	c	4,5	c	4,9	c
4	c/t	4,75	c	5	c

Table 5. 9. Profils des plaques Teflon™ introduites en 1996; la série du 4 au 10/8/96 est composée de 2 lignes (protrusion + tournage), les autres sont les plaquettes obtenues par tournage; c = investigations chimiques; t = investigations par microscopie électronique.

Profondeur: [m]	23-31/7/96	Profondeur: [m]	4-10/8/96	Profondeur: [m]	14-20/10/96
4,5	c/t	5	c	5,1	c
4,75	c/t	5,25	c	5,2	c
5	c/t	5,5	c	5,3	c
5,25	c/t	5,75	c	5,4	c
5,5	c/t	6	c	5,5	c
6	c	6,2	c	6	c
6,25	c	6,4	c	6,5	c
6,5	c	6,6	c	6,7	c
6,75	c/t	6,8	c	6,8	c
7	c/t	7	c	6,9	c
7,25	c/t	7,2	c	7	c
7,5	c/t	7,4	c	7,1	c
7,75	c	7,6	c	7,2	c
8	c	7,8	c	7,3	c
8,5	c	8	c	7,5	c
9	c	9	c	7,8	c
9,5	c	10	c	blanc	c

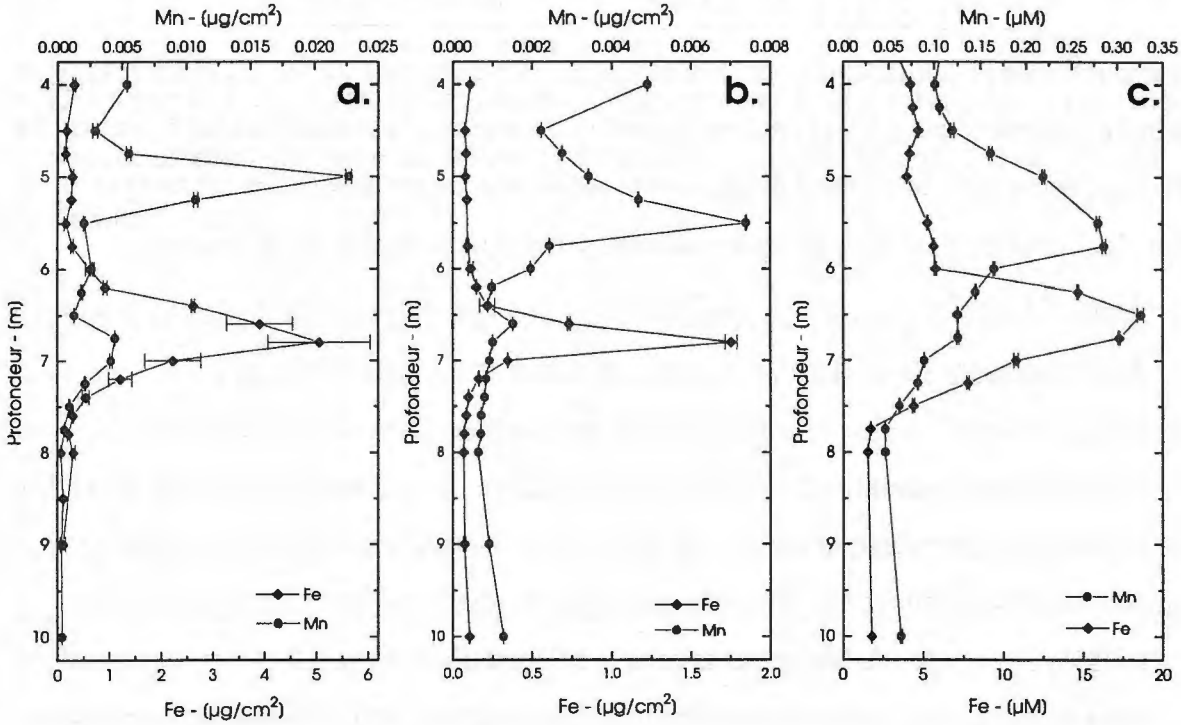
Comme lors de la mise au point sur le lac de Lugano, deux approches ont été adoptées: Dans le ch. 5.10.1, nous décrirons les profils obtenus après minéralisation du matériel déposé sur les plaquettes de Teflon™, alors qu'au ch. 5.10.2 nous discuterons la morphologie des particules observées par microscopie électronique sur ces plaquettes de Teflon™.

5.10.1 Analyses chimiques du matériel déposé sur les plaquettes de Teflon™

Les profils mentionnés dans ce chapitre sont obtenus en récupérant les plaquettes de Teflon™ après des séjours variant entre 6 et 8 jours dans la colonne d'eau (voir tables 5.7 à 5.9). Ces plaquettes sont placées dans des boîtes en polystyrène (plaquettes obtenues par tournage) ou dans des tubes de 12 ml en polypropylène (plaquettes obtenues par protrusion), dans lesquels sont ajoutés 5 ml d'une solution HNO_3 3% et $HONH_2 \cdot HCl$ 0,1 M. Les plaquettes sont laissées à reposer pendant 24 heures avant d'être agitées dans leur solution pendant 2 à 3 heures. Cette procédure permet d'obtenir des solutions suffisament concen-

trées en Fe et en Mn pour être facilement analysées à l'aide des techniques conventionelles (AAS, ICP). Les profils du Fe et du Mn sont donnés dans la figure 5.30 pour les deux types de plaquettes pour l'année 1996, en comparaison avec le matériel particulaire récupéré sur les membranes de filtration. On remarque une parfaite similitude entre les trois techniques au niveau de la profondeur des pics particulaires, avec une adsorption trois fois plus forte pour les plaquettes obtenues par tournage.

Figure 5.30: Profils de fer et de manganèse obtenus sur les plaquettes Teflon^{TM} obtenues par tournage (a) ou par protrusion (b), en comparaison avec le matériel particulaire récupéré sur membrane (c).



Ce résultat est en parfait accord avec nos études de laboratoire et peut être expliqué par la rugosité plus grande des plaquettes obtenues par tournage, comme démontré dans la figure 3.18. Il est par contre difficile de déterminer le rapport entre surface réelle disponible et adsorption observée. En effet, les quantités de Mn et de Fe adsorbées sur ces plaquettes sont mesurées en fonction de la surface macroscopique des plaquettes Teflon^{TM}. Or il s'avère après examen microscopique (cf. ch. 3.4.3) que cette surface est plus importante dans le cas des plaquettes obtenues par tournage qu'elle ne l'est pour les plaquettes moulées par protrusion. Sans analyse plus approfondie de cette surface, il est difficile de juger si les sillons et fractures observés sur les plaquettes peuvent multiplier la surface réelle par un facteur trois.

En considérant le rapport $[Mn]_{part}$:$[Fe]_{part}$ à partir des concentrations mesurées sur les plaquettes et sur les membranes (tableau 5.10), on s'aperçoit que les plaquettes de

Table 5.10. Concentrations mesurées sur les membranes et sur les plaquettes de Teflon™ en 1996 :

	sur membranes [µM]	sur plaq. obt. par protrusion [nmole]	sur plaq. obt. par tournage [nmole]
Mn	0,286	0,134	0,418
Fe	18,6	31,25	90,36
Mn:Fe [$\cdot 10^{-2}$]	1,538	0,428	0,463

Teflon™ sont plus efficaces pour la récupération des particules de fer. En effet, le rapport Mn:Fe déterminé pour les plaquettes permet de montrer qu'à concentrations égales de fer et manganèse dans la colonne d'eau, une quantité plus importante de fer est récupérée sur les plaquettes de Teflon™. Deux hypothèses permettent d'expliquer ce résultat:

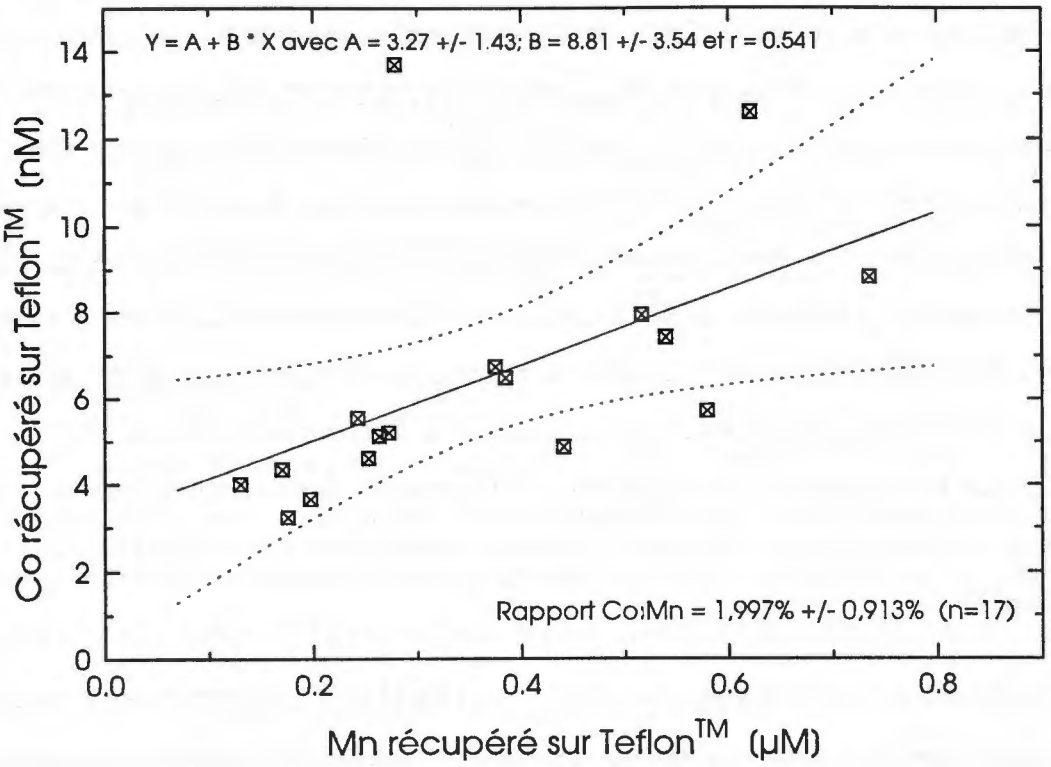
- Si l'on considère que les plaquettes ne récupèrent que les phases fraîchement formées dans la colonne d'eau, il est probable, en fonction des résultats obtenus par les analyses chimiques et la microscopie électronique, que l'année 1996 soit peu favorable à la formation d'oxydes de Mn. Cette observation serait en accord avec les résultats de microscopie électronique qui montrent que les seules bactéries recouvertes d'une capsule de MnO_x sont inclues dans des aggrégats en sédimentation. Une grande partie (~75%) des oxydes de Mn présents dans la colonne d'eau entre 4,5 et 6 m seraient alors des entités résiduelles formées antérieurement, alors que seul 25% des oxydes seraient fraîchement formés et capables de s'adsorber sur les plaquettes de Teflon™. Cette hypothèse permettrait également d'expliquer l'épaisseur des pics. En effet si l'on compare sur la figure 5.30 la largeur des pics particulaires, on constate que celle-ci est moindre pour les profils obtenus avec les plaques de Teflon™ qu'avec le matériel récupéré sur les membranes. Cette observation pourrait également être expliquée par le fait que les plaquettes de Teflon™ n'adsorbent que dans la zone où les particules sont fraîchement formées. Cette hypothèse est intéressante par le fait que l'utilisation des plaquettes de Teflon™ permettrait de localiser les zones de formation des oxydes de Fe et de Mn et de les discriminer des zones dans lesquelles les particules sédimentent.

- La seconde hypothèse est que les oxydes de fer ont une plus grande affinité que les oxydes de Mn pour le Teflon™. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'à concentrations équivalentes de Mn_{part} et de Fe_{part}, le Mn récupéré sur les plaquettes est quatre fois moins important que le Fe, et cela quelque soit le type de plaquettes utilisées. Cette affinité pourrait provenir de la plus grande surface spécifique disponible sur les oxydes de fer qui se déposent sous la forme de fibrilles électron-denses (voir figure 5.32), alors que les oxydes de Mn associés aux bactéries existent sous forme de sphères de plus de 500 nm de diamètre. La grande quantité de polysaccharides présents dans les oxydes de fer, possédant des groupes acides susceptibles de se fixer sur de nombreux sites (*Fletcher et Floodgate, 1973; Decho, 1990*), pourrait également expliquer cette différence de réactivité entre les oxydes de fer et de manganèse vis-à-vis des surfaces de Teflon™.

En tenant compte du fait qu'une concentration de 18 µM de $Fe_{part.}$ correspond à un dépôt de 5 µg/cm² sur les plaquettes obtenues par tournage, environ 0,7 µg/cm² pourraient être recueillis tout le long de la colonne d'eau sur les plaquettes de Teflon™ (présence de 2-3 µM de $Fe_{part.}$ observés dans toute la colonne d'eau). Or une concentration quasi nulle (Fe < 0,3 µg/cm²) est mesurée en dehors de la zone du pic particulaire, nous permettant d'affirmer que la déposition sur Teflon™ est extrêmement spécifique à la zone de formation de $Fe_{part.}$.

En fonction des bons résultats obtenus sur la corrélation entre Co et Mn dans la colonne d'eau, tant par les mesures chimiques que microscopiques, nous nous sommes intéressés au comportement des oxydes de Mn récupérés sur les plaquettes de Teflon™. Sur quelques plaquettes, des analyses de Co ont été effectuées en parallèle avec les mesures du Mn et sont reportées dans la figure 5.31. Le calcul du rapport Co:Mn (Co:Mn = 2% ± 1) est proche de celui obtenu au sein des particules analysées par microscopie électronique.

Figure 5.31: Corrélation entre concentrations arbitraires de Co et de Mn sur les plaquettes de Teflon™.



5.10.2 Analyses microscopiques du matériel déposé sur les plaquettes en Teflon™

Des investigations microscopiques ont été menées en 1995 et 1996 sur le matériel déposé sur les plaquettes de Teflon™ (adjonction de grilles TEM en or à la surface des plaquettes). Les observations de microscopie électronique effectuées tout le long de la colonne d'eau (voir tables 5.7 et 5.9) ont permis de confirmer que peu de matériel se dépose en dehors des zones concernées par les pics de fer et de manganèse particulaires. Les grilles provenant de la zone située entre la surface et 4,5 m, ainsi qu'en dessous de 6,75 m, sont essentiellement vides et seules quelques bactéries sont observées. En 1995 et à la profondeur du $Mn_{part.}$, quelques bactéries recouvertes de leur coque électron-denses sont observées, mais en nombre relativement faible comparé à leur distribution dans la colonne d'eau. Cette observation est à corréler avec le rendement plus faible mesuré pour la déposition du manganèse sur les surfaces de Teflon™ en comparaison de celui du fer. En revanche les grilles provenant des profondeurs situées entre 6,75 et 7,5 m sont fortement chargées des entités déjà observées (Figure 5.32) lors des investigations par microscopie électronique des spécimens préparés par ultracentrifugation et en résine.

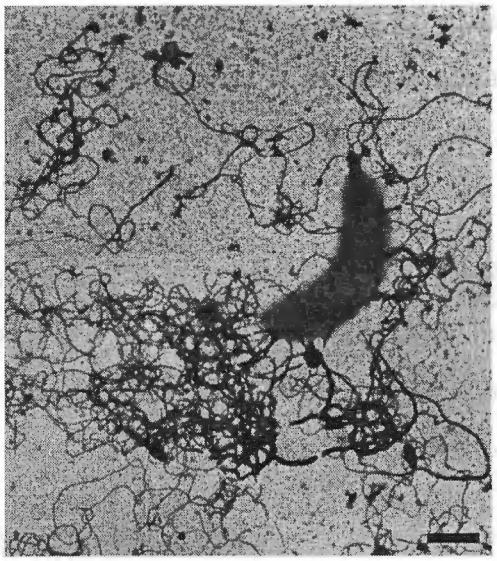


Figure 5.32: Matériel particulaire récolté sur les plaquettes de Teflon™ à 7,5m en 1996.

La présence marquée de l'espèce en fuseau proche de *Leptothrix*, ainsi que de bactéries de type *Gallionella*, et de grosses coques (∅ = 3-4 µm) intégralement recouvertes d'une couche dense de fer, permet de noter l'omni-présence des bactéries et de leur exsudats fibrillaires dans la composition du pic de $Fe_{part.}$.

La densité du matériel recouvrant les grilles de microscopie entre les profondeurs 6,75 et 7,5 m est différente. On remarque des grilles très chargées à 6,75 m, alors que les grilles placées à 7,25 m permettent une observation plus aisée du matériel déposé. Cette densité du matériel présent sur les grilles est en accord avec les pics de $Fe_{part.}$ obtenu sur les profils de type chimique, qui montrent également un maximum à 6,75 m.

En revanche, un inconvénient a été observé avec cette technique: Si elle permet l'observation du matériel après un prélèvement *in situ*, le matériel n'est que peu fixé sur la grille et il est impossible de traiter ces grilles par des processus chimiques tel que le marquage avec le protéinate d'argent (ch. 3.2.4). Des essais effectués avec la méthode permettant le développement de grains d'argent (ch. 3.2.4) sur les fibrilles de polysacharides n'ont malheureusement pas abouti.

5.11 Rappel des résultats et lien avec le réel

Malgré que le lac Paul soit considéré comme méromictique et donc stratifé tout au long de la saison, les analyses morphologiques et les investigations chimiques ont montré que des variations temporelles importantes peuvent intervenir dans la colonne d'eau du lac. Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que le lac subit un cycle essentiellement relié à la biologie des espèces présentes dans sa colonne d'eau, ces dernières étant capables de modifier de façon importante les processus chimiques. Ainsi, nos résultats sur le manganèse ont montré que l'apparition d'une phase particulaire dépend de conditions

encore mal connues et pouvant varier d'une saison à l'autre dans un système considéré jusque là comme stable. Compte tenu de la grande affinité du cobalt pour les phases particulaires de manganèse, les variations de concentrations des espèces permettent de prédire que la biodisponibilité du cobalt variera de saison en saison.

Les différences de concentrations totales pour le Pb, le Fe et le Mn entre les deux périodes de prélèvement dans la colonne d'eau du lac Paul sont également les témoins d'une activité annuelle pouvant intervenir dans un lac méromictique. Ces changements ont jusque là été fort peu décrits dans la littérature et nécessiteraient plus d'attention.

Au niveau des oxydes de fer, la présence marquée dans la colonne d'eau de l'espèce bactérienne proche de *Leptothrix,* en corrélation avec des études antérieures (*Adams et Ghiorse, 1987*) qui montrent que cette bactérie possède une enzyme capable d'oxyder le Mn et probablement le fer, ainsi que l'observation de structures en désagrégation présentant une morphologie identique aux oxydes de fer observés dans les eaux du lac Paul, nous permet de mettre en évidence un nouveau concept de formation des particules de fer se basant sur leur développement sur des fibrilles de polysaccharides. Ainsi, les particules de fer ne sont pas nécessairement des entités sphériques couvertes de matières organiques de faibles poids moléculaires, ou reliées par des fibrilles dans un agrégat tri-dimensionel comme quelques modèles les décrivent (*Wilkinson et al., 1995*). En regard des résultats obtenus sur le lac de Lugano, et des observations effectuées sur le lac Paul montrant que le polysaccharide peut servir de noyau de nucléation, une reconsidération des concepts régissant les interactions entre particules minérales et matière organique est à entreprendre.



RÉSUMÉ ET PERSPECTIVES

6.1 Rappel des résultats 188
6.2 Perspectives 192

6.1 Rappel des résultats

La démarche habituellement utilisée dans l'optique d'étudier les effets des particules dans les eaux naturelles consiste à synthétiser en laboratoire des substrats minéraux susceptibles de mimer les colloïdes naturels (*Ledin, 1993; Pizzaro-Konzak, 1993*). Cependant *Gadde et Laitinen* en 1973, dans une étude de l'adsorption du Pb sur les oxydes de fer, rappellent que les oxyhydroxydes naturels sont trop complexes et trop différents d'un échantillon à l'autre pour être étudiés en laboratoire.

Notre travail présente un intérêt par le fait qu'il est justement effectué sur des milieux naturels et qu'il rassemble deux sujets d'études traités habituellement de façon autonome. En effet, la littérature décrit d'une part des études sur les associations entre matière organique et matériel particulaire (*Ishikawa et al., 1993; Chenu, 1989; Gu et Doner, 1992; Yokoyama et al., 1990; Filella et al., 1993*), et d'autre part des études sur l'adsorption de métaux traces et de polluants sur des entités minérales (*Murray, 1975; Gade et Laitinen, 1974; Eggleston et Stumm, 1993*). Ce travail a permis de voir qu'à l'opposé des postulats habituellement considérés pour entreprendre l'étude des milieux naturels, la matière organique, les phases minérales de fer et de manganèse ainsi que les polluants constituent un ensemble intimement lié, où chaque facteur a son importance dans cette interaction ternaire.

Par exemple, dans le lac de Lugano, les particules de fer sont des pièges à phosphates, mais la faible teneur en fer dans le lac fait que ce trappage est peu efficace tout au long de l'année. La présence de bactéries et surtout de matériel fibrillaire associé en grande masse pendant les mois de mars et avril permet de renforcer le piégeage des phosphates par le fer, en favorisant la formation d'une "entité ternaire" entre fibrilles, colloïdes de fer et phosphates.

Dans le cas du lac Paul, les oxydes de Mn ne sont présents que sur les bactéries, et sont également des pièges préférentiels du cobalt. Mais nous avons vu que ces oxydes se dissocient de façon réductive pendant la saison 1996, puisque les bactéries sont retrouvées sous forme de cellules nues dans la colonne d'eau. Quant aux oxydes de fer, leur morphologie est essentiellement dictée par les polysaccharides, présents en grandes quantités dans toute

la colonne d'eau et particulièrement aux profondeurs du pic de fer particulaire. Les analyses de microscopie électronique révèlent que ces entités peuvent piéger du Pb et il est montré que d'autres particules de fer, cristallines et présentes dans la même couche d'eau, ne contiennent pas de traces décelables de Pb. La présence d'une phase de fer n'est donc pas la seule condition requise pour l'adsorption du Pb. Les principaux résultats de ce travail de thèse sont résumés dans les paragraphes suivants et illustrés dans la figure 6.1.

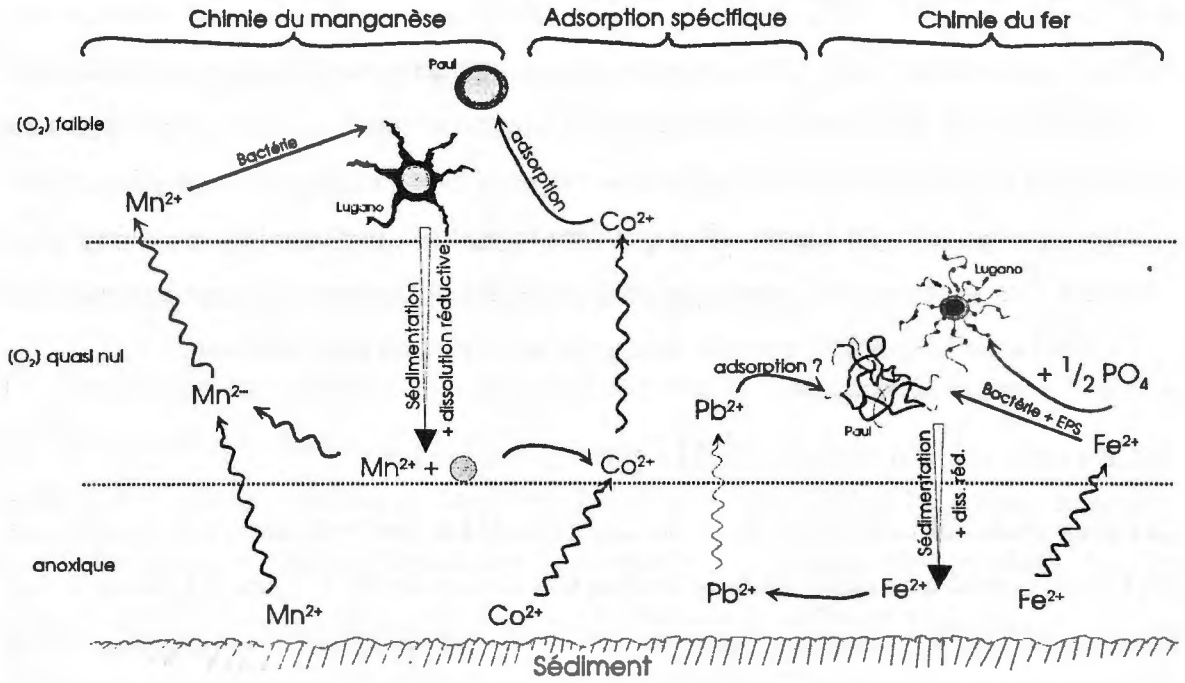


Figure 6.1: Résumé des observations effectuées sur le lac Paul et le lac de Lugano.

6.1.1 Récupération de phases authigènes sur les plaques de Teflon™

L'utilisation de plaquettes de Teflon™ lors de synthèses en laboratoires, sur le lac de Lugano et sur le lac Paul a représenté une alternative valable pour l'échantillonage *in situ* des phases particulaires. Cette méthode est d'autant plus intéressante que la collecte des particules est basée sur des paramètres physico-chimiques (aptitude à s'adsorber sur une surface) et non plus sur des paramètres physiques (critères de tailles). Ces investigations ont permis de révéler plusieurs tendances particulières:

- Une récupération spécifique du matériel particulaire fraîchement formé (Fe, Mn) a été observée par les investigations chimiques et microscopiques. En dehors des zones de formation des espèces particulaires, les plaquettes de Teflon™ s'avèrent inefficaces pour l'échantillonnage.
- L'aspect microscopique de la surface des plaquettes de Teflon™ est crucial pour déterminer la quantité de matériel particulaire récupéré.
- De grandes variations ont été mesurées dans les temps nécessaires à la déposition du matériel sur les plaquettes. Ainsi, le lac de Lugano requiert un mois de prélèvement pour des couvertures identiques à celles obtenues avec nos synthèses de laboratoires effectuées en quelques heures, alors que dans le lac Paul, une quantité de matériel plus de dix fois supérieure est récupérée en 6 jours. De plus, dans un même système (lac Paul et lac de Lugano), la quantité récupérée semble varier avec la saison.

6.1.2 Formation d'oxydes de Mn par les bactéries

Les deux études effectuées sur le lac de Lugano et le lac Paul ont clairement montré que les bactéries sont à l'origine de la formation des oxydes de Mn (Figure 6.1). Pour le lac Paul, l'année 1996 est cependant atypique par le fait que les conditions chimiques restent favorables à la formation d'oxydes de Mn dans la colonne d'eau du lac, mais une barrière d'activation importante pour la formation de MnO_x freine leur production. De ce fait, les oxydes de Mn sont observés en très faible concentration et les cellules de bactéries, recouvertes d'une couche d'oxyde en 1995, restent nues.

Il a récemment été montré que la bactérie *Leptothrix discophora* possède une enzyme capable d'oxyder le Mn (*Boogerd et DeVrind, 1987; Adams et Ghiorse, 1987*) et procède donc de façon active à la formation des phases solides du Mn dans les milieux naturels. Plus récemment encore, la mise en évidence de deux régions de chromosomes (*VanWaasbergen et al., 1993*) impliquées dans l'oxydation du Mn(II) sur la souche marine *Bacillus sp.* SG-1 a permis de renforcer l'idée que les bactéries tirent activement profit de l'oxydation du Mn^{2+}.

Ces études démontrent la participation des bactéries dans la formation des oxydes de Mn. Lorsqu'elles sont corrélées aux résultats obtenus sur le lac Paul et le lac de Lugano, elles renforcent l'importance de la médiation du biota dans les processsus habituellement envisagés sous l'angle du chimiste exclusivement. Les propriétés oxydantes du matériel biologique sont exemplaires par le fait que des résidus de ces structures sont tellement recouverts d'oxyde minéraux que leurs composants biologiques initiaux ne peuvent parfois plus être identifiés (*Beveridge, 1989*). Cet effet est à relier avec l'étude effectuée sur le lac de Lugano, qui montre des entités proches du produit *Metallogenium*, ayant une structure bactérienne à son origine, clairement visible sous la forme d'une cellule grisâtre, et qui est lentement noyée dans la masse des oxydes de Mn formés. Le produit final, fortement concrétionné, est commun dans beaucoup de systèmes lacustres et a été défini comme une forme non-vivante dont l'origine biologique reste controversée.

Finalement, la dissolution réductive des oxydes de Mn observée dans la colonne d'eau du lac Paul pendant la période d'échantillonnage 1996 démontre en conditions réelles le modèle de Davison (*DeVitre et Davison, 1993*) pour le profil du Mn_{tot}. Non seulement nos observations ont permis de montrer la sédimentation des particules de MnO_x dans la colonne d'eau, leur dissolution réductive par la diminution de $[MnO_x]$ au cours du temps, mais également l'effet que ce phénomène produit sur le profil du Mn_{tot}.

6.1.3 Importance des polysaccharides dans la formation des oxydes de Fe(III)

Il est habituellement considéré que des substances organiques de faible masse moléculaire recouvrent la surface des particules et modifient leurs caractéristiques physico-chimiques, particulièrement leur capacité d'adsorption. En revanche, le rôle de la matière organique colloïdale sur la formation des oxyhydroxydes de fer et de manganèse n'est pas complètement connu dans les milieux naturels (*Tessier et al., 1996*).

Nos travaux ont montré l'importance des polysaccharides dans les deux lacs étudiés, sous la forme d'entités fibrillaires couramment associées aux entités de fer (Figure 6.1). Dans le cas du lac de Lugano, comme dans le cas du lac Paul, ces fibrilles peuvent servir de centres de nucléation et semblent avoir un effet catalytique sur la formation des oxyhydroxy-

des de fer. Cette observation est importante par le fait que les connaissances sur les interactions entre la matière organique et les particules de fer partent de l'*a priori* de deux entités distinctes initialement présentes dans la colonne d'eau (*Buffle et Leppard, 1995; Filella et Buffle, 1993; Filella et al., 1993*) avant d'être rassemblées. De ce fait, les connaissances sur les interactions entre matériel organique et particules minérales doivent être reconsidérées.

6.1.4 Spécificité des métaux traces pour les phases de Fe ou de Mn

Plusieurs auteurs ont tenté de connaître la spécificité des métaux traces pour les différentes phases particulaires présentes dans les systèmes naturels (*Krauskopf, 1956; McCarthy et Degueldre, 1993; Honeyman et Santschi, 1992*). Il s'avère que les phases d'oxydes de Fe et de Mn sont des pièges efficaces pour les métaux traces (*Hem, 1978; Paulson et al., 1988; Tessier, 1992*), mais ce n'est que récemment que des études ont permis de dégager quelques spécificités entre métaux traces et phases de fer ou de manganèse (*Viollier et al., 1995; Balistrieri et Murray, 1986*). Cependant, aucun de ces travaux n'a permis d'identifier à l'échelle de la particule individuelle le rôle spécifique d'une phase pour un métal donné. Notre étude sur le lac Paul a résulté en des observations inédites puisqu'elle a permis de montrer de façon non équivoque la présence de Co sur les phases de Mn (figure 6.1). Ces résultats s'avèrent être de première importance pour la compréhension du devenir du Co dans les milieux aquatiques.

6.2 Perspectives

Dans ce sous-chapitre, nous proposerons différents travaux qui s'affichent dans la lignée de notre étude et qui pourraient s'avérer précieux pour la compréhension des mécanismes de piégeage des polluants par les oxyhydroxydes de fer et de manganèse. Ces propositions concernent la caractérisation des phases particulaires, ainsi que le contrôle de leur morpho-logie par les substances organiques des milieux naturels. Leur pertinence découle directement de certains résultats préliminaires que nous présentosn ci-dessous.

6.2.1 Etats d'oxydation des phases d'oxyhydroxydes de Mn

Afin de comprendre l'incorporation des métaux traces et autres polluants au sein des phases d'oxydes de fer ou de manganèse, il est important de connaître non seulement la spécificité des métaux pour ces phases, mais également leur structure cristalline. Dans le cas des oxydes de Mn, leurs caractéristiques cristallines n'ont été que très peu étudiées. De ce fait, leur structure est souvent mal définie et les oxydes de Mn sont habituellement regroupés sous la formule chimique MnO_x avec $1 < x \leq 2$, la valeur de x dépendant de l'état d'oxydation moyen du Mn. Les investigations habituellement menées sur les particules de MnO_x dans le but de déterminer l'état d'oxydation du Mn, l'ont été sur la base de réactions chimiques élégantes décrites dans *Mandernack (1992)*, *Mandernack et al. (1995)*, *Freeman et Chapman (1971)*, *Hem, (1981)* et *Murray et al. (1984)*. Les valeurs obtenues avec ces méthodes sont présentées dans la table 6.1 ci-dessous. Une majorité des études ont été effectuées à partir de cultures de bactéries produisant des oxydes en laboratoire. Ces différents états d'oxydation peuvent être aisément expliqués comme la résultante des trois réactions d'oxydation présentées au ch.2.2. En outre, le processus d'oxydation chimique tel qu'il est décrit de nos jours s'effectue en deux étapes (*Stumm et Morgan, 1981*): Adsorption rapide du Mn(II) sur les oxydes déjà formés, suivie d'une étape lente d'oxydation. Du point de vue biologique, l'oxydation est également proposée selon un schéma en deux étapes (*Ehrlich, 1996*): Une première oxydation du Mn^{2+} en Mn^{3+} (le Mn^{3+} reste lié à une enzyme) suivie d'une seconde oxydation enzymatique rapide donnant lieu à du Mn(IV).

Table 6. 1. Etats d'oxydation du Mn dans les oxydes étudiés en laboratoires.

Valeur de x dans MnO_x	Etat d'oxydation moyen:	Réferences:
1,94	3,88	*Waite et al., 1988; Burdige et Nealson, 1986*
1,64	3,28	*Stone et Morgan, 1984a; Stone et Morgan, 1984b*
1,97	3,94	*Ulrich et Stone, 1989*
1,92 +/- 0,05	3,84 +/- 0,1	*Mandernack et al., 1995*
1,9 - 2,0	3,8 - 4	*Murray et al., 1984*
1,37 - 1,49	2,74 - 2,98	*Murray et al., 1985*

Table 6. 1. Etats d'oxydation du Mn dans les oxydes étudiés en laboratoires.

Valeur de x dans MnO_x	Etat d'oxydation moyen:	Réferences:
1,5 - 1,6	3 - 3,2	*Tebo et al., 1984*
1,315 - 1,535	2,63 - 3,07	*Hem, 1981*

Les états d'oxydation obtenus à partir des déterminations chimiques peuvent être entachés d'erreur provenant de l'adsorption de Mn^{2+} sur les réseaux cristallins ou par l'incorporation de Mn^{2+} au sein de ces réseaux (*Murray et al., 1984*). De plus, la détermination de l'état d'oxydation repose sur 2 réactions colorimétriques, dont l'une utilise la formaldoxime (*Brewer et Spencer, 1971*). La présence de Fe interfère et peut fausser cette mesure de 10% environ (nos résultats et *Murray et al., 1984*); elle peut donc biaiser les observations faites en milieu naturel, où le fer est généralement associé aux oxydes de Mn.

Au niveau des processus environnementaux, les travaux de *Hem (1981)* tendent à montrer que la réaction d'oxydation chimique du Mn^{2+} en milieu basique, dans des conditions de température situées entre 0,5 et 37,4°C et de pH entre 7 et 9, produit des particules de MnO_x dont l'état d'oxydation du Mn ne dépasse pas 3. L'état d'oxydation Mn(IV) serait donc uniquement obtenu lors des processus biologiques. Ces hypothèses sont reprises par *Ehrlich (1996)*, qui propose que les oxydes de Mn(IV) fraîchement déposés pourraient être associés à une catalyse biologique dans les milieux naturels, alors que les oxydes de Mn(III) proviendraient de réactions abiotiques ou enzymatiques, mais n'ayant pas fourni de l'énergie à la bactérie responsable de cette oxydation.

Dans le but de caractériser l'arrangement cristallin des atomes de Mn dans les produits formés dans les conditions naturelles et de pouvoir discuter l'incorporation des métaux traces au sein de ces structures, il est important de trouver d'autres méthodes susceptibles de déterminer les états d'oxydation des atomes présents.

Le récent développement d'une technique de microscopie électronique pointues a permis la détermination de l'état d'oxydation du Mn présents dans divers matériaux et alliages (*Wilcox et al., 1995; Garvie et al., 1994; Sparrow et al., 1984; Otten et al., 1985*).

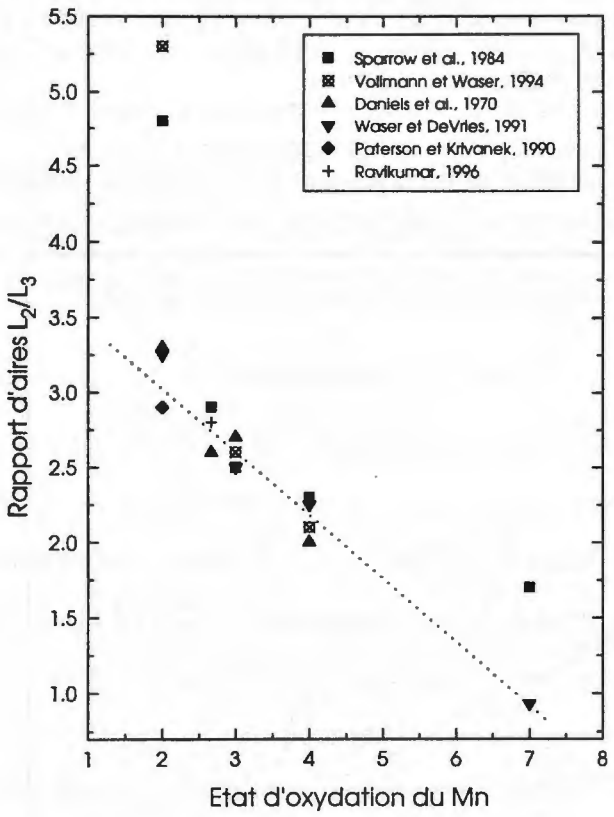


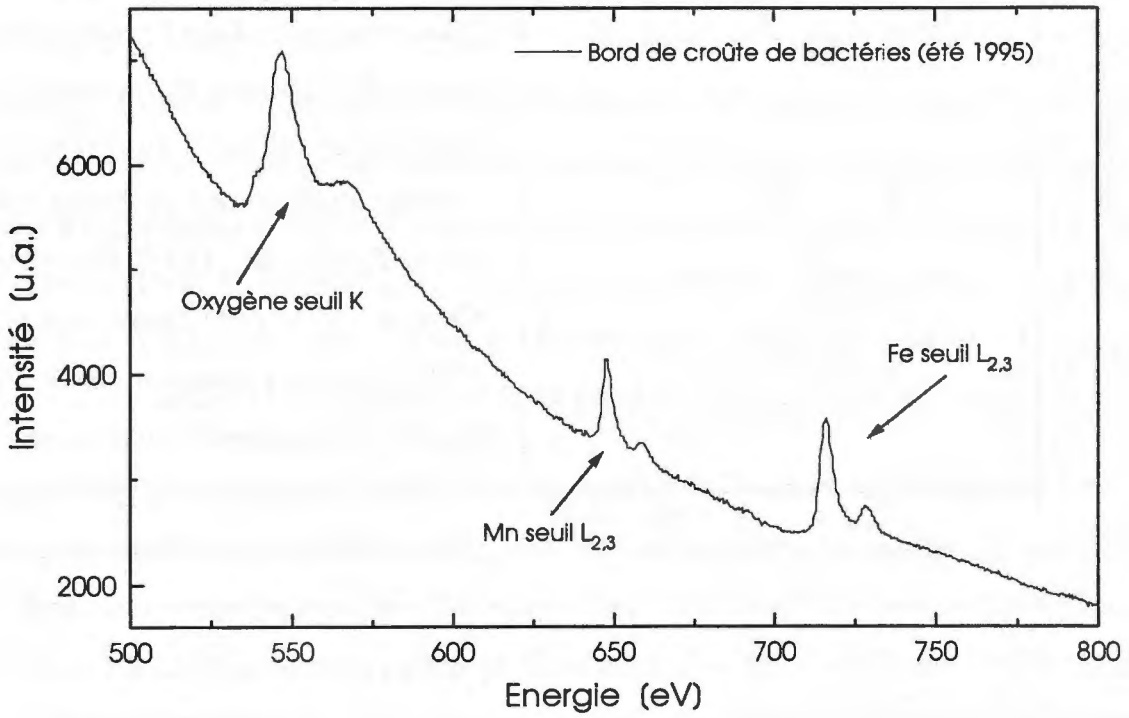
Figure 6.2: Variation du rapport L_2/L_3 en fonction de l'état d'oxydation du Mn.

Cette technique est basée sur la mesure du rapport des raies d'adsorption L_2 et L_3 sur les spectres EELS (Electron Energy Loss Spectrometry, voir ch.2.3) obtenus en récoltant les électrons ayant passé au travers du spécimen (*Paterson et Krivanek, 1990; Rask et al., 1987; Garvie et Craven, 1994a et b; Pearson et al., 1988*). Ces deux raies sont observées lors de la transition d'électrons entre les orbitales 2p et 3d du métal considéré et la variation de l'intensité des raies L_2 et L_3 est provoquée par l'effet du champ cristallin sur la dégénerescence des orbitales 3d (*Garvie et al., 1994*). La variation de ce rapport en fonction de l'état d'oxydation est illustrée sur la figure 6.2.

Quelques essais préliminaires ont été effectués par spectrométrie EELS dans nos laboratoires sur les préparations de MnO_x récolté sur le lac Paul en 1995. Les spectres obtenus permettent de visualiser la bande K de l'O et les bandes $L_{2,3}$ du Mn et du Fe (Figure 6.3); cependant la spectrométrie EELS étant limitée par l'épaisseur de l'échantillon (*Mavrocordatos, 1997*), les spécimens préparés par ultracentrifugation ("whole mount") se sont avérés inadéquats pour la mesure du rapport L_2:L_3. Une alternative possible est le recours à des échantillons préparés par ultramicrotomie, après inclusion en résine. Des essais avec cette méthode de préparation ont été effectués sans succès en 1996, étant donné qu'aucune particule de MnO_x n'a été observée par microscopie électronique lors de cette campagne. Cependant cette alternative s'avère être prometteuse pour la détermination de l'état d'oxydation du Mn et pourrait même être appliquée au Fe (*Garvie et al., 1994; Otten et al.,*

1985; Paterson et Krivanek, 1990) puisque *Buffle et al. (1989)* ont trouvés un mélange de Fe^{2+} et de Fe(III) dans certaines particules naturelles.

Figure 6.3: Spectre EELS enregistré sur le bord d'une croûte d'oxyde de Mn présent en 1995 sur les bactéries du lac Paul. L'important signal de fer est provoqué par la présence d'oxyde de fer amorphe agrégé à la bactérie analysée.



6.2.2 Importance du biota sur la croissance des phases d'oxyhydroxydes de fer et de manganèse

Il a été montré dans les lacs de Lugano et Paul que le rôle des bactéries revêt une importance primordiale dans les processus de formation d'oxyhydroxydes de fer et de manganèse. L'intervention de processus biochimiques est en effet observée directement (bactéries et phases de Mn formées sur leur flan) ou indirectement (fibrilles libres et phases de fer) et le recours à des méthodes de caractérisation microbiologique est par conséquent évident. Dans cette optique, il s'avérerait intéressant d'isoler les bactéries responsables de l'oxydation du Mn, afin de mieux comprendre les processus qui régulent la formation des phases minérales de Mn et leur rôle dans le piégeage des métaux traces. D'autre part, et dans le but d'étudier les relations entre phases de fer et polysaccharides, il serait judicieux d'identifier les bactéries responsables de la production des fibrilles trouvées en grande masse dans les strates de production du fer particulaire.

Dans ce but, deux séries de travaux préliminaires ont été menées en collaboration avec B. McGregor (groupe du Prof. D. Stahl, Université de Northwestern), et le groupe de la Prof. A.-M. Gounot à l'Université Claude Bernard Lyon 1. Les résultats obtenus apportent une dimension nouvelle à cette étude, en y ajoutant le volet de la microbiologie et surtout les outils très précieux de la phylogénie. Ils permettent en outre d'envisager un prolongement à ce travail, dans lequel la microbiologie pourrait être couplée aux études chimiques.

6.2.2.1 Profils phylogéniques du lac Paul:

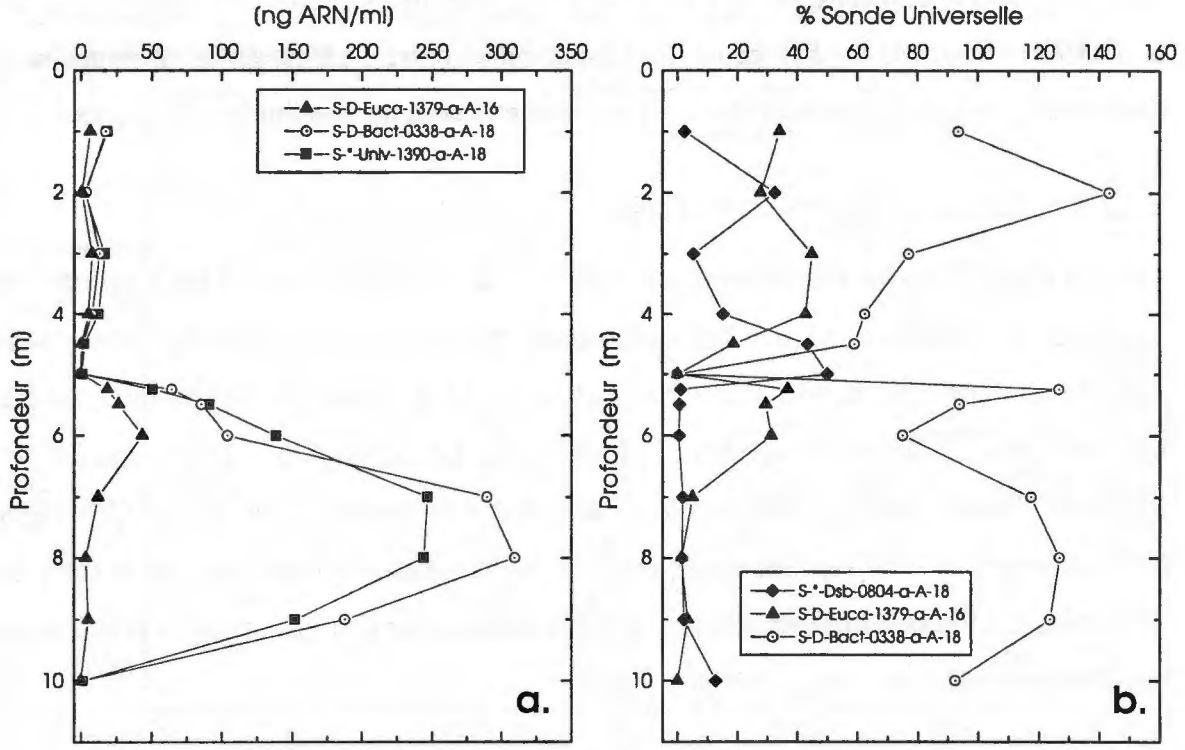
Lors de l'été 1996, les organismes présents dans la colonne d'eau du lac Paul ont été récupérés par filtration sur membranes (Isopore® 0,4 µm), ces échantillons ont été congelés immédiatement et utilisés pour en extraire l'ARN messager. Ces extraits ont été hybridés avec différentes sondes phylogéniques (*Amann et al. 1995; Risatti et al.,1994; Stahl, 1995*) spécifiques à des séquences de bases situées dans l'ARN (16S habituellement et 18S pour les eukaryotes), la longueur et l'emplacement de la suite de bases dans l'ARN déterminant la spécificité des sondes pour un plus ou moins grand nombre d'espèces vivantes (*Amann et al., 1995*).

Les profils obtenus avec différentes sondes phylogéniques sont présentés dans la figure 6.4. Dans la figure 6.4a, les résultats sont exprimés en ng/ml et représentent la totalité des différentes espèces. La sonde S-*-Univ est une sonde universelle marquant la totalité des organismes vivants. On remarque sur cette figure que la majorité des espèces vivantes présentes dans le lac Paul est située dans la partie anoxique du lac. La concentration de phosphates réactifs étant très faible dans la zone oxique (voir ch. 5.9.8), la régénération des nutrients à l'interface oxique/anoxique permet la croissance de phytoplancton près de cette interface, comme signalé par le profil des eucaryotes (sonde S-D-euca).

Sur la figure 6.4b, les résultats sont exprimés en % de la sonde universelle. Cette représentation permet de considérer la représentativité des différentes espèces dans la colonne d'eau et de mettre en évidence les espèces dominantes en fonction de la profondeur. Il est intéressant de noter que les bactéries dominent dans toute la colonne d'eau et que l'augmentation de la quantité d'eucaryotes est corrélée à une diminution de la population de

bactéries, selon le processus de "broutage" bien documenté dans la littérature (*Heissenberger et Herndl, 1994; Tranvik et al., 1993*).

Figure 6.4: Profils phylogéniques obtenus dans la colonne d'eau du lac Paul.



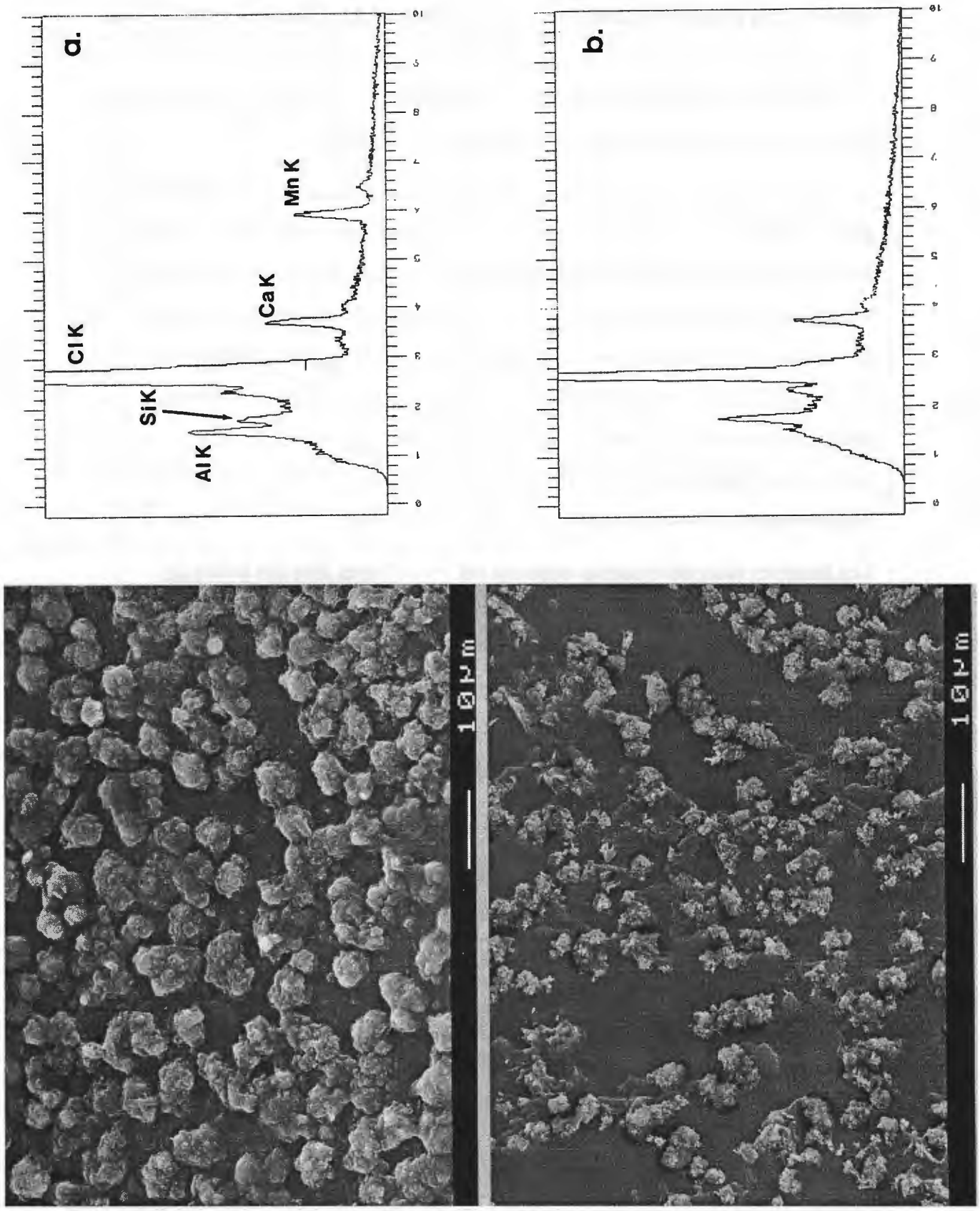
La sonde S-*-Dsb est spécifique à certaines bactéries réductrices des sulfates et des métaux (McGregor, communication personnelle); leur présence dans la couche du $Mn_{part.}$ est intéressante et pourrait être reliée aux bactéries responsables de l'oxydation du Mn, puisque certaines bactéries peuvent changer de métabolisme et sont capables de réduire ou d'oxyder le Mn en fonction des conditions environnantes (*Ehrlich, 1996*).

Les excellents résultats obtenus avec cette technique permettent d'envisager des travaux futurs, plus approfondis sur le lac Paul. Etant donné que des sondes spécifiques aux bactéries responsable de l'oxydation du Mn sont actuellement commercialisées (*Ghiorse et al, 1996; Sierling et Ghiorse, 1997*), celles-ci pouraient être testées dans le lac afin d'identifier la ou les bactéries produisant les oxyhydroxydes de Mn, dans le but de mieux comprendre les relations existant entre le biota et la chimie.

6.2.2.2 Isolement et culture de la souche bactérienne responsable de l'oxydation du Mn:

- Dans un premier temps, des colonnes de verre remplies de laine de verre et de sable ont été inoculées à partir d'échantillons d'eau prélevés à 5,25 m (octobre 1996) puis alimentées en continu par une solution de Mn^{2+} (5 mg/l). Des conditions stériles ont été respectées tout au long des manipulations et l'ajout d'un anti-procaryote (Cycloheximide) a permis de limiter la croissance d'organismes étrangers.
- Après un mois de culture, des dépôts marrons ont été observés sur les colonnes et en sortie sur les tuyaux de recirculation. Ces derniers ont été sectionnés et préparés pour une visualisation en microscopie électronique à balayage. Les résultats obtenus avec les tuyaux sortant des colonnes inoculées sont comparés aux observations effectuées sur les tuyaux des colonnes témoins (non inoculées) dans la figure 6.5. Les tuyaux ont ensuite été insérés dans de la résine Spurr® et des sections minces ont été préparées pour la microscopie électronique à transmission. Ces sections exhibent la présence de cellules bactériennes au sein de sphères de Mn déposées sur le tuyau; l'analyse EDS confirme que la croûte présente est bien un oxyde de Mn.
- Les bactéries récupérées sur ces colonnes ont été cultivées dans des boîtes de Pétri dans un milieu spécifique aux oxydants du Mn; onze souches ont été obtenues en fonction de la morphologie de leur colonies (travail de E. Charton). Six souches ont été séquencées (500-900 bases) et la comparaison des séquences déterminées avec les banques de données RDP (Ribosomal Database Project) et BLAST (GenBlank) a permis d'identifier l'espèce *Zooglea ramigera* dans cinq des cas (travail de B. McGregor).

Figure 6.5: Micrographies et analyses EDS des dépôts observées sur les tuyaux de recirculation des colonnes inoculées (a) et non inoculées (b). Les signaux d'Al et de Cl sont dus au support et au tuyau.



Dans ce cas également, les résultats préliminaires s'avèrent enrichissants puisque l'espèce isolée, même si elle peut avoir subit des modifications dues à l'enrichissement en culture, s'avère être fortement liée aux processus chimiques observées dans le lac Paul. Une production importante de polysaccharides regroupés sous la forme d'une capsule a déjà été observée par *Norberg et Enfors (1982)* dans le cas de *Zooglea ramigera.* Les micrographies obtenues en 1996 montrent en effet un corps sombre entouré d'un manteau plus clair susceptible d'être une capsule de polysaccharides. Plus anciennement, *Friedman et Dugan (1968)* ont montré lors d'une étude sur l'accumulation des métaux dans les flocs formés par *Zooglea*, que le Co y était massivement retenu.

Bien que les résultats obtenus avec des cultures bactériennes doivent être considérés avec circonspection, les fortes similitudes entre les caractéristiques et le comportement de *Zooglea* et l'espèce responsable de la formation des oxyhydroxydes de manganèse dans le lac Paul sont troublantes. Des investigations plus poussées s'avéreraient profitables à la caractérisation des processus biochimiques reliés au manganèse au sein du lac Paul, entre autres en appliquant une sonde spécifique à l'espèce *Zooglea* directement sur des échantillons prélevés dans le lac.

6.2.3 Caractérisation des polysaccharides dans le milieu naturel

La grande quantité de polysaccharides présents dans les couches de formation des oxyhydroxydes de fer, et leur présence dans une entité mixte organo-minérale riche en fer, nous oblige à considérer cette espèce avec plus d'attention. Les investigations microscopiques menées au cours de cette étude ont permis de mettre en évidence chimiquement la nature polysaccharidique des fibrilles présentes dans le lac de Lugano et dans le lac Paul. L'utilisation de lectines complexées à des colloïdes d'or dans le but de caractériser les sucres individuels a déjà été mentionnées dans le ch. 3. Il est important de rappeler ici cette technique développée pour l'analyse de tissus biologiques, qui nécessiterait d'être optimalisée en vue de son utilisation pour la caractérisation de fibrilles individuelles. En effet, il s'avère qu'une bactérie peut produire des polysaccharides de type différents simultanément ou lors de phases différentes (*Decho, 1990*). En outre, la détermination des séquences de monosaccharides dans les fibrilles produites dans le lac permettrait notam-

ment d'améliorer les modèles théoriques de spéciation, pour lesquels les mécanismes de complexation de métaux par la matière organique sont généralement limités par la description lacunaire de cette dernière.

6.2.4 Processsus d'adsorption des particules de fer et de manganèse sur les plaquettes de Teflon™

Durant la saison 1996, nous avons constaté dans le lac Paul une diminution temporelle de Fe et de Mn déposés sur les plaquettes obtenues par tournage, lors de la pose de lignes de plaquettes à 3 périodes différentes mais de durées équivalentes. Les quantités relevées pour le Fe et le Mn sont données dans la table 6.2. La diminution des quantités mesurées

Table 6. 2. Concentrations maximales relevées au cours de la saison 1996 dans le lac Paul:

	Fe [µg/cm^2]	Mn [µg/cm^2]
23/7 - 31/7/96	6,27	0,0224
4/8 - 10/8/96	5,06	0,00122
14/10 - 20/10/96	1,323	-

est probablement reliée à la diminution du stock de particules fraîchement formées de Fe et de Mn au cours de la saison. Si cette tendance s'avère être confirmée par d'autres essais, nous aurions alors développé la première méthode de prélèvement *in situ* basée sur des critères de réactivité et d'aptitude à l'adsorption. Dans ce but, une meilleure caractérisation de la surface des plaquettes obtenues par tournage est nécessaire afin de connaître la surface réelle de ces plaquettes.

Dans un second temps, des investigations sur les processus d'adsorption sur le Teflon™ devront être entreprises, afin de comprendre la nature de la liaison existant entre le matériel particulaire et la surface de Teflon™.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, L. F. et Ghiorse, W. C. (1987). Characterization of extracellular Mn^{2+}-oxidizing activity and isolation of an Mn^{2+}-oxidizing protein from *Leptothrix discophora* SS-1. *J. Bacteriol.*, 169, 1279-1285.

Ali, S. H. et Stokes, J. L. (1971). Stimulation of heterotrophic and autotrophic growth of *Sphaerotilus discophorus* by manganous ions. *Antonie v.Leeuwenhoel*, 37, 519-528.

Alldredge, A. L.; Passow, U. et Logan, B. E. (1993). The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Res.*, 40, 1131-40.

Aller, R. C. et Rude P.D. (1988). Complete oxidation of solid phase sulfides by manganese and bacteria in anoxic marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52, 751-765.

Aly, S. M. et Letey, J. (1988). Polymer and water quality effects on flocculation of montmorillonite. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 52, 1453-8.

Amann, R. I.; Ludwig, W. et Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59 (1), 143-169

APHA, AWWA, WPCF (1976). Standards methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington.

Archibald, F. S. et Fridovich, I. (1981). Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lacobacillus plantarum. J. Bacteriol.*, 145, 442-451.

Aristovskaya, T.V. et Zavarzin, G. A. (1971). Biochemistry of iron in soils. In: Soil Biochemistry, vol. 2. McLaren, A. D. et Skujins, J. (Eds), Marcel Dekker, New York, 385-408.

Atteia, O.; Perret, D.; Adatte, T.; Kozel, R. et Rossi, P. (1997). Characterization of natural colloids from a karstic aquifer. *Envir. Geol.*, soumis.

Bachhuber, K. et Frösch, D. (1983). Melamine resins, a new class of water-soluble embedding media for electron microscopy. *J. Microsc.*, 30 (1), 1-9.

Baldi, E. (1949). Alcuni caraterri generali dei laghi marginali sudalpini, *Verh. Int. Ver. Limnol.*, 10, 50-69.

Balikungeri, A.; Robin, D. et Haerdi, W. (1985). Manganese in natural waters II.Evidence for microbiological oxidation of Mn(II). *Toxicol. Environ. Chem.*, 9, 309-25.

Balistrieri, L. S. et Murray. J.W. (1986). The surface chemistry of sediments from the Panama basin: The influence of Mn oxides on metal adsorption. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 50, 2235-2243.

Balistrieri, L. S.; Murray. J.W. et Paul, B. (1992a). The cycling of iron and manganese in the water column of Lake Sammamish, Washington. *Limnol. Oceanogr.*, 37, 510-528.

Balistrieri, L. S.; Murray, J. W. et Paul, B. (1992b). The biogeochemical cycling of trace metals in the water column of Lake Sammamish, Washington: Response to seasonally anoxic conditions. *Limnol. Oceanogr.*, 37, 529-548.

Barbi, N. C. (1977). Electron probe microanalysis: Using energy dispersive X-ray spectroscopy. Princeton Gamma-Tech, Princeton, NJ. 34 pp.

Barbieri, A. et Mosello, R. (1992). Chemistry and trophic evolution of Lake Lugano in relation to nutrient budget. *Aquat. Sci.*, 54, 3/4, 219-237.

Barroin, G. (1991). La réhabilitation des plans d'eau, *La Recherche*, 22, 1412-1422.

Bauer, H. D. (1993). Investigations on thin solid layers by analytical transmission electron microscopy. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 346, 11-13.

Belzile, N; DeVitre, R. R. et Tessier, A. (1989). In situ collection of diagenetic iron and manganese oxyhydroxides from sediments. *Nature*, 340, 376-377.

Benner, R.; Pakulski, J. D.; McCarthy, M.; Hedges, J. I. et Hatcher, P. G. (1992). Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science*, 255, 1561-1564.

Beveridge, T. J. (1989). Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annu. Rev. Microbiol.*, 43, 147-171.

Boogerd, F. C. et de Vrind, J. P. M. (1987). Manganese oxidation by *Leptothrix discophora*. *J. Bacteriol.*, 169, 489-494.

Borg, H. (1983). Trace metals in swedish natural fresh waters. *Hydrobiologia*, 101, 27-34.

Brewer, P. G. et Spencer, D. W. (1971). Colorimetric determination of manganese in anoxic waters. *Limnol. Oceanogr.*, 16, 107-112.

Buffle, J. (1988). Complexation reactions in aquatic systems: An analytical approach. Chalmers, R. A. et Masson, M. (Eds.). Ellis Horwood, Chichester. 692 pp.

Buffle, J.; De Vitre, R. R.; Perret, D. et Leppard, G. G. (1989). Physico-chemical characteristics of a colloidal iron phosphate species formed at the oxic-anoxic interface of a eutrophic lake. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 53, 399-408.

Buffle, J.; Perret, D. et Newman, M. (1992). The use of filtration and ultrafiltration for size fractionation of aquatic particles, colloids and macromolecules. In: *Environmental Particles*, vol. 1. Buffle J. et Van Leeuwen, H. P. (Eds). Lewis, Chelsea, MI. 171-230.

Buffle, J. et DeVitre, R. R. (1994). Chemical and biological regulation of aquatic systems. Lewis, CRC Press, Boca Raton, FL. 393 pp.

Buffle, J. et Leppard, G. G. (1995). Characterization of aquatic colloid and macromolecules. 1.Structure and behaviour of colloidal material. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 2169-2175.

Burdige, D. J. et Nealson, K. H. (1986). Chemical and microbiological studies of sulfide-mediated manganese reduction. *Geomicrobiol. J.*, 4, 361-387.

Burnison, B. K. et Leppard, G. G. (1983). Ethanol fractionation of lacustrine colloidal fibrils. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41, 385-388.

Burns, R. G. (1976). The uptake of cobalt into ferromanganese nodules, soils and synthetic Mn(IV) oxides. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 40, 95-101.

Campbell, P. et Torgersen, T. (1980). Maintenance of iron meromixis by iron redeposition in a rapidly flushed monimolimnion. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37, 1303-1313.

Carey, F. A. et Sundberg, R. J. (1983). Advanced organic chemistry, Part. B: Reactions and synthesis, 2nd edition. Plenum Press, New York. 513-515.

Carpenter, S. R. et Kitchell, J. F. (1993). Experimental lakes, manipulations and measurements. In: *The trophic cascades in lakes*. Carpenter, S.R. et Kitchell, J. F. (Eds). Cambridge Univ. Press, 15-25.

Chenu, C. (1989). Influence of a fungal polysaccharide, scleroglucan, on clay microstructures. *Soil Biol. Biochem.*, 21, 299-305.

Chenu, C. (1993). Clay- or sand-polysaccharide associations as models for the interface between micro-organisms and soil: water relaetd properties and microstructure. *Geoderma*, 56, 143-156.

Chenu, C. et Guérif, J. (1991). Mechanical strength of clays minerals as influenced by an adsorbed polysaccharides. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 55, 1076-1080.

Chenu, C. et Jaunet, A. M. (1992). Cryoscanning electron microscopy of microbial extracellular polysaccharides and their association with minerals. *Scanning*, 14, 360-364.

Coale, K. H. et Flegal, A. R. (1989). Copper, zinc, cadmium and lead in surfaces water-soft Lake Erie and Ontario. *Sci. Tot. Env.*, 87/88, 297-304.

Colmer, A. R.; Temple, K. L. et Hinkle, H.E. (1950). An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J. Bacteriol.*, 59, 317-328.

Cotton, F. A.; Wilkinson, G. et Gaus, P. L. (1987). Basic inorganic chemistry. John Wiley & Sons, New York. 708 pp.

Cowen, J. P. et Silver, M. W. (1984). The association of iron and manganese with bacteria on marine macroparticles material. *Science*, 224, 1340-1342.

Cowen, J. P. et Bruland, K. W. (1985). Metal deposits associated with bacteria: Implications for Fe and Mn marine biogeochemistry. *Deep-Sea Res.*, 32 (3), 253-272.

Cowen, J. P.; Massoth, G. J. et Baker, E. T. (1986). Bacterial scavenging of Mn and Fe in a mid- to far-field hydrothermal particle plume. *Nature*, 322, 169-171.

Daniels, J. (1970). Tracts in modern Physics, vol. 54. Hohler, G. Ed. Springer-Verlag, Berlin.

Davidson, D. L. (1984). The analysis of particles by electron microscopy and spectroscopy. Beddow, J. K. (Ed). Application and Microanalysis, vol. 1, Particle Characterization in Technology. CRC Press, Boca Raton, FL. 59-65.

Davison, W.; Woof, C. et Rigg, E. (1982). The dynamics of iron and manganese in a seasonally anoxic lake; direct measurement of fluxes using sediment traps. *Limnol. Oceanogr.*, 27, 987-1003.

Davison, W. et DeVitre, R. (1992). Iron particles in freshwater. In: *Environmental Particles*, vol. 1. Buffle, J. et Van Leeuwen, H. P. (Eds). Lewis, Chelsea, MI, 315-355.

Decho, A. W. (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments: Their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 28, 73-153.

Degens, E. T. et Ittekkot, V. (1982). In situ metal-staining of biological membranes in sediments. *Nature*, 298, 262-264.

De Groot, A. J. et Allersma, E. (1973). Field observations and transport of heavy metals in sediments. Heavy Metals in the Aquatic Environment. Krenkel, P. A. (Ed). Proc. Int. Conf., Nashville, 83.

Del Rio Cantero, M. C. (1995). Marqueurs moléculaires spécifiques pour la détermination des polysaccharides par microscopie électronique. Université de Lausanne, travail de diplôme, 24 pp.

DeVitre, R.; Buffle, J.; Perret, D. et Baudat, R. (1988). A study of iron and manganese transformations at the O_2/S(-II) transition layer in a eutrophic lake (Lake Bret, Switzerland): A multimethod approach. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52, 1601-1613.

DeVitre, R. et Davison, W. (1993). Manganese particles in freshwater. In: *Environmental Particles*, vol. 2. Buffle, J. et VanLeeuwen, H. P. (Eds). Lewis, Chelsea, MI, 317-352.

DeVrind, J. P. M.; de Vrind, E. W.; de Voogt, J. W. H.; Westbroek, P.; Boogerd, F. C. et Rosson, R. A. (1986). Manganese oxidation by spores and spore coats of a marine bacillus species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1096-1100.

Diem, D. et Stumm, W. (1984). Is dissolved Mn^{2+} being oxidized by O_2 in absence of Mn-bacteria or surface catalyst?. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 48, 1571-1573.

Door, R.; Frösch, D. et Martin, R. (1991). Estimation of sections thickness and quantification of iron standard with EELS. *J. Microsc.*, 162 (1), 15-22.

Door, R.; Haberle, K. D. et Martin, R. (1994). Effect of specimen thickness and carbon content on the carbon peak region in EEL spectra. *J. Microsc.*, 174, 183-193.

Dubinina, G. A. (1978a). Functionnal role of bivalent iron and manganese oxidation in Leptothrix pseudoochracea. *Mikrobiologiya*, 47, 631-636.

Dubinina, G. A. (1978b). Mechanism of the oxidation of divalent iron and manganese by iron bacteria growing at neutral pH of the medium. *Mikrobiologiya*, 47, 471-478.

Egerton, R. F. (1986). Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope. Plenum Press, New York. 409 pp.

Eggleston, C. M. et Stumm, W. (1993). Scanning tunneling microscopy of Cr(III) chemisorbed on α-Fe_2O_3 (001) surfaces from aqueous solution: Direct observation of surfaces mobility and clustering. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 57, 4843-50.

Ehrenberg, C. G. (1836). Vorlaüfige Mitteilungen über das wirkliche Vorkommen fossiler Infusioren und ihre grosse Verbreitung. *Poggendorf's Ann. Phys. Chem.*, 38, 213-227.

Ehrlich, H. L.; Yang, S. H. et Mainwaring, J. D. (1973). Bacteriology of manganese nodules. VI. Fate of copper, nickel, cobalt and iron during bacterial and chemical reduction of the manganese(IV). *Z. Allg. Mikrobiol.*, 13, 39-48.

Ehrlich, H. L. (1983). Manganese-oxidizing bacteria from a hydrothermally active area on the Galapagos Rift. *Ecol. Bull.*, 35, 357-366.

Ehrlich, H. L. (1996). Geomicrobiology, 3rd edition, Marcel Dekker, New York, 719 pp.

Emerson, D.; Garen, R. E. et Ghiorse, W. C. (1989). Formation of Metallogenium-like structures by a manganese-oxidizing fungus. *Arch. Microbiol.*, 151, 223-31.

Emerson, D. et Ghiorse, W. C. (1993). Ultrastructure and chemical composition of the sheats of Leptothrix discophora SP-6. *J. Bacteriol.*, 175, 7808-7818.

Ferris, F. G.; Fyfe, W. S. et Beveridge, T. J. (1987). Manganese oxide deposition in a hot spring microbial mat. *Geomicrobiol. J.*, 5, 33-42.

Filipek, L. H.; Chao, T. T. et Carpenter, R. H. (1982). Factors affecting the partitioning of Cu, Zn and Pb in boulder coatings and stream sediments in the vicinity of a polymetallic sulfide deposit. *Chem. Geol.*, 33, 45-58.

Filella, M. et Buffle, J. (1993). Factors controlling the stability of submicron colloids in natural waters. *Colloids Surf. A: Physicochem. and Eng. Aspects*, 73, 255-73.

Filella, M.; Buffle, J. et Leppard, G. G. (1993). Characterization of submicrometre colloids in freshwaters: Evidence of their bridging by organic structures. *Wat. Sci. Tech.*, 27, 91-102.

Fleer, G. J. et Lyklema, J. (1974). Polymer adsorption and its effect on the stability of Hydrophobic colloids. *J. Colloid Interface Sci.*, 46, 1-12.

Fletcher, M. et Floodgate, G. D. (1973). An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *J. General Microbiol.*, 74, 325-334.

Forstner; U. et Stoffers, P. (1981). Chemical fractionation of transition elements in Pacific Pelagic sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 45, 1141-1145.

Fortin, D.; Leppard, G. G. et Tessier, A. (1993). Characteristics of lacustrine diagenetic iron oxyhydroxides. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 57, 4391-4404.

Foster, R. C. (1981). Polysaccharides in soil fabrics. *Science*, 214 (6), 665-667.

Freeman, D. S. et Chapman, W. G. (1971). An improved oxalate method for the determination of active oxygen in manganese dioxide. *Analyst*, 96, 865-869.

Friedman, B. A. et Dugan, P. R. (1968). Concenration and accumulation of metallic ions by the bacterium Zooglea. *Dev. Ind. Microbiol.*, 9, 381-385.

Fukai, R. (1968). A spectrophotometric method for determination of cobalt in seawater after enrichment with solid manganese dioxide. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, 24, 1-9.

Gadde, R. R. et Laitinen, H. A. (1973). Study of sorption of lead by hydrous ferric oxide. *Environ. Lett.*, 5 (4), 223-235.

Gadde, R. R. et Laitinen, H. A. (1974). Studies of heavy metal adsorption by hydrous iron and manganese oxides. *Anal. Chem.*, 46 (13), 2022-2026.

Garvie, L. A. J. et Craven, A. J. (1994a). Electron-beam-induced reduction of Mn4+ in managanese oxides as revealed by parallel EELS. *Ultramicroscopy*, 54, 83-92.

Garvie, L. A. J. et Craven, A. J. (1994b). High-resolution parallel electron energy-loss spectroscopy of Mn $L_{2,3}$-Edges in inorganic Manganese compounds. *Phys. Chem. Minerals*, 21, 191-206.

Garvie, L. A. J.; Craven, A. J. et Brydson, R. (1994). Use of electron-energy loss near-edge fine structure in the study of minerals. *American Mineralogist*, 79, 411-25.

Ghiorse, C. et Hirsh, P. (1979). An ultrastructural study of iron and manganese deposition associated with extracellular polymers of Pedomicrobium-Like budding bacteria. *Arch. Microbiol.*, 123, 213-26.

Ghiorse, W. C. (1984). Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 38, 515-550.

Ghiorse, W. C.; Miller, D. N.; Sandoli, R. L. et Siering, P. L. (1996). Applications of laser scanning microscopy for anlysis of aquatic microhabitats. *Microsc. Res. and Techn.*, 33, 73-86.

Godart, C.; Larroche, M.; Fretigny C. et Levy-Clement, C. (1992). EXAFS studies of synthetic γ-MnO_2 and related pyrolusite and ramsdellite minerals. *Phys. Stat. Sol. (a)*, 132, 253-268.

Gounot, A. M. et Di-Ruggiero, J. (1991). Rôle géochimique des bactéries dans les eaux souterraines: exemple du cycle du manganèse dans les nappes aquifères. *Hydrogéologie*, 3, 249-56.

Gounot, A. M. (1994). Microbial oxidation and reduction of manganese: Consequences in groundwater and applications. *FEMS Microb. Rev.*, 14, 339-350.

Gu, B. et Doner, H. E. (1992). The Interraction of Polysaccharides with Silver Hill Illite. *Clays Clay Miner.*, 40, 151-156.

Guilizzoni, P. G.; Bonomi, G.; Galanti, G. et Ruggiu, D. (1983). Relationship between sedimentary pigments and primary production: Evidence from core analyses of twelve Italian lakes. *Hydrobiologia*, 103, 103-106.

Gupta, S. K.; Häni, H. et Schindler, P. W. (1979). Factors affecting the degree of phosphate-removal in the system $FeCl_3$-orthophosphate and nature of the precipitates. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd*, 142, 705-18.

Halbach, P.; Giovanoli, R. et Von Borstel, D. (1982). Geochemical processes controlling the relationship between Co, Mn and Fe in early diagenetic deep-sea nodules. Earth Planet Sci. Lett., 60, 226-236.

Hanke, D. E. et Northcote, D. H. (1975). Molecular Visualization of pectin and DNA by Ruthenium Red. *Biopolymers*, 14, 1-17.

Hayat, M. A. (1981). Fixation for electron microscopy. Academic Press, New York. 501 pp.

Healy, T. H. et La Mer, V. K. (1962). The Adsorption-flocculation reactions of a polymer with an aqueous colloidal dispersion. *J. Phys. Chem.*, 66, 1835-1838.

Heissenberger, A. et Herndl, G. J. (1994). Formation of high molecular weight material by free living bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 111, 129-35.

Hem, J. D. (1978). Redox processes at surfaces of manganese oxide and their effects on aqueous metal ions. *Chem. Geol.*, 21, 199-218.

Hem, J. D. (1981). Rates of manganese oxidation in aqueous systems. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 45, 1369-1374.

Hering, J. G. et Stumm, W. (1990). Oxidative and reductive dissolution of minerals. In: Mineral-Water Interface Geochemistry. Hochella M. F. et White A. F. (Eds), Reviews in Mineralogy, 23. Mineral Soc. Am., 427-466.

Hiraide, M.; Arima, Y. et Mizuike, A. (1988a). Selctive desorption and analysis of humic substances on suspended particles in river water. *Mikrochim. Acta*, II, 231-238.

Hiraide, M.; Ishi, M. et Mizuike, A. (1988b). Speciation of iron in river water. *Anal. Sci.*, 4, 605-609.

Hofmann, A. (1996). Caractéristiques géochimiques et processus de transport de la matière particulaire dans le bassin nord du lac de Lugano (Suisse, Italie). Université de Genève, thèse. 392 pp.

Honeyman, B. D. et Santschi, P.H. (1992). The role of particles and colloids in the transport of radionuclides and trace metals in the oceans. In Environmental Particles, vol. 1. Buffle J. et Van Leeuwen, H. P. (Eds). Lewis, Chelsea, MI. 379-423.

Imboden, D. M.; Tschopp, J. et Stumm, W. (1980). Die rekonstruktion früherer Stofffrachten in einem See mittels Sedimentuntersuchungen. *Schweiz. Z. Hydrol.*, 42, 1-14.

Ishikawa, T.; Kataoka, S. et Kandori, K. (1993, May 15). The Influence of Carboxylate Ions on the Growth of beta-FeOOH Particles. *J. Mater. Sci.*, 28, 2693-2698.

Jaquet, J. M.; Nembrini, G.; Garcia, J. et Vernet, J. P. (1982). The manganese cycle in Lac Leman, Switzerland: the role of Metallogenium. *Hydrobiologia*, 91, 323-40.

Jones, B. F. et Bowser, C. J. (1978). The mineralogy and related chemistry of lake sediments. In: Lakes: Chemiytry, Geology, Physics. Lerman, A. (Ed), Springer-Verlag, New York.

Kell, R. G.; Montluçon, D. B.; Prahl, F. G. et Hedges, J. I. (1994). Sorptive preservation of labile organic matter in marine sediments. *Nature*, 370, 549-52.

Kepkay, P. E. (1985). Kinetics of microbial manganese oxidation and trace metal binding in sediments: Results from an in situ dialysisi technique. *Limnol. Oceanogr.*, 30 (4), 713-726.

Kepkay, P.E. et Nealson, K. H. (1987). Growth of manganese oxidizing Pseudomonas sp. in continuous culture. *Arch. Microbiol.*, 148, 63-67.

Kessick, M. A.; Vuceta, J. et Morgan, J. J. (1972). Spectrophotometric determination of oxidized manganese with Leuco Crystal Violet. *Environ. Sci. Technol.*, 6 (7), 642-644.

Klaveness, D. (1977). Morphology, distribution and significance of the manganese-accumulating microorganism Metallogenium in lakes. *Hydrobiologia*, 56, 25-33.

Knauer, G. A.; Martin, J. H. et Gordon, R. M. (1982). Cobalt in north-east Pacific waters. *Nature*, 297, 49-51.

Koenings, J. P. et Hooper, F. F. (1976). The influence of colloidal organic matter on iron and iron-phosphorus cycling in an acid bog lake. *Limnol. Oceanogr.*, 21 (5), 684-696.

Kono, Y. et Fridovich, I. (1983). Isolation and characterization of the pseudocatalase of Lactobacillus plantarum: A new manganese-containing enzyme. *J. Biol. Chem.*, 258, (10), 6015-6019.

Krauskopf, K. B. (1956). Factors controlling the concentration of thirteen rare metals in sea-water. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 9, 1-32B.

Lami, A.; Guilizzoni, P.; Ruggiu, D.; Polli, B.; Simona, M. et Barbieri, A. (1992). Role of pigments on algal communities and photosynthesis. *Aquat. Sci.*, 54, 3/4, 321-330.

Ledin, A. (1993). Colloidal carrier substances - Properties and impact on trace metal distribution in natural waters. Linköping University (Sweden), thesis. 70 pp.

Lee, Y. et Tebo, B. M. (1994). Cobalt(II) oxidation by the marine manganese(II)-oxidizing *Bacillus* sp. strain SG-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(8), 2949-2957.

Lerman, A. (1979). Geochemical processes water and sediment environments. John Wiley & Sons, New York. 481 pp.

Leppard, G. G., Massalski, A. et Lean, D. R. S. (1977). Electron-opaque microscopic fibrils in lakes: Their demonstration, their biological derivation and their potential significance in the redistribution of cations. *Protoplasma*, 92, 289-309.

Leppard, G. G. (1984). Organic coatings on suspended particles in lake water. *Arch. Hydrobiol.*, 102, (2), 265-269.

Leppard, G. G. (1986). The Fibrillar matrix components of lacustrine biofilms. *Water Res.*, 20, (6), 697-702.

Leppard, G. G.; Buffle, J.; De Vitre, R. R. et Perret, D. (1988). The ultrastructure and physicl characteristics of a distinctive colloidal iron particulate isolated from a small eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol.*, 113, 3, 405-24.

Leppard, G. G. (1992). Evaluation of electron microscope techniques for the description of aquatic colloids. In: *Environmental Particles*, vol. 1. Buffle J. et Van Leeuwen, H. P. Eds). Lewis, Chelsea, MI. 231-289.

Leppard, G. G. (1995). The characterization of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems. *Sci. Tot. Environ.*, 165, 103-131.

Leppard, G. G., Heissenberger, A. et Herndl, G. J. (1996). Ultrastructure of marine snow. I. Transmission electron microscopy methodology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 135, 289-298.

Liang, L. (1988). Effects of surface chemistry on kinetics of coagulation of submicron iron oxide particles (α-Fe_2O_3) in water. California Insitute of Technology, report n° AC-5-88, thesis. 156 pp.

Liang, L. et Morgan, J. J. (1990). Coagulation of iron oxide particles in the presence of organic materials; Application of chemical surface model. Chemical Modeling of Aqueous System II, ch.23, 295-308, ACS Symposium Series No.416.

Liechti, P. (1994). L'état des lacs en Suisse, Cahier de l'environnement n°237. Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage (OFEFP), 159 pp.

Lienemann, C.-P.; Mavrocordatos, D.; Perret D. (1997a). Enhanced visualization of polysaccharides from aqueous suspensions. *Mikrochim. Acta*, 126, 123-129.

Lienemann, C.-P.; Taillefert, M.; Perret, D. et Gaillard, J.-F. (1997b). Association of Co and Mn in aquatic systems: Chemical and microscopic evidence. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 61 (7), 1437-46.

Liener, I. E.; Sharon, N. et Goldstein, I. J. (1986). The lectins. Properties, functions and application in biology and medicine. Academic Press, London. 600 pp.

Lijklema, L. (1980). Interaction of orthophosphate with iron(III) and aluminum hydroxides. *Environ. Sci. Techn.*, 14 (5), 537-541.

Löfgren, S. et Boström, B. (1989). Interstitial water concentrations of phosphorus, iron and manganese in a shallow, eutrophic swedish lake-implications for phosphorus cycling. *Water Res.*, 23, 1115-25.

Luther, G. W. III. (1990). The frontier-molecular-orbital theory approach in geochemical porcesses. In: Aquatic Chemical Kinetics: Reactions rates of Processes in Natural Waters. Stumm. W. (Ed). Wiley Interscience, New York.

Maki, J. S.; Tebo, B. M.; Palmer, F. E.; Nealson, K. H. et Staley, J. T. (1987). The abundance and biological activity of manganese-oxidizing bacteria and Metallogenium-like morphotypes in lake Washigton, USA. *FEMS Microbiology Ecology*, 45, 21-9.

Manceau, A.; Gorshkov, A. I. et Drits, V. A. (1992). Structural chemistry of Mn, Fe, Co, and Ni in manganese hydrous oxides: Part I. Information from XANES spectroscopy. *American Mineralogist*, 77, 1133-1143.

Mandernack, K. W. (1992). Oxygen isotopic, mineralogical, and field investigations of microbial manganese oxidation. University of California, thèse.

Mandernack, K. W.; Post, J. et Tebo, B. M. (1995). Manganese mineral formation by bacterial spores of the marine Bacillus, strain SG-1: Evidence for the direct oxidation of Mn(II) to Mn(IV). *Geochim. Cosmochim. Acta*, 59, 4393-4408.

Manning, P. G. et Jones W. (1982). The binding capacity of ferric hydroxides for non-apatite inorganic phosphorus in sediments of the depositional basins of lakes Erie and Ontario. *Canadian Mineralogist*, 20, 169-176.

Manns, S. (1988). Molecular recognition in biomineralization. *Nature*, 332, 119-124.

Martin, J. M. et Whitfield, M. (1981). The significance of the river input of chemical elements to the ocean. Proc. of NATO. Advanced Research Institute on "Trace Metals in Sea Water". Wang, C. S. (Ed). Plenum Press, New York.

Matijevic, E. et Scheiner, P. S. (1978). Ferric hydrous oxide sols: III.Preparation of uniform particles by hydrolysis of Fe(III)-chloride, -nitrate, and -perchlorate solutions. *J. Colloid Interface Sci.*, 63, 509-524.

Mavrocordatos, D.; Lienemann, C.-P.; Perret, D. (1994). Energy filtered transmission electron microscopy for the physico-chemical characterization of aquatic submicron colloids. *Mikrochim. Acta*, 117, 39-47.

Mavrocordatos, D. (1997). Développement de la microscopie électronique analytique pour la caractérisation physico-chimique de colloïdes aquatiques. Université de Lausanne, thèse, 156 pp.

Mayer, L. M.; Liotta, F. P.; Norton, S. A. (1982). Hypolimnetic redox and phosphorus cycling in hypereutrophic lake Sebasticook, Maine. *Water Res.*, 16, 1189-1196.

McCarthy, J. F. et Degueldre, C. (1992). Sampling and characterization of colloids and particles in groundwater for studying their role in contaminant transport. In: *Environmental Particles*, vol. 2. Buffle J. et Van Leeuwen, H. P. Eds). Lewis, Chelsea, MI. 247-315.

McQueen, D. J.; Lean, D. R. S. et Charlton, M. N. (1986). The effects of hypolimnetic aeration on iron-phosphorus interactions. *Water Res.*, 20 (9), 1129-1135.

Monnerat, M. (1995). Minéralogie et géochimie des sédiments des rivières affluant dans le bassin nord du lac de Lugano (Tessin et Lombardie). Université de Genève, travail de diplôme. 239 pp.

Monti, R. (1929). Limnologia comparata dei laghi insubrici. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 5, 462-497.

Morel, F. M. M. (1983). Principles of aquatic chemistry. John Wiley & Sons, New York.

Morgan, J. J. (1967). Chemical equilibrium and kinetic of manganese in natural water. In: Principles and Applications of Water Chemistry. Faust, S. D. et Hunter, J. Y. (Eds). 561-624.

Mory, C. et Colliex, C. (1989). Elemental analysis near the single-atom detection level by processing sequences of energy-filtering images. *Ultramicroscopy*, 28, 339-346.

Murray, J. W. (1975). The interaction of metal ions at the manganese dioxide-solution interface. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 39, 505-19.

Murray, J. W.; Balistrieri, L. S. et Paul, B. (1984). The oxidation state of manganese in marine sediments and ferromanganese nodules. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 48, 1237-47.

Murray, J. W.; Dillard, J. G.; Giovanoli, R.; Moers, H. et Stumm, W. (1985). Oxidation of Mn(II): Initial mineralogy, oxidation state and ageing. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 49, 463-70.

Nealson K. H. (1978). The isolation and characterization of marine bacteria which catalyze manganese oxidation. In: Environmental Biogeochemistry, vol. 3, Methods, Metals and Assessment. Krumbein, W. E. (Ed), Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI, 847-858.

Nealson K. H.; Tebo, B. M. et Rosson, R. A. (1988). Occurence and mechanisms of microbial oxidation of manganese. *Adv. in Appl. Microbiol.*, 33, 279-318.

Norberg, A. B. et Enfors, S.-O. (1982). Production of extracellular polysaccharide by Zooglea ramigera. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 (5), 1231-1237.

Nriagu, J.O. et Dell, C. I. (1974). Diagenetic formation of iron phosphates in recent lake sediments. *Amer. Mineral.*, 59, 934-946.

Nriagu, J.O. (1979). Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature*, 279, 409-412.

Otten, M. T.; Miner, B.; Rask, J. H. et Buseck, P. R. (1985). The determination of Ti, Mn and Fe oxidation states in minerals by Electron Energy-Loss Spectroscopy. *Ultramicroscopy*, 18, 285-90.

Passow, U. et Alldredge, A. L. (1995). A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). *Limnol. Oceanogr.*, 40, 1326-1335.

Paterson, J. H. et Krivanek, O. L. (1990). ELNES of 3d transition-metal oxides. *Ultramicroscopy*, 32, 319-325.

Paulson, A. J.; Feely, R. A.; Curl, H. C.; Crecelius, E. A. et Geiselman, T. (1988). The impact of scavenging on trace metal budgets in Puget Sound. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52, 1765-1779.

Pearson, D. H.; Fultz, B. et Ahn, C. C. (1988). Measurements of 3d state occupancy in transition metals using electron energy loss spectrometry. *Appl. Phys. Lett.*, 53, 1405-1407.

Pefferkorn, E.; Widmaier, J.; Graillat, C. et Varoqui, R. (1990). Dynamic scaling in colloid aggregation reaction limited process induced by electrolytes and polyelectrolytes. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 81, 169-73, 81, 169-173.

Pelletier, E. (1995). Environmental organometallic chemistry of mercury, tin, and lead: Present status and perspectives. In: *Metal Speciation and Bioavailability in aquatic systems*. Tessier, A. et Turner, D. R. (Eds). IUPAC series on analytical and physical chemistry of environemental systems, Oxford. 103-148.

Penners, N. H. G. (1985). The preparation and stability of homodisperse colloidal haematite (α-Fe_2O_3). Wageningen Agricultural University, PhD thesis. 88 pp.

Perret, D. (1991). Caractéristiques physico-chimiques et dynamique de transport des formes du fer dans un lac eutrophe. Université de Genève, thèse. 195 pp.

Perret, D.; Leppard, G. G.; Muller, M.; Belzile, N.; De Vitre, R. et Buffle, J. (1991). Electron microscopy of aquatic colloids: Non-perturbing preparation of specimens in the field. *Water Res.*, 25, 1333-1343.

Perret, D.; Newman, M. E.; Nègre, J. C.; Chen, Y. et Buffle, J. (1994). Submicron particles in the Rhine river-I. Physico-chemical characterization. *Water Res.*, 28, 91-106.

Perret, D.; Lienemann, C.-P.; Mavrocordatos D. (1995). EELS-ESI identification of heterogeneous suspensions of aquatic microparticles. *Microsc. Microstruct. Microanal.*, VI, 41-51.

Pizarro-Konzak, J. (1993). Le cycle du fer dans un lac eutrophe (Bret, Vaud): Facteurs physico-chimiques. Université de Genève, thèse de doctorat. 167 pp.

Pizarro, J.; Belzile, N.; Fillela, M.; Leppard, G. G. :. J. -C.; Perret, D. et Buffle, J. (1995). Coagulation/sedimentation of submicron iron particles in a eutrophic lake. *Water Res.*, 29, 617-32.

Polli, B. et Simona, M. (1992). Qualitative and quantitative aspects of the evolution of the planktonic populations in Lake Lugano. *Aquat. Sci.*, 54, 3/4, 303-320.

Pottu-Boumendil, J. (1989). Techniques en microscopie électronique. Principes et méthodes de préparation. Editions INSERM, Paris. 221 pp.

Rankama, K. et Sahama, T. G. (1950). Geochemistry. University of Chicago Press, Chicago, 657-676.

Rask, J. H.; Miner, B. A. et Buseck, P. R. (1987). Determination of manganese oxidation states in solids by electron energy-loss spectroscopy. *Ultramicroscopy*, 21, 321-6.

Ravikumar, V. (1996). Surfaces and grain boundaries in towards establishing structure-property interfaces in electroceramics. Northwestern University. Thèse de doctorat.

Reed, S. J. B. (1993). Electron Microprobe analysis. 2nd Ed. Cambridge University Press. 326 pp.

Reid, R. T.; Live, D. H.; Faulkner, D. J. et Butler, A. (1993). A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant. *Nature*, 366, 455-8.

Reimer, L.; Fromm, I. et Rennekamp, R. (1988).Operations modes of electron microscopic imaging and EELS in a transmission microscope. *Ultramicroscopy*, 24, 339-354.

Reimer, L.; Fromm, I.; Hirsh, P.; Plate, U. et Rennekamp, R. (1992). Combination of EELS modes and electron spectroscopic imaging and diffraction in an energy-filtering electron microscope. *Ultramicroscopy*, 46, 335-47.

Richardson, L. L.; Aguilar, C. et Nealson K. H. (1988). Manganese oxidation in pH and O_2 microenvironments produced by phytoplancton. *Limnol. Oceanogr.*, 33, 352-363.

Risatti, J. B.; Capman, W. C. et Stahl, D. A. (1994). Community structure of a microbial mat: The phylogenetic dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 91, 10173-10177.

Robards, A. W. et Wilson, A. J. (1993). Procedures in electron microscopy. John Wiley & Sons, Chichester. 2 volumes.

Ros, J. (1994). La santé de la Méditerranée. *Pour la Science*, 202, 80-88.

Rose, J.; Manceau, A.; Bottero, J.-Y.; Masion, A. et Garcia, F. (1996). Nucleation and growth mechanism of Fe oxyhydroxide in the presence of PO_4 ions. 1. Fe K-edge EXAFS study. *Langmuir*, 12 (26), 6701-6707.

Rose, J.; Flank, A.-M.; Masion, A.; Bottero, J.-Y. et Elmerich, P. (1997). Nucleation and growth mechanism of Fe oxyhydroxide in the presence of PO_4 ions. 2. P K-edge EXAFS study. *Langmuir*, 13 (6), 1827-1834.

Rossiter, B. W. et Hamilton, J. F. (1991). Physical methods of chemistry, vol. IV. Microscopy. John Wiley & Sons, New York. 539 pp.

Ruiz DeVargas Carrascosa, E. (1997). Reactivity of particles under electron microscopy. Université de Lausanne, travail de diplôme. 43 pp.

Salomons, W. et Forstner, V. (1984). Metals in the hydrocycle. Springer-Verlag, Berlin.

Salvadè, G.; Stocker, K.; Trösch, J. et Zamboni, F. (1992). Hydrodynamics of Lake Lugano. *Aquatic Sciences*, 54, 3/4, 187-204.

Santschi, P. H. (1988). Factors controlling the biogeochemical cycles of trace elements in fresh and coastal marine waters as revealed by artificial radioisotopes. *Limnol. Oceanogr.*, 33, 848-866.

Schröder, R. R. (1992). Zero-loss energy-filtered imaging of frozen-hydrated proteins: model calculations and implications for future developments. *J. Microsc.*, 166, 389-400.

Schultze-Lam, S. et Beveridge, T. J. (1994). Nucleation of celestite and strontianite on a cyanobacterial S-layer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 447-453.

Schwertmann, U. et Thalmann, H. (1976). The influence of Fe[II], Si and pH on the formation of lepidocrocite and ferrihydrite during oxidation of aqueous $FeCl_2$ solutions. *Clay Minerals*, 11, 189-200.

Shafer, M. M. et Armstrong, D. E. (1991). Trace element cycling in southern Lake Michigan: Role of water column particles component. In: *Organic Substances and Sediment in Water*, Baker R. A. (Ed), Lewis, Chelsea, MI. 273-277.

Sierling, P.L. et Ghiorse, W.C. (1997). Development and application of 16S-ARN-targeted probes for detection of iron and manganese oxidizing sheathed bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(2), 644-651.

Sigg, L.; Sturm, M.; Davis, J. et Stumm, W. (1983). Metal transfer mechanisms in lakes. *Thalassia Jugosl.*, 18, 293.

Sigg, L. (1987). Surface chemical aspects of the distribution and fate of metal ions in lakes. Metcalf, R. L. et Stumm, W. (Eds), Aquatic Surface Chemistry, Wiley-Interscience, New-York, 319-349.

Sigg, L.; Sturm, M. et Kistler, D. (1987). Vertical transport of heavy metals by settling particles. *Limnol. Oceanogr.*, 32, 112-129.

Smart, P. et Tovey, N. K. (1982). Electron microscopy of soils and sediment: techniques. Clarendon Press, Oxford. 264 pp.

Sorber, C. W. J.; DeJong, A. A. W.; DenBreejen, N. J. et DeBruijn, W. C. (1990). Quantitative energy-filtered image analysis in cytochemistry. I. Morphometric analysis of contrast-related images. *Ultramicroscopy*, 32, 55-68.

Span, D.; Dominik, J.; Loizeau, J.-L.; Belzile, N. et Vernet, J.-P. (1992a). Phosphorus trapping by turbidites in deep-lake sediments. *Chem. Geol.*, 102, 73-82.

Span, D.; Dominik, J.; Lazzaretti, M. A. et Vernet, J.-P. (1992b). The role of sediment in the phosphorus cycle in Lake Lugano. I. Geochemical approach. *Aquat. Sci.*, 54, 3/4, 277-284.

Span, D.; Coppee, V., Dominik, J.; Balvay, G.; Berthier, F.; Martin, C. et Vernet, J.-P. (1993). Recovery from eutrophic to oligotrophic states in lakes: Roles of sediments. *Stud. Environ. Sci.*, 55, 303-322.

Sparrow, T. G.; Williams, B. G.; Rao, C. N. R. et Thomas, J. M. (1984). L3/L2 white-line intensity ratios in the electron energy-loss spectra of 3d transition-metal oxides. *Chem. Phys. Let.*, 108, 547-50.

Stahl, D. A. (1995). Application of phylogenetically based hybridization probes to microbial ecology. *Mol. Ecol.*, 4, 535-542.

StAmmand, A. (1990). Mechanisms controlling metalimnetic communities and the importance of metalimnetic phytoplancton to whole lake primary productivity. University of Notre-Dame, thèse.

Staub, C. (1983). Ultrafiltration et spéciation. Application à la détermination des constantes de complexes dans les conditions naturelles. Université de Genève, thèse de doctorat. 172 pp.

Stauffer, R. E. et Armstrong, D. E. (1986). Cycling of iron, manganese, silica, phosphorus, calcium and potassium in two stratified basins of Shagawa Lake, Minnesota. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 50, 215-229.

Steedman, H. F. (1950). Alcian Blue 8GS: a new stain for mucin. *Quart. J. Microbiol. Sc.*, 91, 477-479.

Sternbeck, J. (1996). Manganese cycling in a eutrophic lake - Rates and pathway. *Aquatic Geochemistry*, 1, 399-426.

Stone, A. T. et Morgan, J. J. (1984a). Reduction and dissolution of manganese(III) and manganese(IV)oxides by organics. I. Reaction with hydroquinone. *Environ. Sci. Technol.*, 18, 450-456.

Stone, A. T. et Morgan, J. J. (1984b). Reduction and dissolution of manganese(III) and manganese(IV)oxides by organics. II. Survey of the reactivity of organics. *Environ. Sci. Technol.*, 18, 617-624.

Stookey, L. L. (1970). Ferrozine-A new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.*, 42, 779-781.

Strycek, T.; Acreman, J.; Kerry, A.; Leppard, G. G.; Nermut, M. V. et Kushner, D. J. (1992). Extracellular fibril production by freshwater algae and cyanobacteria. *Microb. Ecol.*, 23, 53-74.

Stumm et Morgan, (1981). Aquatic Chemistry: An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters, 2nd edition. Wiley Interscience, New York. 780 pp.

Stumm, W. (1992). Chemistry of the solid-water interface. Processes at the mineral-water and particles-water interface in natural systems. Wiley Interscience, New-York, 428 pp.

Stumm, W. (1993). Aquatic colloids are chemical reactants: Surface structure and reactivity. *Colloids Surfaces A*, 73, 1-18.

Sunda, W. G. et Kieber, D. J. (1994). Oxidation of humic substances by manganese oxides yields low-molecular-weight organic substrates. *Nature*, 367, 62-64.

Taillefert, M. (1997). Northwestern University, thèse en préparation.

Taillefert, M.; Rose, E. et Gaillard, J.-F. (1997). Trace metals cycling in a meromictic lake: the influence of hydrous iron particles and dissolved organic matter. Proceeding of the Third International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Paris. (sous presse).

Tebo, B. M. et Emerson, S. (1985). Effect of oxygen tension, Mn(II) concentration, and temperature on the microbially catalysed Mn(II) oxidation rate in a marine fjord. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 1268-1273.

Tebo, B. M.; Nealson, K. H.; Emerson, S. et Jacobs, L. (1984). Microbial mediation of Mn(II) and Co(II) precipitation at the O_2/H_2S interfaces in two anoxic fjords. *Limnol. Oceanogr.*, 29, 1247-58.

Tessenow, U. (1974). Lösungs-, Diffusions- und Sorptionprozesse in der Obersicht von Seesedimenten, part. IV. *Arch. Hydrobiol.*, 1, 1-79.

Tessier, A. (1992). Sorption of trace elements on natural particles in oxic environments. In: *Environmental Particles*, vol. 1. Buffle J. et Van Leeuwen, H. P. Eds). Lewis, Chelsea, MI. 425-453.

Tessier, A.; Fortin, D.; Belzile, N.; DeVitre, R. R. et Leppard, G. G. (1996). Metal sorption to diagenetic iron and manganese oxyhydroxides and associated organic matter: Narrowing the gap between field and laboratory measurements. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 60, 387-404.

Thiéry, J. P. (1967). Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc. (Paris)*, 6, 987-1018.

Tilzer, M. M.; Serruya, C. (1990). Large Lakes, Ecological Structure and Function. Springer-Verlag, Berlin. 691 pp.

Tipping, E.; Woof, C. et Cooke, D. (1981). Iron oxide from a seasonally anoxic lake. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 45, 1411-1419.

Tipping, E. et Cooke, D. (1982). The effects of adsorbed humic substances on the surface charge of goethite in freshwaters. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 46, 75-80.

Tipping, E. et Ohnstad, M. (1984). Colloid stability of iron oxide particles from a fresh-water lake. *Nature*, 308, 266-268.

Tipping, E.; Thompson, D. W. et Woof, C. (1989). Iron oxides particulates formed by the oxygenation of natural and model lakewaters containing Fe(II). *Arch. Hydrobiol.*, 115, 59-70.

Tranvik, L. J.; Sherr, E. B. et Sherr, B. F. (1993). Uptake and utilization of 'colloidal DOM' by heterotrophic flagellates in seawater. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 92, 301-309.

Turner, S. et Buseck, P. R. (1981). Todorokites: A new familly of naturally occuring manganese oxides. *Science*, 212, 1024-1027.

Ulrich, H.-J. et Stone, A. T. (1989). Oxidation of chloro-phenols adsorbed to manganese oxide surfaces. *Environ. Sci. Technol.*, 23, 421-428.

Urrutia Mera, M. et Beveridge, T. J. (1993). Mechanism of silicate binding to the bacterial cell wall in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 175 (7), 1936-1945.

Van Waasbergen L. G.; Hoch, J. A. et Tebo, B. M. (1993). Genetic analysis of the marine manganese-oxidizing bacillus sp strain SG-1: Protoplast transformation, Tn917 mutagenesis, and identification of chromosomal Loci involved in manganese oxidation. *J. Bacteriol.*, 175 (23), 7594-7603.

Vilks, P. et Degueldre, C. (1991). Sorption behaviour of ^{85}Sr, ^{131}I and ^{137}Cs on colloids and suspended particles from the Grimsel Test site, Switzerland. *Appl. Geochem.*, 6, 553-563.

Viollier, E. (1995).Géochimie des élements traces en milieu lacustre. Université Denis Diderot, thèse.

Viollier, E.; Jezequel, D.; Michard, G.; Pepe, M.; Sarazin, G. et Alberic, P. (1995). Geochemical study of a crater lake (Pavin Lake, France): Trace-elements behaviour in the monimolimnion. *Chem. Geol.*, 125, 61-72.

Vollenweider, R. A. (1965). Materiali ed idee per una idrochimica delle acque insubriche. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 19, 213-286.

Vollmann, M. et Waser, R. (1994). Proceedings of the 4th International Conference on Electron Ceramics and Application. Volume I. Aachen. 615-620.

Von Gunten, H. R. et Lienert, C. (1993). Decreased metal concentrations in ground water caused by controls of phosphates emissions. *Nature*, 364, 220-222.

Von Gunten, U. et Schneider, W. (1991). Primary products of the oxygenation of iron(II) at an oxic-anoxic boundary: Nucleation, aggregation, and ageing. *J. Colloid Interface Sci.*, 145, 127-139.

Waite, T. D.; Wrigley, I. C. et Szymczak, R. (1988). Photoassisted disolution of a colloidal manganese oxide in the presence of fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.*, 22 (7), 778-785.

Waser, R. et De Vries, J. W. C. (1991). Proceedings of IEEE, 7th International Symposium of Applications of Ferroelectrics.

Whitfield, M. et Turner, D. R. (1987). The role of particles in regulating the composition of natural waters. In: *Aquatic Surface Chemistry*. Stumm, W. (Ed). Wiley Interscience, New York. 457-493.

Wilcox, N.; Ravikumar, V.; Rodrigues, R. P.; Dravid, V. P.; Vollmann, M.; Waser, R.; Soni, K. K. et Adriaens, A. G. (1995). Investigations of grain boundary segregation in acceptor and donor doped strontium titanate. *Solid State Ionics*, 75, 127-136.

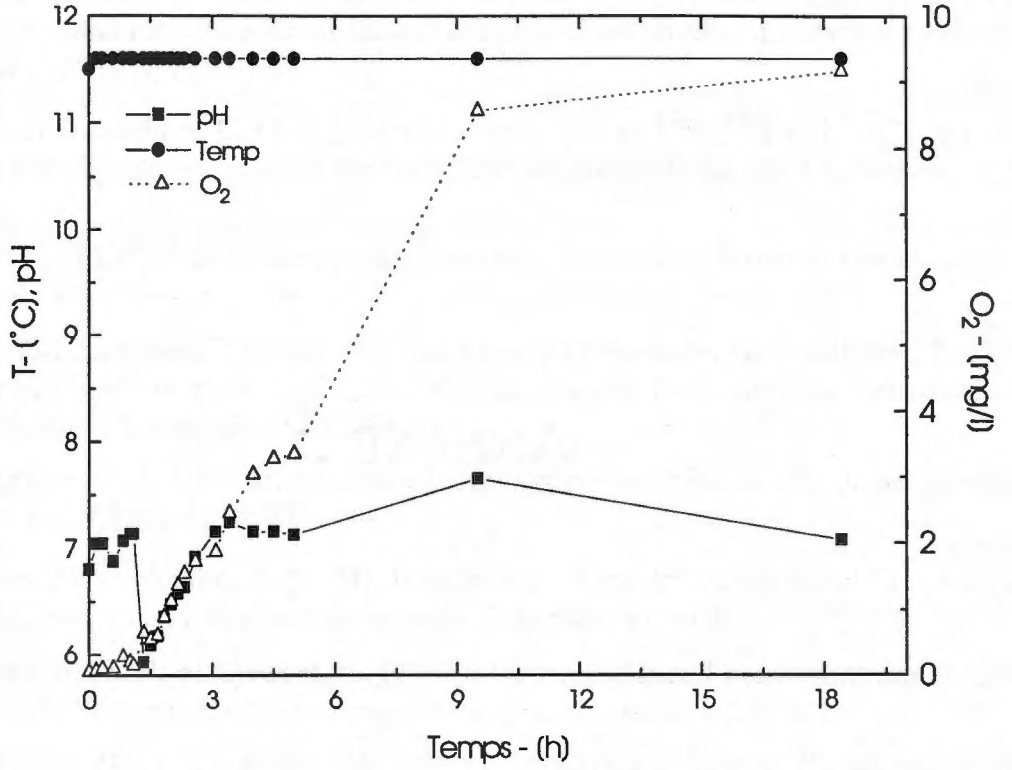
Wilkinson, K. J.; Stoll, S. et Buffle, J. (1995). Characterization of NOM-colloid aggregates in surface waters: Coupling transmission electron microscopy staining techniques and mathematical modelling. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 351, 54-61.

Yagi, A. (1988). Dissolved organic manganese in the anoxic hypolimnion of Lake Fukami-ike. *Jpn. J. Limnol.*, 49, 149-156.

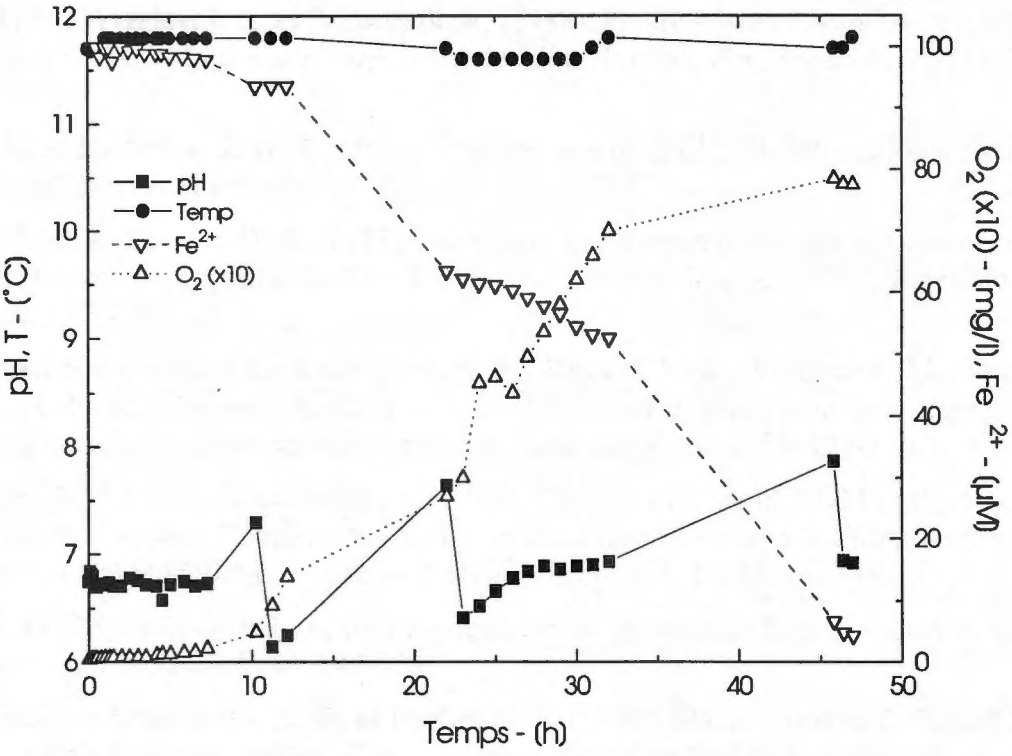
Yokoyama, A.; Srinivasan, K. R. et Fogler, H. S. (1990). Stabilization of Colloidal Particles by Acidic Polysaccharides. Effect of Temperature on Stability. *Langmuir*, 6, 702-706.

ANNEXE 3

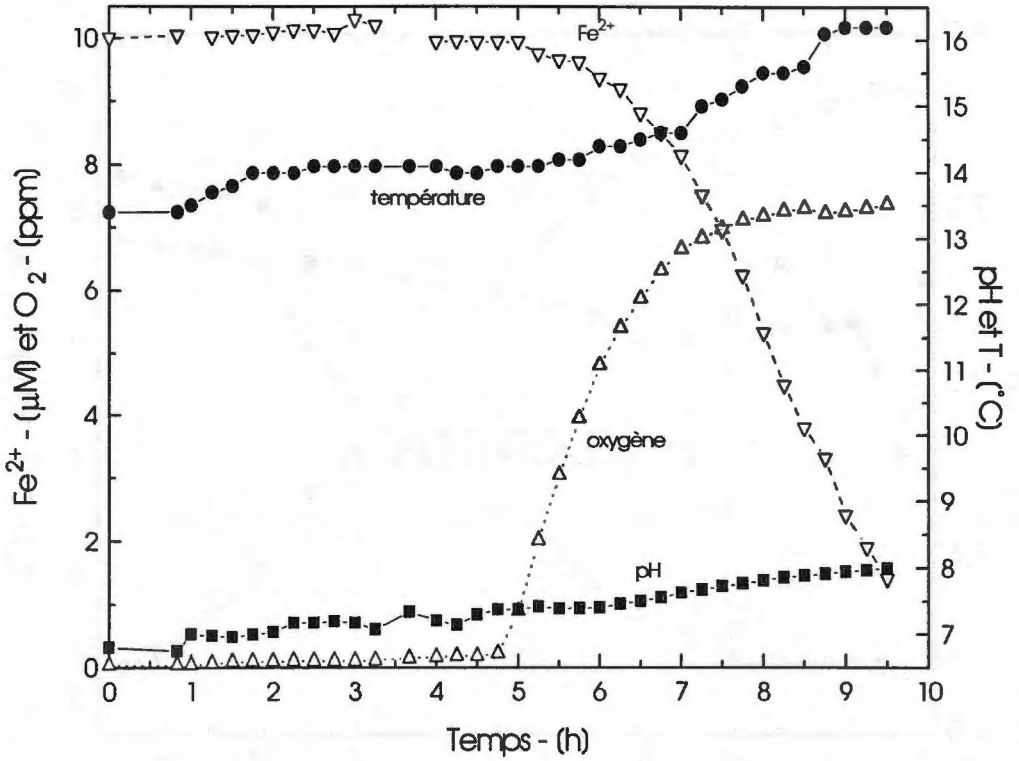
Synthèse n°4, contrôle des valeurs de pH, température et d'oxygène.



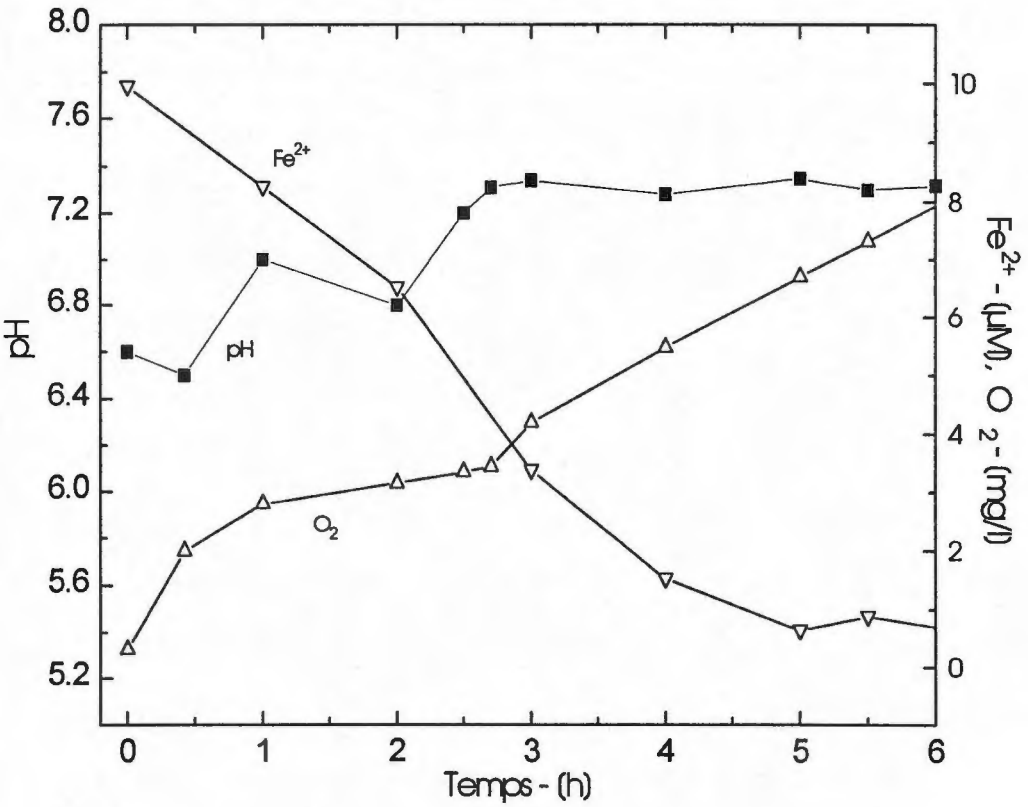
Synthèse n°5, contrôle des valeurs de pH, température, oxygène et Fe^{2+}.



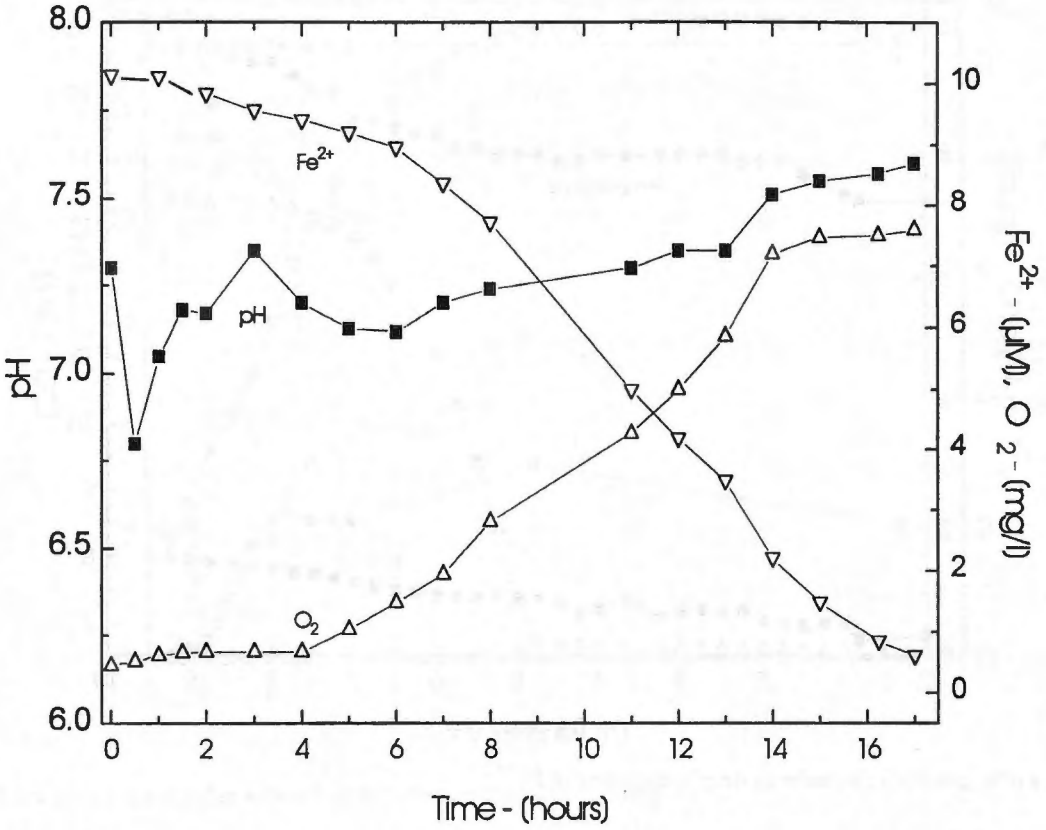
Synthèse n°6, contrôle des valeurs de pH, température, oxygène et Fe^{2+}.



Synthèse n°9, contrôle des valeurs de pH, oxygène et Fe^{2+}.



Synthèse n°10, contrôle des valeurs de pH, oxygène et Fe^{2+}.



ANNEXES 4

Table 1: Profils de janvier 1996; B: brut; F: filtré, U: ultrafiltré, memb: récupéré sur membrane.

m	$Fe^{2+}B$	$Fe^{2+}F$	$Fe^{2+}U$	PO_4B	PO_4F	PO_4U	MnB	MnF	MnU	Mn_{memb}	Fe_{memb}
70	0.07254	0.08734	0.04293	2.72314	3.13432	2.55866	0.10576	1E-3	0.00358	--	--
75	0.07254	0.08734	0.07254	2.96985	3.10691	2.44901	0.11531	0.00359	0.00434	0.06888	0.06192
80	0.16136	0.08734	0.08734	3.24397	3.32621	2.80537	0.47071	0.10657	0.23751	0.13934	0.06203
85	0.11695	0.08734	0.13175	3.35362	3.38103	2.80537	0.94024	0.89837	0.76441	0.0253	0.06663
90	0.10215	0.10215	0.07254	3.24927	3.22267	2.71721	1.41978	1.41468	1.12499	0.00677	0.05794
95	0.36862	0.54626	0.11695	2.6374	2.37138	1.83932	1.8205	1.81613	1.62319	0.0037	0.04435
100	0.33901	0.3242	0.3242	4.97845	5.03166	4.18037	2.47233	2.45158	2.15433	0.00158	0.03126
105	0.3094	0.41303	0.22058	4.68582	4.63262	4.04735	2.87414	2.84102	2.5384	--	--
110	0.57587	0.66469	0.3242	4.81883	4.92525	3.75472	3.51122	3.45653	1.45709	--	--
115	1.10881	1.04959	0.78312	5.24448	5.29769	3.88774	3.72865	3.62067	3.09912	--	--
120	1.27165	0.63509	0.91636	5.4573	5.00505	4.26018	3.67322	3.65075	3.29589	--	--

Table 2: Profils de février 1996; B: brut; F: filtré, U: ultrafiltré, memb: récupéré sur membrane.

m	$Fe^{2+}B$	$Fe^{2+}F$	$Fe^{2+}U$	PO_4B	PO_4F	PO_4U	MnB	MnF	MnU	Mn_{memb}	Fe_{memb}
70	0.04092	0.04092	0.0253	2.44279	--	2.19403	0.07663	0	1.8E-4	0.06194	0.04904
75	0.0253	0.06435	0.07216	2.86174	2.74391	2.40351	0.162	0.00164	--	0.11591	0.04804
80	0.0253	0.08779	0.11903	3.05813	2.95339	2.67845	0.49601	0.14107	--	0.23692	0.05957
85	0.07216	0.19713	0.04092	3.18905	3.1105	2.84865	0.81273	0.48054	0.26939	0.11067	0.07026
90	0.07216	0.11903	0.0253	3.31998	3.24142	2.95339	1.19407	1.05664	0.90283	0.05779	0.08281
95	0.13465	0.11903	0.08779	3.37235	3.35926	2.95339	1.33696	1.29145	0.93742	0.03622	0.06949
100	0.07216	0.13465	0.13465	3.54255	3.39853	2.95339	1.57905	1.48076	1.07849	0.02199	0.08018
105	0.21275	0.15027	0.05654	3.81749	3.86986	3.08432	2.10146	1.93946	1.55084	0.00562	0.06915
110	0.32209	0.30647	0.24399	5.07437	4.96963	4.23645	3.46845	3.30463	1.89668	0.00186	0.03468
115	0.33771	0.40019	0.25961	5.11364	5.13983	4.23645	4.21383	3.92806	2.02046	0.00182	0.02942
120	0.44705	0.36895	0.05654	5.04818	5.022	3.94842	4.87185	4.33124	2.41545	0.00148	0.02283

Table 3: Profils de mars 1996; B: brut; F: filtré, U: ultrafiltré, memb: récupéré sur membrane.

m	$Fe^{2+}B$	$Fe^{2+}F$	$Fe^{2+}U$	PO_4B	PO_4F	PO_4U	MnB	MnF	MnU	Mn_{memb}	Fe_{memb}
55	0.04068	0.10424	0.05657	1.19558	1.19558	1.14537	--	--	--	0.07736	0.1059
60	0.05657	0.13602	0.04068	2.14964	2.12453	1.98644	0.07093	--	--	0.13688	0.1086
65	0.04068	0.08835	0.07246	2.70198	2.70198	2.55134	0.27009	--	--	0.28294	0.12174
70	--	0.15191	0.19959	3.1539	3.10369	2.95305	0.63567	--	--	0.45821	0.12964
75	0.08835	0.1837	0.10424	3.25433	3.10369	2.87773	0.88794	0.01637	--	0.62543	0.15197
80	0.12013	0.16781	0.24726	3.30454	3.35476	3.00326	1.49597	1.2477	1.06582	0.16866	0.18801
85	0.24726	0.10424	0.10424	3.63093	3.58072	3.25433	2.098	2.11346	2.03525	0.06129	0.224
90	0.32671	0.15191	0.19959	3.95732	3.93221	3.40497	3.05833	3.01741	2.73094	0.01929	0.32195
92.5	0.22342	0.15191	0.12013	4.10796	4.08285	3.5305	3.43846	3.37389	2.99831	0.01447	0.37818
95	0.07405	0.40617	0.73987	4.78584	4.45945	4.40924	3.63489	3.56578	3.55214	0.01183	0.23403
97.5	0.53329	0.53329	0.48562	4.45945	4.68541	4.30881	3.51576	3.69673	3.51303	0.00892	0.1839
100	0.76371	0.78754	0.67631	4.91137	5.03691	4.2586	4.17508	3.99593	3.59215	0.00553	0.0929
105	1.01001	1.01001	0.89878	5.13733	5.11223	4.35903	4.39425	4.26784	3.83314	0.00437	0.08196
110	1.51851	1.48673	1.15303	5.53904	5.56415	4.55988	4.96808	4.90624	4.00775	0.00351	0.06733
115	2.15414	1.74098	1.32782	5.84032	5.91564	4.58499	5.14814	5.13359	4.14598	0.00313	0.118
119	2.67853	2.18592	2.0429	6.04117	5.99096	5.03691	5.56101	5.26455	4.56339	0.00413	0.06088

Table 4: Profils d'avril 1996; B: brut; F: filtré, U: ultrafiltré, memb: récupéré sur membrane.

m	$Fe^{2+}B$	$Fe^{2+}F$	$Fe^{2+}U$	PO_4B	PO_4F	PO_4U	MnB	MnF	MnU	Mn_{memb}	Fe_{memb}	PO_{4memb}
70	0.24808	8.7E-4	8.7E-4	1.03634	0.98945	0.966	0.11953	0.01574	0.01634	0.10084	0.05873	0.067
75	0.05031	0.01323	0.02559	1.20047	1.10668	0.98945	0.15622	0.01438	0.01386	0.12123	0.0616	0.062
80	8.7E-4	0.01323	8.7E-4	1.41149	1.29426	1.17702	0.19662	0.01853	0.01957	0.17529	0.06751	0.064
82.5	8.7E-4	0.18628	8.7E-4	1.48183	1.43494	1.20047	0.24754	0.00951	0.01691	0.19749	0.0693	0.055
85	0.01323	8.7E-4	8.7E-4	1.78664	1.76319	1.64596	0.35378	0.01083	0.01175	0.26976	0.0881	0.077
90	0.02559	0.01323	0.03795	2.3728	2.16178	1.90387	0.69907	0.10786	0.08405	0.51076	0.13501	0.131
92	0.03795	8.7E-4	0.01323	2.60727	2.4197	2.20868	0.9256	0.09925	0.06926	0.72347	0.16868	0.113
94	0.08739	0.01323	8.7E-4	3.21688	3.05275	2.84174	1.92651	1.70751	1.42982	0.20842	0.29796	0.118
96	0.13684	--	0.01323	3.59203	3.87339	3.09965	2.55524	2.39873	1.9646	0.0628	0.33771	0.15
98	0.37169	0.37169	0.39642	4.20164	4.06096	3.66237	3.13565	3.08348	2.69966	0.0253	0.22365	0.141
100	0.11211	0.09975	0.07503	3.49824	3.40445	3.19343	2.46625	2.32617	2.18484	0.07518	0.35955	0.177
105	0.39642	0.30989	0.24808	4.03751	3.94373	3.21688	3.0185	2.99907	2.61768	0.02585	0.27325	0.149
110	0.61891	0.61891	0.60655	4.29543	4.29543	3.99062	3.38631	3.36737	3.06969	0.01238	0.13322	0.062
115	0.76724	0.68072	0.52002	4.483	4.38921	3.92028	3.60465	3.56977	3.31443	0.00728	0.08201	0.042
120	1.2864	1.11335	0.76724	4.97538	4.8347	4.01407	3.81897	3.73098	2.9976	0.00473	0.06607	0.039

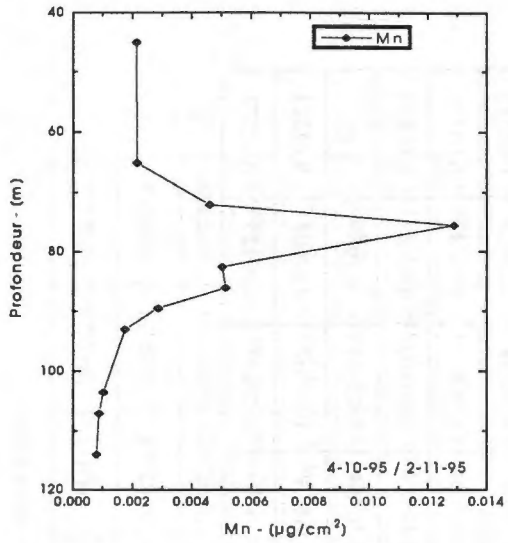
Table 5: Profils de mai 1996; B: brut; F: filtré, U: ultrafiltré, memb: récupéré sur membrane.

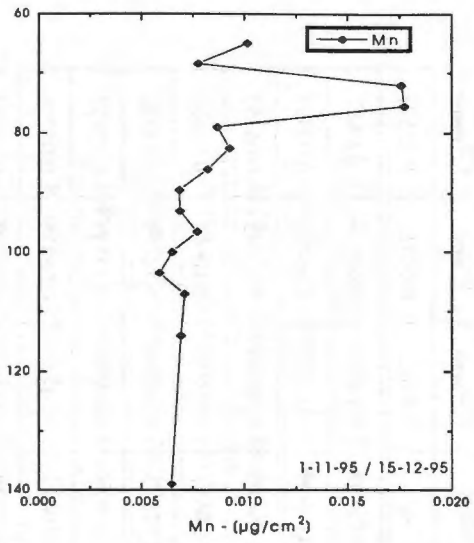
m	$Fe^{2+}B$	$Fe^{2+}F$	$Fe^{2+}U$	PO_4B	PO_4F	PO_4U	MnB	MnF	MnU	Mn_{memb}	Fe_{memb}
60	-0.03098	-0.03098	-0.03098	1.67572	1.62085	1.48368	0.09783	0.02407	0.02464	0.08883	0.05354
70	-0.03098	-0.03098	-0.03098	2.91029	2.91029	2.6085	0.24497	0.02422	0.02202	0.23354	0.07789
75	-0.03098	0.00112	-0.03098	3.43155	3.26694	3.02003	0.55072	0.07249	0.02796	0.28942	0.08487
80	0.00112	-0.01493	0.03323	3.59616	3.54129	3.32181	1.11838	0.80127	0.5808	0.33037	0.18067
85	0.16166	-0.01493	-0.03098	4.00768	3.89794	3.76077	1.87591	1.79094	1.84835	0.11613	0.27378
90	0.14561	0.22588	0.04929	4.08999	4.17229	3.87051	2.44974	2.42942	1.6619	0.03549	0.15131
92.5	0.22588	0.16166	0.24193	4.63868	4.69355	4.44664	2.6055	2.62793	2.50044	0.02421	0.13394
95	0.38642	0.27404	0.25799	5.10508	4.99534	4.77586	2.96262	3.0269	2.73848	0.01438	0.10959
100	0.51485	0.48274	0.46669	5.13251	5.24225	4.94047	3.26118	3.21496	3.13162	0.00954	0.08387
102	0.59512	0.57907	0.51485	5.15995	5.24225	4.9679	3.38532	3.34471	3.25566	0.00783	0.08004
104	0.81987	0.4988	0.46669	5.35199	5.26968	4.94047	3.3698	3.30921	3.22584	0.00692	0.06894
106	0.75566	0.7075	0.4988	5.32455	5.37942	5.07764	3.48612	3.51311	3.31712	0.00637	0.06088
108	0.80382	0.86804	0.86804	5.46173	5.43429	5.24225	3.53595	3.53479	3.42194	0.00637	0.06106
110	0.86804	0.81987	0.69144	5.5166	5.46173	5.18738	3.52708	3.57669	3.42668	0.00582	0.06213
120	1.81522	1.97576	1.46203	6.17503	6.33964	5.76351	3.62027	3.65377	3.58825	0.00582	0.06876
130	2.92294	2.82662	1.20517	6.80604	6.91578	6.50425	3.62614	3.66261	3.57116	0.00437	0.08237

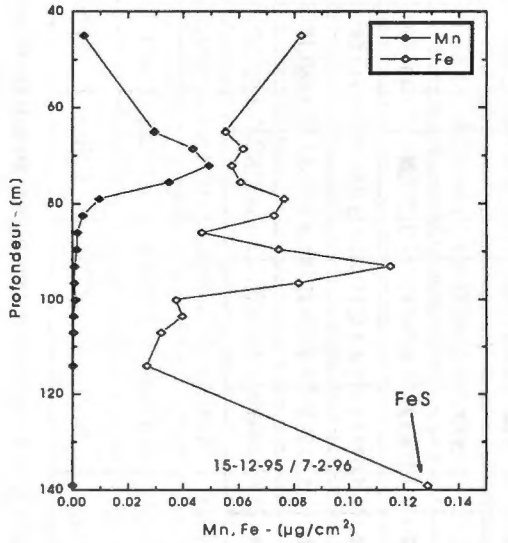
Table 6: Profils de juin 1996; B: brut; F: filtré, U: ultrafiltré, memb: récupéré sur membrane.

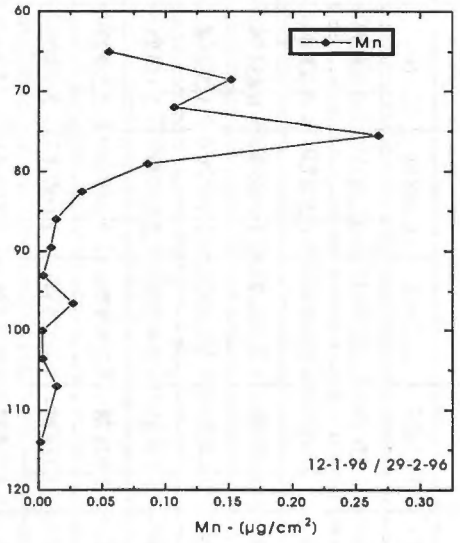
m	$Fe^{2+}B$	$Fe^{2+}F$	$Fe^{2+}U$	PO_4B	PO_4F	PO_4U	MnB	MnF	MnU	Mn_{memb}	Fe_{memb}	PO_{4memb}
60	0.07598	0.06051	0.04503	1.9238	1.97635	1.73988	0.06818	0	--	0.07022	0.04911	0.02521
70	0.09146	0.10693	-0.00139	2.58066	2.55439	2.37047	0.15455	-0.00909	-0.00909	0.15664	0.06446	0.0441
75	0.01408	0.06051	0.04503	3.02733	3.0536	2.84341	0.27273	-0.00909	-0.00909	0.2382	0.06482	0.03971
80	0.10693	0.15336	0.02956	3.42144	3.47399	3.29007	1.05909	0.85455	0.86818	0.16465	0.10643	0.06357
85	0.10693	0.10693	0.06051	3.50026	3.44771	3.13242	1.41818	1.26364	1.28637	0.09813	0.10607	0.06635
90	0.78784	0.15336	0.09146	3.31634	3.21125	2.92223	2.15909	2.15455	2.17273	0.04049	0.14179	0.13383
92	0.21526	0.12241	0.10693	3.0536	2.97478	2.97478	2.24546	2.27273	2.27728	0.03691	0.17125	0.17873
94	0.26168	0.19978	0.18431	3.8681	3.78928	3.52654	2.69091	2.50909	2.59091	0.01711	0.08375	0.05209
96	0.37001	0.29263	0.19978	4.76143	4.70888	4.36731	3.23637	3.1	3.02728	0.00945	0.06286	0.03584
98	0.33906	0.32358	0.23073	4.76143	4.70888	4.47241	3.35909	3.29091	3.27273	0.01038	0.04589	0.03843
102	0.37001	0.37001	0.27716	4.81398	4.7877	4.36731	3.69091	3.6	3.52728	0.00895	0.04982	0.03375
105	0.83426	0.52476	0.38548	4.91908	4.86653	4.39359	3.72728	3.40455	3.79546	0.00709	0.05036	0.02857
110	0.74141	0.63309	0.74141	5.07672	5.02417	4.84025	3.95	3.86818	3.76364	0.00384	0.105	--
120	1.57707	1.40684	1.20566	5.60221	5.57593	4.65633	4.11364	3.96364	3.90909	0.00807	0.02607	0.03324
130	2.75317	--	2.27344	6.60063	6.54808	5.99632	4.16818	4.02728	4	0.00807	0.08125	0.02272

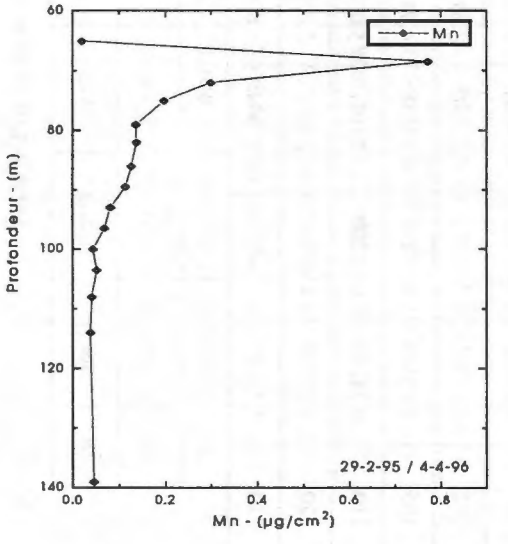
Annexe 4.2


Mn
Profondeur - (m)
Mn - (µg/cm²)
4-10-95 / 2-11-95


Mn
Mn - (µg/cm²)
1-11-95 / 15-12-95

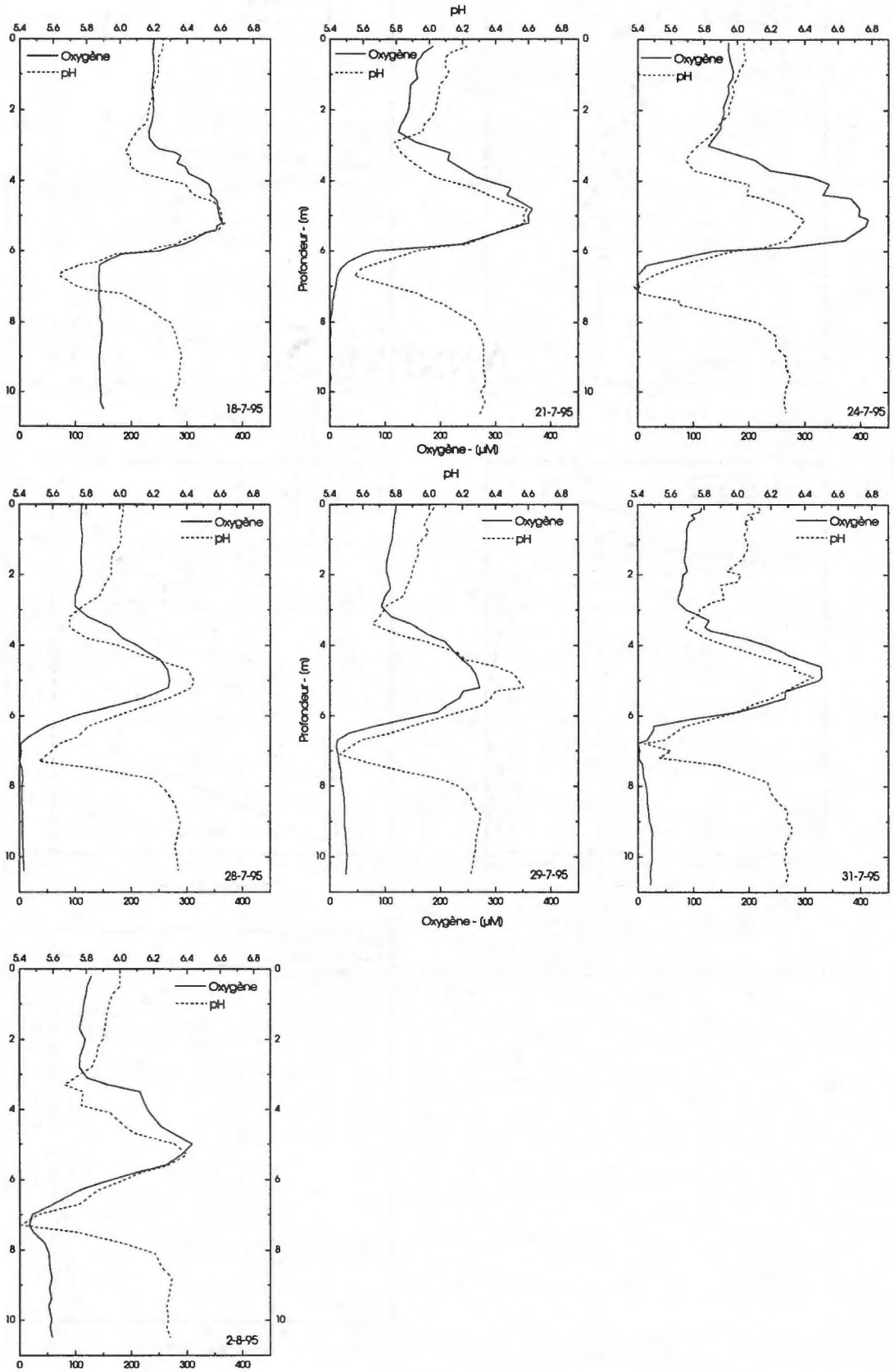

Mn
Fe
Profondeur - (m)
Mn, Fe - (µg/cm²)
FeS
15-12-95 / 7-2-96


Mn
Mn - (µg/cm²)
12-1-96 / 29-2-96


Mn
Profondeur - (m)
Mn - (µg/cm²)
29-2-95 / 4-4-96

ANNEXE 5

Annexe 5


pH
Oxygène
pH
Profondeur - (m)
Oxygène - (µM)
18-7-95
21-7-95
24-7-95
28-7-95
29-7-95
31-7-95
2-8-95

Charles-Philippe LIENEMANN
Institut de Chimie Minérale et Analytique
BCH
Université de Lausanne
CH-1015 Dorigny (Suisse)
Tél.: (41-21) 692-3930, fax: (41-21) 692-3935
e-mail: Charles-Philipp.Lienemann@icma.unil.ch

Divers:

Date de naissance:	14 juin 1968 (29 ans)
Etat civil:	Célibataire
Nationalité:	Française et suisse
Langue:	Anglais et allemand parlé et écrit, notion d'italien
Adresse privée :	Chatenod, F-74270 Frangy, tél: 04.50.32.21.10

Formation:

juin 1997	-Obtention de la thèse de doctorat, sous la direction du Prof. J.-C. Bünzli et co-direction du Dr. D. Perret, Institut de Chimie Minérale, et Analytique, Université de Lausanne (Suisse)
1993	-Obtention du Diplôme (équ. DEA), sous la direction du Prof. J. Buffle et co-direction du Dr. D. Perret, Département de Chimie Minérale, Analytique et Appliquée, Université de Genève (Suisse)
1992	-Obtention du certificat de Chimie de l'Environnement décerné par l'Université de Genève
	-Stage de recherche de 2 mois à l'Université de Notre-Dame (Indiana, Etats-Unis) sous la direction du Prof. J.-F. Gaillard
1991	-Obtention de la Licence (équ. Maitrise), Faculté des Sciences, Université de Genève (Suisse).
1987	-Maturité fédérale de type C avec mention, Collège Calvin (Genève).

Expériences:

1995-1996	- Assistant-doctorant pour les laboratoires de biologie, médecine, chimie et géologie au sein de l'Université de Lausanne
1993-1996	- Assistance et mise au point de 6 modules de cours de formation continue pour les maîtres de sciences du secondaire (organisation UniL)
1992	- Assistant-diplomant pour les laboratoires de chimie à l'ECG Jean Piaget-Genève
1988-1991	- Stages d'été d'un mois chez Givaudan-Roure S.A. (Genève). Travaux comprenant: échantillonage et analyse, recherche olfactive, pilotage d'une station de traitement biologique des eaux usées

Loisirs:

-Plongée subaquatique, niveau II FFESSM, Open Water Diver PADI, env. 90 plongées dont la plupart effectuées en lac.

-Sports de montagne: Escalade, randonnée à ski, randonnée à pied.

-Voyages et dépaysements, trekking.

Publications:

1997 Lienemann C.-P., Heissenberger A., Leppard G. G., Perret D.; Optimal preparation of water samples for the examination of colloidal material by transmission electron microscopy, *Aquatic Microbial Ecology,* soumis.

Lienemann C.-P., Taillefert M., Perret D., Gaillard J.-F.; Association of Co and Mn in aquatic systems: Chemical and microscopic evidence, *Geochimica Cosmochimica Acta,* 61 (7), (1997), 1437-46.

Lienemann C.-P., Mavrocordatos D., Perret D.; Enhanced visualization of polysaccharides from aqueous suspensions, *Mikrochim. Acta* , 126, (1997), 123-129.

1996 Couture, C., Lienemann C.-P., Mavrocordatos D., Perret D.; New directions towards the understanding of physico-chemical processes in aquatic systems, *Chimia,* 50, (1996), 625-29.

1995 Perret D., Lienemann C.-P., Mavrocordatos D.; EELS-ESI identification of heterogeneous suspensions of aquatic microparticles, Microsc. Microstruct. Microanal., VI, (1995), 41-51.

1994 Mavrocordatos D., Lienemann C.-P., Perret D., Energy filtered transmission electron microscopy for the physico-chemical characterization of aquatic submicron colloids, Mikrochim. Acta, 117, (1994), 39-47.

Perret D., Lienemann C.-P., Mavrocordatos D.; Natural microparticles-macromolecules interactions : an EF-TEM approach, Proceeeding of the international congress on electron microscopy, (1994), 1277-78.

Séminaires donnés:

1997 -Size fractionnation: Is it the right procedure?, *Institut Forel, Université de Genève, Suisse*

-Polluants, bactéries et fibrilles,phases minérales de Fe et de Mn; leurs liens dans deux lacs méromictiques, *Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France*

1996 -Importance du biota dans les processus chimiques lacustres: Lac Paul et Lac de Lugano, *Istituto Cantonale Batteriosierologico, Lugano, Suisse*

-Analytical Electron Microscopic investigations of a meromictic lake: Evidence of specific trace elements onto collidal hydrous oxides, *Ocean Science Meeting of the American Geophysical Union, San Diego, CA, Etats-Unis*

1995 -Electron Microscopy of lake water and groundwaters: An optimum tool for characterizing colloids/particles, *Symposium on Colloids in Aquatic Environments, Genève, Suisse*

1994 -Caractérisation de Polysaccharides : Structure microscopique et influence sur la stabilité de colloïdes d'hématite, *Centre de Microscopie Electronique, Université de Lausannne, Suisse*

1992 -The interaction between hematite colloids and polymers, *University of Notre-Dame, Notre-Dame IN, Etats-Unis*

Affiches scientifiques:

1997 B. J. McGregor, M.Taillefert, C-P. Lienemann, J-F. Gaillard, D. A. Stahl, Molecular characterization of microbial populations in the water column of a stratified lake, *American Society for Microbiology Meeting, Miami, FL (USA)*

M.Taillefert, C-P. Lienemann, D. Perret, et J-F. Gaillard, Analytical speciation of lead in the water column of Paul lake (MI), *American Chemical Society, Spring Meeting, San Francisco, CA (USA)*

1996 M.Taillefert, C-P. Lienemann, D. Perret, et J-F. Gaillard, Trace metal cycling in a meromictic lake: Interplay between adsorption onto colloidal hydrous oxides and complexation with NOM, *American Society of Limnology and Oceanography Annual Meeting, Milwaukee, WI (USA)*

C-P. Lienemann, D. Perret, M. Monnerat, M.Taillefert, A. Heissenberger, G.G. Leppard, et D. Flannigan, Biotic effects on the characteristics of autochtonous mineral particles: Paul Lake (USA) vs. Lake Lugano (CH), *The 1996 Symposium on Subsurface Microbiology, Davos, (Suisse)*

M. Taillefert, C. Féliers, B. Greidanus, C-P. Lienemann, et J-F. Gaillard, The influence of NOM and hydrous oxides on trace elements cycling in a meromictic lake, *American Geophysical Union Ocean Sciences Meeting, San Diego, CA (USA)*

1995 T. Billen, J. Dominik, J-L. Loizeau, C. Matternberger, A. Wüest, C. Degueldre, C-P. Lienemann, D. Mavrocordatos, D. Perret, et M. Biber, Repartition of Be-7 on particulate and colloidal matter in surface water of Lake Lugano, *Symposium on colloids in aquatic environments, Genève, Suisse.*

C-P. Lienemann, D. Perret, M. Tonolla, et J-L. Loizeau, Electron microscopy of particles and colloids from Lake Lugano, *Symposium on colloids in aquatic environments, Genève, Suisse*

1994 D. Perret, C-P. Lienemann, et D. Mavrocordatos, EELS-ESI as a powerful technique for the identification of heterogeneous mixtures of aquatic species, *Electron Energy-Loss Spectroscopy and Imaging-13, Leukerbad, Suisse.*

D. Perret, D. Mavrocordatos, et C-P. Lienemann, Natural microparticles-macromolecules interactions: an EF-TEM approach, *International Congress on Electron Microscopy (ICEM-13), Paris, France.*

1991 D. Perret, C-P. Lienemann, et J. Buffle, Size distribution of submicron particles in natural waters: Predictions and observations, *International conference on interfacial phenomena in the environment, Davos, Suisse*

Références:

Prof. Jean-François GAILLARD, email: jfg@galois.civil.nwu.edu , tél: (847) 467-1376, fax: (847) 491-4011, EHE Department of Civil Engineering, Northwestern University, 2145 N. Sheridan Av., Evanston IL 60208, USA

Prof. Pierre STADELMAN, email: pierre.stadelman@cime.epfl.ch, tél: (41-21) 693.2976, fax: (41-21) 693.4401, Centre Interdépartemental de Microscopie Electronique, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Suisse

Prof. Jean-Claude BUENZLI, email: jbunzli@icma.unil.ch, tél: (41-21) 692.3821, fax: (41-21) 692.3825, ICMA-BCH, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Suisse

Dr Didier PERRET, email:dperret@icma.unil.ch, tél: (41-21) 692.3923 , fax: (41-21) 692.3935, ICMA-BCH, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Suisse