

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

**ÉTUDE DU POTENTIEL D'ATTÉNUATION NATURELLE DES  
CYANURES DANS DES RÉSIDUS MINIERS PROVENANT  
D'USINES DE TRAITEMENT DE MINÉRAI D'OR**

**KAHINA OUDJEHANI  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)  
DÉCEMBRE 2000**

© Kahina Oudjehani, 2000.



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

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

**0-612-60911-1**

**Canada**

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

**ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL**

**Ce mémoire intitulé :**

**ÉTUDE DU POTENTIEL D'ATTÉNUATION NATURELLE DES  
CYANURES DANS DES RÉSIDUS MINIERS PROVENANT  
D'USINES DE TRAITEMENT DE MINÉRAI D'OR**

**présenté par : OU DJEHANI Kahina**

**en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées**

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

**M. PERRIER Michel, Ph.D., Président**

**Mme DESCHÈNES Louise, Ph.D., membre et directrice de recherche**

**M. ZAGURY Gérald J., Ph.D., membre et codirecteur de recherche**

**M. TASSÉ Normand, Ph.D., membre**

*À la mémoire de mon père et de mon frère  
À ma tendre et chaleureuse mère  
À mon cher époux*

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie vivement le professeur Réjean Samson, directeur de la chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites, et le professeur Louise Deschênes, codirectrice de la chaire, de m'avoir accueillie dans leur équipe et de m'avoir permis de réaliser ce projet qui m'a fait découvrir de nouvelles capacités en moi.

Je tiens à remercier particulièrement le professeur Louise Deschênes d'avoir dirigé ce travail et de sa disponibilité aux multiples rencontres qui ont éclairé le cheminement de ce projet.

Je suis très reconnaissante au Dr Gérald Zagury, codirecteur du projet, pour la formation qu'il m'a permis d'acquérir, les divers conseils scientifiques prodigués et la rigueur dont il m'a fait part. Qu'il trouve ici ma profonde gratitude.

Je ne saurais trop remercier madame Manon Leduc pour l'intérêt constant qu'elle a porté à ce projet, son dévouement et son implication dans les aspects techniques et analytiques. Mes remerciements s'adressent également à monsieur Pierre Gagné pour avoir effectué une recherche sur les méthodes analytiques des cyanures, et madame Sandra Estrela pour ses nombreux conseils.

Je remercie cordialement les partenaires de la chaire de leur contribution financière : Alcan, Bell Canada, Cambior, Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ), Chemin de fer Canadien Pacifique, Elf Aquitaine, Hydro-Québec, Pétro-Canada, Solvay, Ville de Montréal et le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG). Je remercie tout particulièrement la compagnie Cambior pour leur soutien et leur collaboration à ce projet.

Je remercie très sincèrement Martin Bilodeau et Françoise Castegnier qui ont eu la gentillesse d'accepter de relire ce mémoire, ainsi que Dina Oudjehani pour la mise en page. Enfin, je remercie toute l'équipe de la chaire pour leur sympathie et leurs nombreux conseils apportés à ce projet lors des séminaires.

## RÉSUMÉ

Les cyanures libres sont connus pour leur forte toxicité. Cependant, les formes complexées et les formes oxydées sont beaucoup moins toxiques. Les cyanures sont utilisés par plusieurs industries (industrie minière, industrie pharmaceutique, usines d'électrolyse de l'aluminium) comme réactifs, ou bien ils sont générés lors des processus industriels comme produits dérivés. Leur danger pour l'environnement résulte du fait que ces industries les rejettent sous forme de résidus ou d'effluent. Plusieurs techniques existent pour la détoxification des effluents contaminés aux cyanures, mais très peu ont vu le jour pour les résidus solides. L'atténuation naturelle, une technique de traitement passive, suscite l'intérêt de plusieurs industriels à cause de ses faibles coûts et de sa commodité vis-à-vis de l'environnement. Cette voie de traitement semble très prometteuse pour l'avenir.

Dans le but d'estimer le potentiel d'atténuation naturelle des cyanures contenus dans des résidus miniers provenant d'usines de traitement du minerai d'or, le sort des cyanures a été étudié. L'hypothèse que les cyanures, dans les résidus miniers, sont présents sous des formes stables ou sont sujets à des mécanismes de dégradation, va être vérifiée. Les objectifs visés par cette étude sont, dans un premier temps, l'identification et la quantification des principaux facteurs influençant le devenir des cyanures dans les résidus miniers, et dans un deuxième temps, l'étude du potentiel d'atténuation naturelle des cyanures par trois phénomènes que sont la dissolution, la biodégradation et la volatilisation. Les phénomènes d'atténuation naturelle seront étudiés sur des échantillons provenant de résidus frais entreposés depuis quelques mois et sur des échantillons de vieux résidus entreposés depuis plus de 6 ans provenant de deux sites miniers situés au Québec (Canada).

Les facteurs influençant le devenir des cyanures ont été identifiés suite à une revue critique de la littérature, et quantifiés grâce à une caractérisation physico-chimique et microbiologique approfondie. Les analyses physico-chimiques suivantes : teneur en métaux lourds, analyse granulométrique, pH, teneur en eau, teneur en matière organique, capacité d'échange cationique et capacité tampon ont été effectuées sur les vieux résidus et sur les résidus frais. Les concentrations en cyanures totaux ( $CN_T$ ), cyanures facilement dissociables ( $CN_{WAD}$ ), cyanates ( $CNO^-$ ) et thiocyanates ( $SCN^-$ ) ont été mesurées dans la phase liquide des résidus, alors que les  $CN_T$  et  $CN_{WAD}$  ont été analysés dans la phase solide. La caractérisation microbiologique consistait en un dénombrement, par la méthode des comptes viables, des hétérotrophes totaux (cultivés sur un milieu complet non sélectif), des micro-organismes tolérants aux cyanures (capable de croître dans un milieu complet additionné de cyanure de potassium), et enfin, des micro-organismes dégradeurs de cyanures (obtenus par un milieu sélectif où les cyanures ajoutés constituaient la source unique de carbone).

Les résultats de cette caractérisation ont montré une évolution des propriétés physico-chimiques et microbiologiques des résidus dans le temps. La concentration en  $CN_T$  était 10 fois plus élevée et le pH plus basique dans les résidus frais. Des concentrations élevées en  $CN_T$ ,  $CN_{WAD}$ ,  $CNO^-$ ,  $SCN^-$  ont été mesurées dans la phase liquide des résidus frais alors que ces espèces étaient non détectables dans les vieux résidus. La caractérisation microbiologique a révélé la présence des micro-organismes hétérotrophes totaux et tolérants aux cyanures dans les vieux résidus avec une moyenne de  $1 \times 10^5$  UFC/g de résidu sec. Cependant, une absence totale de ces micro-organismes a été observée dans les résidus frais. Par ailleurs, les micro-organismes dégradeurs étaient non détectables dans les deux types de résidus soient, les résidus frais et les vieux résidus.

Suite à la caractérisation des résidus miniers échantillonnés, trois phénomènes d'atténuation naturelle des cyanures, soient la dissolution, la biodégradation et la



volatilisation, ont été étudiés pour comprendre l'origine de la diminution de la concentration des cyanures.

Les tests de lixiviation ont été réalisés afin de déterminer la fraction soluble des cyanures et ainsi prédire leur potentiel de mobilisation dans l'environnement. Ces tests ont été effectués en cuvée dans l'eau désionisée ainsi que dans une solution de NaOH 10% (p/v), en maintenant un rapport solide-liquide de 1:5. La totalité des cyanures étant solubilisée à un  $\text{pH} \geq 12$ , les pourcentages de solubilisation des  $\text{CN}_T$  ont été calculés par rapport aux concentrations déterminées lors de la lixiviation dans la solution de NaOH. Les tests de lixiviation ont montré que les cyanures des résidus frais sont très lixiviables (68% de solubilisation après 48 h d'agitation) alors que les cyanures solubilisés à partir des vieux résidus étaient non détectables ( $< 0,01 \text{ mg/l}$ ) après le même temps d'agitation.

La biodégradation a été étudiée pour vérifier le potentiel des micro-organismes indigènes des résidus à dégrader les cyanures. Dans un premier temps, le potentiel de minéralisation des cyanures libres, ajoutés au résidu sous forme de  $\text{K}^{14}\text{CN}$ , a été estimé grâce à des essais en microcosmes. Des concentrations de 0, 5 et 10 mg de  $\text{CN}^-/\text{kg}$  non radiomarké ont été testées sur les différents échantillons. Dans un second temps, la biodégradation des cyanures contenus initialement dans le résidu a été étudiée sur les échantillons âgés de 3 mois et de 6 ans. Cette étude a été effectuée en suivant, durant une période de 96 jours, le formate, le formamide, l'ammoniaque ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$ ) et les  $\text{CN}_T$ . Les résultats des essais de minéralisation étaient très concluants. Ils ont montré l'existence de microflore indigène capable de minéraliser les cyanures libres, et ce même à une concentration allant jusqu'à 10 mg/kg. Des pourcentages maximums de minéralisation variant entre 71,5 % et 100 % ont été observés sur tous les échantillons et aux trois concentrations (0, 5 et 10 mg/kg). Cependant, le suivi de la biodégradation des cyanures contenus initialement dans le résidu n'a révélé aucune réduction de la concentration des  $\text{CN}_T$  dans les vieux résidus (6 ans), alors qu'une légère tendance de diminution, de celle-ci, a été observée dans les résidus frais (3 mois). L'absence de

biodégradation des cyanures dans les vieux résidus serait liée, en grande partie, à leur forme complexe et difficilement biodégradable. Les formates et formamides n'ont été détectés sur aucun type de résidus. L'ammoniac détecté sur certains échantillons serait issu de réactions physico-chimiques puisqu'il a également été retrouvé dans les témoins stériles, et ceci dans les mêmes concentrations que dans les échantillons biotiques.

Enfin, les essais de volatilisation, réalisés dans le but de vérifier l'atténuation des cyanures par volatilisation du HCN, consistaient à mettre les résidus frais et les vieux résidus dans des réacteurs fermés munis de trappe de NaOH (0,5 N). La soude a été utilisée pour sa capacité à absorber le HCN. Des échantillons de soude ont été prélevés et analysés pour les  $CN_T$  sur une période totalisant 8 semaines. Le principe de la méthode de volatilisation a été validé par des tests préliminaires en contaminant artificiellement le résidu avec des cyanures libres (1000 mg/l). Les essais de volatilisation n'ont révélé aucune présence de HCN dans la soude. L'absence de volatilisation dans les résidus frais serait due à leur pH basique, alors que dans les vieux résidus elle serait attribuable à la forme stable et non volatile des cyanures.

En conclusion, il a été montré dans ce projet que les cyanures contenus dans les vieux résidus étaient sous une forme stable, alors que ceux des résidus frais étaient plutôt lixiviables. Un potentiel élevé de minéralisation des cyanures en  $CO_2$ , par la microflore indigène, a été observé sur les deux types de résidus miniers, montrant l'existence du phénomène de biodégradation pouvant mener à l'atténuation naturelle.

## ABSTRACT

Free cyanides are known for their toxicity. However, the complex and oxidized forms are much less toxic. Cyanides are used by many industries (mining industry, pharmaceutical industry, aluminum production plants...) as reactants, or else they are generated from industrial processes as derived products. The hazard to the environment comes from the cyanide contaminated solid wastes and waste waters discarded by these industries. Many techniques for detoxification of cyanide-contaminated effluents exist, but very few can be applied to solid residues. Natural attenuation which is a passive treatment method is of great interest to industries because of the low costs involved and its harmlessness to the environment. This treatment approach seems very promising.

The fate of cyanides has been studied in order to evaluate the natural attenuation potential of cyanides contained in gold mine tailings. The hypothesis that cyanides in mine tailings are present in stable forms, or can be degraded by several mechanisms will be verified. The objectives of this study are firstly to identify and to quantify the main factors influencing the cyanide behavior in mine tailings, and secondly to investigate the natural attenuation potential of cyanides by three mechanisms which are dissolution, biodegradation and volatilization. Natural attenuation is a phenomenon which evolves over time. Therefore, this study investigates newly deposited tailings stored for only 3 months and 6 and 9 years old tailings collected from two gold extraction plant sites in Quebec (Canada).

The factors influencing the cyanide behavior were identified from the literature review, and were quantified by physicochemical and microbiological characterization. The old and new tailings were analyzed for the following physicochemical parameters: heavy metals, grain size, pH, moisture content, ignitable matter content, cation exchange capacity and buffer capacity. The total cyanide ( $CN_T$ ), weak acid dissociable cyanide

( $CN_{WAD}$ ), cyanates ( $CNO^-$ ) and thiocyanates ( $SCN^-$ ) concentrations were measured in the liquid phase of tailings, while the  $CN_T$  and  $CN_{WAD}$  were analyzed in the solid phase. The microbiological characterization consisted of an enumeration of three kinds of microbial population using the spread plate counting method. These populations are total heterotrophs (cultured in general nonselective medium), cyanide resistant microorganisms (able to grow in general medium supplemented with potassium cyanide) and finally, cyanide degrading microorganisms (obtained by a selective medium where cyanide added constitutes the sole source of carbon).

Characterization suggested a change over time of the physicochemical and microbiological properties of tailings. The  $CN_T$  concentration was ten times higher and the pH more basic in the new tailings. High concentrations of  $CN_T$ ,  $CN_{WAD}$ ,  $CNO^-$ , and  $SCN^-$  were measured in the liquid phase of the new tailings while these species were not detectable in the old tailings. The microbiological characterization revealed the presence of total heterotrophs and cyanide resistant microorganisms in the old tailings at an average level of  $1 \times 10^5$  CFU (colony-forming units)/g dry weight. However, no growth of these microorganisms occurred in the new tailings. Moreover, the degrading microorganisms were absent in both the new and old tailings.

After mine tailings characterization, three natural attenuation mechanisms were studied in order to understand the decrease of cyanide concentration. These mechanisms were dissolution, biodegradation and volatilization.

Leaching tests were conducted to evaluate the soluble cyanide fraction and to predict their potential mobility in the environment. These tests were done in stirred batch reactors using both deionized water and NaOH solution (10% w/v) at a 1:5 solid-liquid ratio. The cyanide measured at  $pH \geq 12$  was considered to represent the concentration of total cyanide, then their percent solubility were calculated with respect to the concentration determined during the extraction in the NaOH solution. The leaching tests

results showed high cyanide solubility in the new tailings of about 68% after 48 h batch extraction, whereas cyanide was not detectable from the old tailings after the same extraction time.

Biodegradation tests were carried out in two steps in order to verify the ability of indigenous microorganisms to degrade cyanide. First, the free cyanide mineralization potential was estimated by microcosms tests. The free cyanide was added to the samples as  $K^{14}CN$ . Unlabeled cyanide concentrations of 0, 5 and 10 mg/kg were tested in the different samples. Second, the natural biodegradation of cyanide contained initially in the tailings was studied in new and 6 years old tailings by monitoring formate, formamide, ammonia ( $NH_4^+$ ,  $NH_3$ ), and  $CN_T$ . The mineralization tests results showed a presence of indigenous microorganisms which can degrade free cyanide at concentrations up to 10 mg/kg. A maximum mineralization percentage ranging from 71,5 to 100 % was observed on every sample and all three concentrations (0, 5 and 10 mg/kg). However, the natural biodegradation assay showed no decrease of  $CN_T$  in the 6 years old tailings, whereas a slight decline occurred in the new tailings. The complex form highly resistant to biodegradation could explain the absence of cyanide biodegradation in old tailings. Formate and formamide species were never detected on any sample. Ammonia was present in both abiotic and biotic samples at the same concentration suggesting that this specie could be originate from physico-chemical reactions.

Finally, the volatilization tests, studied in order to estimate the natural cyanide attenuation through HCN volatilization, were conducted using sealed reactors containing new and old tailings samples and a NaOH trap. Caustic soda, used for its capacity to absorb HCN, was sampled and analyzed during 8 weeks. The principle of the volatilization method was verified by preliminary experiment in which samples were supplemented with free cyanide concentration (1000 mg/l). However, the volatilization assay revealed no presence of cyanide in NaOH solution. The absence of volatilization

may be due to the high pH of new tailings, whereas in old tailings it could be attributed to the stable and no volatile form of cyanide.

In conclusion, this research has demonstrated that cyanide contained in old tailings were in a stable form, whereas those in the new tailings were highly soluble. A potential of cyanide mineralization by indigenous microorganisms into CO<sub>2</sub> was observed in all samples. This suggests that biodegradation phenomena would be occurring in gold mine tailings.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>DÉDICACE .....</b>	<b>IV</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>V</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XI</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>XV</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>XIX</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>XX</b>
<b>Liste des annexes.....</b>	<b>XXI</b>
<b>Liste des notations et symboles.....</b>	<b>XXII</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1.....</b>	<b>5</b>
<b>1 REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 LES SOURCES DES CYANURES DANS L'ENVIRONNEMENT .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1 Production anthropique des cyanures .....</b>	<b>5</b>
<i>1.1.1.1 Utilisation des cyanures dans l'industrie aurifère.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.1.2 Utilisation des cyanures dans l'industrie de plaquage de métaux....</i>	<i>8</i>
<i>1.1.1.3 Utilisation des cyanures dans l'industrie de l'aluminium .....</i>	<i>9</i>
<b>1.1.2 Production naturelle des cyanures.....</b>	<b>9</b>
<i>1.1.2.1 Les plantes cyanogéniques.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.2.2 Les micro-organismes cyanogéniques .....</i>	<i>11</i>
<b>1.2 LA CHIMIE DES CYANURES .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.1 Propriétés physico-chimiques .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2 Structure des molécules HCN et CN<sup>-</sup>.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.3 Les différentes formes de cyanures.....</b>	<b>14</b>
<i>1.2.3.1 Les cyanures simples.....</i>	<i>15</i>
<i>1.2.3.2 Les cyanures complexés .....</i>	<i>15</i>

1.2.3.3	<i>Les thiocyanates (SCN)</i> .....	18
1.2.3.4	<i>Les cyanates (CNO)</i> .....	19
1.3	<b>TOXICITÉ DES CYANURES</b> .....	19
1.3.1	<b>Toxicité des cyanures libres</b> .....	19
1.3.1.1	<i>Toxicité chez les micro-organismes</i> .....	20
1.3.1.2	<i>Toxicité chez les organismes supérieurs</i> .....	22
1.3.2	<b>Toxicité des cyanures complexés</b> .....	24
1.3.3	<b>Toxicité des thiocyanates (SCN)</b> .....	25
1.4	<b>LES MÉCANISMES NATURELS D'ATTÉNUATION DES CYANURES</b> .....	26
1.4.1	<b>Volatilisation</b> .....	27
1.4.2	<b>Oxydation chimique</b> .....	28
1.4.3	<b>Hydrolyse chimique</b> .....	29
1.4.4	<b>Adsorption/lessivage</b> .....	29
1.4.5	<b>Solubilisation/transport</b> .....	30
1.4.6	<b>Biodégradation</b> .....	31
1.4.6.1	<i>Biodégradation des cyanures libres</i> .....	31
1.4.6.2	<i>Biodégradation des cyanures complexés</i> .....	39
1.5	<b>ÉTUDES PORTANT SUR L'ATTÉNUATION NATURELLE DES CYANURES</b> .....	40
1.5.1	<b>Atténuation naturelle des cyanures dans le sol</b> .....	40
1.5.2	<b>Atténuation naturelle des cyanures dans les boues</b> .....	41
1.5.3	<b>Atténuation naturelle des cyanures dans les résidus miniers</b> .....	41
1.6	<b>CONCLUSION</b> .....	43
1.7	<b>HYPOTHÈSE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS</b> .....	45
	<b>CHAPITRE 2</b> .....	<b>46</b>
2	<b>CARACTÉRISATION DES RÉSIDUS MINERS</b> .....	<b>46</b>
2.1	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>46</b>
2.2	<b>ÉCHANTILLONNAGE</b> .....	<b>47</b>
2.3	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>48</b>
2.3.1	<b>Caractérisation physico-chimique</b> .....	<b>48</b>



2.3.1.1	<i>Paramètres physico-chimiques</i> .....	48
2.3.1.2	<i>Concentration et spéciation des cyanures</i> .....	51
2.3.2	Caractérisation microbiologique .....	54
2.4	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	58
2.4.1	Caractérisation physico-chimique.....	58
2.4.1.1	<i>Paramètres physico-chimiques</i> .....	58
2.4.1.2	<i>Concentration et spéciation des cyanures</i> .....	63
2.4.2	Caractérisation microbiologique .....	67
2.5	CONCLUSION.....	71
<b>CHAPITRE 3</b>	.....	<b>73</b>
<b>3</b>	<b>ÉTUDE DE LA DISSOLUTION DES CYANURES</b> .....	<b>73</b>
3.1	INTRODUCTION.....	73
3.2	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	73
3.3	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	75
3.4	CONCLUSION.....	81
<b>CHAPITRE 4</b>	.....	<b>82</b>
<b>4</b>	<b>ÉTUDE DE LA BIODÉGRADATION DES CYANURES</b> .....	<b>82</b>
4.1	INTRODUCTION.....	82
4.2	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	83
4.2.1	Première partie : tests de minéralisation .....	83
4.2.2	Deuxième partie : tests de biodégradation .....	87
4.3	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	90
4.3.1	Première partie : tests de minéralisation .....	90
4.3.1.1	<i>Cinétique de minéralisation</i> .....	102
4.3.1.2	<i>Discussion générale sur les tests de minéralisation</i> .....	104
4.3.2	Deuxième partie : tests de biodégradation .....	105
4.4	CONCLUSION.....	110
<b>CHAPITRE 5</b>	.....	<b>112</b>
<b>5</b>	<b>ÉTUDE DE LA VOLATILISATION DES CYANURES</b> .....	<b>112</b>

5.1	INTRODUCTION.....	112
5.2	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	112
5.3	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	114
5.4	CONCLUSION.....	115
	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>116</b>
	<b>RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>119</b>
	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>121</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>138</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Constantes de stabilité des complexes cyanurés métalliques.....	16
Tableau 1.2 Classification des composés cyanurés.....	18
Tableau 2.1 Composition des milieux de culture non sélectif et sélectif utilisés pour le dénombrement des hétérotrophes totaux et des micro-organismes tolérants et dégradeurs .....	56
Tableau 2.2 Paramètres physico-chimiques des vieux résidus .....	61
Tableau 2.3 Paramètres physico-chimiques des résidus frais .....	61
Tableau 2.4 Concentration des espèces cyanurées des vieux résidus .....	65
Tableau 2.5 Concentration des espèces cyanurées des résidus frais.....	65
Tableau 2.6 Concentration (mg/kg) en élément minéraux dans les vieux résidus et les résidus frais .....	66
Tableau 3.1 Pourcentage de solubilisation des $CN_T$ et $CN_{WAD}$ dans l'eau .....	76
Tableau 3.2 Comparaison des $CN_T$ (mg/kg) estimés par la méthode 4500-CN C avec ceux extraits dans 10% de NaOH.....	78
Tableau 4.1 Différents essais réalisés dans les tests de minéralisation.....	85
Tableau 4.2 Définition des paramètres d'une courbe de minéralisation.....	86
Tableau 4.3 Paramètres de minéralisation pour Yv6 ans (0,2) et Yv6 ans (1) .....	94
Tableau 4.4 Paramètres de minéralisation pour Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1) .....	98
Tableau 4.5 Paramètres de minéralisation pour Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1).....	102
Tableau 4.6 Constantes de cinétique de premier ordre de minéralisation du $^{14}CN$ .....	104
Tableau 4.7 Suivi du formate, formamide, $CN_T$ et $NH_4^+$ dans l'échantillon Yv6 ans (0,2) .....	107
Tableau 4.8 Suivi du formate, formamide, $CN_T$ et $NH_4^+$ dans l'échantillon Dy3 mois (0,2) .....	108
Tableau 4.9 Résultats du $NH_3$ après 4 mois d'incubation.....	110
Tableau 5.1 Cyanures totaux (mg/l) retrouvés dans l'essai biotique et abiotique des tests de volatilisation .....	115

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Production de cyanures par les glucosides cyanogéniques des plantes.....	10
Figure 1.2 Équilibre entre les formes cyanurées moléculaires (HCN) et ioniques (CN <sup>-</sup> ) en solution en fonction du pH.....	13
Figure 1.3 Structure de la molécule HCN (Théorie de l'Hybridation). ....	14
Figure 1.4 Structure de l'ion CN <sup>-</sup> (Théorie de l'Hybridation).....	14
Figure 1.5 Transport d'électrons vers l'accepteur final (O <sub>2</sub> ) par les cytochromes oxydases dans la membrane interne de la mitochondrie.....	21
Figure 1.6 Représentation schématique de la chaîne de cytochromes d'Achromobacter développée en présence de 1mM de KCN.....	22
Figure 1.7 Voie métabolique de dégradation des cyanures par <i>P. fluorescens</i> NCIMB 11764.....	37
Figure 2.1 Capacité tampon des vieux résidus et des résidus frais. ....	62
Figure 2.2 Dénombrement des hétérotrophes totaux dans les vieux résidus. ....	70
Figure 2.3 Dénombrement des micro-organismes tolérants dans les vieux résidus. ....	70
Figure 3.1 Comparaison des cyanures totaux des résidus frais extraits à l'eau désionisée avec ceux extraits à 10% de NaOH.....	79
Figure 3.2 Comparaison des cyanures totaux des vieux résidus extraits à l'eau désionisée avec ceux extraits à 10% de NaOH.....	80
Figure 4.1 Représentation des paramètres d'une courbe de minéralisation.....	87
Figure 4.2 Courbes de minéralisation du K <sup>14</sup> CN dans les échantillons a) Yv6 ans (0,2) et b) Yv6 ans (1).....	93
Figure 4.3 Courbes de minéralisation de K <sup>14</sup> CN dans les échantillons a) Dy9 ans (0,2) et b) Dy9 ans (1).....	97
Figure 4.4 Courbes de minéralisation du K <sup>14</sup> CN dans les échantillons a) Dy3 mois (0,2) et b) Dy3 mois (1). ....	101

## **LISTE DES ANNEXES**

<b>ANNEXE I P33-A- Détermination de la matière organique par combustion à 550°C</b>	<b>139</b>
<b>ANNEXE II P33-B- Méthode de détermination de la Capacité d'Échange Cationique (CEC) pour un résidu minier</b> .....	<b>143</b>
<b>ANNEXE III P33-C- Dénombrement de microflores tolérantes aux cyanures et dénombrement sélectif par la méthode du comptage sur boîtes de Pétri ou méthode des comptes viables</b> .....	<b>150</b>
<b>ANNEXE IV P33-D- Tests de biodégradation en microcosmes des cyanures contenus dans un résidu minier</b> .....	<b>167</b>
<b>ANNEXE V P33-E- Dosage du NH<sub>3</sub> gazeux absorbé dans l'acide borique</b> .....	<b>183</b>
<b>ANNEXE VI P33-F -Test de volatilisation des cyanures contenus dans un résidu minier</b> .....	<b>195</b>
<b>ANNEXE VII P33-G- Test de lixiviation des cyanures contenus dans un résidu minier</b> .....	<b>203</b>
<b>ANNEXE VIII P32-E -Détermination de la capacité tampon des échantillons de sol provenant des six sites entourant des poteaux appartenant à Bell Canada</b> ..	<b>211</b>
<b>ANNEXE IX PSO A10-Test de minéralisation en microcosmes</b> .....	<b>218</b>

## LISTE DES NOTATIONS ET SYMBOLES

<b>CN<sub>T</sub></b> :	Cyanures totaux
<b>CN<sub>SAD</sub></b> :	“Strong acid dissociable”
<b>CN<sub>WAD</sub></b> :	“Weak acid dissociable”
<b>CIL</b> :	“Carbon in leach”
<b>CIP</b> :	“Carbon in pulp”
<b><sup>14</sup>CO<sub>2</sub></b> :	Dioxyde de carbone radiomarqué
<b>EPA</b> :	“U.S. Environmental Protection Agency”
<b>HPLC</b> :	“High performance liquid chromatography”
<b>ICP</b> :	“Inductively coupled plasma”
<b>K<sup>14</sup>CN</b> :	Cyanures de potassium avec carbone marqué
<b>MENV</b> :	Ministère de l’environnement du Québec
<b>MO</b> :	Matière organique
<b>MSM</b> :	Solution minérale minimale
<b>pK<sub>a</sub></b> :	pH auquel 50% d’un composé est sous forme non ionisée (HA) et 50% sous forme ionisée (A <sup>-</sup> )
<b>rpm</b> :	Rotation par minute
<b>TSB</b> :	“Tryptic soy broth”
<b>UFC</b> :	Unités formant des colonies
<b>UV</b> :	Ultraviolet

## INTRODUCTION

La gestion des sites contaminés par les cyanures est une préoccupation majeure des industries concernées à cause de leur forte toxicité et du danger de contamination des eaux souterraines et des eaux de surface. Les cyanures souvent rejetés dans l'environnement doivent être éliminés. À l'heure actuelle, des restrictions sur le rejet des résidus solides et des effluents industriels tendent à réduire les quantités de cyanures libérées dans l'environnement.

Le rejet des cyanures dans l'environnement résulte du fait que plusieurs industries les utilisent dans divers processus industriels fondés sur leur grande réactivité et affinité avec le produit cible. Les industries qui utilisent ou qui génèrent les cyanures sont multiples. Parmi elles, figurent les industries minières, les usines de plaquage de métaux, les industries pharmaceutiques, les usines d'électrolyse d'aluminium et les usines à gaz. La consommation mondiale de cyanure (exprimée en équivalent de HCN) s'évalue entre 6 et 9,5 millions de tonnes par année (Libaude, 1994; Pesce, 1993). Les résidus issus des industries minières et plus précisément ceux provenant de l'industrie aurifère font l'objet de cette étude.

Les cyanures sont aussi produits naturellement par des végétaux et des micro-organismes (Castric, 1981; Knowles, 1976). Plusieurs aliments contiennent des glucosides cyanogéniques (pêches, poires, amandes, abricots, etc.), tandis que des micro-organismes tels que *Chlorella vulgaris*, *Linnaria stariata* synthétisent la cyanocobalamine appelée communément la vitamine B<sub>12</sub> [ $R_{00}^-Co^{+++}CN$ ] (Howe, 1984). La quantité de cyanures produite naturellement ne persiste pas dans l'environnement, elle est vite dégradée à cause de sa faible concentration (Chatwin *et al.*, 1988; Knowles, 1988).

Il existe de nombreuses méthodes de dépollution des cyanures essentiellement fondées sur des procédés chimiques ou thermiques. Elles sont efficaces pour le traitement des résidus solides et effluents liquides mais elles restent coûteuses et parfois polluantes. L'atténuation naturelle, une technique de traitement passive, suscite l'intérêt de plusieurs industriels à cause de ses faibles coûts et sa commodité vis à vis de l'environnement. Cette voie de traitement semble très prometteuse pour l'avenir.

Plusieurs auteurs ont étudié l'atténuation naturelle des cyanures dans les effluents et dans le sol (Chatwin et Hendrix, 1988; Gonen *et al.*, 1996; RRCC, 1987; Schmidt *et al.*, 1981; Smith, 1988). Également, plusieurs études d'atténuation naturelle des cyanures ont été faites dans des résidus miniers provenant d'usines d'extraction d'or (Smith et Struhsacker, 1987; Smith et Mudder, 1991; Church et Boyle, 1990). Ces études basées généralement sur le suivi des concentrations des cyanures dans le temps n'ont, cependant, jamais été appuyées par des expériences. Les phénomènes potentiels de dégradation naturelle des cyanures dans un résidu ou dans un sol sont : la volatilisation, la précipitation, l'adsorption sur des minéraux, l'oxydation chimique, l'hydrolyse chimique, la solubilisation/transport et la biodégradation. Des études portant sur ces phénomènes ont été réalisées séparément : étude de la mobilité des cyanures et des ferrocyanures (Alesii et Fuller, 1976; Meeussen *et al.*, 1995; Meeussen *et al.*, 1994), tests d'adsorption (Lee *et al.*, 1998; Theis et West, 1986) et tests de volatilisation (Chatwin et Trepanowski, 1987; Mihaylov et Hendrix, 1994). Également, plusieurs études sur la biodégradation aérobie et anaérobie des cyanures ont été réalisées (Chapatwala *et al.*, 1998; Dumestre *et al.*, 1997b; Finnegan *et al.*, 1991; Harris et Knowles, 1983; Ingvorsen *et al.*, 1991; Meyers *et al.*, 1991). Ces études, effectués avec des souches pures, ont été généralement faites à des fins de traitement et non pas dans le but d'étudier l'atténuation naturelle. De plus, les expériences de biodégradation et de volatilisation ont été effectuées le plus souvent dans des milieux liquides ou dans des boues, et rarement dans un solide. Kjeldsen (1999) mentionne que la plupart des études d'atténuation naturelle des cyanures à ce jour ont été réalisées dans des systèmes purs. Il



recommande par ailleurs l'accomplissement d'études orientées vers la biodégradation naturelle dans les sols et les eaux souterraines des sites contaminés.

Dans le présent travail, le potentiel d'atténuation des cyanures contenus dans le résidu minier va être étudié tel qu'il a été échantillonné, c'est-à-dire en modifiant le moins possible ses caractéristiques. Le but de cette étude est donc l'étude du potentiel d'atténuation naturelle des cyanures dans un résidu minier issu du procédé CIP/CIL d'extraction d'or. Ce travail va permettre de réaliser une évaluation quantitative du potentiel d'atténuation naturelle des cyanures dans les résidus miniers propres aux sites étudiés. Les phénomènes d'atténuation naturelle seront étudiés sur des échantillons provenant de résidus frais entreposés depuis quelques mois et sur des échantillons de vieux résidus mis en décharge depuis plus de 6 ans. L'identité des sites miniers ne peut être divulguée par souci de confidentialité. Les mécanismes qui feront l'objet de cette étude sont la volatilisation, la solubilisation et la biodégradation.

L'approche proposée dans ce projet permettra d'éviter des traitements actifs et coûteux des cyanures dans le cas où les conditions d'atténuation naturelle existent. Les résultats de cette étude intéresseront particulièrement l'industrie minière lors de la fermeture des parcs. Cependant, les résultats pourront également servir à mieux comprendre les mécanismes qui affectent le devenir des cyanures dans un résidu minier, et éventuellement dans des sols.

Ce mémoire comprend 5 chapitres. Le premier chapitre qui renferme la revue de littérature présentera succinctement les sources de cyanures dans l'environnement, la chimie des cyanures, la toxicité des cyanures et les mécanismes naturels d'atténuation des cyanures. La conclusion sur ces mécanismes et le choix des trois phénomènes qui seront étudiés dans ce mémoire ainsi que l'hypothèse et l'objectif de recherche seront présentés à la fin de ce chapitre.

Le deuxième chapitre traite de la caractérisation approfondie des résidus miniers. Après un résumé de l'étape d'échantillonnage, les paramètres essentiels qui régissent l'atténuation des cyanures vont être quantifiés dans la caractérisation physico-chimique. La concentration initiale des cyanures dans les échantillons de résidu ainsi que leur spéciation seront présentées dans la caractérisation chimique. Enfin, la caractérisation microbiologique discutera des dénombrements des hétérotrophes totaux, des micro-organismes tolérants (capables de résister aux cyanures) et des micro-organismes dégradeurs (micro-organismes capables de croître sur les cyanures comme source unique de carbone).

Aux chapitres 3, 4 et 5 l'étude de trois phénomènes d'atténuation naturelle des cyanures sera abordée. La solubilisation des cyanures contenus initialement dans le résidu sera présentée au chapitre 3. Au chapitre 4, les essais de biodégradation étudieront dans un premier temps, la capacité de la microflore indigène à dégrader des cyanures libres ajoutés au résidu par des tests de minéralisation, et dans un second temps, la biodégradation naturelle des cyanures contenus initialement dans le résidu. Enfin, dans le chapitre 5 le test de volatilisation des cyanures sera présenté. Finalement, la conclusion générale émergeant de ce projet ainsi que les recommandations seront apportées à la fin de ce mémoire.

## CHAPITRE 1

### 1 REVUE DE LITTÉRATURE

#### 1.1 Les sources des cyanures dans l'environnement

Pour comprendre la problématique des cyanures, il est important de connaître leur origine dans l'environnement. La présence des cyanures dans l'environnement est reliée à l'activité humaine et à la production naturelle. Plusieurs industries utilisent les cyanures comme réactif dans les procédés qui se retrouvent en fin de chaîne dans les résidus. C'est le cas des mines d'extraction d'or ou d'argent, des usines de plaquage de métaux, des industries pharmaceutiques, des laboratoires d'analyse, etc.

D'autres industries n'utilisent pas les cyanures comme réactifs, mais ils sont plutôt générés lors du déroulement du procédé comme produits dérivés. Ils se retrouvent de la même façon que dans le premier cas dans les rejets industriels. Parmi ces industries figurent les usines à gaz, les usines d'électrolyse de l'aluminium et les usines de fabrication de certaines peintures (Dumestre, 1995).

##### 1.1.1 Production anthropique des cyanures

###### *1.1.1.1 Utilisation des cyanures dans l'industrie aurifère*

Au XIV<sup>e</sup> siècle, l'extraction de l'or se faisait par le mercure, procédé appelé «amalgamation», mais son utilisation a diminué depuis l'introduction des cyanures en 1889 à cause de leur grande affinité pour l'or. Le principe de la cyanuration consiste à mélanger le minerai broyé avec une solution alcaline de cyanure de sodium. Le cyanure

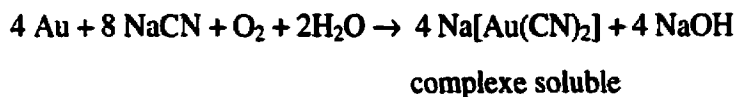
dissout l'or et le maintient en solution sous forme d'un sel complexe soluble, ensuite cette solution est séparée du solide par filtration et l'or est récupéré (Libaude, 1994).

Trois types de processus d'extraction de l'or par les cyanures ont vu le jour : le procédé Merrill Crowe, le procédé Zadra et la cyanuration en tas.

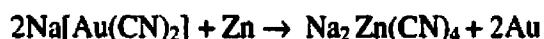
#### ***1.1.1.1 Procédé Merrill Crowe (Libaude, 1994)***

Après concassage, le minerai mélangé à de l'eau est broyé à une dimension de l'ordre de 0,1 mm dans des broyeurs cylindriques horizontaux remplis d'une charge de barres ou de boulets en acier. La «pulpe» ainsi préparée traverse une série de quatre à huit cuves dans lesquelles la réaction de dissolution a lieu après que la concentration en cyanure de sodium eut été ajustée aux environs de 0,5 g/l. L'addition de chaux maintient l'alcalinité du milieu à un pH de 10 à 11; cela permet de maintenir le cyanure en solution, tout en évitant la formation de gaz cyanhydrique. Le temps de séjour moyen de la pulpe cyanurée dans les cuves varie de douze à quarante heures. L'attaque chimique consomme de 0,2 à 1 kg de cyanure de sodium par tonne de minerai. La séparation de la solution aurifère du solide, devenu stérile, s'opère par filtration ou par décantations successives à contre-courant. La solution, d'abord clarifiée par des filtres, traverse une tour à vide pour éliminer l'oxygène dissous, qui entraverait le dépôt de l'or en oxydant la surface du zinc. La poudre de zinc ajoutée à la solution précipite ensuite l'or et forme un «cément», à son tour séparé par filtration. La fusion du cément fournit des lingots contenant de 50 à 80% d'or.

Le mécanisme global de la cyanuration de l'or est décrit par la réaction d'Elsner. Elle met en évidence la nécessaire présence d'oxygène pour former un complexe auro-cyanure :



La récupération de l'or dans le procédé Merrill-Crowe se fait à l'aide du zinc qui remplace l'or pour former un nouvel ion complexe suivant la réaction globale :



#### **1.1.1.1.2 Procédé Zadra (Libaude, 1994)**

Les premières étapes de concassage et de préparation de la pulpe cyanurée sont identiques à celles du procédé Merrill Crowe et c'est uniquement la méthode de récupération de l'or qui diffère. La nouvelle technique de récupération de l'or en solution CIP (*Carbon in Pulp*) a été inaugurée à l'usine Homestake aux Etats-Unis en 1973. Les matières carbonées possèdent la propriété d'adsorber à leur surface le sel complexe auro-cyanure en solution. Des grains de charbon actif sont donc mélangés à la pulpe cyanurée. L'or adsorbé sur le charbon est extrait à l'aide d'une solution de 1% de soude et de 0,1% de cyanure de sodium chauffée entre 90 et 100 °C. L'or passe en solution et se dépose sur les cathodes en laine d'acier d'une cellule d'électrolyse. La fusion de ces cathodes en présence de silice, borax et nitrate de sodium, qui forme une scorie avec le fer, permet de couler l'or en lingot. Cette méthode d'extraction, nommée Zadra du nom de son inventeur, est utilisée par la quasi-totalité des usines de cyanuration construites ces quinze dernières années. Une variante du procédé CIP est connue sous le nom de CIL (*Carbon in Leach*) où le charbon actif est ajouté à la pulpe de minerai en même temps que le cyanure. Plus puissant, le charbon actif adsorbe préférentiellement l'or et empêche les minéraux carbonés de ré-associer l'or à la gangue. Au niveau mondial, les procédés CIP/CIL (*Carbon in Pulp/Carbon in Leach*) et Merrill-Crowe se partagent en parts à peu près égales.

Une fois l'or extrait et récupéré, les cyanures libres et les cyanures complexés tels que les cyanures de cuivre, de zinc, de fer et d'autres métaux extraits du minerai restent dans la solution qui a servi pour l'extraction de l'or. Cette solution ainsi que le minerai d'où l'or a été extrait sont rejetés dans des parcs sous forme d'effluent et de résidu contaminés aux cyanures qui causent un problème majeur de toxicité.

Les résidus cyanurés issus du procédé CIP/CIL font l'objet de ce projet de maîtrise.

#### ***1.1.1.1.3 La cyanuration en tas***

Dans ce procédé, le minerai concassé est disposé en tas sur une aire imperméabilisée par une couche d'argile ou des feuilles de plastique soudées. Ensuite, il est arrosé par une solution de cyanure. L'or ainsi dissous est récupéré dans un bassin, puis envoyé et piégé dans des colonnes garnies de charbon actif. La cyanuration en tas est adaptée au traitement des minerais superficiels et intensément oxydés des régions tropicales.

#### ***1.1.1.2 Utilisation des cyanures dans l'industrie de plaquage de métaux***

Le plus grand pourcentage de rejets cyanurés dans l'environnement provient des procédés de trempe, de finissage et de plaquage des métaux. Toutes les industries qui utilisent des métaux comme produits finaux ont affaire à des problèmes de résidus contenant des cyanures.

Ces déchets proviennent du fait que les métaux doivent être débarrassés des substances étrangères indésirables présentes sur leur surface par un procédé de décapage avant d'être plaqués. Le cyanure de sodium est souvent utilisé dans cette étape. Le procédé de plaquage utilise une cellule d'électrolyse dans laquelle la cathode est constituée du métal

à plaquer, et dont les électrolytes sont des complexes cyanurés de cuivre, de cadmium, de zinc ou d'argent (Dumestre, 1995).

#### *1.1.1.3 Utilisation des cyanures dans l'industrie de l'aluminium*

La production de l'aluminium se fait par électrolyse de l'alumine en sel fondu dans des cellules constituées d'un caisson en acier renforcé. Ce caisson est revêtu au fond et sur les côtés de briques réfractaires et isolantes, sur lesquelles viennent se déposer les cathodes en carbone précuit. Des barres métalliques en acier transportent le courant à ces cathodes. La durée de vie d'une cathode est en moyenne de 6 ans. Lorsque celle-ci est vieille, l'azote commence alors à diffuser dans les cathodes pour générer des cyanures de sodium et des nitrures. Lors du débrasquage (démolition de la vieille cathode), les brasques se retrouvent généralement contaminées par les fluorures et les cyanures. Malgré une production mondiale qui reste faible, les brasques représentent une source de cyanures toxiques (Dumestre, 1995).

#### **1.1.2 Production naturelle des cyanures**

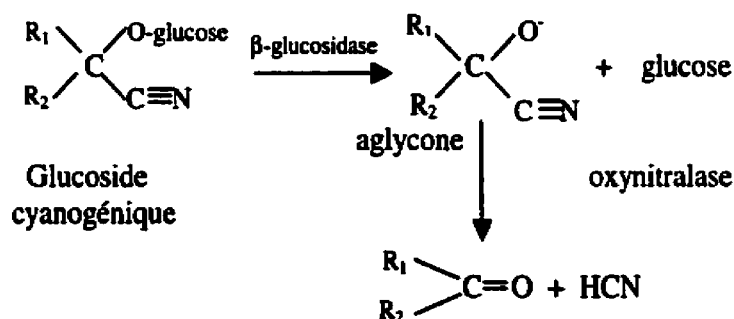
En plus de la production anthropique des cyanures, certains organismes vivants ont la capacité de produire l'acide cyanhydrique (HCN). Parmi eux, figurent de nombreuses plantes supérieures et un certains nombres de micro-organismes (bactéries, champignons, algues).

##### *1.1.2.1 Les plantes cyanogéniques*

Plus de 800 espèces de plantes sont capables de synthétiser des composés cyanogéniques en libérant de l'acide cyanhydrique (cyanogénèse). Ces espèces renferment entre 70 et 80 familles, incluant le cassava (plante tropicale avec des fleurs vert-jaune connue aussi

sous le nom de manioc, pouvant atteindre jusqu'à 2,4 m de long), le sorghum (originaire d'Afrique et d'Asie où il a été cultivé depuis plusieurs siècles et dont les graines sont comestibles), l'alfalfa (originaire d'Asie, introduit en Amérique du nord par les espagnols, cultivé principalement aux États-Unis), et enfin les pêches, les amandes et les haricots. Lorsque le cassava est consommé comme nourriture de base, il est équivalent à la moitié de la dose létale. C'est probablement la raison de la fréquence des maladies neurologiques dans les régions où il est fortement consommé (Knowles, 1976).

Chez les végétaux, les cyanures se trouvent généralement sous forme de glucosides divers et non pas sous la forme libre. La libération du HCN par les glucosides cyanogéniques se produit en deux étapes. La glucosidase (EC 3.3.1.21,  $\beta$ -D-glucose glucohydrolase) agit pour enlever le glucose et donner lieu à un aglycone. Ensuite, l'oxynitralase décompose ce dernier pour libérer le HCN :



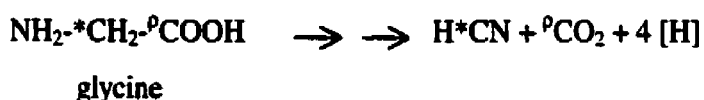
**Figure 1.1** Production de cyanures par les glucosides cyanogéniques des plantes (Knowles, 1976).



### 1.1.2.2 Les micro-organismes cyanogéniques

La formation de l'acide cyanhydrique par les micro-organismes a été démontrée la première fois par von Losecke en 1871 lorsque qu'il a observé cette molécule chez le champignon *Marasmius oreades*. D'autres chercheurs ont montré que plusieurs champignons produisent la  $\beta$ -glucoside responsable de nombreuses maladies, comme la maladie de la luzerne, provoquée par un champignon, désigné sous le nom de «moisissure des neiges», qui se développe l'hiver sous le couvert neigeux (Dumestre, 1995).

D'autres études ont été menées pour détecter les espèces bactériennes cyanogéniques (Knowles et Bunch, 1986). Elles ont montré que *Chromatobacterium violacium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et quelques autres espèces de *Pseudomonas* étaient cyanogéniques (Freeman *et al.*, 1975). Des techniques radiochimiques avec marquage du carbone ont montré que le HCN et le CO<sub>2</sub> se forment chez *C. violacium* par décarboxylation oxydative de la glycine comme le montre la réaction suivante (Bunch et Knowles, 1982; Michaels et Corpe, 1965) :



## 1.2 La chimie des cyanures

### 1.2.1 Propriétés physico-chimiques

Les cyanures rassemblent une famille de composés, dont les plus réactifs et, de ce fait, les plus toxiques sont les cyanures libres, représentés par l'acide cyanhydrique HCN et l'ion CN<sup>-</sup>. L'acide cyanhydrique, ou acide Prussique, a été retiré du bleu de Prusse pour

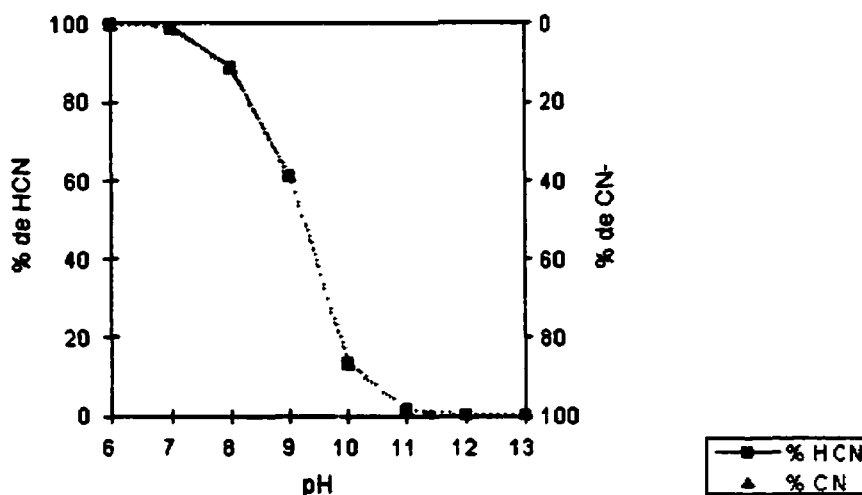
la première fois par le chimiste suédois Scheele en 1786. En 1815, Gay-Lussac établit sa composition en préparant de l'HCN semi-pur, et le nomme acide cyanhydrique. Il propose également le nom de cyanogène pour le radical CN (Brun, 1925).

L'acide cyanhydrique et l'ion  $\text{CN}^-$  forment un couple acide/base ( $\text{pK}_a = 9,2$  à  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) selon l'équation (1.1).



Cette équation dépend fortement du pH comme le montre la figure 1.2. Les solutions acides favorisent la présence du HCN. À pH 7, essentiellement tous les cyanures libres sont présents sous cette forme, alors qu'à pH 9,2 les concentrations du HCN et du  $\text{CN}^-$  sont égales. L'acide cyanhydrique est très soluble dans les solvants organiques comme l'éthyl-éther et l'éthyl-alcool à 95%. Il se solidifie à une température de  $-13,8\text{ }^\circ\text{C}$ . Le processus de vaporisation est endothermique, l'énergie de vaporisation est de  $6,027\text{ cal/mol}$  et la chaleur de fusion est de  $2,009\text{ cal/mol}$  (Perry et Green, 1997).

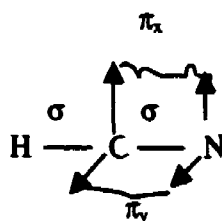
En solution, le HCN peut se retrouver en équilibre avec le HCN gazeux. Dans la majorité des cas, il a tendance à se volatiliser, et cela est dû à son faible point d'ébullition ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) et à sa grande pression de vapeur (100 Kpa). Dodge et Zabon (1952) ont montré que la volatilisation du HCN dépendait du pH, de la température, et de la concentration. Ils ont observé que seules les molécules des cyanures d'hydrogène pouvaient se volatiliser et que le taux de volatilisation dépendait de la constante de Henry ( $K_H$  du HCN égale à  $9,68\text{ mol/atm litre}$  à  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ).



**Figure 1.2** Équilibre entre les formes cyanurées moléculaires (HCN) et ioniques (CN<sup>-</sup>) en solution en fonction du pH (Smith et Mudder, 1991).

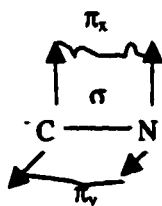
### 1.2.2 Structure des molécules HCN et CN<sup>-</sup>

La molécule d'acide cyanhydrique est constituée d'un atome de carbone, d'un atome d'azote et d'un atome d'hydrogène (H-C≡N). L'atome de carbone central et l'atome d'azote sont dans un état d'hybridation sp (hybridation diagonale). La liaison  $\sigma$  est formée entre les atomes C et N ainsi que C et H par recouvrement axial des orbitales atomiques. Deux liaisons  $\pi_x$  et  $\pi_y$  sont présentes par le recouvrement latéral (voir figure 1.3). Les électrons  $\pi$  sont plus mobiles et plus polarisables que les électrons  $\sigma$  (Dumestre, 1995).



**Figure 1.3** Structure de la molécule HCN (Théorie de l'Hybridation).

La structure de l'ion cyanure  $\text{CN}^-$  ressemble à celle de la molécule HCN sauf qu'une charge négative est associée à l'atome de carbone par rupture de la liaison entre l'hydrogène et le carbone (figure 1.4).



**Figure 1.4** Structure de l'ion  $\text{CN}^-$  (Théorie de l'Hybridation).

### 1.2.3 Les différentes formes de cyanures

Les cyanures sont très réactifs et possèdent des propriétés physico-chimiques très variées : volatilisation du HCN, réactivité avec les oxydants et complexation de  $\text{CN}^-$  avec les ions de transition. Les complexes metal-cyanure sont produits par la réaction des cyanures avec une grande variété de minéraux : oxydes, carbonates, silicates et sulfures de zinc, de cuivre, de nickel et de fer.

### 1.2.3.1 Les cyanures simples

Les cyanures simples sont représentés par la formule  $A(CN)_x$ , où A est un cation alcalin ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ , ...) ou bien un métal de transition (Zn, Cd, Cu, Ni, Ag) et x la valence de A qui représente le nombre du groupe CN présent dans la molécule. Les cyanures simples sont électriquement neutres. Ces composés, et particulièrement les cyanures alcalins sont complètement solubilisés en solution et donnent lieu à des ions cyanures suivant la réaction (1.2).

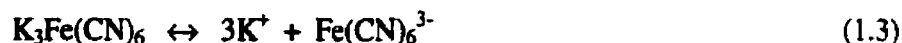


La solubilité est influencée par le pH et la température (Huiatt *et al.*, 1982). Contrairement aux cyanures alcalins, les cyanures des métaux de transition sont très peu solubles, certains sont même insolubles dans des acides forts.

Plusieurs composés ont un effet sur les cyanures simples. Ainsi, l'oxygène à chaud transforme les cyanures simples en cyanates, les acides libèrent l'acide cyanhydrique des sels de cyanure, et enfin, l'acide nitrique les transforme en nitrates en libérant l'azote et en oxydant le carbone en gaz carbonique (Brun, 1925).

### 1.2.3.2 Les cyanures complexés

Cette forme de cyanure est un complexe alcalin-métal cyanures qui est généralement représenté par la formule  $A_y M(CN)_x$ , où A est un alcalin, y le nombre d'alcalins, M le métal ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , Cd, Cu, Zn, Ni, ...) et x le nombre de groupes de CN. La dissolution d'un complexe métallique cyanuré ne libère pas d'ions  $CN^-$ , comme les cyanures simples; le métal de transition et les cyanures restent combinés ensemble sous la forme d'un anion complexe comme le montre l'équation suivante :



Le niveau de dissociation de l'anion complexe varie en fonction du cation métallique central du complexe, du pH et du potentiel redox. Au tableau 1.1, quelques constantes de stabilité des complexes cyanurés métalliques sont indiquées. La valeur de la constante de stabilité est d'autant plus grande que le complexe est plus stable. Par exemple pour la formation du complexe ferrocyanure ( $Fe(CN)_6^{4-}$ ) selon l'équation suivante (Kyle, 1997):



la constante de stabilité K égale :

$$K = \frac{[Fe(CN)_6^{4-}]}{[Fe^{2+}] \cdot [CN^-]^6} = 1 \times 10^{47}$$

**Tableau 1.1** Constantes de stabilité des complexes cyanurés métalliques (Kyle, 1997; Smith et Mudder, 1991)

Formule	Constante de stabilité
$Au(CN)_4^-$	$1 \times 10^{85}$
$Fe(CN)_6^{3-}$	$1 \times 10^{52}$
$Co(CN)_6^{4-}$	$1 \times 10^{50}$
$Fe(CN)_6^{4-}$	$1 \times 10^{47}$
$Hg(CN)_4^{2-}$	$1 \times 10^{39}$
$Cu(CN)_4^{2-}$	$5 \times 10^{30}$
$Ni(CN)_4^{2-}$	$1 \times 10^{30}$
$Zn(CN)_4^{2-}$	$1 \times 10^{21}$
$Cd(CN)_4^{2-}$	$1 \times 10^{19}$

Les complexes du zinc et du cadmium sont relativement instables. Ils se dissocient en  $\text{CN}^-$  et en métal, et sont appelés "complexes métalliques cyanurés facilement dissociables" (Weak Acid Dissociable ( $\text{CN}_{\text{WAD}}$ )). Une catégorie intermédiaire nommée "complexes partiellement dissociables" (Moderately Strong Complexes) est composée par les complexes du cuivre, du nickel et de l'argent. Les autres complexes fer-cyanures, or-cyanures et cobalt-cyanures sont très stables d'où l'appellation "complexes forts" (Strong Acid Dissociable ( $\text{CN}_{\text{SAD}}$ )) (voir tableau 1.2). Les méthodes d'analyse de ces complexes sont détaillées au chapitre 2, paragraphe 2.3.1.2.

Deux facteurs influencent le taux de dissociation des complexes forts à une température donnée : le pH et la concentration de l'ion complexé (Broderius, 1973). En général, le taux de dissociation augmente avec la diminution du pH ou la diminution totale de la concentration des cyanures. Broderius (1973) a étudié la formation et la dissociation des complexes  $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  et  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  ainsi que le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans un système fermé. Il a remarqué qu'à pH acide, le pourcentage de cyanures libres est élevé et décroît lorsque le pH devient neutre ou alcalin. D'autres facteurs susceptibles de dissocier ces complexes sont les acides forts et les ultraviolets particulièrement pour les complexes forts (Rader *et al.*, 1995; Yong, 1998).

Un autre aspect de la chimie des complexes métalliques cyanurés est la formation de précipités insolubles de cyanures métalliques doubles comme le bleu de Prusse ( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ), ou d'autres précipités de ferrocyanures avec des métaux de transition. Cependant, ces précipités ne sont pas stables à pH faiblement alcalin et sont susceptibles de se solubiliser (Meeussen *et al.*, 1992b; Meeussen *et al.*, 1994).

Une classification proposée par Scott et Ingles (1987) est présentée au tableau 1.2. Elle résume toutes les formes de complexes cyanurés, discutées ci-dessus, et leur appellation.

**Tableau 1.2** Classification des composés cyanurés (d'après Scott et Ingles, 1987)

<b>Classification</b>	<b>Composés</b>
1. Cyanures libres	$\text{CN}^-$ , $\text{HCN}$
2. Cyanures simples	
Complètement solubles	$\text{NaCN}$ , $\text{KCN}$ , $\text{Ca}(\text{CN})_2$ , $\text{Hg}(\text{CN})_2$
Relativement insolubles	$\text{Zn}(\text{CN})_2$ , $\text{Cd}(\text{CN})_2$ , $\text{Cu}(\text{CN})$ , $\text{Ni}(\text{CN})_2$ , $\text{Ag}(\text{CN})$ , $\text{Au}(\text{CN})$
3. Complexes facilement dissociables ( $\text{CN}_{\text{WAD}}$ )	$\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$ , $\text{Cd}(\text{CN})_3^-$ , $\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$ ,
4. Complexes partiellement dissociables	$\text{Cu}(\text{CN})_2^-$ , $\text{Cu}(\text{CN})_3^-$ , $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ , $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$
5. Complexes forts ( $\text{CN}_{\text{SAD}}$ )	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ , $\text{Co}(\text{CN})_6^{4-}$ , $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$

### 1.2.3.3 Les thiocyanates ( $\text{SCN}^-$ )

Les thiocyanates sont le produit de la réaction des cyanures avec le soufre. Les thiocyanates forment avec le  $\text{HSCN}$  un couple acide/base dont le  $\text{pK}_a$  est voisin de 1. Ainsi, à pH supérieur à 1 c'est la forme  $\text{SCN}^-$  qui domine.

L'ion thiocyanate a un comportement similaire à l'ion cyanure. Il est classé chimiquement dans la catégorie des pseudohalogènes et il a les mêmes propriétés que les chlorures, les bromures et les iodures. Il peut former des sels ioniques insolubles avec l'argent, le mercure et le zinc. Les thiocyanates peuvent être dégradés chimiquement ou biologiquement en produits métaboliques tels que l'ammoniaque, les carbonates et les sulfates (Paruchuri, 1990).



#### 1.2.3.4 Les cyanates (CNO<sup>-</sup>)

De nombreux oxydants tels que le chlore, l'ion hypochlorite, l'ozone, l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène convertissent les cyanures en cyanates. Ces réactions constituent la base des traitements chimiques conventionnels de dépollution des cyanures. Les cyanates ne sont pas stables : sous l'action d'oxydants résiduels ou en milieu acide, ils se transforment en dioxyde de carbone et en ammoniac.

Les cyanates et les thiocyanates comptent parmi les plus importants produits résultants des réactions d'oxydation et de biodégradation des cyanures.

### 1.3 Toxicité des cyanures

#### 1.3.1 Toxicité des cyanures libres

La toxicité de l'acide cyanhydrique est liée à l'inhibition de plusieurs enzymes constituées de protéines hémiques, dont la cytochrome oxydase, ou des oxydases qui contiennent un métal. Les cytochromes sont des transporteurs d'électrons qui utilisent des atomes de fer pour le transfert de ces derniers dans des réactions réversibles d'oxydoréduction. Une grande partie de l'ATP produit en aérobiose a lieu dans la chaîne de transport des électrons (Prescott *et al.*, 1995). Généralement, à des concentrations égales ou inférieures à  $10^{-4}$  M, les cyanures inhibent la cytochrome oxydase par liaison d'ions CN<sup>-</sup> avec le fer des chaînes porphyriques et le blocage des réactions d'oxydoréduction. Ils ont un effet moindre sur les autres enzymes dont l'inhibition nécessite des teneurs en cyanures comprises entre  $10^{-4}$  et  $10^{-2}$  M (Knowles, 1976).

### ***1.3.1.1 Toxicité chez les micro-organismes***

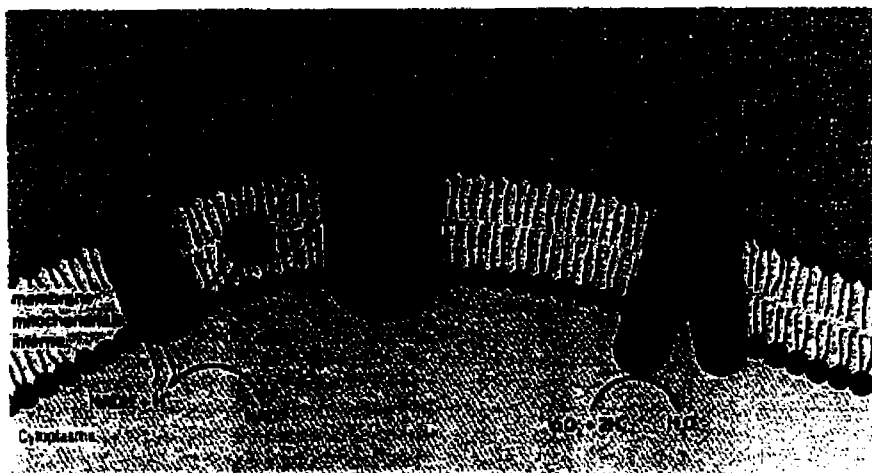
Les micro-organismes parviennent à croître en présence des cyanures malgré leur toxicité et leur inhibition métabolique. Pour se protéger de cette toxicité, les micro-organismes induisent des enzymes de dégradation et de détoxification ou bien ils développent des enzymes de résistance aux cyanures. Le développement des enzymes résistantes aux cyanures implique le développement de systèmes respiratoires alternatifs capables de tolérer les cyanures.

Il existe de nombreux travaux concernant les effets des cyanures sur les mitochondries, les extraits cellulaires et sur la respiration de micro-organismes. Des "oxydases alternatives" résistantes aux cyanures, qui ne sont pas des cytochromes, ont été trouvées chez des micro-organismes eucaryotes variés (Henry et Nyns, 1975). De telles oxydases peuvent être induites par une modification des conditions de croissance, ou par la formation de mutants. Elles sont synthétisées pour contrebalancer une diminution des teneurs en cytochromes oxydase ou en d'autres composantes respiratoires. Des systèmes respiratoires complémentaires ayant apparemment une sensibilité moindre vis-à-vis des cyanures interviennent également chez les bactéries (Ackrell et Jones, 1971; Jones et Redfean, 1967; Weston *et al.*, 1974).

#### ***1.3.1.1.1 Les "oxydases alternatives" des eucaryotes***

Les systèmes respiratoires résistants aux cyanures se trouvent sur la membrane interne des mitochondries chez les eucaryotes. Lorsque ces systèmes sont actifs, les électrons divergent du système de transport d'électrons habituel sensible aux cyanures au niveau du groupe ubiquinone (Umbach et Siedow, 1993). Ainsi, au lieu de poursuivre le cheminement habituel vers le cytochrome c (Cyt c), oxydase terminale, où les cyanures bloquent le transport d'électrons entre Cyt a et l'O<sub>2</sub> (figure 1.5), le flux d'électrons est

orienté vers des "oxydases alternatives" qui catalysent la réduction de l'oxygène moléculaire en eau.



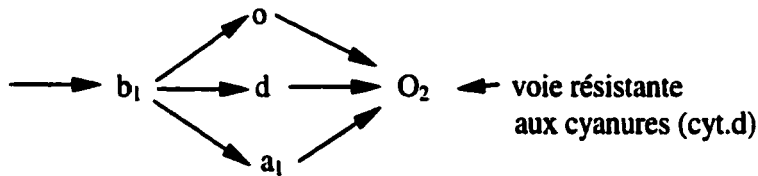
**Figure 1.5** Transport d'électrons vers l'accepteur final ( $O_2$ ) par les cytochromes oxydases dans la membrane interne de la mitochondrie (tiré de Prescott *et al.*, 1995).

#### **1.3.1.1.2 Les systèmes respiratoires résistants des bactéries**

La tolérance des concentrations de cyanures inhibitrices de la respiration n'est pas restreinte uniquement aux eucaryotes. Cette tolérance a aussi été observée chez une grande variété de procaryotes. Les systèmes respiratoires bactériens présentent souvent des similitudes avec ceux des mitochondries (organismes eucaryotes). Ils sont membranaires et maintiennent une conservation de l'énergie en couplant les réactions rédox de la chaîne respiratoire avec la synthèse d'ATP. Une des caractéristiques majeures des systèmes bactériens semble être la grande variété de supports rédox qui peuvent avoir une fonction oxydante. Une combinaison de plus de quatre supports rédox terminaux n'est pas un phénomène rare dans les membranes bactériennes. Une des conséquences de cette pluralité des oxydases terminales et de leur présence simultanée

est le développement de voies alternatives pour les flux d'électrons, et une diminution de leur sensibilité relative aux inhibiteurs respiratoires tels que les cyanures (Henry, 1981).

La bactérie *Achromobacter* isolée du sol par Arima et Oka (1965) induit un autre cytochrome oxydase lorsqu'elle se trouve en présence d'aération réduite. Une situation similaire a été observée lorsque la croissance se déroule en présence de 1mM de cyanures. Les auteurs ont conclu que le cytochrome d est l'oxydase résistante capable de faire transiter les électrons jusqu'à l'oxygène, même en présence de concentrations importantes de cyanures, alors que les cytochromes  $a_1$  et o sont sensibles aux cyanures (figure 1.6).



**Figure 1.6** Représentation schématique de la chaîne de cytochromes d'*Achromobacter* développée en présence de 1mM de KCN (Arima et Oka, 1965).

En conclusion, l'importance métabolique des oxydases alternatives semble significativement différente entre les procaryotes et les eucaryotes. Chez les bactéries, ces oxydases interviennent fréquemment dans un but de protection des fonctions propres des cytochromes oxydases. En revanche chez les végétaux, les oxydases alternatives coexistent souvent avec un cytochrome  $a_3$  entièrement fonctionnel (Henry, 1981).

### 1.3.1.2 Toxicité chez les organismes supérieurs

Les cyanures ont également un effet inhibiteur sur les accepteurs d'électrons au niveau de la cytochrome oxydase chez les organismes supérieurs, ainsi qu'un effet sur le

métabolisme du glucose. Isome *et al.* (1975) ont étudié l'effet des doses sub-létales de cyanures sur le métabolisme du glucose chez les souris. Ils ont observé que ces doses avaient comme effet d'augmenter les teneurs en glucose et en acide lactique du sang, et d'abaisser le rapport ATP/ADP. Ce rapport est dû à un déplacement du métabolisme aérobie vers le métabolisme anaérobie. En présence des cyanures, la voie des pentoses phosphates de catabolisme du glucose est favorisée par rapport à la glycolyse.

#### **1.3.1.2.1 Toxicité chez l'Homme**

La plupart des cellules du corps humain sont capables d'alterner leur système de respiration en mode anaérobie lorsque l'oxygène est présent à de faibles concentrations ou lorsque des produits chimiques tels que les cyanures empêchent l'utilisation de l'oxygène. Cependant, les cellules nerveuses ne sont pas capables d'utiliser la voie anaérobie. Elles meurent immédiatement lorsque les cyanures les empêchent de produire l'énergie chimique à partir de l'oxygène. Les organes qui doivent fournir beaucoup de travail comme le cœur sont aussi vulnérables aux cyanures (U.S. EPA, 1984, 1992).

La dose de mortalité chez l'Homme est de 0,5-3,5 mg/kg/poids de la personne (Ermans *et al.*, 1972). Lorsque des sels de cyanures simples tels que les cyanures de potassium (KCN) et les cyanures de sodium (NaCN) sont ingérés, l'ion  $\text{CN}^-$  est rapidement libéré. Ce dernier réagit avec l'hydrogène pour former dans un milieu à pH faible le HCN. Toutefois, dans le milieu acide de l'estomac (pH ~ 2), pratiquement tous les cyanures consommés sous forme de sels de cyanures sont présents sous forme de HCN, et sont par la suite rapidement absorbés dans le système gastro-intestinal (Shifrin *et al.*, 1996).

L'inhalation du HCN peut causer des effets toxiques plus graves que l'ingestion des ions cyanures. Par exemple, lors de l'inhalation de l'HCN à des concentrations comprises entre 0,5 à 20 mg HCN/m<sup>3</sup> d'air, la rétention du HCN est approximativement de 60% (Landahl et Herrmann, 1950).

Les principaux effets associés à l'empoisonnement chronique par les cyanures (spécialement HCN et CN<sup>-</sup>) comprennent : la lésion du nerf optique, la démyélinisation, le goitre, l'hypertension et la défaillance thyroïdienne (Ermans *et al.*, 1972). Ces symptômes peuvent se manifester chez les individus qui incluent dans leur alimentation des quantités significatives de produits contenant des cyanures, tels que le cassava, le sorghum et l'alfalfa.

#### **1.3.1.2.2 Toxicité chez les plantes**

Selon l'Agence de Protection de l'Environnement Américaine (U.S. EPA, 1978), l'effet majeur des cyanures libres sur les plantes est l'inhibition de plusieurs enzymes, qui implique l'inhibition de la respiration de la cellule. Roberts et Gemmell (1979) ont observé qu'un mélange de 1% de résidu contaminé aux cyanures avec du sol produisait un léger effet d'inhibition sur la croissance de l'ivraie, et qu'un mélange de 10% entraînait un effet encore plus important.

#### **1.3.2 Toxicité des cyanures complexés**

Contrairement aux cyanures libres qui sont toxiques et très réactifs, les complexes de cyanures sont stables chimiquement et n'ont pas la propriété de se dissocier en cyanures libres que sous des conditions spécifiques de températures et de pH (Meeussen *et al.*, 1994).

La toxicité des complexes ferrocyanures a fait l'objet de plusieurs études. Dvorák *et al.* (1971) ont donné de l'eau (contaminée à 20 000 mg/l en ferri ferrocyanure) à boire à des rats pendant une durée de 12 semaines. Durant toute cette période, les rats n'ont montré aucun signe d'intoxication. En Europe, les ferri ferrocyanures ont été utilisés comme antidote contre l'empoisonnement au thallium chez l'humain. La dose recommandée

était de 250 mg/kg/jour pour une période de 2 à 4 jours (Spoerke *et al.*, 1986). La faible toxicité de ce complexe est due à son absorption limitée par l'intestin. En effet, une seule fraction de la quantité absorbée se dissocie en cyanure libre toxique (HCN ou CN<sup>-</sup>) (Nielsen *et al.*, 1990).

Cependant, d'autres études ont montré que les risques associés à ces composés ne sont pas tout à fait nuls. Sous l'effet de la lumière, les ferri ferrocyanures sont susceptibles de se décomposer en donnant des cyanures libres (HCN ou CN<sup>-</sup>). Burdick et Lipschuetz (1948) ont étudié la toxicité des ferri ferrocyanures sur des poissons. Ils ont alors exposé les poissons à des concentrations de 1 et 2 mg/kg sous des conditions intenses de lumière. Ils ont observé que 0,19 mg/kg de cyanures était toxique pour le genre *Rhinichthys atratulus* et *Semolitus atramaculatus*. À cette concentration, le taux de mortalité était de 100% en 76 heures.

Dans les sols, le phénomène le plus impliqué dans l'augmentation des risques associés aux ferri ferrocyanures est la re-solubilisation de précipités tel que le bleu de Prusse (Fe<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub>). Ces résultats proviennent d'une série d'études menées par Meeussen *et al.* (1995), Meeussen *et al.* (1994) et Meeussen *et al.* (1992b) sur des sols contaminés par les complexes fer-cyanures. Les auteurs ont remarqué que la solubilisation de précipités dépend directement du pH et du POR des sols. Des teneurs importantes en fer-cyanures ont été retrouvées dans les eaux souterraines des sites à sols alcalins (pH voisin de 7,5), tandis que les concentrations étaient beaucoup plus faibles dans les sols acides (pH voisin de 4).

### 1.3.3 Toxicité des thiocyanates (SCN<sup>-</sup>)

La toxicité des thiocyanates ne fait pas l'unanimité auprès des chercheurs. Certains affirment qu'ils sont dangereux et toxiques, et d'autres rapportent qu'ils sont inoffensifs.

Mais d'après les organismes officiels, ces composés sont beaucoup moins toxiques que les cyanures libres, et ne présentent pas de danger pour l'environnement.

Autrefois, ces composés étaient utilisés à des fins thérapeutiques dans le traitement de l'hypertension chez l'Homme. Cependant, une concentration d'environ 150 mg/l dans le sang peut être dangereuse. L'absorption chronique des thiocyanates peut causer des étourdissements, des éruptions cutanées et des nausées (Kumaran et Shivaraman, 1988). La transformation des thiocyanates organiques et inorganiques en cyanures a été observée chez les mammifères et les poissons (Boxer et Rickards, 1952; Pines et Crymble, 1952).

D'après APHA *et al.* (1998) les thiocyanates ne sont pas très toxiques. Cependant, si ces derniers sont sujets à une chloruration, le chlorure de cyanogène (CNCl) (composé très toxique) se forme. APHA *et al.* (1998) recommandent donc de doser les thiocyanates lorsque la chloruration alcaline est employée comme technique de traitement des effluents. D'autre part, le Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec (MENV, 1999) n'a pas inclus les thiocyanates dans les critères de la politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés.

#### **1.4 Les mécanismes naturels d'atténuation des cyanures**

Plusieurs mécanismes sont connus dans la littérature pour leur implication dans la mobilité et le devenir des cyanures dans les effluents, les sols et les résidus miniers. Les processus d'atténuation naturelle réduisent considérablement la toxicité des cyanures. Ces processus résultent de la combinaison de phénomènes physiques, chimiques et biologiques, incluant : la volatilisation, l'oxydation chimique, l'hydrolyse, l'adsorption sur des minéraux, la solubilisation et enfin la biodégradation (Scott, 1984).



Ces phénomènes ont été le plus souvent observés dans les effluents contaminés aux cyanures. Cependant, selon les publications de Smith et Struhsacker (1987), Smith et Mudder (1991) et Church et Boyle (1990) des mécanismes d'atténuation naturelle des cyanures ont également été observés dans des résidus miniers issus du procédé de cyanuration en tas et celui du CIP/CIL.

#### **1.4.1 Volatilisation**

La réaction entre l'ion cyanure et une molécule d'eau résulte en la formation de l'acide cyanhydrique (HCN), comme indiqué dans l'équation (1.1).

La volatilisation est considérée comme étant un des plus importants phénomènes d'atténuation naturelle des cyanures dans les effluents (Simovic, 1984), et notamment dans les solides (Church et Boyle, 1990; Smith et Mudder, 1991). Les résidus miniers récemment rejetés ont souvent un pH alcalin d'environ 10,5, qui est le pH opérationnel du procédé d'extraction de l'or. Avec le temps, ce pH a tendance à décroître à cause des pluies acides et de la dissolution du CO<sub>2</sub>. Avec ce phénomène, la volatilisation du HCN devient importante, l'acide cyanhydrique se retrouve dans l'atmosphère par dissipation à travers le résidu, ou bien il est détruit par oxydation chimique (voir paragraphe 1.4.2). D'après Smith et Mudder (1991), le HCN subit trois processus de transport avant de se retrouver dans l'atmosphère :

- HCN dans le solide ↔ HCN dans le liquide
- HCN dans le liquide ↔ HCN dans la phase vapeur sol/air
- HCN dans la phase vapeur sol/air ↔ HCN dans l'atmosphère

Les propriétés du solide (sol ou résidu) qui affectent la volatilisation du HCN comprennent : contenu en eau et en argile, caractéristiques de sorption et de diffusion du solide, matière organique, porosité et densité. Les paramètres météorologiques qui

peuvent affecter la volatilisation du HCN sont le taux de circulation d'air à la surface du solide, l'humidité et la température.

#### 1.4.2 Oxydation chimique

L'oxydation chimique joue un rôle important dans la détoxification des cyanures : l'oxygène oxyde les cyanures en cyanates dans une réaction très lente en absence de catalyseur. L'oxydation de HCN produit de l'hydrogène de cyanate selon l'équation (1.5) (Owenback, 1978).

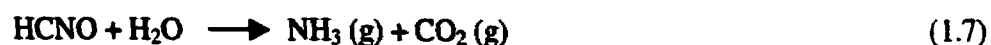


L'oxydation directe de l'ion  $\text{CN}^-$  (équation 1.6) nécessite un catalyseur bactériologique, minéralogique ou photochimique (rayons UV) pour produire l'ion cyanate.



Dans le tas de résidu, l'oxydation chimique est restreinte aux couches supérieures, plus particulièrement à celles qui sont le plus en contact avec l'air (Smith et Struhsacker, 1987).

L'hydrogène de cyanate (HCNO) et l'ion cyanate ( $\text{CNO}^-$ ) sont beaucoup moins toxiques que l'acide cyanhydrique (HCN) et l'ion cyanure ( $\text{CN}^-$ ). À l'intérieur du tas, HCNO et  $\text{CNO}^-$  sont hydrolysés pour former le gaz ammoniac et le dioxyde de carbone, selon l'équation (1.7). Ces gaz sont par la suite dissipés dans l'atmosphère.



L'ammoniac généré dans la réaction (1.7) peut aussi réagir pour former des composés ammoniacaux ou pour être oxydé en nitrates dépendamment du pH (Hendrickson et Daignault, 1973). De cette manière, l'oxydation diminue la concentration des cyanures libres dans le système.

### 1.4.3 Hydrolyse chimique

À mesure que le pH du système diminue, le HCN peut être hydrolysé par différentes manières pour donner le formate d'ammonium ou le formate selon les équations (1.8) et (1.9) respectivement.



Ou bien,



L'hydrolyse des cyanures en formate d'ammonium se réalise très lentement à 25 °C et ne donne pas une dégradation significative; cependant, elle s'accélère à des températures élevées (Madersan et House, 1992).

### 1.4.4 Adsorption/lessivage

L'adsorption des cyanures par les minéraux a été le sujet d'intensives recherches dans les années 80. Plusieurs minéraux sont capables d'atténuer les cyanures et les composés cyanurés. Par exemple, il a été montré que la matière carbonée peut adsorber plus que 0,5 mg CN/g, et les minéraux argileux approximativement 0,05 mg CN/g (Madersan et House, 1992). Le charbon actif a été utilisé pour l'élimination des cyanures durant approximativement 20 ans. Il a été observé que les cyanures sont d'abord adsorbés et

ensuite oxydés. La présence des ions de cuivre, cadmium, zinc et nickel en solution favorise la formation des complexes métal-cyanure qui sont mieux adsorbés par le charbon actif (Chatwin *et al.*, 1988).

Alesii et Fuller (1976) ont réalisé des tests d'adsorption pour étudier la mobilité des cyanures dans 5 types de sol. Ils ont fait circuler, à travers chaque sol, trois solutions de cyanures : cyanures libres dans l'eau désionisée, cyanures de potassium dans l'eau désionisée et cyanures libres dans le lixiviat provenant d'un lieu d'enfouissement. Les résultats de cette étude ont montré que les sols avec de fortes concentrations en manganèse et en hydroxydes de fer possèdent une plus grande capacité de rétention des cyanures. Les auteurs ont conclu que les sols chargés positivement (contenant la kaolinite, le chlorite, la gibbsite, le fer et les oxydes d'aluminium) adsorbent mieux les cyanures que ceux chargés négativement (montmorillonite).

#### **1.4.5 Solubilisation/transport**

La solubilisation et le transport des polluants dans l'environnement compte parmi les phénomènes d'atténuation naturelle les moins bien perçus par les autorités environnementales, car souvent les nappes aquifères se retrouvent contaminées. Cependant, la solubilisation des cyanures à partir d'un sol joue un grand rôle dans leur élimination, c'est pourquoi certaines études se sont intéressées à ce mécanisme et au transport des cyanures dans l'environnement.

Meeussen *et al.* (1994) ont étudié la mobilité des cyanures en suivant leur concentration dans les nappes souterraines adjacentes à des sols contaminés aux cyanures, dont les formes dominantes sont le complexe fer-cyanure et le bleu de Prusse. Des concentrations élevées de cyanures ont été retrouvées dans les nappes souterraines des sols basiques (pH = 7,5) alors, que de faibles concentrations ont été enregistrées dans celles des sols acides (pH = 4,0). Les auteurs ont conclu l'existence d'une relation entre la solubilité du

bleu de Prusse et le pH ainsi que le potentiel redox (POR) des sols contaminés. Plus le pH et le POR sont élevés et plus les complexes fer-cyanure sont instables (Meeussen *et al.*, 1992a; Meeussen *et al.*, 1994; Meeussen *et al.*, 1995). Mansfeldt *et al.* (1998) ont abouti aux mêmes conclusions lorsqu'ils ont étudié la mobilité des cyanures dans le sol. Ils ont observé une grande mobilité des cyanures lorsque le pH est basique, et ils ont conclu que la dissolution et la précipitation du bleu de Prusse sont les seuls processus qui gouvernent la mobilité des cyanures dans le sol. Mansfeldt *et al.* (1998) suggèrent que les cyanures dans le sol sont transportés sous forme de précipités (bleu de Prusse) à travers les macropores.

#### **1.4.6 Biodégradation**

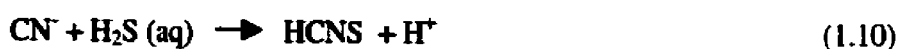
La biodégradation des cyanures n'est pas une découverte récente. D'après Castric (1981), les recherches sur ce sujet remontent à 1913. De nombreux auteurs ont étudié la biodégradation des cyanures. La capacité de certaines bactéries et champignons à dégrader une grande variété de formes de cyanures est connue depuis plusieurs années.

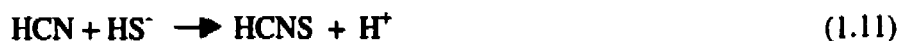
##### *1.4.6.1 Biodégradation des cyanures libres*

La biodégradation des cyanures libres peut se produire dans des conditions aérobie et anaérobie (Nesbitt *et al.*, 1959).

##### *1.4.6.1.1 Biodégradation anaérobie*

En condition anaérobie, la décomposition des cyanures par des bactéries forme les thiocyanates suivit d'une hydrolyse qui donne le NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S et le CO<sub>2</sub> :





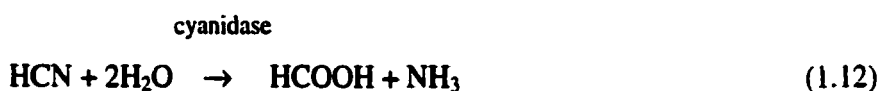
D'après Smith et Struhsacker (1987), la biodégradation anaérobie ne peut avoir lieu que s'il y a présence de  $\text{HS}^-$  et  $\text{H}_2\text{S}$  (aq) dans le tas de résidu. La présence d'espèces sulfurées dépend du pH. À pH supérieur à 7,  $\text{HS}^-$  est l'espèce dominante et à pH inférieur à 7,  $\text{H}_2\text{S}$  (aq) est le composé majoritaire.

#### 1.4.6.1.2 Biodégradation aérobie

Quatre types de réactions en condition aérobie ont été observés : l'hydrolyse, l'hydratation, l'oxydation et la substitution/addition.

##### 1) Hydrolyse des cyanures

La réaction d'hydrolyse fait intervenir deux molécules d'eau pour donner le formate (acide formique) et l'ammoniac comme produits.



L'enzyme responsable de l'hydrolyse du HCN en formate et ammoniac est appelé "cyanidase". Dans quelques cas seulement, l'hydrolyse directe des cyanures en formate et ammoniac a été observée chez *Alcaligenes xylooxidans* subsp. *denitrificans* et quelques *Pseudomonas* (Ingvorsen *et al.*, 1991; White *et al.*, 1988).

White *et al.* (1988) ont isolé la souche *Pseudomonas* et l'ont enrichie avec une boue activée provenant d'une usine de coke en rajoutant 10 mg/l de cyanures. Ils ont observé que les *Pseudomonas* dégradaient les cyanures en formate et en ammoniac. L'ammoniac peut, par la suite, être utilisé comme source d'azote. La source de carbone est puisée du

méthanol et du méthyle amine et non pas du formate. Les bactéries adaptées ont commencé à dégrader les cyanures après 40 h, et les bactéries non adaptées après 72 h. La respiration augmentait lorsque les cellules adaptées étaient exposées aux cyanures, mais chutait lorsque les cellules inadaptées l'étaient dans les mêmes conditions. Les auteurs suggèrent que cette adaptation est due au développement de la résistance à la toxicité et à la production d'enzymes pour la décomposition des cyanures. La souche *Pseudomonas* était capable de dégrader 100 mg/l de cyanures lorsque la source de carbone était le lactate.

Ingvorsen *et al.* (1991) ont isolé une bactérie du sol identifiée sous le nom de *Alcaligenes xylooxidans* subsp. *denitrificans*. Ils ont montré que cette bactérie était capable d'hydrolyser l'acide cyanhydrique en formate et en ammoniac sans la formation du formamide comme intermédiaire libre. La concentration des cyanures était réduite de 0,97 M (approximativement 25,2 mg/kg) à 77 nM (approximativement 0,002 mg/kg) en 55h.

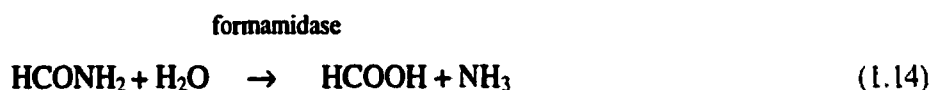
## 2) Hydratation des cyanures

L'enzyme cyanide hydratase (EC 4.2.1.66 ; formamide hydrolyase) convertit les cyanures en formamide. Les mécanismes enzymatiques impliqués dans leur dégradation sont les suivants :



Cette enzyme est produite par plusieurs champignons pour combattre la toxicité du HCN (Raybuck, 1992). Fry & Millar (1972) ont remarqué la présence de l'enzyme chez *Stemphylium loti* pour la première fois avec une activité maximale observée à un pH variant entre 7,0 et 9,0. Kunz *et al.* (1994) ont démontré, aussi pour la première fois, la présence de cette enzyme chez la bactérie *Pseudomonas fluorescens*. La réaction

d'hydratation des cyanures en formamide peut être suivie par la transformation de ce dernier en formate par l'intermédiaire d'une enzyme appelée "formamidase".



D'autres champignons produisant l'enzyme "cyanide hydratase" en présence du HCN sont connus aujourd'hui : *Helminthosporium turcicum*, *Gloeocercospora sorghi* (Fry et Evans 1977), ainsi que de nombreux *Fusarium*, dont la *Fusarium solani* qui fait l'objet de plusieurs recherches récemment (Barclay *et al.*, 1998; Dumestre *et al.*, 1997b).

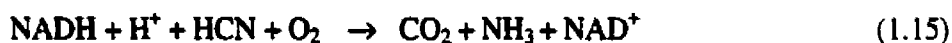
Dumestre *et al.* (1997b) ont isolé le champignon *Fusarium solani* d'un sol contaminé aux cyanures provenant d'une ancienne usine d'électrolyse d'aluminium. Les tests de biodégradation ont été réalisés dans des conditions alcalines (pH = 10,1) en utilisant le  $\text{K}^{14}\text{CN}$ . Deux essais ont eu lieu : le premier consistait en l'ajout de 2 mM  $\text{K}^{14}\text{CN}$  + 125 mg d'extrait de levure dans le bioréacteur contenant le champignon, et le deuxième uniquement du  $\text{K}^{14}\text{CN}$  (1,75 mM) comme seule source de carbone et d'azote. Les auteurs ont remarqué une croissance de la *Fusarium solani* dans le premier cas. Aucune croissance n'a cependant été observée dans le cas du  $\text{K}^{14}\text{CN}$  comme seule source de carbone et d'azote. L'identification des produits de dégradation du  $\text{K}^{14}\text{CN}$  s'est fait à l'aide d'un HPLC couplé à un spectrophotomètre et un détecteur radioactif. Les produits identifiés étaient le formamide ( $\text{H}^{14}\text{CONH}_2$ ) et l'acide formique ( $\text{H}^{14}\text{COOH}$ ). Par cette étude, les auteurs ont confirmé un fait qui n'avait été qu'une hypothèse jusqu'alors, c'est à dire que ces deux produits sont bel et bien issus de la biodégradation du  $\text{K}^{14}\text{CN}$  par la *Fusarium solani*. Ils ont suggéré que les mécanismes de dégradation étaient les mêmes que ceux décrits dans les équations (1.13) et (1.14) ci-dessus.



### 3) Oxydation des cyanures

Très peu de systèmes biologiques ont été signalés pour leur capacité à oxyder directement les cyanures. La première voie de dégradation oxydative des cyanures a été trouvée chez une bactérie gram-négative identifiée sous le nom de *Pseudomonas fluorescens* (Dorr et Knowles, 1989), puis sur d'autres bactéries telles que *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas paucimobilis* (Babu *et al.*, 1993). Les bactéries gram-négatives ont une croissance optimale à 30 °C, à pH compris entre 7,0-8,5 et possèdent un métabolisme respiratoire et non fermentatif (Raybuck, 1992).

La dégradation des cyanures en ammoniac et CO<sub>2</sub> nécessite une addition stœchiométrique de NADPH et d'oxygène. La réaction d'oxydation des cyanures proposée par Harris & Knowles (1983) est la suivante :



Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette réaction se produit en deux étapes. D'abord l'utilisation de l'oxygénase pourrait produire des cyanates comme un intermédiaire, puis ces derniers seraient hydrolysés par l'enzyme cyanase en dioxyde de carbone et en ammoniac selon les équations (1.16) et (1.17).

Oxygénase

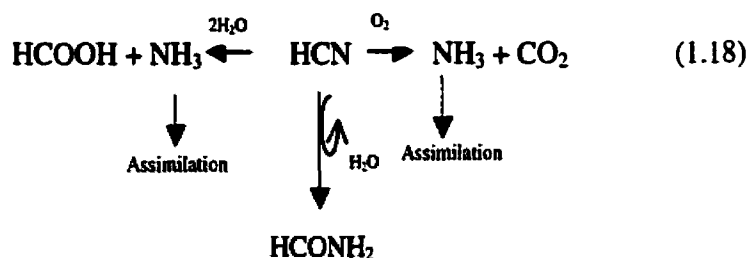


Cyanase



L'enzyme cyanase (cyanate aminohydrolase ; EC 3.5.5.3) a été détectée chez *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.* et des plantes. Le rôle physiologique de cette enzyme est incertain, mais il est supposé qu'elle protège contre la toxicité des cyanures.

Une publication intéressante (Kunz *et al.*, 1992) rapporte une voie multiple de dégradation des cyanures par la bactérie *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. Cette voie implique la formation de formamide, formate,  $\text{NH}_3$  et  $\text{CO}_2$  par une réaction d'oxydation. La bactérie *Pseudomonas* était capable de dégrader des concentrations assez élevées de KCN comme source d'azote. Les auteurs ont remarqué qu'à des concentrations de KCN comprises entre 0,5 et 10 mM, le dioxyde de carbone est le produit majoritaire. Cependant, à des concentrations entre 20 et 50 mM de KCN, le formamide et le formate sont principalement formés. Ils ont alors suggéré trois voies de dégradation de cyanures. La première voie, qui dépend fortement de l'oxygène, consiste en la formation du  $\text{CO}_2$  et de  $\text{NH}_3$  en présence de faibles concentrations de KCN (0,5 à 10 mM). En revanche, en présence de fortes concentrations (20 à 50 mM) le formate et le formamide sont formés. De grandes concentrations en KCN pourraient, probablement, inhiber la formation de  $\text{CO}_2$  (Kunz *et al.*, 1992). Les auteurs suggèrent aussi que la formation de formate et formamide se fait selon deux voies différentes : la première est une conversion en formate et ammoniac, et la deuxième est une conversion uniquement en formamide. La voie métabolique proposée par les auteurs est décrite dans l'équation (1.18).



**Figure 1.7** Voie métabolique de dégradation des cyanures par *P. fluorescens* NCIMB 11764 proposée par Kunz *et al.* (1992).

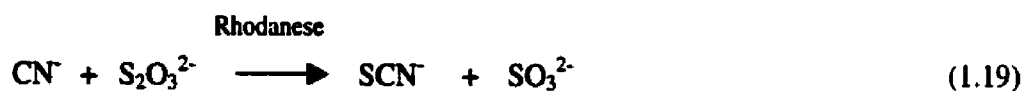
D'autres chercheurs ont constaté la dégradation des cyanures en produits finaux  $\text{NH}_3$  et  $\text{CO}_2$ . Babu *et al.* (1992) ont utilisé la bactérie *Pseudomonas putida* immobilisée dans des billes d'alginate de calcium. Ils ont observé que cette bactérie était capable d'utiliser le NaCN comme seule source de carbone et d'azote. L'expérience avait été réalisée en batch dans des bioréacteurs contenant 100-400 mg/l de NaCN. Les auteurs ont conclu que la bactérie immobilisée était capable de dégrader des concentrations plus élevées que 1 mM de  $\text{CN}^-$ , soient celles qui ont été rapportées antérieurement par Harris et Knowles (1983). Plus tard, la même équipe de chercheurs a immobilisé la bactérie dans différentes matrices : agar, alginate, carrageenan, et a réalisé des tests de biodégradation. Ces chercheurs ont remarqué que l'alginate présentait de plus hauts taux de  $\text{CO}_2$  et de  $\text{NH}_3$  comparativement aux cellules non-immobilisées à l'agar et au carrageenan (Chapatwala *et al.*, 1993). Une récente publication des mêmes auteurs a montré la biodégradation des cyanures, cyanates et thiocyanates en  $\text{NH}_3$  et  $\text{CO}_2$  par la bactérie *Pseudomonas putida* immobilisée dans l'alginate. Ils ont utilisé le  $\text{Na}^{14}\text{CN}$  pour faire un bilan de masse, et ont remarqué que 70 % du carbone du NaCN radiomarqué avait été converti en  $^{14}\text{CO}_2$ . Seulement 10 % du  $^{14}\text{CO}_2$  était associé à la biomasse et moins de 1 % s'était volatilisé (Chapatwala *et al.*, 1998).

D'autre part, Figueira *et al.* (1996) ont fait des essais de biodégradation avec une souche d'*Escherichia coli* isolée des liquides de procédé d'un circuit d'extraction d'or. Cette bactérie était capable de dégrader des complexes glucose-cyanure à des concentrations allant jusqu'à 50,0 mg/l de  $\text{CN}^-$ . Les auteurs ont émis l'hypothèse que la formation du complexe avait réduit la toxicité des cyanures, qui étaient par la suite facilement assimilables par la bactérie. Ils ont remarqué uniquement la formation de l'ammoniac et le dioxyde de carbone comme produits, et ont suggéré que la dégradation des cyanures par *E. coli* BCN6 ne produit pas les cyanates comme intermédiaire. Les auteurs ont supposé l'utilisation d'une enzyme dioxygénase pour la transformation des cyanures en  $\text{NH}_3$  et  $\text{CO}_2$ . L'ammoniac qui s'accumule durant la phase logarithmique de croissance comme source unique d'azote sert par la suite à la croissance bactérienne.

#### 4) Substitution/Addition

Les ions thiocyanates ( $\text{CNS}^-$ ) peuvent être formés par la réaction des cyanures libres avec les sulfures, les sulfures d'hydrogène ( $\text{HS}^-$ ) ou bien les thiosulfates. Plusieurs enzymes dont la Rhodanese, la Mercaptopyruvate sulfurtransferase, l'enzyme Pyridoxal phosphate, la  $\beta$ -Cyanoalanine synthase et la  $\gamma$ -cyano- $\alpha$ -aminobutyric acid synthase sont connues dans la détoxification des cyanures via les réactions de substitution et addition.

La Rhodanese (cyanide sulfur transferase ; EC 2.8.1.1) catalyse la réaction suivante :



L'enzyme a été observée chez les animaux, les plantes, les champignons et autres micro-organismes. Les bactéries identifiées incluent les souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Thiobacillus denitrificans*, *Rhodospirillum palustris*, *Klebsiella pneumoniae* et l'*Azotobacter vinelandii* (Wesley, 1988).

Le  $\text{SO}_3^{2-}$  formé selon la réaction (1.19) peut réagir ensuite avec l'oxygène pour donner les sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Smith et Struhsacker, 1987).

#### 1.4.6.2 Biodégradation des cyanures complexés

Les cyanures complexés sont plus résistants à la biodégradation que les cyanures libres (Aronstein *et al.*, 1994; Laha et Luthy, 1991). Cependant, quelques recherches ont montré la capacité de certaines bactéries et champignons à dégrader cette forme de cyanures. Cherryholmes *et al.* (1985) ont observé que l'hexacyanoferrate (III) de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ), maintenu dans la noirceur et en présence de bactéries *P. aeruginos* et *E. coli*, se décomposait en donnant lieu aux cyanures libres. En 25 jours, la concentration des cyanures libres avait atteint 1460  $\mu\text{g/l}$ , alors que dans les contrôles stériles elle demeurait sous le seuil de 16  $\mu\text{g/l}$ . La concentration initiale de l'hexacyanoferrate (III) de potassium était de 3293  $\text{mg/l}$ . Les résultats de ces études révèlent que les complexes de cyanures ont été dissociés à un pourcentage très faible, soit de seulement 0,1% des cyanures totaux initialement ajoutés.

D'autre part, Silva-Avalos *et al.* (1990) ont étudié la biodégradation du tétracyanonickelate ( $\text{K}_2\text{Ni}(\text{CN})_4$ ) par des bactéries comprenant les espèces *Pseudomonas* et *Klebsiella*. Ces bactéries utilisaient le tétracyanonickelate comme source unique d'azote. Le métabolite de biodégradation observé était le  $\text{Ni}(\text{CN})_2$ . La biodégradation du  $\text{K}_2\text{Ni}(\text{CN})_4$  n'a donc pas été complète puisque seulement le  $\text{Ni}(\text{CN})_2$  a été détecté.

Les études menées par Cherryholmes *et al.* (1985) et Silva-Avalos *et al.* (1990) n'ont pas prouvé une grande efficacité d'enlèvement des cyanures complexés. Récemment, un groupe de chercheurs (Barclay *et al.*, 1998) a démontré la capacité d'une culture pure et mixte de champignons à dégrader chacun de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  et  $\text{K}_2\text{Ni}(\text{CN})_4$  en les utilisant comme source unique d'azote. Les concentrations des trois complexes de cyanure étaient respectivement 0,5 mM, 0,5 mM et 0,25 mM. Après 34 jours

d'incubation approximativement 90% de chacun des ferrocyanures et cyanures totaux ont été dégradés. Le CO<sub>2</sub> a été identifié comme le produit final de biodégradation.

## **1.5 Études portant sur l'atténuation naturelle des cyanures**

De nombreuses études portant sur les mécanismes d'atténuation naturelle des cyanures dans un milieu hétérogène (sol, boue ou résidu) ont été réalisées.

### **1.5.1 Atténuation naturelle des cyanures dans le sol**

Quelques chercheurs se sont intéressés à l'intégrité des phénomènes d'atténuation naturelle des cyanures qui se peuvent se produire dans un sol. Chatwin et Trepanowski (1987) ont étudié l'atténuation naturelle des cyanures dans 13 types de sol. Les tests ont été réalisés, dans un premier temps, dans des réacteurs agités contenant 100 g de sol et 1 litre de solution de cyanures ( $10^{-3}$  M). Ces premiers tests avaient pour objectif d'étudier l'influence des constituants minéralogiques du sol (bauxite, kaolinite, matière organique, feldspath de potassium et plagioclase) sur l'atténuation naturelle des cyanures. Dans un deuxième temps, des essais en colonnes saturées avec une solution de  $10^{-3}$  M de cyanures libres ont été testés sur trois différents sols. Suite à ces essais, deux mécanismes physico-chimiques majeurs d'atténuation naturelle ont été identifiés. Ces mécanismes sont la volatilisation et l'adsorption. Environ 40% des 13 sols étudiés ont montré une capacité d'enlèvement des cyanures. Deux constituants minéralogiques se sont avérés efficaces dans l'atténuation des cyanures par adsorption et réactions chimiques. Ces constituants sont la bauxite ou la kaolinite, et la matière organique. Les autres minéraux étudiés ne montraient pas une grande capacité d'adsorption comparativement à ces deux derniers.

Récemment, un groupe de chercheurs (Hommelgaard *et al.*, 1998) ont étudié l'atténuation naturelle des ferri ferro-cyanures dans le sol et dans l'eau souterraine. Les

essais ont été réalisés dans des réacteurs de 2 litres munis d'une trappe à CO<sub>2</sub>. Les réacteurs contenaient une suspension de sol contaminé additionné de 1000 mg d'hexacyano-ferrate de potassium (K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) et d'une petite quantité de K<sub>4</sub>Fe<sup>14</sup>(CN)<sub>6</sub>. L'eau de la suspension a été échantillonnée tout au long de l'expérience, par contre le sol et la trappe à CO<sub>2</sub> ont été analysés seulement à la fin des essais. Les résultats ont révélé un potentiel de minéralisation de 18% sur l'un des sols étudiés. Les auteurs ont alors conclu que les complexes fer-cyanures peuvent être naturellement éliminés par des processus de dégradation. Cependant, ils n'ont pas précisé la nature de ces processus. La récupération du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> laisse croire que c'est la biodégradation qui a eu lieu. Toutefois, une dégradation de 10% dans les témoins abiotiques a été notée suggérant que des processus physico-chimiques aient pu aussi se produire.

### **1.5.2 Atténuation naturelle des cyanures dans les boues**

Des tests d'atténuation naturelle des cyanures, similaires à ceux étudiés par Chatwin et Trepanowski (1987), ont été réalisés par Castillo et Hendrix (1990) sur des boues. Ces tests consistaient à faire passer une solution de cyanures à travers une colonne remplie de boue, puis à analyser l'effluent pour les cyanures totaux et libres. Les résultats de cette étude ont abouti aux mêmes conclusions que ceux obtenus dans le sol par Chatwin et Trepanowski (1987) : la matière organique joue un rôle important dans l'adsorption des cyanures.

### **1.5.3 Atténuation naturelle des cyanures dans les résidus miniers**

Plusieurs publications ont abordé l'atténuation des cyanures dans un résidu minier (Church et Boyle, 1990; Engelhardt, 1985; Smith et Mudder, 1991; Smith et Struhsacker, 1987). Church et Boyle (1990) ont fait une caractérisation de résidus miniers issus du procédé de cyanuration en tas, provenant d'un site fermé depuis 1942. Des échantillons de résidu entreposés depuis 47 ans et recueillis à plusieurs profondeurs

ont révélé des concentrations très faibles en cyanures totaux. Ces résidus étaient majoritairement contaminés avec des cyanures complexés. Les auteurs ont alors suggéré que la disparition des cyanures libres aurait été produite suite à des mécanismes de volatilisation ou de complexation. D'autre part, Engelhardt (1985) a caractérisé des résidus miniers solides en prélevant 356 échantillons sur une période de 1 an et demi. Engelhardt (1985) a observé une diminution de 85 % de  $CN^-$  sur une période de 18 mois, et une décroissance du pH de 10,5 à 9 en 24 mois. Il a remarqué que les résidus étaient contaminés seulement avec des cyanures libres.

Smith et Mudder (1991) ont cité plusieurs études qui rapportent des cas où le pH, les  $CN_T$  et les  $CN_{WAD}$ , dans l'eau interstitielle des résidus miniers et dans le solide, ont diminué dans le temps. Cette observation a été faite sur plusieurs sites miniers de différents pays (Australie, Brésil, Canada, Nouvelle Zélande, États-Unis). Cependant, les mécanismes qui ont contribué à la diminution des concentrations des cyanures n'ont pas été investigués et demeuraient hypothétiques. Smith et Struhsacker (1987) ont rapporté les phénomènes d'atténuation des cyanures dans un résidu issu du procédé de cyanuration en tas. Leur publication était basée sur des observations géochimiques du tas de résidu contaminé aux cyanures. Elle regroupait l'intégrité des données sur les phénomènes d'atténuation naturelle des cyanures observés dans les sols.

Comme discuté ci-dessus, de nombreux travaux portant sur l'atténuation naturelle des cyanures ont été réalisés dans les résidus miniers. Les auteurs ont souvent associé les pertes des cyanures aux mécanismes de volatilisation, précipitation, biodégradation et complexation. En revanche, aucun phénomène n'a été quantifié ni vérifié par des essais en laboratoire.



## 1.6 Conclusion

Plusieurs mécanismes d'atténuation naturelle des cyanures dans le sol, les résidus et les boues ont été identifiés dans des recherches antérieures. Ces mécanismes incluent la volatilisation, l'adsorption, l'oxydation chimique, l'hydrolyse, la solubilisation/transport et enfin la biodégradation. Parmi tous ces phénomènes, la volatilisation, l'adsorption, le transport et la biodégradation semblent les plus importants mécanismes d'atténuation des cyanures.

La solubilisation et le transport des cyanures ont fait l'objet de plusieurs recherches. Ce phénomène concerne surtout les cyanures complexés qui constitue la forme la plus dominante dans les sols contaminés (Meeussen *et al.*, 1992b; Meeussen *et al.*, 1994). Les conclusions émergent de ces recherches sont unanimes sur la solubilité des complexes et des précipités de cyanures lorsque le pH est basique. Cette solubilité implique le transport des cyanures dans l'environnement et de ce fait, leur atténuation dans le sol.

La volatilisation compte parmi les plus importants phénomènes d'enlèvement des cyanures libres dans les effluents et dans le solide à cause de la grande pression de vapeur et de la faible température d'ébullition du HCN (Chatwin *et al.*, 1988; Simovic, 1984; Smith et Mudder, 1991; Thompson et Gerteis, 1990). Cependant, ce phénomène n'a pas été bien investigué dans le solide. Les seules publications trouvées qui ont quantifié la volatilisation de cyanures ajoutés à la matrice solide, sont celles de Chatwin et Trepanowski (1987) et Mihaylov et Hendrix (1994).

L'autre phénomène important est la biodégradation. D'après la revue de littérature concernant la dégradation des cyanures libres par voie aérobie, plusieurs champignons et bactéries sont capables de transformer les cyanures en produits moins toxiques et moins dangereux pour l'environnement. Les voies de dégradation hydrolytiques sont plutôt

associées aux champignons, alors que les bactéries semblent emprunter les voies oxydatives (formation du formate, formamide et ammoniac par les champignons et quelques bactéries, l'ammoniac et le CO<sub>2</sub> par les bactéries). Dans les deux cas, les produits de dégradation sont moins toxiques que le produit de départ. Les méthodes et les techniques utilisées dans la biodégradation par la majorité des chercheurs étaient à des fins de traitement. Les micro-organismes ont été adaptés aux cyanures avant de les isoler. Dans certains cas, des bactéries ont été encapsulées pour les protéger contre la toxicité des cyanures. Des concentrations de cyanures assez élevées ont ainsi été dégradées. À notre connaissance aucune publication n'a abordé la biodégradation des cyanures dans le but d'étudier l'atténuation naturelle dans un résidu minier, c'est-à-dire des essais de biodégradation utilisant la microflore indigène sans modification des conditions du milieu, sans biostimulation et sans isolation des micro-organismes et leur acclimatation préalable aux cyanures.

Le but du présent travail est donc d'évaluer le potentiel d'atténuation naturelle des cyanures dans un résidu minier issu du procédé CIP/CIL, et cela en étudiant trois phénomènes : la dissolution, la biodégradation et la volatilisation. Le choix de ces phénomènes est basé sur leur importance d'après la revue de littérature. Le phénomène d'adsorption qui joue aussi un rôle non négligeable dans l'atténuation naturelle des cyanures ne sera pas étudié dans le cadre de ce travail.

## **1.7 Hypothèse de recherche et objectifs**

L'hypothèse de recherche sur laquelle se base le projet de recherche est la suivante :

Dans certaines conditions environnementales, les cyanures contenus dans les résidus miniers peuvent être présents sous des formes stables, ou peuvent être sujets à des mécanismes de transformation et/ou de transport qui vont changer leur forme chimique et leur toxicité potentielle.

Les objectifs visés dans cette étude sont :

- Identification à partir d'une revue critique de la littérature des principaux phénomènes qui influencent le devenir des cyanures dans les résidus miniers.
- Caractérisation physico-chimique et microbiologique des résidus miniers issus d'usines de traitement de minerai d'or.
- Étude du potentiel d'atténuation naturelle des cyanures par dissolution, biodégradation et volatilisation.

## CHAPITRE 2

### 2 CARACTÉRISATION DES RÉSIDUS MINIERES

#### 2.1 Introduction

Une caractérisation approfondie des résidus miniers est essentielle à une bonne compréhension des mécanismes qui régissent l'atténuation naturelle des cyanures. Pour cette raison, les échantillons prélevés sur deux sites miniers ont été soumis à une caractérisation physico-chimique (comprenant une spéciation des formes chimiques) et microbiologique. Cette caractérisation a été réalisée sur de vieux résidus entreposés depuis plusieurs années et sur des résidus frais entreposés seulement depuis quelques mois.

Des paramètres tels que le pH, la température (in-situ), le contenu en H<sub>2</sub>O, le % en solides volatils, la granulométrie, la CEC et la capacité tampon ont été évalués dans la caractérisation physico-chimique. Ces paramètres ont été choisis à cause de leur effet sur l'atténuation naturelle des cyanures. Afin de connaître la concentration et le type des cyanures présents dans les échantillons de résidu, une caractérisation chimique a été entreprise. Elle comprend les dosages suivants : cyanures totaux (CN<sub>T</sub>), cyanures facilement dissociables (CN<sub>WAD</sub>), cyanates, thiocyanates et métaux dans la phase solide et liquide (le surnageant). Enfin, la caractérisation microbiologique a été réalisée dans le but de répondre à trois interrogations : existe-il une microflore indigène dans les résidus (hétérotrophes totaux)? Y a-t-il parmi cette microflore des micro-organismes capables de croître dans un milieu qui contient des cyanures (tolérants)? Est-ce que les micro-organismes tolérants sont capables d'utiliser les cyanures comme source unique de carbone (dégradeurs)?.

Ce chapitre est séparé en quatre parties distinctes : la première décrit l'échantillonnage et les précautions prises pour la conservation des échantillons. La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisés pour réaliser les trois caractérisations décrites ci-dessus. La troisième partie (section 2.4), quant à elle, regroupe les résultats obtenus ainsi que les discussions et enfin, la dernière partie est une conclusion portant sur la caractérisation approfondie des résidus.

## **2.2 Échantillonnage**

L'échantillonnage a été effectué sur deux sites miniers du Québec, l'un fermé et l'autre opérationnel, appartenant à une industrie aurifère qui emploie la technique CIP/CIL d'extraction d'or détaillée au chapitre 1, paragraphe 1.1.1.1.2. Dans le site minier fermé, depuis l'été 1997, deux échantillons ont été prélevés le 2 octobre 1998. Il s'agit des échantillons Yv6 ans (0,2) et Yv6 ans (1) recueillis respectivement à 0,2 m et à 1 m de profondeur et provenant de résidus entreposés depuis 6 ans. Afin d'obtenir des résidus frais, le deuxième échantillonnage a été effectué sur un site opérationnel. Deux échantillonnages ont donc été réalisés sur ce site. Le premier échantillonnage concerne les échantillons Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1) prélevés le 1<sup>er</sup> octobre 1998 dans un parc à vieux résidus entreposés depuis 9 ans. Suivent les échantillons Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) provenant de résidus frais entreposés depuis 3 mois et prélevés le 25 juillet 1999. Les résidus frais Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) seront comparés aux vieux résidus Dy9 ans (0,2), Dy9 ans (1), Yv6 ans (0,2) et Yv6 ans (1) pour voir l'effet du vieillissement sur leurs caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques.

Les échantillons destinés à l'analyse microbiologique sont des échantillons instantanés qui ont été préservés dans des sacs et conservés à 4 °C. Ces sacs n'ont pas été ouverts jusqu'à leur utilisation. Les autres échantillons sont un composé de 5 sous-échantillons conservés à 4 °C après leur prélèvement. Tous les échantillons ont été homogénéisés dès leur réception au laboratoire, sauf ceux destinés aux analyses microbiologiques.

## **2.3 Matériels et Méthodes**

Les protocoles expérimentaux détaillés sur la caractérisation physico-chimique et microbiologique se retrouvent dans les annexes I, II, III et VIII.

### **2.3.1 Caractérisation physico-chimique**

Comme le but de ce projet est l'étude de l'atténuation naturelle des cyanures, la caractérisation des échantillons a été faite selon des paramètres physico-chimiques précis. Ces paramètres sont la température, le pH, le pourcentage d'humidité (%H<sub>2</sub>O), les solides volatils à 550°C, la granulométrie, la capacité d'échange cationique (CEC) et la capacité tampon du résidu. Le pH, le %H<sub>2</sub>O, les solides volatils à 550°C et la CEC ont été réalisés en triplicata.

#### **2.3.1.1 Paramètres physico-chimiques**

##### **1) Température**

La lecture de la température du résidu a été prise sur le site lors de l'échantillonnage à l'aide d'une sonde à température (type K, 600-0000, Bernant Company, Barrington, Illinois USA). La température est un paramètre clé indiquant si les conditions sont favorables à la production éventuelle de phénomènes tels que la biodégradation et la volatilisation qui seront étudiés aux chapitres 4 et 5.

##### **2) pH**

Mis à part la température, tous les autres paramètres ont été analysés au laboratoire. Le pH a été évalué à l'aide d'un pH-mètre muni d'une électrode Orion (Ross Sure-Flow, 8172, Beverly, Ma. USA) selon la méthode décrite par Hendershot *et al.* (1993a). Le pH

a été réalisé, une première fois, dans l'eau désionisée et une seconde fois, dans une solution de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ). Ce paramètre est très important, il sera suivi tout au long de ce projet, car les formes des espèces cyanurées dépendent de lui. À  $\text{pH} < 9,2$  la forme protonnée ( $\text{HCN}$ ) est prédominante, alors qu'à  $\text{pH} > 9,2$  c'est l'espèce  $\text{CN}^-$  qui est majoritaire (voir figure 1.2 au chapitre 1). Les tests de solubilisation, de biodégradation et de volatilisation qui seront étudiés aux chapitres 3, 4 et 5 nécessitent tous la connaissance du  $\text{pH}$ .

### **3) Pourcentage d'humidité ( $\% \text{H}_2\text{O}$ )**

Le pourcentage d'humidité ( $\% \text{H}_2\text{O}$ ) a été estimé selon les méthodes ASTM D2216-92 et ASTM D2974-87 (ASTM 1998a, 1998b). Ce paramètre évalue le degré d'humidité présent dans le résidu qui est important pour la volatilisation et la biodégradation.

### **4) Matière organique (MO)**

La matière organique a été évaluée par une détermination de la teneur en solides volatils à  $550^\circ\text{C}$  en utilisant ASTM D4972 (ASTM, 1988). Cette méthode consiste à peser une quantité de résidu séché, puis à la calciner dans un four à  $550^\circ\text{C}$  jusqu'à ce que le poids des cendres soit constant. La différence dans le poids du résidu avant et après la combustion détermine le pourcentage de la matière organique. La matière organique, comme discuté dans la revue de littérature, joue un très grand rôle dans l'atténuation des cyanures par adsorption, et aussi elle constitue une base nutritive pour les micro-organismes.

### 5) *Granulométrie*

La granulométrie a été estimée selon le protocole standard ASTM D421, D422, D1140, D2217 et E11 (ASTM, 1990). Cette méthode est basée sur la distribution par hydrométrie des particules selon leur taille. Ce paramètre a été évalué uniquement pour les échantillons de surface (à 0,2 m). La granulométrie affecte un nombre de caractéristiques qui sont importants à la compréhension du sort des cyanures dans le résidu. Ces caractéristiques incluent la perméabilité du résidu au liquide et au gaz, la surface spécifique du résidu et la porosité (Chatwin et Hendrix, 1988).

### 6) *Capacité d'échange cationique (CEC)*

L'objectif principal de la capacité d'échange cationique (CEC) est d'estimer la quantité de cations échangeables dans le résidu minier. Cette donnée permet, par la suite, de connaître la capacité du résidu à retenir ou à relarguer les métaux et les alcalins qui sont très réactifs avec les cyanures. Cependant, aucune corrélation entre la CEC et l'atténuation naturelle des cyanures n'a été trouvée ou rapportée dans la littérature (Chatwin et Hendrix, 1988).

La méthode employée pour mesurer la CEC a un très grand impact sur les résultats. Il était donc important de choisir la méthode selon le type de solide étudié, lequel dans notre cas, est un résidu minier. Le choix de la méthode de détermination de la CEC a été basé sur les propriétés du résidu (pH, % MO). Après une revue de littérature sur ce sujet, la technique qui utilise l'acétate de sodium (NaOAc) a été choisie (Chapman, 1965). Cette méthode ne donne pas une CEC erronée, car le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ), qui pourrait être présent dans le résidu, n'interfère pas puisqu'il est très peu soluble dans le NaOAc (Bower *et al.*, 1952), l'autre avantage étant que le sodium ( $\text{Na}^+$ ) est facilement récupéré et dosé. Le principe de cette méthode est simple, elle comprend trois étapes. La première étape consiste à enlever les cations échangeables adsorbés sur le résidu, puis à



les remplacer par du sodium ( $\text{Na}^+$ ) au moyen d'un premier lavage avec la solution d'acétate de sodium ( $\text{NaOAc}$ ). La deuxième étape consiste en des lavages successifs du résidu à l'alcool isopropylique pour enlever l'excès de sodium. Enfin, la troisième étape est un dernier lavage destiné, cette fois-ci, à récupérer le sodium en le remplaçant par l'ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) contenu dans la solution d'acétate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ). Le sodium qui a occupé les sites vacants des cations échangeables est ensuite dosé par absorption atomique (voir annexe II).

### **7) Capacité tampon**

La capacité tampon d'un résidu indique sa résistance à la variation de pH. Elle traduit la variation du pH en fonction de quantités croissantes d'acide ajoutées au résidu. Pour chaque échantillon de résidu, 10 ml de concentrations différentes d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) ont été ajoutés à 5 g de résidu humide (dont la teneur en eau a été évaluée pour exprimer les résultats par kg de résidu sec). Les concentrations utilisées sont de 0, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 et 1 M. Les mélanges sol/acide ont été soumis à une agitation de 30 min, puis ont reposé pendant 48h avant la lecture du pH. Un témoin a été réalisé sans résidu en suivant exactement la même procédure employée avec résidu. La quantité d'acide introduite est exprimée en cmoles  $\text{H}^+$ /kg résidu sec (voir le détail de la méthode à l'annexe VIII, PE 32-E) (Zagury, 1997).

#### **2.3.1.2 Concentration et spéciation des cyanures**

La concentration et la spéciation des cyanures contenus dans le résidu minier a été réalisée sur tous les échantillons. Certains échantillons étaient en condition saturées en eau. Cette eau a été séparée du solide puis analysée. Les paramètres évalués dans le solide sont les suivants : les cyanures totaux ( $\text{CN}_T$ ), les cyanures facilement dissociables ( $\text{CN}_{\text{WAD}}$ ) et certains éléments chimiques (Al, Cd, Ca, Co, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn, Ni, K,

Ag, Na, Zn). Dans la matrice eau, les paramètres analysés sont les cyanates ( $\text{CNO}^-$ ), les thiocyanates ( $\text{SCN}^-$ ), les cyanures totaux et les cyanures facilement dissociables (WAD).

### **1) Dosage des cyanures totaux**

Le dosage des cyanures totaux, dans l'eau et dans le résidu, a été réalisé selon la méthode 4500-CN C de Standard Methods (APHA *et al.*, 1998). Cette méthode permet de doser les cyanures libres, la totalité des cyanures alcalins et faiblement complexés et une fraction importante des cyanures fortement complexés (SAD). Cependant, les cyanures complexés avec l'or, le palladium et le platine ne sont pas complètement récupérés. Les cyanates, thiocyanates et les chlorures de cyanogènes ne sont pas, non plus, dosés par cette méthode.

Le principe de la méthode 4500-CN C est simple. L'échantillon d'eau ou de solide additionné d'eau distillée est acidifié à l'acide sulfurique. Du chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ) est ajouté comme catalyseur pour aider la dissociation des métallo-cyanures. L'échantillon est ensuite distillé par chauffage à reflux pendant environ 1 h, puis le HCN qui se volatilise de la matrice est capté sous forme de  $\text{CN}^-$  non volatil dans une solution de NaOH. Les  $\text{CN}^-$  sont, par la suite, dosés par une méthode appropriée qui, dans notre cas, est la colorimétrie (méthode 4500-CN E de Standard Methods, APHA *et al.*, 1998). Les ions cyanures, présents dans la solution de NaOH, réagissent avec la chloramine-T ( $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNaO}_2\text{S}$ ) pour former le chlorure de cyanogène ( $\text{CNCl}$ ), lequel réagit à son tour avec la pyridine ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) et l'acide barbiturique ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3$ ) pour former un complexe de couleur rouge-bleu. La concentration en ions cyanures de l'échantillon est ensuite déterminée par spectrométrie visible à une longueur d'onde de 580 nm.

La méthode 4500-CN C, comme toute autre méthode d'analyse, ne met pas à l'abri des interférences. Les sulfures, les nitrates et les nitrites sont les éléments qui interfèrent le plus dans le dosage des cyanures totaux. Cependant, des mesures correctrices ont été

prévues par la méthode 4500-CN C pour pallier ce problème. Ainsi, pour précipiter les sulfures, du carbonate de plomb ( $\text{PbCO}_3$ ) est additionné à l'échantillon, et pour éliminer les nitrates et les nitrites, 2 g d'acide sulfamique ( $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ) sont ajoutés dans le ballon à distillation.

L'inconvénient majeur de cette méthode se manifeste lors du dosage des cyanures totaux dans un solide. L'acidification de la suspension de solide aide effectivement à la dissociation des complexes cyanurés en libérant le  $\text{CN}^-$ , qui par la suite, se volatilise sous forme de HCN. Cependant, un milieu acide ne favorise pas la solubilisation des cyanures fortement complexés (SAD). Ces derniers restent adsorbés à la matrice même après 1 h de distillation. Par contre, à pH très alcalin, ces complexes sont solubles (Theis *et al.*, 1994; Young et Theis, 1991). Une étape préliminaire de lixiviation du solide dans une solution de 10% de NaOH, comme le suggère APHA *et al.* (1998) dans Standard Methods, devrait à notre avis être obligatoire avant l'application de la méthode 4500-CN.

## **2) Dosage des cyanures facilement dissociables (WAD)**

La méthode 4500-CN I de Standard Methods (APHA *et al.*, 1998) permet de mesurer les cyanures libres et faiblement complexés. Ainsi, les cyanures complexés avec le fer, le cobalt, l'or et le nickel ne sont pas dosés par cette méthode. Le principe de cette méthode est identique à celui des cyanures totaux (4500-CN C) à l'exception des points suivants: l'acide sulfamique n'est pas ajouté parce que les ions nitrite et nitrate n'interfèrent pas dans ce cas; un tampon acétate et de l'acétate de zinc sont ajoutés à la matrice à analyser au lieu de l'acide sulfurique et des chlorures de magnésium. Dans cette méthode le HCN est libéré d'une solution légèrement acide (pH 4,5 à 6,0). Le tampon acétate utilisé contient un sel de zinc pour précipiter les ferrocyanures et ainsi augmenter la sélectivité de la méthode. Il faut noter que toutes les analyses de cyanures

totaux et de cyanures WAD ont été réalisées par le laboratoire accrédité Maxxam Analytique.

### **3) Dosage des CNO, des SCN et des métaux**

Les cyanates et les thiocyanates ont été dosés respectivement selon la méthode 4500-CN L et 4500-CN M de Standard Methods (APHA *et al.*, 1998). Ces analyses ont été exécutées par la corporation des services analytiques Philip.

Le balayage de métaux par ICP (Inductively Coupled Plasma) a été réalisée par le laboratoire Maxxam et par la corporation Philip. La méthode ICP, une technique analytique simultanée ou séquentielle, permet de détecter un grand nombre de métaux à des concentrations allant jusqu'à une limite de détection de 1 mg/kg dans un solide après digestion à l'acide nitrique (16N) (informations obtenues de la compagnie Maxxam). Cette technique comporte principalement une source d'atomisation et d'excitation, ensuite un spectromètre permet de mesurer les intensités lumineuses à des longueurs d'onde données, et enfin, un ensemble informatique contrôle les différentes séquences d'analyse (Dumestre, 1995). Le balayage ICP avait pour but de doser les métaux qui sont susceptibles de réagir avec les cyanures pour former des complexes.

#### **2.3.2 Caractérisation microbiologique**

Dans le but d'estimer l'abondance microbienne et le type de micro-organismes présents dans le résidu, une caractérisation microbiologique a été réalisée. Des dénombrements de la microflore indigène du résidu, comprenant les hétérotrophes totaux, les micro-organismes tolérants et dégradeurs ont été réalisés sur les 6 échantillons (Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1), Dy9 ans (0,2), Dy3 mois (1), Dy3 mois (0,2)). Les trois dénombrements ont été faits par la méthode du comptage sur boîte de Pétri, appelée méthode des comptes viables.

### **1) *Dénombrement des hétérotrophes totaux***

Le dénombrement des hétérotrophes totaux représente un compte total de micro-organismes présents dans le résidu. Il a été obtenu en offrant à la microflore un milieu non sélectif complet en nutriment et en source de carbone facilement assimilable qui est le Tryptic Soy Broth (TSB) (500 g, 0862-17-8 DIFCO laboratories, Detroit MI 48232-7058, USA) (voir tableau 2.1). Cette méthode est basée sur celle de «Cultural methods for soil microorganisms» tiré de Hendershot *et al.* (1993b), et elle consistait à extraire les micro-organismes de 10 g de résidu dans une solution saline (0,85%, p/v). Cette extraction qui représente la première dilution, a été ensuite diluée 4 ou 5 fois pour pouvoir compter des colonies distinctes. Les micro-organismes, qui se retrouvent dans la solution saline ont été inoculés sur la gélose (stérilisée par autoclavage pendant 30 min à 120 °C, puis refroidie à 4°C durant 24 h dans les boîtes de Pétri). Ces dernières ont par la suite été inoculées puis incubées à 28°C pendant une période de 4 semaines, le premier comptage a eu lieu après 7 jours d'incubation et le deuxième après 15 jours. Le comptage a été fait à l'œil au moyen du compteur Québec. Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies ont servi à énumérer une population. Chaque colonie qui se développe est présumée être issue d'une unité viable, soit un seul organisme ou bien un groupe d'organismes. Les résultats sont exprimés en UFC/g de résidu sec (UFC étant Unité Formant des Colonies).

### **2) *Dénombrement des micro-organismes tolérants et dégradeurs***

Le dénombrement des micro-organismes tolérants consistait à faire pousser des micro-organismes sur un milieu complet (TSB) additionné d'une concentration de cyanures sous forme de KCN. Cette technique, comme son nom l'indique, a été réalisée dans le but de savoir s'il existe parmi la microflore indigène du résidu des micro-organismes tolérants aux cyanures, et de ce fait, capables de croître en leur présence. Un autre milieu où les cyanures ont été ajoutés comme source unique de carbone dans l'agar noble (agar

bactériologique OXOID, 500 g code L11 UNIPATH LTD, Hampshire, England) additionné d'une solution minérale (MSM) était destiné à déterminer l'existence de micro-organismes dégradeurs capables d'utiliser les cyanures comme source unique de carbone. La composition des milieux non sélectif et sélectif est résumée dans le tableau 2.1.

**Tableau 2.1** Composition des milieux de culture non sélectif et sélectif utilisés pour le dénombrement des hétérotrophes totaux et des micro-organismes tolérants et dégradeurs

---

**Milieu non sélectif :**

Hétérotrophes totaux : Tryptic Soy Broth (3g/l) + agar purifié (15g/l)

**Milieu sélectif :**

Micro-organismes tolérants: Tryptic Soy Broth (3g/l) + agar purifié (15g/l)  
+ CN<sup>-</sup> (23mg/l)

Micro-organismes dégradeurs: Agar noble (15g/l) + MSM + CN<sup>-</sup> (23mg/l)

---

Le MSM comprend la source d'azote, de phosphore et des oligo-éléments, il est utilisé par la chaire CRSNG en assainissement et gestion des sites, et possède la composition suivante. Pour 1 litre de milieu nutritif, sont ajoutés :

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,88 g	6,37 10 <sup>-3</sup> M
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,26 g	1,29 10 <sup>-3</sup> M
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,10 g	8,32 10 <sup>-3</sup> M
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,08 g	3,25 10 <sup>-3</sup> M
NaNO <sub>3</sub>	1,00 g	1,18 10 <sup>-2</sup> M

Et 1 ml d'une solution contenant les métaux traces suivants a aussi été ajouté.

Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,29 g/l	10 <sup>-3</sup> M
Al(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,47 g/l	10 <sup>-3</sup> M

$\text{CuSO}_4$	0,15 g/l	$10^{-3}$ M
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,29 g/l	$10^{-3}$ M
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,87 g/l	$10^{-2}$ M
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,69 g/l	$10^{-2}$ M
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,48 g/l	$2,0 \cdot 10^{-2}$ M

La technique de dénombrement des micro-organismes tolérants et dégradeurs, adaptée aux cyanures, a été développée au cours de ce projet, en se basant sur des travaux antérieurs (Dumestre, 1995). Cette méthode est basée sur le même principe que celui du dénombrement des hétérotrophes totaux. Cependant, elle diffère dans l'étape de préparation du milieu nutritif. Le pH du milieu utilisé, normalement tamponné à pH 7,0, a été augmenté jusqu'à 9,2 pour préserver le plus possible les cyanures ajoutés : le milieu, sous une agitation magnétique, a été basifié jusqu'à pH = 9,0 avec quelques gouttes d'une solution de NaOH (10N) stérilisée par filtration (0,45  $\mu\text{m}$ ). Par la suite, la solution de cyanures (23 mg/l), dont le pH a été augmenté à 12, a été additionnée au milieu après sa stérilisation par filtration à 0,45  $\mu\text{m}$ . Le pH final était alors 9,2. L'ajustement du pH a été effectué après autoclavage de la gélose (Gerhardt *et al.*, 1981) à l'aide de l'électrode Orion stérilisée à l'acide (pH < 2,0).

Le choix du pH = 9,2 a été fixé selon deux paramètres : (1) l'objectif du projet où il fallait respecter le pH initial du résidu (proche de la neutralité pour les vieux résidus), donc il fallait choisir un pH pas trop basique, (2) la volatilisation qui est fonction du pH, plus ce dernier est basique et plus la volatilisation est minime. Il est à noter que le pH 9,2 ne garantissait pas la préservation totale de la concentration initiale des cyanures libres ajoutés, puisque à ce pH les quantités de HCN et de  $\text{CN}^-$  sont équimolaires. Pour cette raison, un calcul théorique, basé sur la loi de conservation de la masse dans un système fermé, a été réalisé afin d'estimer la quantité approximative de HCN susceptible de se volatiliser. En soustrayant cette donnée à la quantité initiale de cyanures ajoutés, la concentration finale dans la gélose était plus ou moins connue. De cette façon pour,

par exemple, obtenir une concentration finale de 10 mg/kg de cyanures libres dans la gélose, il faut en prévoir plus au moment de l'ajout dans les milieux de culture (pour plus de détails voir PE P33-C à l'annexe III). De plus, pour vérifier la présence des cyanures dans le milieu, un échantillon de gélose a été analysé pour les cyanures totaux au moment du coulage sur boîte de Pétri. Les résultats ont, effectivement, montré la présence des cyanures dans le milieu sélectif au jour 0 de l'incubation.

## **2.4 Résultats et discussion**

### **2.4.1 Caractérisation physico-chimique**

#### *2.4.1.1 Paramètres physico-chimiques*

Les paramètres physico-chimiques évalués pour les vieux résidus (Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2)) et (Dy9 ans (1), Dy9 ans (0,2)) provenant respectivement des deux sites fermé et opérationnel sont indiqués au tableau 2.2. Ceux des résidus frais (Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2)) sont résumés dans le tableau 2.3.

##### **1) Température, pH**

Les résultats de température obtenus pour les différents échantillons de vieux résidus, présentés au tableau 2.2, sont semblables. Il faut rappeler que ces échantillons ont été prélevés dans la même période de l'année, soit au mois d'octobre. Les températures des échantillons Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1) et Dy9 ans (0,2) sont de 11,2, 6,3, 10,7 et 9,6 respectivement. Le pH révèle une valeur proche de la neutralité pour les quatre échantillons. Le pH réalisé avec l'eau désionisée est en moyenne de 8,3, 7,6, 7,4, 7,3 respectivement pour Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1) et Dy9 ans (0,2). Le pH réalisé avec la solution de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) révèle des valeurs légèrement



plus faibles que celles obtenues avec l'eau, soient 7,5, 7,2, 7,1, 7,09 dans l'ordre respectif des échantillons. Ces valeurs seraient une condition favorable pour une éventuelle activité bactérienne qui joue un grand rôle dans l'atténuation naturelle.

D'autre part, la température obtenue pour les échantillons des résidus frais (Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2)) est respectivement de 20 et 22 °C (voir tableau 2.3). Cette valeur est due à la période d'échantillonnage qui se situe au mois de juillet. Le pH de ces deux échantillons s'est avéré plus élevé que celui des vieux résidus. Il est en moyenne de 10,6 et 10,5 respectivement pour Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2) lorsqu'il a été réalisé avec l'eau. Le pH réalisé avec la solution de chlorure de calcium donne des valeurs semblables soient, de 10,0 et 10,1 dans l'ordre respectif des échantillons. Le pH basique des résidus frais s'explique par le pH opérationnel du procédé CIP/CIL qui est de l'ordre de 10,5. Avec le temps, ce pH diminue graduellement sous l'effet des pluies acides et de la dissolution du CO<sub>2</sub> (Smith et Struhsaker, 1987; Simovic *et al.*, 1994). La diminution du pH des résidus miniers alcalins a déjà été rapportée par Engelhardt (1985) où il a noté une décroissance du pH de 10,5 à 9 en l'espace de 24 mois.

## 2) *Matière organique (MO) et pourcentage d'humidité (%H<sub>2</sub>O)*

Le contenu en matière organique et en eau sont très comparables dans les vieux résidus et les résidus frais. Le pourcentage en matière organique est, en moyenne, de 0,8%, 2,1%, 3,0% et 3,2% dans les échantillons Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1) et Dy9 ans (0,2) respectivement, alors que dans les échantillons des résidus frais il est de 2,6% et 2,4% respectivement pour Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2). Ces valeurs sont considérées faibles en comparaison avec les sols en général (Chatwin et Hendrix, 1988), mais elles sont normales pour un résidu minier. Les résultats du contenu en matière organique, dans les sols arides de l'Ouest Américain, obtenus par Chatwin *et al.* (1988) était en moyenne de 0,6%.

Le contenu en eau est en moyenne de 20,9%, 23,1%, 24,3%, 26,9%, 21,7 et 20,8% respectivement dans les échantillons Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1), Dy9 ans (0,2), Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2). Ces valeurs sont assez considérables pour supposer des conditions favorables à la présence des micro-organismes dans le résidu.

### **3) Granulométrie**

La granulométrie obtenue pour Yv6 ans (0,2) est de 28,3% sable, 71% limon et 0,7% argile, et celle de Dy9 ans (0,2) est de 6% sable et 94% limon. En ce qui concerne les résidus frais, la granulométrie obtenue pour Dy3 mois (0,2) est de 2,5% argile, 69,5% limon et 28% sable. Ces échantillons sont majoritairement constitués de limon (situé entre 0,002 et 0,075 mm).

### **4) Capacité d'échange cationique (CEC)**

La valeur moyenne de la capacité d'échange cationique (CEC) dans les quatre échantillons des vieux résidus (Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1) et Dy9 ans (0,2)) est, respectivement, 54,0, 34,9, 24,3 et 35,4 meq/100g de résidu sec. La CEC de ces échantillons est normale étant donné la granulométrie qui est composée principalement de limon. Ce dernier offre une grande surface spécifique, et de ce fait une grande capacité d'adsorption cationique (Buckman et Brady, 1969).

La CEC est très faible dans les échantillons des résidus frais par rapport à celle constatée dans les échantillons des vieux résidus, elle vaut en moyenne 2,3 et 2,9 meq/100g de résidu sec pour Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2) respectivement. Cela est dû probablement à la différence de constituants dans la composition du minéral.

**Tableau 2.2** Paramètres physico-chimiques des vieux résidus

Paramètres <sup>a</sup>	Yv6 ans	Yv6 ans	Dy9 ans	Dy9 ans
	(1)	(0,2)	(1)	(0,2)
T° (°C)	11,2	6,3	10,7	9,6
pH (eau)	8,3 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,3 ± 0,1
pH (CaCl <sub>2</sub> )	7,5 ± 0,1	7,2 ± 0,1	7,1 ± 0,1	7,1 ± 0,1
MO (%)	0,8 ± 0,3	2,1 ± 0,3	3,0 ± 0,2	3,2 ± 0,2
H <sub>2</sub> O (%)	20,9 ± 1,1	23,1 ± 0,2	24,3 ± 0,3	26,9 ± 0,1
CEC (meq/100 g résidu sec)	54,0 ± 5,8	34,9 ± 9,9	24,3 ± 1,8	35,4 ± 6,1

Granulométrie	Yv6 ans (0,2)	Dy9 ans (0,2)
	28,3% sable, 71% limon, 0,7% argile	6% sable, 94% limon

**Tableau 2.3** Paramètres physico-chimiques des résidus frais

Paramètres <sup>a</sup>	Dy3 mois (1)	Dy3 mois (0,2)
T° (°C)	20	22
pH (eau)	10,6 ± 0,1	10,5 ± 0,1
pH (CaCl <sub>2</sub> )	10,0 ± 0,1	10,1 ± 0,1
MO (%)	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,1
H <sub>2</sub> O (%)	21,7 ± 0,2	20,8 ± 1,1
CEC (meq/100 g résidu sec)	2,3 ± 0,6	2,8 ± 0,3

Granulométrie	Dy3 mois (0,2)
	2,5% argile, 69,5% limon, 28% sable

<sup>a</sup> les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type (n = 3)

### 5) Capacité tampon

Les résultats de la capacité tampon des six échantillons sont donnés sous forme de graphique représentant la variation du pH en fonction de quantités croissantes d'acide nitrique ajouté. La capacité tampon est une mesure qualitative, elle donne une idée globale de la résistance du résidu à la variation du pH. Une légère résistance dans l'intervalle 0-100 cmol de  $H^+$ /kg de résidu sec est observée en comparant les courbes des six échantillons avec le témoin (réalisé sans résidu) (voir figure 2.1). À partir de la valeur de 100 cmol  $H^+$ /kg de résidu sec, ces échantillons se comportent comme le témoin, c'est-à-dire ils n'offrent aucune résistance. Les échantillons Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2) présentent une résistance un peu plus élevée que le reste des échantillons dans l'intervalle 50 et 150 cmol  $H^+$ /kg de résidu sec mais, leur pH converge tout de même vers 0 dans cet intervalle. Les six échantillons ont donc une faible capacité tampon. Ce résultat pourrait aussi expliquer la différence de pH observée entre les résidus frais (pH=10) et les vieux résidus (pH neutre).

#### Capacité tampon

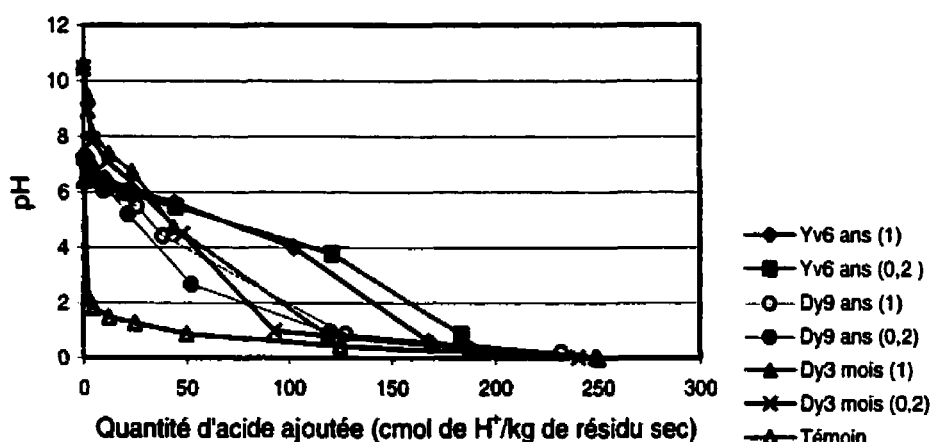


Figure 2.1 Capacité tampon des vieux résidus et des résidus frais.

### 2.4.1.2 Concentration et spéciation des cyanures

Les résultats de la caractérisation chimique des échantillons des vieux résidus et des résidus frais sont résumés dans les tableaux 2.4 et 2.5. Les  $CN_T$  dans les résidus frais se sont avérés beaucoup plus élevés par rapport à ceux dans les vieux résidus. La concentration en  $CN_T$  dans la phase solide est en moyenne de 22 et 17 mg/kg respectivement pour Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2), alors que celle évaluée dans la phase solide des vieux résidus est en moyenne de 2,4, 4,8, 3,4 et 2,4 mg/kg pour Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1) et Dy9 ans (0,2) dans l'ordre respectif des échantillons.

Les  $CN_{WAD}$  évalués dans les résidus frais sont en moyenne de 2,8 et 3,2 mg/kg respectivement pour Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2), alors que ceux dans les vieux résidus sont inférieurs à la limite de détection (<0,05 mg/kg). La concentration en  $CN_T$  dans les vieux résidus et les résidus frais est grande comparativement à celle des  $CN_{WAD}$ . Ceci montre que le résidu est majoritairement contaminé par des complexes de cyanures (cyanures difficilement et/ou partiellement dissociables). L'absence des  $CN_{WAD}$  dans les vieux résidus révèle qu'ils ont probablement disparu du solide à cause de la longue durée d'entreposage. Des résultats semblables ont été observés par Church et Boyle (1990) sur des vieux résidus. Les auteurs ont alors suggéré que la disparition des cyanures libres aurait été produite suite à des mécanismes de volatilisation ou de transformation en complexe.

Les concentrations en  $SCN^-$ ,  $CNO^-$ ,  $CN_T$  et  $CN_{WAD}$  dans la matrice eau sont de 270 et 300 mg/l en  $SCN^-$ , de 98 et 93 mg/l en  $CNO^-$ , de 130 et 110 mg/l en  $CN_T$  et de 110 et 23 mg/l en  $CN_{WAD}$  respectivement pour les échantillons des résidus frais Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2) (tableau 2.5). En revanche, les concentrations des mêmes paramètres sont inférieures à la limite de détection dans les échantillons Yv6 ans (1) et Yv6 ans (0,2), sauf dans le cas des thiocyanates ( $SCN^-$ ) dans l'échantillon Yv6 ans (1) dont la concentration est de 41 mg/l. La présence des thiocyanates à cette profondeur (1 m) est

probablement due aux mécanismes anaérobies, parmi ces mécanismes la biodégradation anaérobie est la plus probable à cause du vieil âge des résidus (Smith et Struhsacker, 1987). Les échantillons Dy9 ans (1) et Dy9 ans (0,2) ne contenaient pas de l'eau, c'est pourquoi elle n'a pu être analysée. Les concentrations élevées en  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{CNO}^-$ ,  $\text{CN}_T$  et  $\text{CN}_{\text{WAD}}$ , dans la matrice eau, observées dans Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2) montrent probablement que les cyanures dans ces résidus sont lixiviables et sont sujets, par la suite, à des phénomènes d'oxydation et de réaction avec les sulfures. La comparaison des concentrations en  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{CNO}^-$ ,  $\text{CN}_T$  et  $\text{CN}_{\text{WAD}}$  des échantillons d'eau recueillis à 1 m avec ceux prélevés à 0,2 m ne permet pas de déduire une corrélation, d'autant plus que ces concentrations ne sont pas représentatives en fonction de la profondeur des résidus à cause de la qualité de l'échantillonnage.

Comme remarque générale, les  $\text{CN}_{\text{WAD}}$  et les  $\text{CN}_T$  dans la phase solide et liquide semblent avoir été atténués dans le temps comme l'ont observé antérieurement Engelhardt (1985), Smith et Mudder (1991) et Church et Boyle (1990). Ces auteurs ont observé une diminution temporelle des concentrations des cyanures contenus dans des résidus miniers (voir paragraphe 1.5.3).

**Tableau 2.4** Concentration des espèces cyanurées des vieux résidus

Paramètres	Yv6 ans (1)	Yv6 ans (0,2)	Dy9 ans (1)	Dy9 ans (0,2)
1. résidu <sup>b</sup>				
CN <sub>T</sub> (mg/kg)	2,4 ± 0,3	4,8 ± 0,5	3,4 ± 0,3	2,4 ± 0,3
CN <sub>WAD</sub> (mg/kg)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
2. eau				
	Yv6 ans (1)		Yv6 ans (0,2)	
CNO <sup>-</sup> (mg/l)	<0,5		<0,5	
SCN <sup>-</sup> (mg/l)	41,0		<0,5	
CN <sub>T</sub> (mg/l)	0,94		<0,01	
CN <sub>WAD</sub> (mg/l)	<0,01		<0,01	

**Tableau 2.5** Concentration des espèces cyanurées des résidus frais

Paramètres	Dy3 mois (1)	Dy3 mois (0,2)
1. résidu <sup>b</sup>		
CN <sub>T</sub> (mg/kg)	22,0 ± 1,0	17,0 ± 1,7
CN <sub>WAD</sub> (mg/kg)	2,8 ± 0,5	3,1 ± 0,6
2. eau		
	Dy3 mois (1)	Dy3 mois (0,2)
CNO <sup>-</sup> (mg/l)	98	93
SCN <sup>-</sup> (mg/l)	270	300
CN <sub>T</sub> (mg/l)	130	110
CN <sub>WAD</sub> (mg/l)	110	23

<sup>b</sup> les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type (n = 3)

Les concentrations en métaux et alcalins déterminées dans les 6 échantillons (Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1), Dy9 ans (0,2), Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2)) sont présentées dans le tableau 2.6. La concentration en fer est élevée dans tous les échantillons et varie de 34000 à 61000 mg/kg, d'où la présence probable de complexes fer-cyanures. La présence du cuivre, du nickel et du cobalt suggère aussi l'association possible avec les cyanures pour donner lieu aux complexes (Theis *et al.*, 1994). Les autres métaux qui complexent les cyanures comme le cadmium et le zinc sont aussi présents à des concentrations non négligeables. Cependant, ces métaux, dont la plupart constituent des métaux lourds, ne dépassent pas le critère C de la politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés du MENV (MENV, 1999), sauf le cuivre dans le cas des vieux résidus.

**Tableau 2.6** Concentration (mg/kg) en élément minéraux dans les vieux résidus et les résidus frais

Échantillons	Vieux résidus			Résidus frais		
	Yv6 ans (0,2)	Yv 6 ans (1)	Dy9 ans (0,2)	Dy9 ans (1)	Dy3 mois (0,2)	Dy3 mois (1)
Aluminium	6200	9100	9300	8900	4600	5000
Cadmium	2 A-B	13 B-C	ND	ND	ND	ND
Calcium	27000	19000	12000	12000	9300	9100
Cobalt	59 B-C	25 A-B	17 A-B	17 A-B	8.8<A	13<A
Cuivre	2100>C	2100>C	930>C	610 >C	440 B-C	450 B-C
Fer	61000	46000	52000	53000	34000	42000
Plomb	110 A-B	85 A-B	27<A	20<A	27<A	28<A
Magnésium	13000	10000	9200	8900	3900	4200
Manganèse	390<A	450<A	340<A	310<A	290<A	300<A
Nickel	110 B-C	41<A	8<A	9<A	4.8<A	5.9<A
Potassium	710	1500	1900	1500	890	980
Argent	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sodium	130	430	140	180	230	250
Zinc	99<A	170 A-B	100 A-B	220 A-B	97<A	91<A

Note : les critères A, B, C du MENV (1999) sont donnés à titre indicatif



## 2.4.2 Caractérisation microbiologique

### 1) *Dénombrement des hétérotrophes totaux*

La figure 2.2 montre le compte microbien des hétérotrophes totaux pour les vieux résidus. Le plus grand nombre d'unités formant des colonies a été observé dans l'échantillon Yv6 ans (0,2) qui vaut  $(1,03 \pm 0,24) \times 10^6$  UFC/g de résidu sec (0,24 étant la valeur de l'écart type obtenu avec 6 réplicats). En ce qui concerne les autres échantillons, leurs populations se situent entre  $10^4$  et  $10^5$  UFC/g et valent  $(1,02 \pm 0,72) \times 10^4$ ,  $(5,51 \pm 0,53) \times 10^4$  et  $(8,25 \pm 0,31) \times 10^4$  UFC/g de résidu sec respectivement pour Yv6 ans (1), Dy9 ans (1) et Dy9 ans (0,2). Les écarts type montrent que les résultats sont très reproductibles.

Le dénombrement bactérien des hétérotrophes totaux réalisé sur les résidus frais (Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2)) n'a montré aucune présence de micro-organismes. Même après un temps d'incubation assez long, d'un mois environ, les micro-organismes n'étaient toujours pas apparus. La même observation a été faite par Dumestre (1995) lorsqu'il a réalisé un dénombrement des hétérotrophes totaux sur des nouvelles vieilles brasques n'ayant pas été déposés en décharge. Ce dénombrement ne révélait aucun peuplement microbien dans ces résidus. Par ailleurs, le même dénombrement a été effectué sur des brasques en décharge depuis 40 ans et a montré la présence d'environ  $10^{+5}$  UFC/g (Dumestre, 1995).

### 2) *Dénombrement des micro-organismes tolérants et dégradeurs*

Les micro-organismes des vieux résidus ne semblent pas avoir été affectés par la présence des  $\text{CN}^-$  et par l'augmentation du pH (de 7,0 à 9,2) comme le montre le dénombrement des micro-organismes tolérants dans la figure 2.3. Le nombre de colonies retrouvé dans les échantillons Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1) et Dy9 ans (0,2) est

respectivement de  $(4,83 \pm 1,80) \times 10^5$ ,  $(6,46 \pm 1,50) \times 10^2$  et  $(3,14 \pm 2,34) \times 10^4$  UFC/g. Le nombre de micro-organismes tolérants dans ces trois échantillons est significativement plus petit que celui des hétérotrophes totaux au niveau de confiance de 95%. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison. Cependant, l'échantillon Yv6 ans (1) a augmenté de 1,5 log, le nombre de colonie enregistré est de  $(4,39 \pm 1,91) \times 10^5$  UFC/g résidu sec. Cette augmentation est difficile à expliquer, car la population de la microflore tolérante en présence de cyanures devrait diminuer à cause de leur toxicité, ou du moins demeurer stable.

Parmi les quatre échantillons des vieux résidus Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1) et Dy9 ans (0,2) aucune UFC n'a poussé dans le milieu sélectif pour les micro-organismes dégradeurs. Il semble donc que la microflore tolérante n'a pas la capacité de dégrader les cyanures, puisqu'ils ne peuvent pas utiliser ces derniers comme source unique de carbone. Cependant, il est aussi probable que la méthode utilisée pour le milieu sélectif ne soit pas adéquate pour le dénombrement des micro-organismes dégradeurs de cyanures. Harris et Knowles (1983) rapportent que des petites concentrations en cyanures ajoutées au milieu sélectif ne suffisent pas à la croissance bactérienne, par contre de grandes concentrations lui sont toxiques. Or, une concentration de 23 mg/l de cyanures libres dans l'agar a été utilisée. En tenant compte des pertes par volatilisation, des analyses réalisées par le laboratoire accrédité Maxxam sur l'agar, au jour 0, ont révélé une concentration en cyanures totaux de 7,22 mg/l. Cette concentration est très faible pour les besoins nutritifs des micro-organismes car la teneur moyenne en carbone dans un milieu nutritif est estimée à 0,65 g/l, et celle de l'azote à 0,15 g/l (Dumestre, 1995).

De même que pour les hétérotrophes totaux, les micro-organismes tolérants et dégradeurs dans les résidus frais (Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2)) n'ont pas été observés. L'absence des micro-organismes dans les résidus frais est probablement due aux concentrations élevées en cyanures totaux observés dans ces échantillons (variant de

17 à 22 mg/kg). De plus, le jeune âge des résidus porte à croire que la microflore indigène n'est pas encore adaptée à son nouveau milieu. Une période d'acclimatation semble donc nécessaire pour la croissance des micro-organismes.

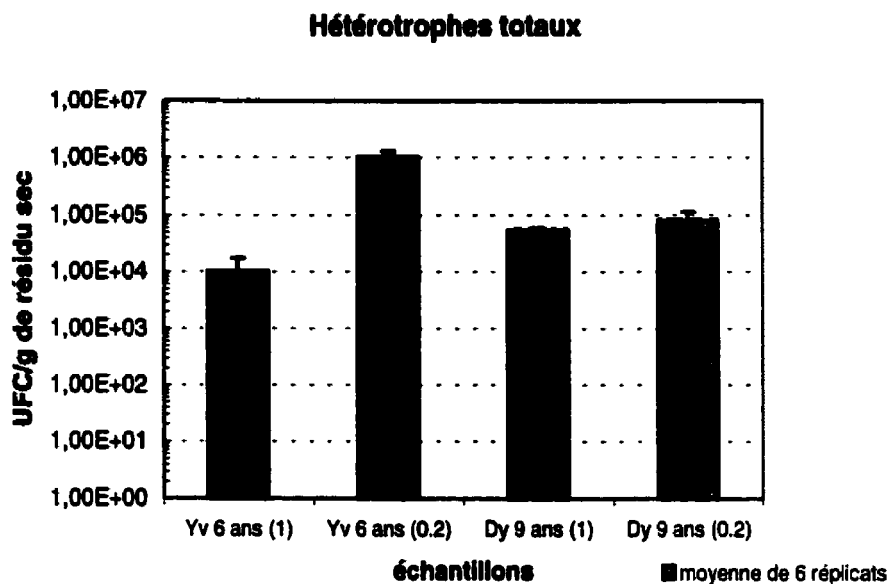


Figure 2.2 Dénombrement des hétérotrophes totaux dans les vieux résidus.

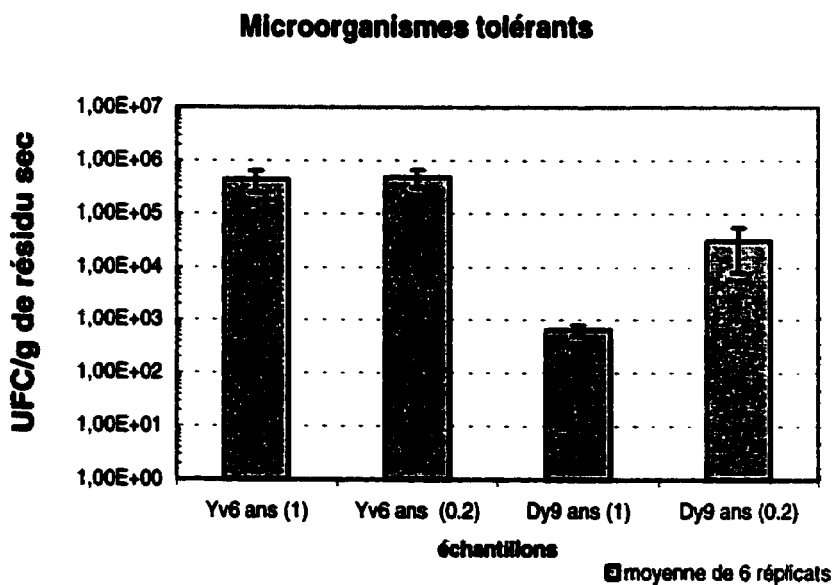


Figure 2.3 Dénombrement des micro-organismes tolérants dans les vieux résidus.

## 2.5 Conclusion

La caractérisation réalisée sur les différents échantillons miniers suggère une évolution temporelle des propriétés physico-chimiques et biologiques des résidus. La caractérisation physico-chimique de ces résidus a dévoilé, comme dans des études antérieures, une diminution du pH et de la concentration des  $CN_T$  dans le temps. La concentration des  $CN_T$  dans les résidus frais (Dy3 mois) est supérieure à celle des  $CN_{WAD}$  laissant supposer que ces résidus sont majoritairement contaminés avec des cyanures partiellement et/ou fortement complexés. La présence des cyanates et des thiocyanates dans la phase aqueuse des résidus frais est la preuve que les cyanures évoluent dans des formes moins toxiques.

La caractérisation microbiologique a montré l'absence totale de micro-organismes dans les résidus frais et ce pour les deux milieux étudiés : non sélectif (hétérotrophes totaux) et sélectif (micro-organismes tolérants et dégradeurs). En revanche, les hétérotrophes totaux et les micro-organismes tolérants se sont développés en nombre assez considérable dans les vieux résidus, mais aucun microorganisme dégradeur n'a été détecté.

Les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des vieux résidus, âgés de 9 et 6 ans et prélevés sur deux sites miniers, sont semblables et ne montrent pas de différence majeure dans les concentrations des cyanures et dans le dénombrement bactérien. La caractérisation physico-chimique et microbiologique sur les trois échantillons Yv6 ans, Dy9 ans et Dy3 mois a montré des résultats similaires pour les deux profondeurs (0,2 et 1 mètre).

La diminution des concentrations de cyanures et du pH des résidus ne renseigne pas sur leur devenir dans l'environnement. Cette diminution pourrait avoir deux origines : soit que les cyanures ont été sujets à des phénomènes de transport ou bien ils ont subi des

phénomènes de transformation. Par exemple, il se peut que la concentration ait décri à cause d'un simple lessivage suivi d'une migration vers des nappes aquifères ou vers des cours d'eau. Il est aussi possible que les cyanures aient subi des phénomènes chimiques et biologiques de dégradation ou de transformation en des produits moins toxiques. Dans le but de vérifier cette hypothèse, plusieurs expériences, comprenant des tests de lixiviation, de biodégradation et de volatilisation, ont été réalisées. Les résultats de ces essais sont présentés aux chapitres 3, 4 et 5 respectivement.

## CHAPITRE 3

### 3 ÉTUDE DE LA DISSOLUTION DES CYANURES

#### 3.1 Introduction

Suite à la caractérisation approfondie qui a montré une évolution des propriétés physico-chimiques et biologiques des résidus, trois phénomènes d'atténuation naturelle, soit la dissolution, la biodégradation et la volatilisation, ont été étudiés pour comprendre l'origine de la diminution de la concentration des cyanures. Le présent chapitre aborde l'étude de la dissolution des cyanures en cuvée par des tests de lixiviation. Il est à noter qu'afin de respecter l'objectif de ce projet, aucun changement de conditions physico-chimiques du résidu n'a été effectué. Les tests de lixiviation ont été réalisés dans l'eau désionisée sans ajout de tampon ou d'autres produits chimiques.

La présente expérience a été entreprise dans le but d'évaluer la fraction soluble des cyanures contenus dans le résidu et ainsi prédire leur potentiel de mobilisation dans l'environnement. Les tests ont été réalisés en triplicata sur les vieux résidus (Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1), Dy9 ans (0,2)) et aussi sur les résidus frais (Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1)), provenant des deux sites miniers discutés au chapitre 2.

#### 3.2 Matériels et méthodes

Le protocole expérimental des tests de lixiviation est détaillé à l'annexe VII. Ce protocole est basé sur des études antérieures réalisées par Theis *et al.* (1994), et Yong et Theis (1991).

Le principe des tests de lixiviation des cyanures consistait à mettre dans des bouteilles en verre ambré d'une capacité de 750 ml, une quantité de 130 g de résidu minier et 650 ml d'une solution de 10 % de NaOH (APHA *et al.*, 1998; Theis *et al.*, 1994). En

parallèle et en triplicata, une même quantité de résidu a été mise en contact avec de l'eau désionisée dans les mêmes bouteilles et en maintenant toujours le ratio solide-liquide de 1:5 (Ray, 1984; Theis *et al.*, 1994). Les bouteilles ont été soumises à une agitation rotative à 30 rpm (MENV, 1985). Le pH de l'eau utilisée était en moyenne de 6,4 et variait de  $\pm 0,5$  d'un échantillon à l'autre. L'expérience s'est déroulée à température ambiante ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) pendant une période totale de 48 h. Cette période a été fixée en se basant sur les travaux de Yong et Theis (1991) où l'équilibre de désorption des cyanures à partir d'un sol était atteint à 48 h. Des échantillons d'eau et de soude ont été prélevés à 24 h et 48 h, ils ont été filtrés sur  $0,45 \mu\text{m}$  puis dosés pour les  $\text{CN}_T$ . De plus, à la période de 48 h, les échantillons d'eau ont été analysés pour les  $\text{CN}_{\text{WAD}}$ . Le pH a été suivi au temps 0 h, 24 h et 48 h. Les cyanures totaux ( $\text{CN}_T$ ) et les cyanures facilement dissociables ( $\text{CN}_{\text{WAD}}$ ) ont été analysés dans la phase liquide par le laboratoire externe Maxxam en utilisant respectivement les méthodes 4500-CN C et 4500-CN I de Standard Methods (APHA *et al.*, 1998). Les résultats des  $\text{CN}_T$  extraits à la soude servent de comparaison avec ceux des  $\text{CN}_T$  solubilisés dans l'eau. Les cyanures dosés dans la soude représentent la quantité maximale de  $\text{CN}_T$  pouvant être extraite du résidu, puisque les cyanures fortement complexés sont très solubles à pH alcalin. Les  $\text{CN}_{\text{WAD}}$  ont été évalués dans le but de savoir si l'on retrouve parmi les cyanures solubles, des cyanures faiblement complexés et facilement utilisables par les micro-organismes.

Afin de rejoindre l'objectif de cette expérience qui est l'étude de l'atténuation naturelle, il fallait faire l'extraction des cyanures dans l'eau désionisée sans ajout de tampon ou d'autres produits chimiques. Il faut mentionner que l'extraction en cuvée utilisée pour les tests de lixiviation, ne représente pas le lessivage réel des cyanures au sein de l'amas de résidu. Cette méthode a été utilisée pour accélérer le temps de contact de l'eau avec le résidu et ainsi évaluer la fraction maximale de cyanures capable de passer en phase aqueuse.



### 3.3 Résultats et discussion

Les tests de lixiviation étaient destinés à déterminer la proportion soluble dans l'eau de cyanures contenus les résidus miniers, et ainsi vérifier l'hypothèse que les cyanures peuvent être sujets à des phénomènes de transport qui contribuent à leur atténuation naturelle. Selon les résultats résumés au tableau 3.1, les échantillons Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) provenant des résidus frais ont révélé un pourcentage très élevé de solubilisation, respectivement de l'ordre de 71,8% et 67,7% en cyanures totaux ( $CN_T$ ) et de 23,6% et 22,4% en cyanures facilement dissociables ( $CN_{WAD}$ ). En revanche, les cyanures totaux et les  $CN_{WAD}$  extraits des échantillons Yv6 ans (0,2), Yv6 ans (1), Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1), provenant des vieux résidus, étaient non détectables.

Les résultats résumés au tableau 3.1 sont schématisés dans les figures 3.1 et 3.2, celles-ci représentent des graphiques traduisant la concentration des cyanures totaux (mg/l) retrouvée dans le liquide (eau ou NaOH) ainsi que la valeur du pH en fonction du temps d'échantillonnage. La concentration en  $CN_T$  dans l'eau désionisée à 48 h pour Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) est respectivement 4,18 et 4,33 mg/l comparativement à 5,8 et 6,4 mg/l dans le NaOH (voir figure 3.1). D'autre part, dans les échantillons des vieux résidus (Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1), Dy9 ans (0,2)) la concentration à 48 h est non détectable ( $<0,01$  mg/l) lors de l'extraction dans l'eau, alors que dans le NaOH elle est respectivement de l'ordre de 4,8, 1,3, 2,1 et 1,6 mg/l (voir figure 3.2). L'écart type calculé sur les valeurs des cyanures totaux dans l'extraction à l'eau montre que les résultats sont très reproductibles (voir Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) à la figure 3.1). Le pH du NaOH était de 13,8 tout le long de l'expérience pour les six échantillons (Dy3 mois (0,2), Dy3 mois (1), Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1) et Dy9 ans (0,2)). Cependant, dans la solubilisation à l'eau le pH variait de 9,1 au temps 0 h à 7,9 au temps 48 h dans le cas des échantillons Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1), et il se maintenait à une valeur d'environ 7,5 pour le reste des échantillons.

**Tableau 3.1** Pourcentage de solubilisation des  $CN_T$  et  $CN_{WAD}$  dans l'eau

<b>Échantillon</b>	<b><math>CN_{T_{50}}/CN_T</math> (%)<sup>c</sup></b>	<b><math>CN_{WAD\ sol}/CN_T</math> (%)<sup>c</sup></b>
<b>Dy3 mois (0,2)</b>	71,8	23,6
<b>Dy3 mois (1)</b>	67,7	22,4
<b>Yv6 ans (0,2)</b>	N.Q.	N.Q.
<b>Yv6 ans (1)</b>	N.Q.	N.Q.
<b>Dy9 ans (0,2)</b>	N.Q.	N.Q.
<b>Dy9 ans (1)</b>	N.Q.	N.Q.

<sup>c</sup> Calculé par rapport aux  $CN_T$  récupérés dans 10% de NaOH à la période de 48 h

N.Q. : Non quantifiable

Les résultats de lixiviation des cyanures totaux obtenus n'affichent pas de différence majeure entre les deux profondeurs (0,2 et 1 m). En revanche, l'échantillon Yv6 (0,2) dont les concentrations en  $CN_T$  dans le NaOH sont de 6 mg/l et 4,8 mg/l respectivement à 24 et 48 h ne révèle que 1,3 mg/l à 1 m de profondeur aux deux périodes d'échantillonnage (voir figure 3.2). Les valeurs non quantifiables obtenues dans les vieux résidus ne permettent pas de comparer les deux profondeurs (tableau 3.1).

Les résultats de cette expérience montrent que les cyanures des résidus frais sont facilement lixiviables, par contre ceux contenus dans les vieux résidus ne le sont pas du tout. Avec le temps, la fraction des cyanures solubles dans les vieux résidus aurait été dégradée suite à des phénomènes de transformation (oxydation, réduction avec les sulfures, biodégradation), ou encore elle aurait été sujette à des phénomènes de transport vers des nappes aquifères et des cours d'eau. L'absence des cyanures solubles dans les vieux résidus pourrait aussi être expliquée par l'évolution des cyanures vers des formes plus stables comme le bleu de Prusse ( $Fe_4 [Fe(CN)_6]_3$ ) lesquelles, à pH avoisinant la neutralité, ne sont pas solubles contrairement au pH alcalin (Meeussen *et al.*, 1992b). L'échantillon Yv6 ans (0,2) de la figure 3.2 supporte bien cette hypothèse car à pH 13,8

en moyenne 5,4 mg/l de cyanures totaux a été retrouvée, alors qu'à pH neutre aucun cyanure n'a pu être dosé. Il est de même pour le reste des échantillons des vieux résidus. Ceci porte à croire que les cyanures contenus dans ces échantillons sont tous sous la forme complexe et stable.

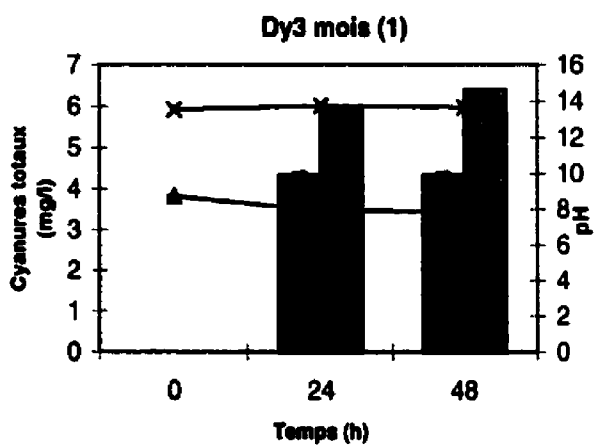
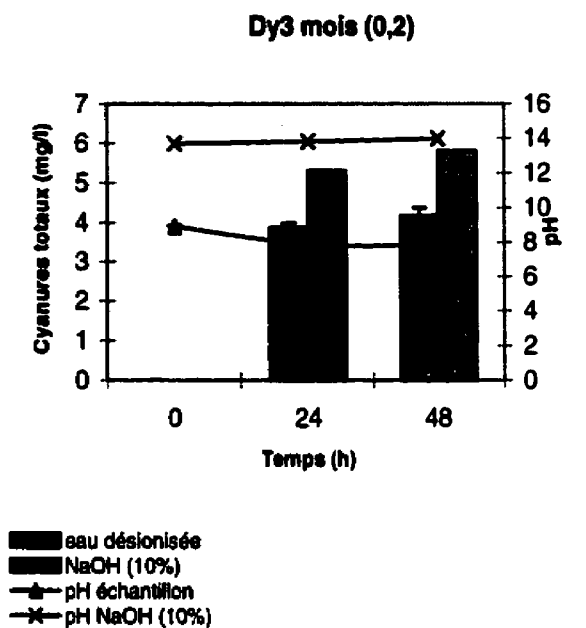
L'autre point important à soulever est la quantité de cyanures réellement présente dans le résidu qui n'a pas pu être dosée par la méthode 4500-CN C de Standard Methods. Cette méthode, comme discuté au paragraphe 2.3.1.2 du chapitre 2, présente un inconvénient quant au dosage des cyanures fortement complexés ( $CN_{SAD}$ ). Ces derniers restent liés à la matrice si elle n'est pas préalablement soumise à une extraction alcaline. Les concentrations en cyanures totaux dosées par la méthode 4500-CN C étaient 2,4, 4,8, 3,4, 2,4, 22 et 17 mg/kg respectivement pour Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1), Dy9 ans (0,2), Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2). Les nouvelles concentrations calculées à partir de l'extraction avec la solution de 10% de NaOH pour les mêmes échantillons sont respectivement 8,6, 31,2, 10,4, 13,7, 41,6 et 37,7 mg/kg. La différence entre les deux concentrations pourrait représenter la fraction de cyanures fortement complexée ( $CN_{SAD}$ ) et les précipités de cyanures, comme le bleu de Prusse, qui à pH acide restent fortement adsorbés à la matrice (Meeussen *et al.*, 1992b; Theis *et al.*, 1994; Yong et Theis, 1991).

Le rapport des concentrations des cyanures totaux, déterminées par la méthode 4500-CN C de Standard Methods, et celles calculées à partir de la lixiviation à 10 % de NaOH donne les valeurs 0,28, 0,15, 0,33, 0,18, 0,53 et 0,45 respectivement pour Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1), Dy9 ans (0,2), Dy3 mois (1) et Dy3 mois (0,2) (tableau 3.2). Ces valeurs dévoilent la proportion des  $CN_T$  quantifiable par la méthode 4500-CN C par rapport aux cyanures totaux réellement présents dans les résidus. Autrement dit, cette proportion représente la fraction de cyanures qui n'était pas fortement adsorbée à la matrice. En revanche, les valeurs données dans la dernière colonne du tableau 3.2, montrent le pourcentage de cyanures qui représenterait les  $CN_{SAD}$  fortement complexés

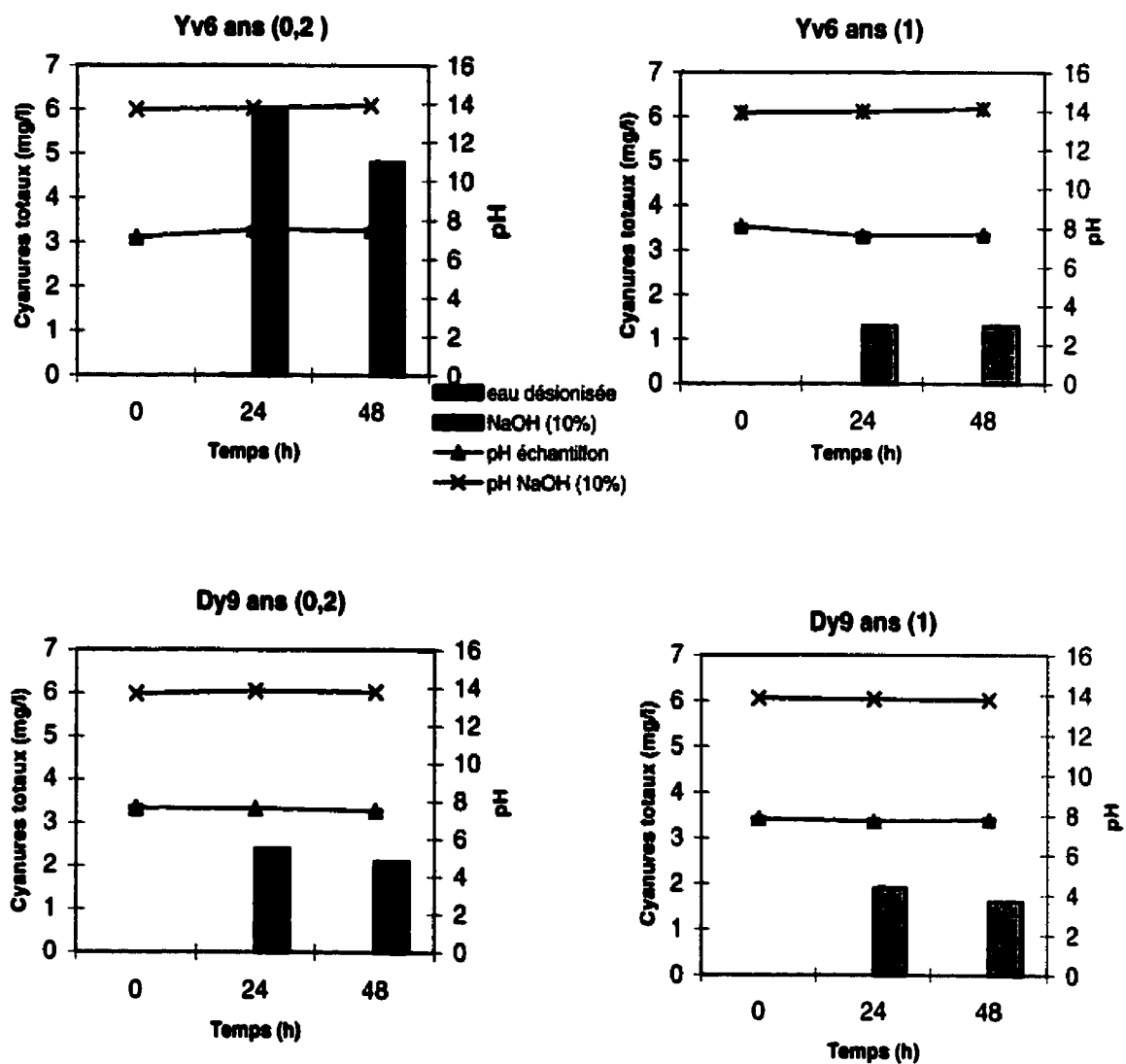
et les précipités de cyanures. On remarque bien que ces valeurs sont plus élevées à 20 cm comparativement à 1 mètre de profondeur et ce, pour les six échantillons. Cette différence s'expliquerait par le phénomène du lessivage des cyanures qui est plus important en surface qu'en profondeur.

**Tableau 3.2** Comparaison des  $CN_T$  (mg/kg) estimés par la méthode 4500-CN C avec ceux extraits dans 10% de NaOH

Échantillon	$CN_T$ 4500-CN C (A)	$CN_T$ (10% NaOH) (B)	A/B	B-A/B*100
Yv6 ans (0,2)	4,8	31,2	0,15	84,6
Yv6 ans (1)	2,4	8,6	0,28	72,1
Dy9 ans (0,2)	2,4	13,7	0,18	82,5
Dy9 ans (1)	3,4	10,4	0,33	67,3
Dy3 mois (0,2)	17	37,7	0,45	54,9
Dy3 mois (1)	22	41,6	0,53	47,1



**Figure 3.1** Comparaison des cyanures totaux des résidus frais extraits à l'eau désionisée avec ceux extraits à 10% de NaOH.



**Figure 3.2** Comparaison des cyanures totaux des vieux résidus extraits à l'eau désionisée avec ceux extraits à 10% de NaOH.

### 3.4 Conclusion

Les tests de lixiviation en cuvée ont montré que les résidus frais, recueillis aux deux profondeurs, possèdent un pourcentage élevé de solubilisation des cyanures totaux lorsque ces derniers ont été soumis à une agitation pendant 48 h. Un pourcentage assez considérable en cyanures facilement dissociables ( $CN_{WAD}$ ) a aussi été observé dans ces échantillons. Cependant, dans les quatre échantillons des vieux résidus les  $CN_T$  et  $CN_{WAD}$  étaient non détectables et ce, aux deux profondeurs (0,2 et 1 mètre).

Les cyanures contenus dans les vieux résidus seraient présents sous des formes complexes ou de précipités. D'autant plus que la spéciation des cyanures a montré l'absence des  $CN_{WAD}$  dans ces résidus. Cependant, les cyanures contenus dans les résidus frais ne sont pas stables et peuvent être sujets à des phénomènes de transport ou de transformation. En effet, la présence des cyanates et des thiocyanates dans l'eau des échantillons de résidus frais, comme il a été montré au chapitre 2, suggère l'implication de phénomènes de transformation des cyanures en des produits moins toxiques. Les  $CN_{WAD}$  présents dans les résidus frais à un pourcentage de 22% sont très réactifs et seront probablement sujets à des phénomènes de dégradation si les conditions y sont favorables. Pour vérifier cette hypothèse, deux phénomènes de transformation (la biodégradation et la volatilisation) seront étudiés dans les prochains chapitres.

## CHAPITRE 4

### 4 ÉTUDE DE LA BIODÉGRADATION DES CYANURES

#### 4.1 Introduction

La biodégradation est un phénomène important dans l'atténuation naturelle des cyanures puisqu'elle contribue à la transformation du polluant en produits non toxiques. Plusieurs bactéries et champignons (voir chapitre 1) sont capables de dégrader les cyanures. Les produits de la biodégradation sont alors, selon le type de micro-organismes et d'enzymes impliqués, le formate, le formamide, le dioxyde de carbone et l'ammoniac.

Les essais de biodégradation proposés dans ce chapitre consistent en une caractérisation du potentiel de biodégradation des cyanures par la microflore indigène des résidus miniers. Aucune biostimulation, bioaugmentation ou isolement de micro-organismes n'a donc été effectué. Cette expérience s'attardera, dans un premier temps, à l'étude du potentiel de minéralisation de cyanures libres ajoutés au résidu sous forme de  $K^{14}CN$  et de  $KCN$  et, dans un deuxième temps, au suivi de la biodégradation des cyanures déjà présents dans le résidu. La première partie a pour but de connaître si la microflore tolérante estimée au chapitre 2 a la capacité de dégrader des cyanures libres en  $CO_2$ . Dans cette partie, trois concentrations de cyanures libres (0, 5 et 10 mg/kg) ont été testées. La deuxième partie, par contre, était destinée à suivre la biodégradation naturelle des cyanures contenus dans le résidu en suivant dans le temps le formate, le formamide, les cyanures totaux et l'ammoniac. Aucun ajout de cyanures ou modification des conditions physico-chimiques n'a eu lieu dans la deuxième partie.



## **4.2 Matériels et méthodes**

### **4.2.1 Première partie : tests de minéralisation**

Le protocole détaillé des tests de minéralisation se trouve à l'annexe IV, P33-D, et à l'annexe IX, PSO A10.

Les tests de minéralisation ont été effectués sur les six échantillons : Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1), Dy9 ans (0,2), Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1). Le pH initial de ces échantillons était respectivement 8,3, 7,6, 7,4, 7,3, 10,5 et 10,6. Ces tests, réalisés en triplicata, consistaient à suivre le  $^{14}\text{CO}_2$  généré par la biodégradation complète du  $\text{K}^{14}\text{CN}$ . Le  $^{14}\text{CO}_2$  est ensuite compilé sous forme de pourcentage cumulatif, puis représenté par des courbes de minéralisation en fonction du temps.

Les tests de minéralisation ont été réalisés suite à des essais préliminaires qui avaient pour but, dans un premier temps, de vérifier l'existence d'un potentiel de minéralisation et, dans un deuxième temps, de fixer les intervalles d'échantillonnage. Pour ce faire, quatre essais ont été réalisés sur les échantillons à 0,2 m de profondeur (Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (0,2), Dy3 mois (0,2)). Les échantillons à 0,2 m ont été choisis dans l'espoir d'obtenir un meilleur potentiel de minéralisation à cette profondeur. Le premier essai consistait à ajouter uniquement du  $\text{K}^{14}\text{CN}$  (100 000 dpm) (activité spécifique 18,5 mCi/mmol, P6431, 500 $\mu\text{Ci}$ , Sigma Chemicals, St-Louis, MO) au résidu. Le deuxième était de savoir si l'on obtenait une minéralisation en présence d'une contamination de 5 mg/kg en CN. Le troisième et le quatrième étaient prévus dans le cas où les deux premiers ne fonctionneraient pas, et ils consistaient à ajouter au résidu des minéraux et une source d'azote en plus du  $\text{K}^{14}\text{CN}$ . Les résultats de ces essais ont montré l'existence d'un potentiel de minéralisation dans les quatre différents essais et sur les trois échantillons (voir annexe IV, PE P33-D). Le but de ce projet étant l'étude de l'atténuation naturelle des cyanures, seuls les essais sans ajout de minéraux et de source

d'azote (les deux premiers essais) ont été retenus pour l'expérience de minéralisation. À ces essais, un troisième essai a été ajouté et consistait à additionner le  $K^{14}CN$  au résidu en présence de 10 mg/kg de  $CN^-$  (voir tableau 4.1). Ces différents essais ont été envisagés afin de voir l'effet de la concentration des cyanures sur la minéralisation.

Pour chacun des trois essais résumés dans le tableau 4.1, une masse de 20 g de résidu minier a été pesée dans une bouteille sérologique de 125 ml. Le premier essai consistait à ajouter 100 000 dpm de  $K^{14}CN$  au résidu et à suivre la formation du  $^{14}CO_2$ . Cet essai représente la contamination 0 mg/kg, puisque le cyanure non radiomarqué (froid) n'a pas été additionné au microcosme (100 000 dpm de  $K^{14}CN$  ajouté à 20 g de résidu représente une concentration négligeable de 0,0032 mg/kg en  $^{14}CN^-$ ). Lors du deuxième essai, 1 ml d'une solution de 100 mg/l de KCN (UN1680, 500g, Mallinckrodt Baker, Paris, Kentucky) mélangé avec 100 000 dpm de  $K^{14}CN$  a été ajouté au résidu minier pour obtenir une contamination de 5 mg/kg. Enfin, le troisième essai consistait à doubler la concentration pour arriver à une contamination de 10 mg/kg dans le résidu. Les bouteilles sérologiques ont été munies d'une trappe à  $CO_2$  qui contenait 1 ml de KOH *IN* puis, elles ont été scellées au moyen d'une valve mininert très étanche pour empêcher les fuites du  $^{14}CO_2$ . Les microcosmes ont été incubés à l'obscurité et à température ambiante ( $23 \pm 1^\circ C$ ). Un témoin abiotique, préparé de la même façon pour chaque essai, contenait de plus 0,2% (p/p) d'azoture de sodium (AC-8240P, UN-1687 (500g), Anachemia, Montréal, Qc) (Matteau, 1996). Ce témoin a été réalisé afin de comparer les milieux biotique et abiotique, et ainsi mesurer les pertes des cyanures dues aux mécanismes physico-chimiques (volatilisation sous forme de  $H^{14}CN$ ). L'azoture de sodium peut, cependant, causer une augmentation du pH de l'échantillon et par conséquent diminuer l'effet de volatilisation du HCN et ainsi sous estimer les pertes abiotiques du carbone radiomarqué. Wolf *et al.* (1989) ont remarqué une augmentation du pH de 0,4 unités lorsque des échantillons de sols ont été traités avec 200 mg/kg d'azoture de sodium. Dans cette expérience, 10 fois cette concentration a été ajoutée dans les témoins abiotiques. Le suivi du pH dans les vieux résidus a, en effet, révélé une

augmentation entre 0,8 et 1 unités de pH. Étant donné le pH neutre des vieux résidus, l'augmentation du pH d'une unité n'a pas d'effet majeur sur la volatilisation du HCN dans le témoin abiotique. Cependant, dans les autres expériences, l'azoture de sodium a été changé par le chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ), tel que recommandé par Wolf *et al.*, (1989), car il s'est avéré un poison efficace qui affecte très peu les caractéristiques physico-chimiques d'un sol.

**Tableau 4.1** Différents essais réalisés dans les tests de minéralisation

<b>Essai I :</b> résidu minier + $\text{K}^{14}\text{CN}$ (0 mg/kg) →	témoin abiotique
<b>Essai II :</b> résidu minier + $\text{K}^{14}\text{CN}$ + $\text{CN}^-$ (5 mg/kg) →	témoin abiotique
<b>Essai III :</b> résidu minier + $\text{K}^{14}\text{CN}$ + $\text{CN}^-$ (10 mg/kg) →	témoin abiotique

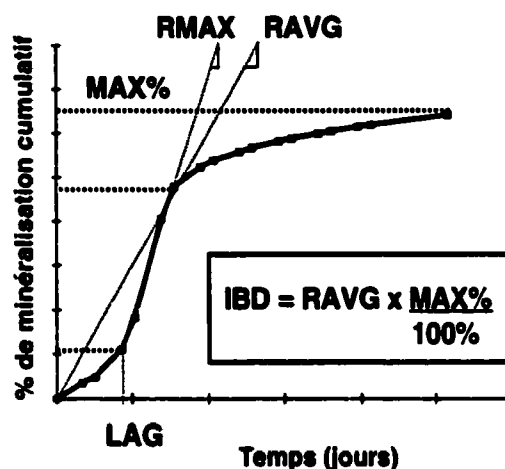
L'échantillonnage des microcosmes a été effectué en prélevant le KOH (qui a servi à absorber le  $^{14}\text{CO}_2$ ) et en le transférant dans une fiole contenant 10 ml de liquide à scintillation (Optiphase HiSafe'3, Wallac, Turku, Finland). Le mélange contenant le KOH a ensuite été analysé à l'aide du compteur à scintillation Wallac modèle 1409 (Wallac, Turku, Finland). Le temps d'échantillonnage a été fixé grâce aux essais préliminaires.

Du KCN a été ajouté au résidu, au lieu d'un cyanure complexé, dans le but de savoir si la microflore indigène est capable de minéraliser les cyanures libres. Les résidus, comme l'ont montré les résultats du chapitre 2 et 3, sont plutôt contaminés avec des cyanures complexés ( $\text{CN}_{\text{SAD}}$ ). L'utilisation des cyanures libres est due au fait qu'ils constituent la forme la plus toxique et la plus assimilée par les micro-organismes. De plus, il peut arriver, suite à un changement de conditions du site (pH, POR), que les  $\text{CN}_{\text{SAD}}$  soient solubilisés, puis dissociés pour libérer des  $\text{CN}^-$ , comme c'est le cas pour les ferro ferri cyanures qui se décomposent rapidement en  $\text{CN}^-$  sous l'effet de la lumière (Aronstein *et al.*, 1994; Meussen *et al.*, 1992b).

Afin de pouvoir interpréter les courbes de minéralisation et de les comparer entre elles, des paramètres mis au point par Millette *et al.* (1995) ont été utilisés. Pour une courbe de minéralisation standard comprenant une phase de latence, une phase exponentielle et une période de ralentissement de la minéralisation, Millette *et al.* (1995) ont défini cinq paramètres (MAX%, RAVG, RMAX, LAG, IBD) (voir tableau 4.2). Ces paramètres sont schématisés dans la figure 4.1. Les paramètres qui seront estimés dans cette étude sont le % MAX, le RAVG, l'IBD, et parfois le LAG. Le RMAX ne sera pas calculé car la période de latence (LAG), dont il tient compte, est absente dans la majorité des courbes de minéralisation obtenus (voir les résultats au paragraphe 4.2). L'indice de biodégradation est le paramètre clé qui va servir à comparer le potentiel de minéralisation entre les échantillons. Cet indice, tenant compte du taux moyen de minéralisation (RAVG) et du pourcentage MAX, est d'autant plus élevé que la microflore indigène du résidu possède une grande capacité de minéralisation.

**Tableau 4.2** Définition des paramètres d'une courbe de minéralisation (Millette *et al.*, 1995)

Paramètre	Définition	Unités	Méthode de calcul
MAX%	Pourcentage maximal de minéralisation atteint	%	% maximal atteint sur la courbe
RAVG	Taux moyen de minéralisation	% / jour	$\frac{2/3 \text{ MAX}}{\text{Temps à } 2/3 \text{ MAX}}$
RMAX	Taux maximal de minéralisation atteint	% / jour	$\frac{(2/3 \text{ MAX} - 1/5 \text{ MAX})}{(\text{Temps } 2/3 \text{ MAX} - \text{Temps } 1/5 \text{ MAX})}$
LAG	Période de latence	jours	Temps à $1/5 \text{ MAX}$
IBD	Indice de biodégradation	% / jour	$\text{RAVG} \times \frac{\% \text{ MAX}}{100\%}$



**Figure 4.1** Représentation des paramètres d'une courbe de minéralisation.

#### 4.2.2 Deuxième partie : tests de biodégradation

Les protocoles des tests de biodégradation ainsi que la méthode du dosage du  $\text{NH}_3$  figurent dans l'annexe IV, P33-D et l'annexe V, P33-E.

Cette partie comprend deux séries (A et B). La série A, où le formate, le formamide, les cyanures totaux et l'azote ammoniacal dissous ( $\text{NH}_4^+$ ) ont été suivis, a été réalisée uniquement sur deux échantillons Yv6 ans (0,2) et Dy3 mois (0,2) à cause des coûts élevés des analyses de formate et de formamide. Ces deux échantillons provenant respectivement des vieux résidus et des résidus frais ont été choisis à titre de comparaison. Le choix de Yv6 ans (0,2) au lieu de Dy9 ans (0,2) est dû au fait que le premier offrait un plus grand potentiel de biodégradation des cyanures libres (voir les résultats des tests de minéralisation). La série B, réalisée sur tous les échantillons, consistait à suivre uniquement le  $\text{NH}_3$  (le  $\text{NH}_3$  est la forme gazeuse de l'azote ammoniacal, lorsque le pH est inférieur à 9,2 la forme protonnée ( $\text{NH}_4^+$ ) est majoritaire, et lorsque le pH devient supérieur à 9,2 c'est le  $\text{NH}_3$  qui domine). Les tests de

biodégradation comparativement à ceux de minéralisation, étaient plus destinés à suivre les cyanures contenus dans le résidu. Aucune contamination artificielle n'a donc été effectuée.

### 1) Série A

La série A, réalisée en triplicata, consistait à peser 400 g de résidu minier dans un contenant en verre de 1,5 litres. Un témoin abiotique additionné de 0,5% de chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) (UN-1624, Anachemia Canada, Montréal, QC) a été réalisé de la même manière (Wolf *et al.*, 1989). Dix fois la quantité en  $\text{HgCl}_2$  recommandée par Wolf *et al.* (1989) a été utilisée pour être sûr d'avoir éliminé la microflore. Il faut noter que l'échantillon Yv6 ans (0,2) dans cette série a été stérilisé à l'aide de 0,2 % d'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ). Au cours de l'expérience, il s'est avéré que le  $\text{NaN}_3$  biaisait les résultats en se transformant facilement en ammoniac. Il a donc été remplacé par du chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) pour l'échantillon Dy3 mois (0,2). Les échantillons ont été incubés à la noirceur et à température ambiante ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Le suivi de la série A a été fait sur une période de 96 jours comprenant au total 5 points d'échantillonnage.

Dans cette série les métabolites de biodégradation (formate, formamide,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CN}_T$ ) ont été analysés dans les mêmes intervalles de temps. Le formate et le formamide dans le résidu minier ont été analysés par le Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ). La technique utilisée était une extraction suivie d'une analyse par chromatographie liquide haute performance (Kunz *et al.*, 1992). L'extraction du formate et formamide a été réalisée en agitant manuellement 2 g de résidu 3 fois avec 1 ml, 0,5 ml et 0,4 ml d'eau purifiée en présence d'un agent d'extraction (200  $\mu\text{g}$  d'acide succinique). Le volume final a été ajusté à 2 ml. Un volume de 100  $\mu\text{l}$  de l'extrait a ensuite été injecté dans l'HPLC (HP-CHEM, Varian Vista 5500) muni d'un détecteur UV ajusté à une longueur d'onde de 210 nm. La séparation était obtenue avec une colonne pour les acides gras 300 par 7,8 mm. L'éluant (phase mobile) était constitué de

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,015 N) et EDTA (0,4 mM), et fonctionnait avec un débit de 0,5 ml/min en mode isocratique. Le temps de rétention pour le formate et le formamide était respectivement de 17,3 et 30,3 min.

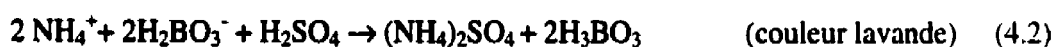
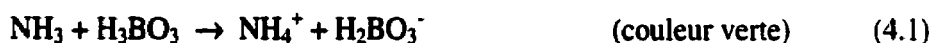
Les cyanures totaux ont été dosés par le laboratoire externe Maxxam analytique selon la méthode 4500 CN C de APHA *et al.* (1998). Le NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a aussi été analysé par le laboratoire Maxxam selon la méthode HACH. Brièvement, cette méthode consiste en une extraction de l'azote ammoniacal, avec une solution de KCl, suivie d'une filtration et d'une addition de l'iodure de mercure. Le filtrat est ensuite analysé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 425 nm (informations obtenues de la compagnie Maxxam).

## 2) Série B

La série B a été réalisée en triplicata sur tous les échantillons Yv6 ans (1), Yv6 ans (0,2), Dy9 ans (1), Dy9 ans (0,2), Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1). Cette série a été prévue pour suivre uniquement l'ammoniac gazeux (NH<sub>3</sub>). Une quantité de 20 g de résidu a été mise dans des bouteilles sérologiques de 125 ml munies de valves mininert. Par la suite, une trappe à NH<sub>3</sub> contenant 4 ml d'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) (AC-1309, (500g) Anachemia, Montréal, QC) a été déposée dans la bouteille. Des témoins abiotiques, dont la microflore a été éliminée par l'ajout de 0,5% (p/p) de HgCl<sub>2</sub>, ont été réalisés pour chaque échantillon. Les bouteilles ont été incubées dans l'obscurité et à température ambiante (23 ± 1°C).

Le dosage du NH<sub>3</sub> était basé sur la méthode 4500-NH<sub>3</sub> C décrite par APHA *et al.* (1998). Cette méthode a été développée et adaptée aux cyanures au cours de ce projet. Le principe de cette méthode est simple. L'acide borique en présence du NH<sub>3</sub> donne lieu à l'ion ammonium et au borate (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub><sup>-</sup>), qui se forment selon l'équation (4.1). La couleur initiale de l'acide borique, additionné d'un indicateur coloré, étant lavande,

en présence du borate le milieu devient basique d'où l'apparition de la couleur verte. Le borate, considéré comme une base forte selon la théorie de Brønsted, est ensuite titré avec l'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,02N (pureté 95-98%, AC-8750, UN-1830, Anachemia, Montréal, QC) jusqu'au retour de la couleur lavande (équation 4.2). Pour connaître la normalité exacte de l'acide sulfurique, il a été standardisé à l'aide d'une solution de carbonate de sodium (0,05 N) (Anachemia 8290N, Étalon Primaire, Montréal, QC). Le  $\text{NH}_3$  dissout dans l'acide borique est quantifié en connaissant le volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  consommé au point d'équilibre (pour plus de détails voir PE P33-E à l'annexe V).



### 4.3 Résultats et discussion

#### 4.3.1 Première partie : tests de minéralisation

Un potentiel de minéralisation montrant la présence de micro-organismes dégradeurs de cyanures libres a été observé sur tous les échantillons étudiés dans cette première partie, soient Yv6 ans (0,2), Yv6 ans (1), Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1) provenant des vieux résidus et Dy3 mois (0,2), Dy3 mois (1) provenant des résidus frais. Les résultats sont présentés sous formes de courbes de minéralisation dans les figures 4.2, 4.3 et 4.4. Ces dernières présentent le pourcentage de dégradation du cyanure radiomarqué en fonction du temps. Pour chacune des courbes obtenues le %MAX, le RAVG et l'IBD ont été évalués. Le LAG a été calculé uniquement pour les courbes présentant une phase de latence apparente. Les valeurs de ces paramètres sont regroupées dans les tableaux 4.3, 4.4 et 4.5.



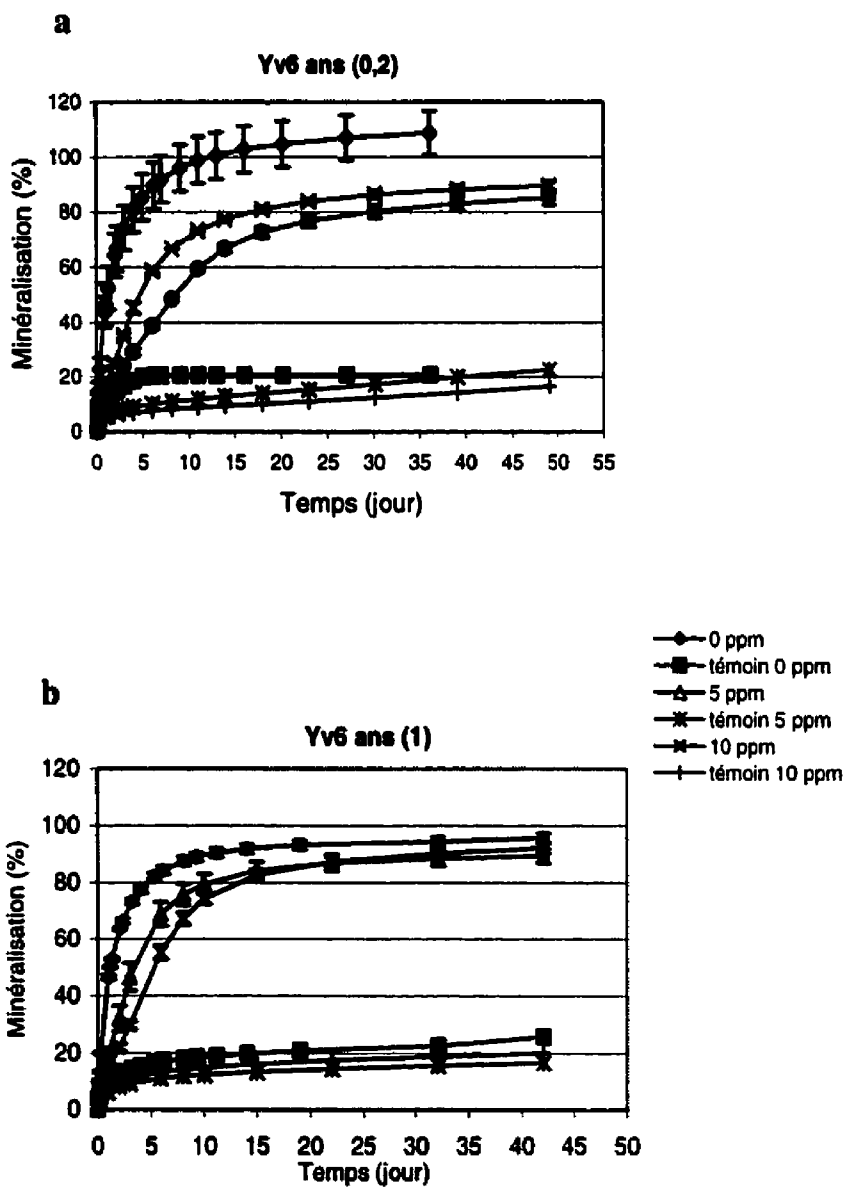
L'échantillon Yv6 ans (0,2) montre le plus grand potentiel de biodégradation lorsque la concentration en cyanure est 0 mg/kg en CN<sup>-</sup>. Yv6 ans (0,2) affiche, à cette concentration, l'indice de biodégradation (IBD) le plus élevé de l'ordre de 30,3 %/jour, un %MAX de 100% et un taux de minéralisation moyen (RAVG) de 30,3 %/jour. Aussi, la cinétique de minéralisation est très importante dans cet échantillon, le %MAX a été atteint en 11 jours à la concentration de 0 mg/kg (figure 4.2a). La phase exponentielle se situe dans l'intervalle 0 à 11 jours. L'échantillon Yv6 ans (1) montre, lorsque la concentration est 0 mg/kg, un IBD de 29,6 %/jour légèrement inférieur à celui de Yv6 ans (0,2) dont la valeur est de 30,3 %/jour. La phase stationnaire a été atteinte au jour 11 et le %MAX est de 95,6% (voir tableau 4.3).

Dans les deux échantillons Yv6 ans (0,2) et Yv6 ans (1), lorsque la concentration des cyanures augmente le taux de minéralisation (RAVG) diminue et, par conséquent, l'indice de biodégradation décroît. Dans le cas de l'échantillon Yv6 ans (0,2), l'IBD descend de la valeur de 30,3 %/jour pour une concentration de 0 mg/kg à 8,5 %/jour, puis à 4,7 %/jour, lorsque les concentrations sont, respectivement, de 5 et 10 mg/kg. Dans l'échantillon Yv6 ans (1), les valeurs respectives des IBD dans l'ordre croissant des concentrations sont 29,6, 11,3 et 8,1 %/jour. La diminution de l'indice de biodégradation en fonction des concentrations en cyanures ajoutés paraît tout à fait logique car la toxicité devient de plus en plus importante avec l'augmentation de la concentration des cyanures. Les micro-organismes deviennent, apparemment, moins résistants lorsque les concentrations sont fortes. Ceci pourrait être expliqué par l'acclimatation de la microflore à des concentrations plus faibles que 10 mg/kg, puisque l'échantillon Yv6 ans est faiblement contaminé (en moyenne 3,2 mg/kg).

Les courbes des témoins abiotiques dans les deux échantillons Yv6 ans (0,2) et Yv6 ans (1) demeurent en dessous de la valeur de 25 % dans le cas des trois concentrations 0, 5 et 10 mg/kg (voir figure 4.2). Ce pourcentage relativement élevé serait lié à la volatilisation du H<sup>14</sup>CN. Silva et Beone (1999) ont obtenu, lorsqu'ils ont utilisé des tests

respirométriques avec du  $K^{14}CN$  en présence de 100 mg/kg de KCN, 14% de volatilisation du  $^{14}CN$  sous forme de  $H^{14}CN$  et 60 % de minéralisation.

Les écarts types obtenus sur les courbes des échantillons Yv6 ans (0,2) et Yv6 ans (1) sont très petits montrant que les tests de minéralisation réalisés en triplicata sont en effet reproductibles. Cependant, l'écart type de la courbe 0 mg/kg de Yv6 ans (0,2), variant de 5 à 8 %, est assez grand en le comparant aux autres concentrations (5 et 10 mg/kg). De plus, cette courbe dépasse 100 % après le onzième jour. Cette déviation s'explique, en grande partie, par la valeur de l'écart type. En effet, la borne inférieure de l'intervalle au dernier point se situe très près de 100%. De plus, lors de l'essai préliminaire, réalisé sur le même échantillon et à la même concentration (voir l'annexe IV, P33-D), les écarts types étaient plus petits et la courbe demeurait près du niveau 100%.



**Figure 4.2** Courbes de minéralisation du  $K^{14}CN$  dans les échantillons a) Yv6 ans (0,2) et b) Yv6 ans (1).

**Tableau 4.3** Paramètres de minéralisation pour Yv6 ans (0,2) et Yv6 ans (1)

	Yv6 ans (0,2)			Yv6 ans (1)		
	0 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	0 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
<b>%MAX<sup>a</sup></b> (%)	108,7 <sup>b</sup> ± 7,7	89,6 ± 1,5	85,2 ± 2,6	95,6 ± 1,6	89,3 ± 2,5	92,0 ± 1,6
<b>RAVG</b> (%/jour)	30,2	9,5	5,6	30,9	12,7	8,8
<b>LAG</b> (jour)	non visible	non visible	1,6	non visible	non visible	non visible
<b>IBD</b> (%/jour)	30,3	8,5	4,7	29,6	11,3	8,1

<sup>a</sup> les résultats sont présentés sous forme de % ± écart type (n = 3)

<sup>b</sup> la valeur de 100% a été utilisée pour les calculs

La microflore des échantillons Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1) a aussi montré un potentiel de minéralisation très élevé (figure 4.3). En ce qui concerne l'échantillon Dy9 ans (0,2) un IBD de l'ordre de 13,3 %/jour, un %MAX de 100% et un RAVG de 13,3 %/jour ont été obtenus à la concentration de 0 mg/kg en CN<sup>-</sup> (voir tableau 4.4). Le %MAX a été atteint en 37 jours à la concentration de 0 mg/kg en CN<sup>-</sup> (figure 4.3a). Le potentiel de minéralisation dans l'échantillon Dy9 ans (1) est plus élevé que celui dans Dy9 ans (0,2) (figure 4.3b). Lorsque la concentration en CN<sup>-</sup> est 0 mg/kg, un IBD de 17,9 %/jour et un taux de minéralisation moyen de 19,0 %/jour ont été estimés dans Dy9 ans (1). Le %MAX a été atteint au 32<sup>ème</sup> jour. Cependant, le %MAX de 94,1% est légèrement inférieur à celui de Dy9 ans (0,2) (voir tableau 4.4).

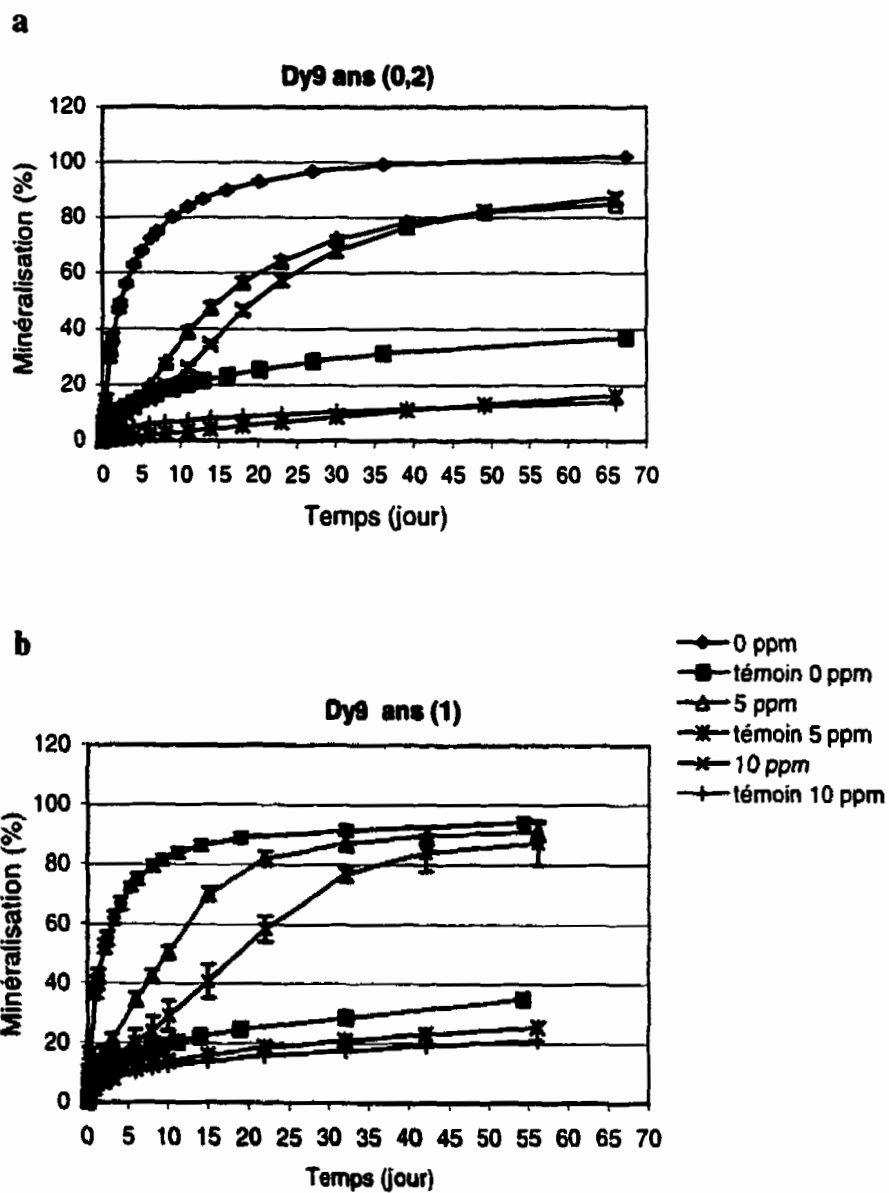
La même relation, observée sur les échantillons Yv6 ans (0,2) et Yv6 ans (1), concernant la variation inversement proportionnelle du taux de minéralisation avec la concentration des cyanures a été constatée pour les échantillons Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1). Pour l'échantillon Dy9 ans (0,2), les valeurs respectives des IBD dans l'ordre croissant des concentrations en cyanures sont 13,7, 2,6 et 2,2 %/jour, alors que celles de l'échantillon Dy9 ans (1) sont de 17,9, 4,4 et 2,3 %/jour. Les indices de biodégradation sont beaucoup

plus faibles que ceux observés pour les échantillons Yv6 ans (0,2) et Yv6 ans (1), et cela, quelle que soit la concentration de cyanures libres ajoutée. La microflore indigène des échantillons Yv6 ans aux deux profondeurs possède, alors, un potentiel de minéralisation des cyanures libres plus élevé que celui de Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1). Les résultats des dénombrements, dans la caractérisation microbiologique, montrent, en effet, un nombre de micro-organismes tolérants plus important dans les échantillons Yv6 ans par rapport à Dy9 ans. Cette différence pourrait expliquer le potentiel élevé de minéralisation dans Yv6 ans.

Les courbes des témoins abiotiques dans les deux échantillons Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1) demeurent en dessous de la valeur de 25 % sauf pour celle de 0 mg/kg qui atteint environ 40% lors du dernier point d'échantillonnage. Ce pourcentage élevé serait lié à la volatilisation du  $H^{14}CN$  à cause du pH neutre (~ 7) de ces échantillons.

Les pourcentages MAX obtenus dans les quatre échantillons Yv6 ans (0,2), Yv6 ans (1), Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1) et aux trois concentrations (0, 5 et 10 mg/kg) sont des pourcentages très élevés. Des valeurs avoisinant ces pourcentages de minéralisation des cyanures ont déjà été obtenues dans la littérature par des bactéries isolées et acclimatées. Un pourcentage MAX de minéralisation de 70% après 120h d'incubation a été observé par Chatatwala *et al.* (1998) lorsqu'ils ont étudié la biodégradation du  $Na^{14}CN$  en présence de 4 mM de NaCN par la bactérie *Pseudomonas putida* immobilisée dans les billes d'alginate. Or, les pourcentages MAX obtenus à 10 mg/kg pour les quatre échantillons Yv6 ans (0,2), Yv6 ans (1), Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1) sont, respectivement, 85, 92, 87 et 87 % après 939 h, 1008 h, 1584 h et 1344 h d'incubation. Ces valeurs, obtenues avec la microflore indigène, sont plus élevées que celles obtenues avec la *Pseudomonas putida* immobilisée dans l'alginate. Cependant, le temps pour atteindre le pourcentage MAX est beaucoup plus petit dans le cas de la *Pseudomonas*. Ceci est dû, en majeure partie, aux conditions optimales dans lesquelles ont eu lieu les

essais de biodégradation (isolation et immobilisation de la bactérie, aération, etc.), ce qui n'a pas été le cas pour cette expérience.



**Figure 4.3** Courbes de minéralisation de  $K^{14}CN$  dans les échantillons a) Dy9 ans (0,2) et b) Dy9 ans (1).

**Tableau 4.4** Paramètres de minéralisation pour Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1)

	Dy9 ans (0,2)			Dy9 ans (1)		
	0 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	0 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
<b>%MAX<sup>c</sup></b> (%)	102,0 <sup>d</sup> ± 0,1	84,9 ± 0,3	87,2 ± 1,8	94,1 ± 1,5	91,1 ± 3,0	87,3 ± 7,4
<b>RAVG</b> (%/jour)	13,3	3,1	2,5	19,0	4,8	2,7
<b>LAG</b> (jour)	non visible	6,0	7,1	non visible	2,4	4,6
<b>IBD</b> (%/jour)	13,3	2,7	2,2	17,9	4,4	2,3

<sup>c</sup> les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type (n = 3)

<sup>d</sup> la valeur de 100% a été utilisée pour les calculs

Les échantillons Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) ont aussi montré un potentiel de minéralisation assez considérable (figure 4.4 et tableau 4.5) prouvant ainsi, l'existence de micro-organismes et, spécifiquement, les dégradeurs de cyanures libres. Cependant, les mêmes échantillons n'ont révélé aucune présence de micro-organismes dans les dénombrements sur boîtes de Pétri (voir résultats de la caractérisation microbiologique au chapitre 2). L'absence de microflore, constatée lors du dénombrement, serait alors liée à la méthode des comptes viables qui s'avère inadéquate pour l'estimation d'un petit nombre de micro-organismes. En effet, le désavantage de cette méthode, dévoilant une fraction minime de la diversité totale d'un sol, a été noté par Torsvik *et al.* (1998). Ces auteurs ont rapporté que la croissance des bactéries (UFC) sur l'agar est de 10% du nombre total existant dans les sols fertiles, et varie de 0,1% à 1% du nombre total dans les sols forestiers.

Contrairement aux échantillons Yv6 ans (0,2), Yv6 ans (1), Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1) qui ont montré, respectivement, des IBD de 30,3, 29,6, 13,4 et 17,9%/jour et des RAVG de 30,3, 30,9, 13,3 et 19,0 %/jour à la concentration de 0 mg de CN/kg, les IBD calculés pour Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) sont de 1,2 et 1,1 %/jour, respectivement, et les

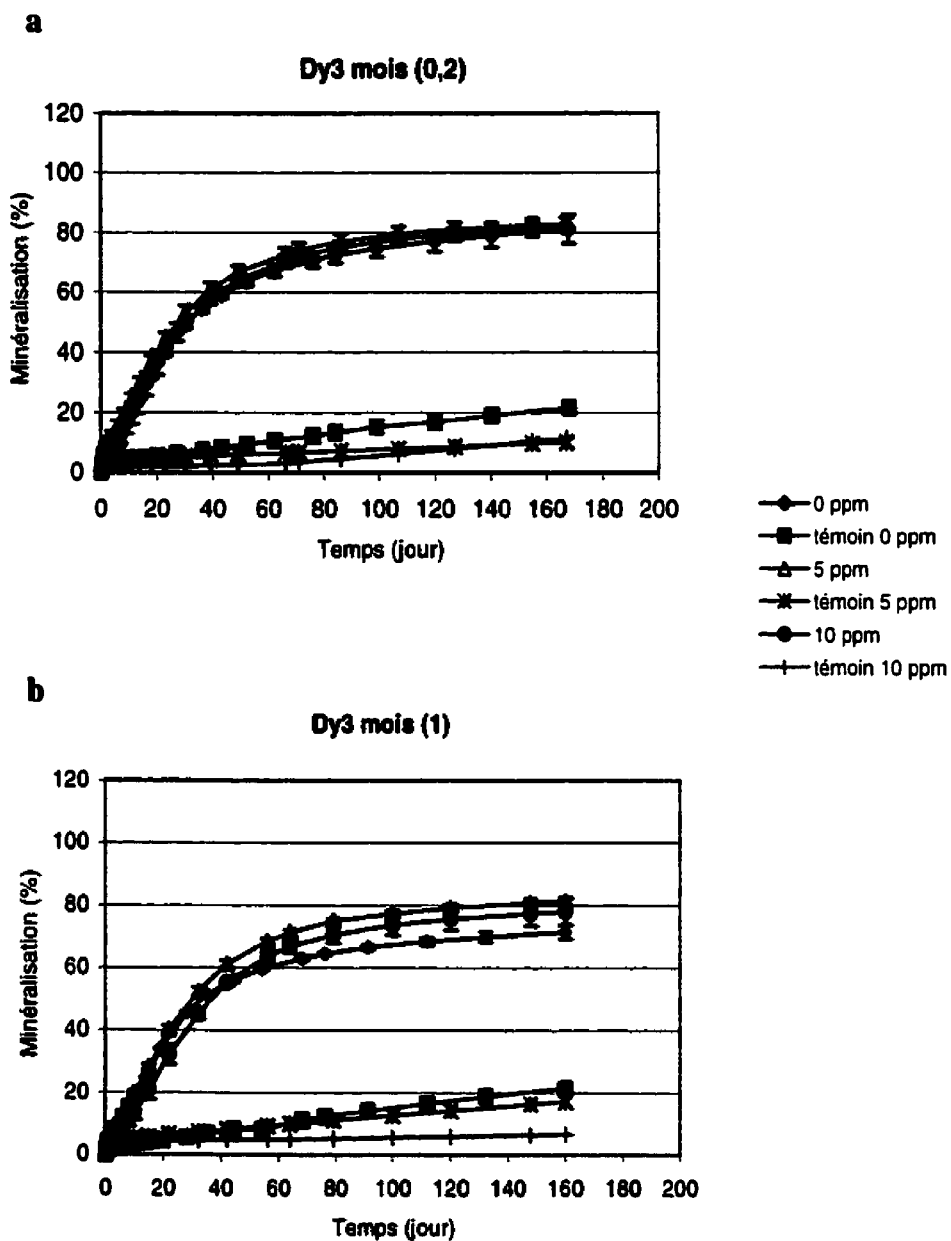


RAVG sont estimés à 1,5 et 1,5 %/jour à la même concentration (voir tableau 4.5). Ces taux impliquent que la cinétique de minéralisation dans ces échantillons est beaucoup plus lente que celle de Yv6 ans et Dy9 ans comme il est, d'ailleurs, indiqué dans le tableau 4.6 où les constantes de cinétiques calculés pour les échantillons des résidus frais sont plus petites que celles obtenues dans les vieux résidus. En effet, le pourcentage MAX dans Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) a été atteint après environ 160 jours d'incubation comparativement à 11 jours pour Yv6 ans (0,2) par exemple. Cette cinétique lente est probablement due à la présence d'une petite communauté microbienne qui n'a pas encore eu le temps de se développer en grand nombre à cause du jeune âge des résidus frais. Le pH basique (10,6) de ces derniers serait une autre raison pour laquelle la cinétique de minéralisation est plus lente dans les résidus frais. L'effet du pH basique sur la cinétique de dégradation des cyanures a déjà été rapporté par Dumestre *et al.* (1997a) et Fedel-Moen *et al.* (2000). Les %MAX de l'ordre de 80% et de 71,5 % ont été atteints en 142 et 160 jours respectivement pour Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) lorsque la concentration était 0 mg/kg en CN.

Les indices de biodégradation à 5 et 10 mg/kg pour chacun des deux échantillons Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) sont très comparables à ceux de 0 mg/kg. Pour l'échantillon Dy3 mois (0,2), les IBD à 5 et 10 mg/kg sont respectivement de 1,4 et 1,2 %/jour, et valent 1,2 et 1,1 %/jour pour Dy3 mois (1). La microflore de ces deux échantillons ne semble donc pas avoir été affectée par l'augmentation de la concentration des cyanures libres contrairement à ce qu'il a été observé dans les échantillons des vieux résidus (Yv6 ans et Dy9 ans). En effet, les trois courbes (0, 5 et 10 mg/kg) sont superposées dans Dy3 mois (0,2) (figure 4.4a), alors que celles de 5 et 10 mg/kg dans Dy3 mois (1) dépassent légèrement la courbe de 0 mg/kg (figure 4.4b). Le comportement similaire de Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) aux trois concentrations en CN (0, 5 et 10 mg/kg) pourrait s'expliquer par l'acclimatation de la microflore à des concentrations plus élevées que 5 et 10 mg/kg puisque ces échantillons étaient initialement contaminés à 17 et 22 mg/kg respectivement, alors que les vieux résidus l'étaient, en moyenne, à 3,2 mg/kg.

Les taux moyens de minéralisation (RAVG) dans les échantillons Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) aux concentrations de 5 et 10 mg/kg en CN<sup>-</sup> restent toutefois assez comparables avec ceux de 0 mg/kg traduisant, ainsi, une cinétique aussi lente. Ces taux valent, à 5 mg/kg, 1,7 et 1,5 %/jour respectivement pour Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1), et à 10 mg/kg, ils sont estimés à 1,5 et 1,3 %/jour dans l'ordre respectif des échantillons. Malgré la cinétique lente de minéralisation, les pourcentages maximums atteints dans ces échantillons sont assez élevés. À la concentration de 5 mg en CN<sup>-</sup>/kg, les %MAX sont de 82,9% et 81,2% respectivement pour Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1), et ils valent à la concentration de 10 mg en CN<sup>-</sup> /kg 81,6% et 77,9% (voir tableau 4.5). Les pourcentages MAX élevés obtenus dans les échantillons Dy3 mois montrent, de plus, que la microflore indigène de ces échantillons est capable de minéraliser les cyanures à pH alcalin. La biodégradation des cyanures complexés à pH 10 a déjà été observée par Fedel-Moen *et al.* (2000) lorsqu'ils ont utilisé des micro-organismes indigènes contenus dans des résidus miniers et biostimulés avec des nutriments minéraux et un substrat organique (peptone).

Les courbes des témoins abiotiques dans les deux échantillons Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1) sont restées en dessous du niveau de 20 %, et cela quelle que soit la concentration. Ce pourcentage, quatre fois plus petit que le pourcentage MAX obtenu dans tous les échantillons, garantit l'origine biologique de la récupération du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Aussi, les écarts types de toutes les courbes sont petits d'où la reproductibilité et la précision des résultats.



**Figure 4.4** Courbes de minéralisation du  $K^{14}CN$  dans les échantillons a) Dy3 mois (0,2) et b) Dy3 mois (1).

**Tableau 4.5 Paramètres de minéralisation pour Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1)**

	Dy3 mois (0,2)			Dy3 mois (1)		
	0 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	0 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
<b>%MAX<sup>c</sup></b> (%)	81,2 ± 4,8	82,9 ± 2,2	81,6 ± 2,5	71,5 ± 2,2	81,2 ± 1,2	77,9 ± 4,1
<b>RAVG</b> (%/jour)	1,5	1,7	1,5	1,5	1,5	1,3
<b>LAG</b> (jour)	non visible	non visible	non visible	non visible	non visible	non visible
<b>IBD</b> (%/jour)	1,2	1,4	1,4	1,1	1,1	1,1

<sup>c</sup> les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type (n = 3)

#### 4.3.1.1 Cinétique de minéralisation

Afin de pouvoir comparer les différentes courbes de minéralisation, la cinétique peut également être quantifiée de façon similaire à celle d'un taux de formation d'une molécule lors d'une réaction chimique comme décrit par Laidler (1950). Le modèle du premier ordre de la cinétique de minéralisation s'écrit :

$$d(a-x)/dt = -k (a-x),$$

où x est le pourcentage de minéralisation au temps t, a = 100% est le substrat non minéralisé de carbone radiomarqué à t = 0. La constante k, appelée constante de cinétique, quantifie le taux de minéralisation. La cinétique du premier ordre peut aussi s'exprimer sous la forme intégrée :

$$\ln[100/(100-x)] = k t.$$

La forme intégrée du modèle du premier ordre exprime la relation linéaire entre la transformation  $\ln[100/(100-x)]$  et le temps. Le calcul de la constante  $k$  peut donc se faire directement de la forme intégrée à l'aide de la méthode dite des moindres carrés. D'un point de vue statistique, on peut dire que la régression de la transformation  $\ln[100/(100-x)]$  sur le temps est une droite passant par l'origine.

Le calcul de la constante  $k$  a été effectué par le progiciel statistique Splus 2000. Le progiciel utilise les données de chaque échantillon et renvoie la valeur de  $k$  avec un écart type. L'écart type de  $k$  est calculé en supposant le modèle de régression linéaire  $\ln[a/(a-x_i)] = kt_i + \varepsilon_i$ . Les quantités  $\varepsilon_i$  sont des variables représentant les erreurs commises. La variance de  $k$  (proportionnelle à la variance des erreurs  $\varepsilon_i$ ) réfère alors à la variabilité, d'une expérience à l'autre, dans l'estimation de la constante de cinétique. Ici, la moyenne des triplicatas a été utilisée pour le calcul. Le progiciel calcule également le coefficient de détermination  $R^2$ . L'ajustement est d'autant meilleur que  $R^2$  est proche de 1. Les valeurs de  $R^2$  dans le tableau 4.6 sont comprises entre 0,74 et 0,99. En fait, la plupart (14 sur 18) des échantillons ont un  $R^2$  supérieur à 0,90. Le modèle du premier ordre est donc satisfaisant pour pouvoir comparer la cinétique des différentes courbes de minéralisation.

Les constantes de cinétique  $k$  quantifient le taux de minéralisation. Par exemple, l'échantillon Yv6 ans (0,2) à des concentrations de 0, 5 et 10 mg/kg possède, respectivement, des constantes  $k$  de 0,391, 0,062 et 0,049 jour<sup>-1</sup> (voir tableau 4.6). Ces constantes sont d'autant plus faibles que les concentrations en cyanures libres sont croissantes, sauf, dans le cas des échantillons des résidus frais où les constantes de cinétique sont du même ordre quelle que soit la concentration. Les constantes de cinétique obtenues pour chaque échantillon sont en accord avec leur IBD respectif en fonction des concentrations de cyanures ajoutées. En effet, pour l'échantillon Yv6 ans (0,2) les IBD obtenus sont de 30,3, 8,5 et 4,5 %/jour respectivement lorsque les concentrations en cyanures libres sont 0, 5 et 10 mg/kg (tableau 4.3).

**Tableau 4.6** Constantes de cinétique de premier ordre de minéralisation du  $^{14}\text{CN}$ 

Échantillon	Concentration (mg/kg)	k (jour <sup>-1</sup> )	Coefficient de détermination
Yv6 ans (0,2)	0	0,391 ± 0,009	0,99
	5	0,062 ± 0,005	0,89
	10	0,049 ± 0,003	0,94
Yv6 ans (1)	0	0,110 ± 0,014	0,75
	5	0,073 ± 0,009	0,84
	10	0,076 ± 0,006	0,92
Dy9 ans (0,2)	0	0,139 ± 0,005	0,97
	5	0,035 ± 0,001	0,97
	10	0,034 ± 0,001	0,99
Dy9 ans (1)	0	0,077 ± 0,010	0,74
	5	0,053 ± 0,003	0,95
	10	0,039 ± 0,001	0,99
Dy3 mois (0,2)	0	0,013 ± 0,001	0,94
	5	0,014 ± 0,001	0,93
	10	0,013 ± 0,001	0,94
Dy3 mois (1)	0	0,011 ± 0,001	0,91
	5	0,013 ± 0,001	0,93
	10	0,012 ± 0,001	0,95

#### 4.3.1.2 Discussion générale sur les tests de minéralisation

Comme remarque générale sur les six échantillons les IBD obtenus ne permettent pas de déduire une corrélation entre les deux profondeurs 0,2 et 1 mètre. L'indice de biodégradation ainsi que l'allure des courbes (forme exponentielle) reste plus ou moins semblable en comparant les échantillons aux deux profondeurs. Le pourcentage MAX de 100% atteint dans les échantillons Yv6 ans (0,2) et Dy9 ans (0,2) à la concentration de 0 mg en CN/kg, montre qu'aucune fraction de cyanures n'a été associée à la biomasse. Les cyanures étaient probablement utilisés comme source d'énergie uniquement pour détoxiquer le milieu. Chapatwala *et al.* (1998) ont observé, lorsqu'ils ont réalisé un bilan de masse avec le  $\text{Na}^{14}\text{CN}$ , que seulement 10% du  $^{14}\text{CO}_2$  était incorporé à la biomasse.

La production du CO<sub>2</sub> par les micro-organismes, lors de la minéralisation des cyanures libres, implique l'intervention de bactéries utilisant des enzymes oxydantes. En se basant sur la littérature, ces bactéries seraient *Escherichia Coli* ou bien des *Pseudomonas* qui ont montré de grandes capacités d'oxydation des cyanures en utilisant l'enzyme Oxygénase et Cyanase (Harris et Knowles, 1983), ou bien les enzymes dioxygénase tel que suggéré par Figueira *et al.* (1996).

Les métaux lourds, présents dans les six échantillons, dosés dans la caractérisation chimique au chapitre 2 (voir tableau 2.6) ne semblent pas avoir inhibé la biodégradation des cyanures libres puisqu'on a observé un potentiel de minéralisation dans tous ces échantillons. La capacité des micro-organismes à dégrader les cyanures en présence de métaux lourds a déjà été observée par Ul'Berg *et al.* (1994) lorsqu'ils ont étudié la dégradation des cyanures par la souche *Pseudomonas fluorescens* VKM V-5040.

#### **4.3.2 Deuxième partie : tests de biodégradation**

##### **1) Résultats de la série A**

La série A a été réalisée dans le but de suivre la biodégradation des cyanures présents initialement dans les échantillons Yv6 ans (0,2) et Dy3 mois (0,2). Quatre produits dont le formate, le formamide, les cyanures totaux et le NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ont été dosés.

Les résultats de l'échantillon Yv6 ans (0,2) reliés à la série A des tests de biodégradation sont résumés dans le tableau 4.7. Les données du formate et formamide, réalisés en triplicata, révèlent des concentrations inférieures à la limite de détection (1 à 2 mg/kg). Cependant, dans le témoin abiotique noté Yv6 (0,2)-T, une concentration variant de 2,3 à 3,5 mg/kg en formate a été dosée à partir du jour 12. Cette valeur ne peut confirmer la biodégradation des cyanures puisqu'elle a été retrouvée dans le témoin stérile. Les cyanures totaux ne diminuent pas dans le temps montrant ainsi l'absence de leur

biodégradation à l'intérieur de la durée de l'expérience. Les concentrations en  $CN_T$ , variant de 2,1 à 5,6 mg/kg, sont restées plus ou moins stables durant la période de 96 jours. De plus, les cyanures dosés dans le témoin abiotique sont proches de ceux estimés dans l'échantillon biotique.

La concentration du  $NH_4^+$  dans Yv6 ans (0,2) a été décelée au jour 12 où elle vaut 2,8 mg/kg, puis atteint 12,7 au jour 61 et enfin 2,7 mg/kg au jour 96. Le  $NH_4^+$  retrouvé dans les échantillons biotiques n'est pas issu de la biodégradation des cyanures puisque ces derniers restent stables dans le temps. De plus, sa présence dans les échantillons ne prouve pas son origine biologique car il a été dosé à des concentrations encore plus élevées dans le témoin stérile. Ces concentrations ont été détectées à partir du jour 4 et valaient 5,5, 3,3, 30 et 12 mg/kg aux jours 4, 12, 61 et 96 respectivement. L'apparition de l'ammoniaque pourrait être issue de réactions physico-chimiques des complexes aminés, comme l'ont observé Theis *et al.* (1994).

La concentration de cyanures totaux retrouvée dans l'échantillon Yv6 ans (0,2) (tableau 4.7) permet de rappeler leur grande stabilité à l'intérieur de ces résidus. En effet, la concentration dosée tout de suite après la réception de l'échantillon était de  $4,77 \pm 0,45$  mg/kg, et elle est demeurée dans le même intervalle 20 mois après son entreposage à 4°C.

En générale, les résultats de formate, formamide, cyanures totaux et  $NH_4^+$  obtenus dans la série A pour l'échantillon Yv6 ans (0,2) ne permettent pas de déduire une biodégradation naturelle des cyanures à l'intérieur de la période de 96 jours. La forme complexe et difficilement biodégradable des cyanures, présents dans cet échantillon, en serait probablement la cause (Aronstein *et al.*, 1994; Laha et Luthy, 1991). En effet, les  $CN_{WAD}$  étaient non détectables dans Yv6 ans (0,2) lors de la spéciation des cyanures, et le pourcentage de solubilisation était nul dans les tests de lixiviation ce qui montre la forme stable des cyanures contenus dans cet échantillon.



**Tableau 4.7** Suivi du formate, formamide,  $\text{CN}_T$  et  $\text{NH}_4^+$  dans l'échantillon Yv6 ans (0,2)

Temps (jour)	0	4	12	61	96
<b>Formate (mg/kg)</b>					
Yv6 ans (0,2)	ND	ND	ND	ND	ND
Yv6 ans (0,2)-T	ND	ND	2,3	3,7	3,5
<b>Formamide (mg/kg)</b>					
Yv6 ans (0,2)	ND	ND	ND	ND	ND
Yv6 ans (0,2)-T	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Cyanures totaux (mg/kg)</b>					
Yv6 ans (0,2)	2,1 ± 0,3	5,6 ± 0,6	3,5 ± 0,4	4,2 ± 1,4	3,8 ± 0,2
Yv6 ans (0,2)-T	2,3	5,4	4,5	4,2	2,9
<b><math>\text{NH}_4^+</math> (mg/kg)</b>					
Yv6 ans (0,2)	ND	ND	2,8 ± 0,9	12,7 ± 2,9	2,7 ± 1,4
Yv6 ans (0,2)-T	ND	5,5	3,3	30	12

ND : < 1mg/kg

Les résultats de la série A obtenus pour l'échantillon Dy3 mois (0,2) sont résumés dans le tableau 4.8. Durant toute la période de 96 jours le formate et le formamide se sont révélés en dessous de la limite de détection (<1 mg/kg) dans chacun des échantillons stériles et non stériles. La concentration en  $\text{NH}_4^+$  varie beaucoup dans l'intervalle d'échantillonnage : au jour 0 et au jour 4 elle vaut en moyenne 8,0 et 8,8 mg/kg respectivement, puis augmente à la valeur de 24,7 et 27,3 mg/kg au jour 12 et 61 respectivement et elle redescend jusqu'à 8,9 mg/kg au jour 96. Il est de même pour le témoin abiotique où les concentrations en  $\text{NH}_4^+$  sont de 9,8, 9,9, 39, 43 et 11 mg/kg aux jours 0, 4, 12, 61 et 96 respectivement. Les résultats de l'ammoniaque ne donnent aucune indication sur la biodégradation des cyanures puisqu'elle a été dosée dans le témoin stérile. En revanche, une légère tendance à la diminution des concentrations de cyanures totaux aux jours 61 et 96 semblent montrer une biodégradation de ces derniers, d'autant plus que le témoin abiotique maintient une valeur plus ou moins stable d'environ 8 mg/kg. Il faut, cependant, plus de points d'échantillonnage afin de confirmer

cette tendance. La diminution de la concentration des cyanures contenus dans l'échantillon Dy3 mois (0,2) serait possible en raison de leur caractère instable et lixiviable, comme l'ont montré les résultats du chapitre 3. Ceci pourrait aussi expliquer la différence de concentration des cyanures totaux observée après une durée de 12 mois d'entreposage. En effet, la concentration initiale de 17 mg/kg de cyanures totaux dosée dans Dy3 mois (0,2) juste après la réception de l'échantillon, a baissé pendant la durée d'entreposage (12 mois) jusqu'à 8,2 mg/kg (au jour 0 d'échantillonnage, tableau 4.8). Toutefois, il est difficile de confirmer l'origine biologique de cette diminution car il est aussi possible que les cyanures soient dégradés suite à des mécanismes physico-chimiques.

**Tableau 4.8** Suivi du formate, formamide,  $CN_T$  et  $NH_4^+$  dans l'échantillon Dy3 mois (0,2)

Temps (jour)	0	4	12	61	96
<b>Formate (mg/kg)</b>					
Dy3 mois (0,2)	ND	ND	ND	ND	ND
Dy3 mois (0,2)-T	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Formamide (mg/kg)</b>					
Dy3 mois (0,2)	ND	ND	ND	ND	ND
Dy3 mois (0,2)-T	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Cyanures totaux (mg/kg)</b>					
Dy3 mois (0,2)	8,2 ± 0,6	7,2 ± 1,0	9,3 ± 0,1	4,4 ± 2,1	2,9 ± 2,3
Dy3 mois (0,2)-T	8,7	8,6	9,2	6,1	8,1
<b><math>NH_4^+</math> (mg/kg)</b>					
Dy3 mois (0,2)	8,0 ± 1,3	8,8 ± 0,8	24,7 ± 2,5	27,3 ± 3,5	8,9 ± 1,3
Dy3 mois (0,2)-T	9,8	9,9	39	43	11

ND : < 1mg/kg

## **2) Résultats de la série B**

Le dosage du  $\text{NH}_3$  avait pour but de détecter la présence de la forme gazeuse de l'ammoniaque qui constitue un produit majeur de la biodégradation des cyanures. La série B a été réalisée sur les six échantillons Dy3 mois (0,2), Dy3 mois (1), Yv6 ans (0,2), Yv6 ans (1), Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1). Comme indiqué au tableau 4.9, les seuls échantillons sur lesquels un changement de couleur, de l'acide borique de lavande au vert, a été observé sont ceux des résidus frais, soient Dy3 mois (0,2), Dy3 mois (1), et cela après 4 mois d'incubation. Les résultats sont exprimés en mg de  $\text{NH}_3$  retrouvé dans 4 ml d'acide borique et issu de 20 g de résidu minier. Le dosage du  $\text{NH}_3$  dans l'échantillon Dy3 mois (0,2) a donné une valeur de  $0,08 \pm 0,01$  mg et dans Dy3 mois (1) une valeur de  $0,09 \pm 0,01$  mg. Cependant, les mêmes quantités, de l'ordre de 0,09 mg pour chacun des échantillons Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1), ont été retrouvées dans les témoins abiotiques, montrant que l'ammoniac n'est pas d'origine biologique et serait produit par des processus physico-chimiques, comme il a été constaté dans les résultats du  $\text{NH}_4^+$  de la série A. Aucun virement de couleur de l'acide borique coloré n'a été noté sur les échantillons des vieux résidus. Ceci est dû soit à l'absence de la production de  $\text{NH}_3$  ou bien, au contraire, à la présence de ce dernier, mais sous la forme dissoute ( $\text{NH}_4^+$ ) puisque le pH de ces échantillons est neutre. La présence du  $\text{NH}_4^+$  dans Yv6 ans (0,2), comme indiqué au tableau 4.9, peut être la preuve de l'existence de l'ammoniaque sous la forme de  $\text{NH}_4^+$ .

**Tableau 4.9** Résultats du NH<sub>3</sub> après 4 mois d'incubation

<b>Échantillon</b>	<b>NH<sub>3</sub> (mg)</b>
Dy3 (0,2)	0,08 ± 0,01
Dy3 (0,2)-T	0,09
Dy3 mois (1)	0,09 ± 0,01
Dy3 mois (1)-T	0,09
Yv6 (0,2)	ND
Yv6 (0,2)-T	ND
Yv6 ans (1)	ND
Yv6 ans (1)-T	ND
Dy9 (0,2)	ND
Dy9 (0,2)-T	ND
Dy9 ans (1)	ND
Dy9 ans (1)-T	ND

#### 4.4 Conclusion

Les essais de minéralisation ont répondu aux principales interrogations concernant la capacité des micro-organismes à dégrader les cyanures. En effet, les six échantillons qui ont fait l'objet de cette étude, ont montré un grand potentiel de minéralisation des cyanures libres. Ce potentiel utilisant la microflore indigène d'un résidu minier a été prouvé pour la première fois dans le présent projet de recherche. Des pourcentages de minéralisation élevés, variant de 71,5% à 100 %, ont été mesurés sur les six échantillons. De plus, cette microflore était capable de dégrader les cyanures libres en présence de 5 et 10 mg/kg. Dans les échantillons Yv6 ans (0,2), Yv6 ans (1), Dy9 ans (0,2) et Dy9 ans (1), le taux de minéralisation observé était fonction de la concentration ajoutée. Il était d'autant plus grand que la concentration était faible. Cependant, dans les échantillons des résidus frais Dy3 mois (0,2) et Dy3 mois (1), les micro-organismes dégradaient les cyanures au même taux quelle que soit la concentration. Cette différence montre que la microflore des résidus frais est effectivement adaptée à des concentrations de cyanures plus élevées que celle des vieux résidus. Les cinétiques de minéralisation les plus

rapides ont été observées dans les échantillons des vieux résidus et surtout lorsque les concentrations en cyanures libres étaient de plus en plus petites. La faible cinétique de minéralisation observée dans les résidus frais serait due au nombre minime de dégradeurs de cyanures libres qui se seraient développés en raison du jeune âge des résidus, ainsi qu'au pH alcalin de ces résidus.

Les essais de biodégradation naturelle réalisés sur Yv6 ans (0,2) n'ont révélé aucune réduction de la concentration des  $CN_T$  alors qu'une légère tendance à la diminution a été observée dans Dy3 mois (0,2) pendant la période d'échantillonnage. Comme il a été montré dans les chapitres 3 et 2, la stabilité des cyanures et leur forme complexe (0% de solubilisation à pH neutre et  $CN_{WAD}$  non détectable) à l'intérieur de l'échantillon Yv6 ans (0,2) serait la raison principale de leur résistance à la biodégradation. Toutefois, il faudrait appuyer cette hypothèse par des tests de minéralisation réalisés avec des cyanures complexés radiomarqués.

## CHAPITRE 5

### 5 ÉTUDE DE LA VOLATILISATION DES CYANURES

#### 5.1 Introduction

Le suivi de la volatilisation des cyanures contenus dans le résidu a été réalisé en dosant l'acide cyanhydrique (HCN) dissout dans du NaOH. Comme le HCN (la forme volatile des cyanures) est un acide, il est donc facilement absorbé par une base. L'idée était alors de mettre dans chaque réacteur contenant les échantillons une trappe à NaOH, puis d'échantillonner la soude dans le temps.

Toujours dans le but de comparer les vieux résidus avec les résidus frais, les tests de volatilisation ont été réalisés sur les échantillons qui ont fait l'objet de la série A des tests de biodégradation, soient Yv6 ans (0,2) et Dy3 mois (0,2). Comme toutes les expériences précédentes, les essais de volatilisation ont été effectués sans modification des caractéristiques et des conditions physico-chimiques du résidu.

#### 5.2 Matériels et méthodes

Le protocole détaillé du test de volatilisation se trouve à l'annexe VI, P33-F.

Le test de volatilisation des cyanures a été réalisé pour vérifier l'hypothèse que les cyanures contenus dans le résidu sont volatils. L'expérience proposée tenait compte de la concentration initiale des cyanures ainsi que le pH initial du résidu. Elle a été réalisée en triplicata sur deux échantillons Yv6 ans (0,2) et Dy3 mois (0,2) dont le pH initial (avant le début de l'expérience) était respectivement 7,8 et 10,6 et les concentrations en  $CN_T$  de 4,8 et 17 mg/kg.

Le principe des essais de volatilisation consistait à mettre une quantité déterminée de résidu minier dans un réacteur fermé de 750 ml pourvu d'une trappe de NaOH (0,5N) (Aronstein *et al.*, 1994). Le HCN qui diffuse du résidu se retrouve dissout dans 5 ml de NaOH. La soude est par la suite dosée par la méthode 4500 CN C de Standard Methods (APHA *et al.*, 1998) pour déterminer la concentration en cyanures totaux. Les réacteurs utilisés étaient en verre ambré. Ils étaient munis d'un couvercle en téflon et de valves mininerts permettant l'échantillonnage de la soude sans l'ouverture des réacteurs. Ces derniers ont été placés à température ambiante ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). L'échantillonnage de la soude a été fait sur une période totalisant 8 semaines. Les points d'échantillonnage étaient à 0, 1, 3, 6 et 8 semaines. La période de 8 semaines était largement suffisante pour détecter une éventuelle présence du HCN dans la soude. Aronstein *et al.* (1994) ont suivi l'accumulation du  $\text{H}^{14}\text{CN}$  durant 2 semaines (le pH du milieu était 7,2), alors que Mihaylov et Hendrix (1994) ont suivi la volatilisation du HCN dans un milieu hétérogène à pH 10 sur une période de 25 heures. Dans les deux cas, le suivi de la volatilisation a été fait avec des cyanures ajoutés.

Deux essais ont été prévus dans la présente expérience. Le premier essai consistait à suivre la volatilisation issue uniquement des réactions abiotiques car le HCN peut être produit par des micro-organismes cyanogéniques et de ce fait, biaiser les résultats de volatilisation qui est un phénomène physico-chimique (Aronstein *et al.*, 1994, Knowles, 1976). Le résidu a été stérilisé en ajoutant 0,5% de  $\text{HgCl}_2$  (Wolf *et al.*, 1989). Monté en parallèle, le deuxième essai consistait à suivre la volatilisation dans un système biotique où le résidu a été utilisé sans ajout de  $\text{HgCl}_2$ . Cet essai a été réalisé à titre comparatif avec l'essai abiotique.

Un essai préliminaire a été réalisé pour valider le principe du test de volatilisation des cyanures. Cet essai consistait à contaminer 100 g de résidu minier, contenu dans un réacteur fermé muni d'une trappe à NaOH, avec 10 ml d'une solution de cyanures libres à 1000 mg/l. Après 4 jours, le NaOH a été échantillonné et les cyanures totaux analysés.

Les résultats ont révélé une récupération de 17% de la quantité initiale de cyanures libres ajoutée au résidu. La méthodologie proposée pour le test de volatilisation est donc en mesure de quantifier les cyanures volatils si leur concentration est supérieure à la limite de détection.

### 5.3 Résultats et discussion

Le suivi de la volatilisation des cyanures sur une période de 8 semaines a révélé une concentration en cyanures totaux non détectable ( $<0,01$  mg/l) dans la soude, et cela pour les deux échantillons Dy3 mois (0,2) et Yv6 ans (0,2) et aux deux essais abiotique et biotique, notés Dy3 (0,2)-A, Yv6 (0,2)-A pour les échantillons abiotiques, et Dy3 (0,2)-B, Yv6 (0,2)-B pour les échantillons biotiques (voir tableau 5.1). L'absence de la volatilisation dans Dy3 mois (0,2) pourrait être due à son pH basique (pH = 10,6). Mihaylov et Hendrix (1994) ont montré que le pourcentage de volatilisation des  $\text{CN}^-$ , à pH 10 dans un milieu hétérogène, demeurait en dessous de 1% et ont observé que la diminution du pH de 10 à 7 entraînait une volatilisation des cyanures libres 50 fois plus grande. Cependant, dans l'échantillon Yv6 ans (0,2) (pH 7,8) l'absence de la volatilisation serait plutôt liée à la forme complexée des cyanures contenus dans les vieux résidus, comme l'ont montré les résultats des chapitres 2 et 3 où les  $\text{CN}_{\text{WAD}}$  étaient non détectables et les cyanures lixiviables étaient nuls dans cet échantillon. Au cours du temps, les cyanures libres auraient disparu de ces résidus par plusieurs phénomènes, entre autre par volatilisation à cause de la grande pression de vapeur et la basse température d'ébullition du HCN. Theis *et al.* (1994) n'ont pas détecté la présence de  $\text{CN}^-$  et de HCN lorsqu'ils ont étudié la forme chimique des cyanures contenus dans des résidus acides (pH = 3,9) d'une ancienne usine à gaz. Ils ont conclu alors que même si la forme libre des cyanures avait été présente dans les résidus, elle aurait été éliminée par volatilisation. Le HCN non détecté dans les essais biotiques montre l'absence des micro-organismes cyanogéniques dans les deux échantillons étudiés.



**Tableau 5.1** Cyanures totaux (mg/l) retrouvés dans l'essai biotique et abiotique des tests de volatilisation

Temps (semaines)	0	1	3	6	8
Dy3 (0,2)- A	ND	ND	ND	ND	ND
Dy3 (0,2)- B	ND	ND	ND	ND	ND
Yv6 (0,2)- A	ND	ND	ND	ND	ND
Yv6 (0,2)- B	ND	ND	ND	ND	ND

ND : < 0,01 mg/l

#### 5.4 Conclusion

Les tests de volatilisation ont été en mesure de prouver l'absence de l'acide cyanhydrique dans les échantillons Dy3 mois (0,2) et Yv6 ans (0,2). Également, la production, par les micro-organismes cyanogéniques, du HCN n'a pu être montrée, ce qui conclue l'absence de ce type de micro-organismes dans les échantillons testés. Toutefois, l'absence de la volatilisation du HCN, constatée dans l'échantillon des vieux résidus, serait attribuable à la forme complexe et stable des cyanures contenus dans cet échantillon. Les cyanures libres, dans les vieux résidus, auraient probablement été éliminés par volatilisation lors de l'entreposage ou par d'autres mécanismes d'atténuation naturelle comme la minéralisation. Cependant, dans l'échantillon des résidus frais, l'absence de la volatilisation serait plus liée à leur pH basique.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les cyanures d'origine anthropique posent un problème majeur pour les industries concernées à cause de leur toxicité potentielle et du danger de contamination des eaux souterraines et des eaux de surface. Plusieurs technologies de détoxification des effluents contaminés aux cyanures existent. Ces technologies sont basées sur des processus chimiques ou biologiques. En revanche, peu de technologies sont mises au point pour le traitement des cyanures dans les résidus solides. Dans le but de vérifier l'hypothèse de l'atténuation naturelle des cyanures contenus dans les résidus miniers, provenant d'une usine de traitement du minerai d'or, trois phénomènes majeurs qui contribuent à leur atténuation ont été testés. Ces phénomènes ont été étudiés sur des résidus frais entreposés depuis quelques mois et des vieux résidus entreposés depuis plus de 6 ans, après les avoir soumis à une caractérisation physico-chimique et microbiologique.

Comme cela a déjà été rapporté par la littérature, la caractérisation des résidus frais et des vieux résidus a révélé une évolution des propriétés physico-chimiques et microbiologiques des résidus dans le temps. La concentration en cyanures totaux et le pH dans les résidus frais sont apparus beaucoup plus grands que ceux dans les vieux résidus. Par contre, la présence des hétérotrophes totaux et des micro-organismes tolérants a été observée uniquement dans les vieux résidus lorsque la technique des comptes viables a été utilisée.

Les tests de solubilisation, réalisés pour vérifier le caractère lixiviable des échantillons, ont montré que les cyanures contenus dans les résidus frais seraient prédisposés à d'éventuels phénomènes de transport, puisqu'un pourcentage de solubilisation très élevé a été obtenu dans ces échantillons. Cependant, les concentrations des cyanures totaux étaient non détectables dans le lixiviat des vieux résidus montrant ainsi qu'ils sont sous une forme stable. Le caractère lixiviable des résidus frais explique, en partie, la

différence de concentration en cyanures totaux, entre les deux âges de résidu, constatée lors de la caractérisation chimique. La solubilisation des cyanures contenus dans les résidus frais ne sous-entend pas leur atténuation par des phénomènes de transport uniquement, des phénomènes de transformation pourraient aussi avoir lieu. La présence des cyanates et thiocyanates dans la phase liquide de ces résidus suggère l'existence de réactions d'oxydation et de réduction réduisant ainsi la toxicité des cyanures.

D'autre part, il a été montré par les essais de biodégradation que chacun des vieux résidus et des résidus frais possède un potentiel élevé de minéralisation des cyanures libres ajoutés sous forme de  $K^{14}CN$ , et ce à des concentrations pouvant aller jusqu'à 10 mg/kg de  $CN^-$ . Ces résultats suggèrent que la microflore indigène des résidus est capable de dégrader naturellement la forme la plus toxique des cyanures. Par contre, la forme complexe (précipités des sels de cyanures), qui est plus stable, ne représente pas un danger majeur pour l'environnement. Même s'il arrive, avec un changement de conditions, que les cyanures libres se retrouvent dans le résidu, la minéralisation pourrait à ce moment avoir lieu à cause de la présence des dégradeurs des cyanures libres.

Le suivi de la biodégradation des cyanures contenus initialement dans le résidu, à l'intérieur de la période de 96 jours, n'a révélé aucune réduction de la concentration des  $CN_T$  dans les vieux résidus (6 ans), alors qu'une légère tendance à la diminution a été observée dans les résidus frais (3 mois). L'absence de la biodégradation des cyanures dans les vieux résidus serait liée, en grande partie, à leur forme complexe et difficilement biodégradable

Les cyanures contenus dans les résidus frais et les vieux résidus se sont avérés non volatils. L'absence de volatilisation dans les vieux résidus serait due à la forme complexe et stable des cyanures contenus dans ces résidus. Les cyanures libres qui auraient été présents dans les vieux résidus, auraient été éliminés par des mécanismes de transformation ou de transport. Cependant, dans les résidus frais le pH basique serait la

raison majeure de l'absence de volatilisation. Il est donc difficile de conclure sur le potentiel d'atténuation naturelle des cyanures par volatilisation.

Dans chacun des phénomènes étudiés, aucune différence n'a été observée dans le comportement des échantillons Yv6, Dy9, Dy3 en fonction des deux profondeurs (0,2 et 1 mètre), sauf dans le cas du rapport des cyanures extraits dans 10% de NaOH et ceux analysés par la méthode 4500-CN C-. En effet, ce rapport a montré une différence entre les deux profondeurs dans chaque échantillon. Également, les échantillons des vieux résidus (Yv6, Dy9) prélevés sur deux sites miniers n'ont montré aucune différence majeure dans la caractérisation, le potentiel de minéralisation et la solubilisation.

En résumé, il a été montré dans ce projet de recherche que les cyanures contenus dans les vieux résidus étaient présents dans une forme stable, alors que ceux contenus dans les résidus frais étaient plutôt lixivables se prêtant ainsi à des phénomènes de transformation ou de transport. En effet, les résultats obtenus par les tests de minéralisation ont révélé l'existence du mécanisme de biodégradation des cyanures en produits non toxiques. La biodégradation pourrait alors être un phénomène important de diminution de la concentration des cyanures libres.

L'existence de mécanismes d'atténuation naturelle des cyanures a donc été démontrée, lors de cette étude, sur deux sites miniers et sur des résidus d'âges différents. L'atténuation naturelle serait envisageable comme technique de traitement passive des résidus solides qui ne sont pas fortement contaminés aux cyanures. Cependant, d'autres recherches sont recommandées afin de s'assurer que les cyanures lixiviables sont dégradés avant d'atteindre les eaux de surface et les eaux souterraines.

## RECOMMANDATIONS

Les recommandations suggérées pour la suite de ce projet sont résumées dans les points suivants. Ces recommandations soulignent le besoin en recherche afin de répondre à certaines hypothèses soulevées lors des discussions.

- Réaliser des tests d'adsorption et une analyse minéralogique détaillée du résidu pour voir si ce dernier a une grande capacité d'adsorption.
- Étudier plus en détails la spéciation des cyanures dans les résidus pour savoir sous quelle forme chimique ils se retrouvent.
- Réaliser des études écotoxicologiques.
- Vérifier les phénomènes d'atténuation naturelle par précipitation et oxydation en analysant dans le résidu les précipités des complexes de sels de cyanure et les cyanates.
- Prendre des échantillons d'eaux souterraines et des eaux de surface adjacentes aux deux sites miniers qui ont fait l'objet de cette étude, afin de vérifier la migration des cyanures.

Pour les essais de biodégradation, les travaux suivants sont recommandés :

- Continuer avec les tests de minéralisation en utilisant le  $K^{14}CN$  et en augmentant la concentration du froid (KCN) jusqu'à observer l'inhibition de la minéralisation. Ceci est pour savoir quelle concentration les micro-organismes

sont capables de tolérer, et ainsi prévoir les concentrations maximales pour instaurer l'atténuation naturelle comme technique de traitement passive.

- Réaliser des essais de minéralisation en microcosmes avec des ferrocyanures radiomarqués, dans le but de savoir si les dégradeurs de cyanures libres, dont la présence a été montrée dans ce projet, sont capables de minéraliser la forme complexe des cyanures.
- Faire des tests de minéralisation dans la phase aqueuse du résidu pour démontrer l'existence de micro-organismes dégradeurs de cyanures.
- Il est aussi recommandé d'effectuer des tests de minéralisation en anaérobie afin de savoir s'il existe, dans ces conditions, des bactéries capables de dégrader les cyanures naturellement.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ACKRELL, B.A.C. and JONES, C.W. (1971). The respiratory system of *Azotobacter vinelandii*. I. Properties of phosphorylating respiratory membranes. Eur. J. Biochem., **20**, 22-28.

ALESII, B.A. and FULLER, W.H. (1976). The mobility of three cyanide forms in soils. EPA-600/9-76-015. Residue Management and Land Disposal, Proc. Hazard. Waste Res. Symp., 213-223.

APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), and WEF (Water Environment Federation). (1998). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 20<sup>th</sup> Edition. American Public Health Association, Washington, D.C.

ARIMA, K. and OKA, T. (1965). Cyanide resistance in *Achromobacter* (I). Journal of Bacteriology. **90**, 3, 734-743.

ARONSTEIN, B.N., MAKHA, A. and SRIVASTAVA, V.J. (1994). Chemical and biological removal of cyanides from aqueous and soil-containing systems. Applied Microbiology and Biotechnology, **41**, 700-707.

ASTM (1998a). Test method for laboratory determination of water (moisture) content of soil and rock. Designation D2216-92. American Society for Testing Materials, Philadelphia, Pa.

ASTM (1998b). Test method for moisture, ash, and organic matter of peat and other organic soils. Designation D2974-87 (1995). American Society for Testing Materials, Philadelphia, Pa.

ASTM (1988). Test method for organic matter content. Designation D4972, American Society for Testing Materials, Philadelphia, Pa.

ASTM (1990). Test method for particle-size analysis of soil. Designation D421, D422, D1140, D2217 et E11, American Society for Testing Materials, Philadelphia, Pa.

BABU, G.R.V., WOLFRAM, J.H. & CHAPATWALA, K.D. (1992). Conversion of sodium cyanide to carbon dioxide and ammonia by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. Journal of Industrial Microbiology, **9**, 235-238.

BABU, G.R.V., WOLFRAM, J.H. & CHAPATWALA, K.D. (1993). Degradation of inorganic cyanides by immobilized *Pseudomonas putida* cells. Biohydrometallurgical Technologies, **2**, 159-165.

BARCLAY M., HART, A., KNOWLES, C.J., MEEUSSEN, J.C.L. & TETT, V.A. (1998). Biodegradation of metal cyanides by mixed and pure cultures of fungi. Enzyme and Microbial Technology, **22**, No 4, 233-231.

BOWER, C.A., REITMEIR, R.F., AND FIREMAN, M. (1952). Exchangeable cation analysis of saline and alkali soils. Soil Science. A : 63-79.

BOXER, G.E. and RICKARDS, J.C. (1952). Determination of traces of hydrogen cyanide in respiratory air. Archs. Biochem. Biophys., **39**, 287-291.



BRODERIUS, S.J. (1973). Determination of molecular hydrocyanic acid in water and studies of the chemistry and toxicity to fish of metal cyanide complexes. Ph.D dissertation, Oregon State University, Corvallis, Oregon.

BRUN, P. (1925). L'industrie des cyanures. DOIN, G. (ed.), Librairie octave DOIN, Paris.

BUCKMAN, H.O. and BRADY, N.C. (1969). The nature and properties of soils. Seventh Edition, The Macmillan Company, New York.

BUNCH, A.W. and KNOWLES, C.J. (1982). Production of the secondary metabolite cyanide by extracts of *Chromobacterium violaceum*. Journal of General Microbiology, 128, 2675-2680.

BURDICK, G.E. and LIPDCHUETZ, M. (1948). Toxicity of ferro-and ferricyanide solutions to fish, and determination of the cause of mortality. Trans-American Fisheries Soc., 78, 192-202.

CASTILLO, D. and HENDRIX, J.L. (1990). Attenuation of cyanide in swage sludge. Gold Tech 4 Symposium of SME, Reno, Nevada, 287-291.

CASTRIC, P.A. (1981). The metabolism of hydrogen cyanide by bacteria. In: Vennesland, B., Conn, E.E., Knowles, C.J., Westley, J., Wissing, F. (eds.) Cyanide in Biology. Academic Press, New York, 233-261.

CHAPATWALA, K, D., BABU, G.R.V., VIJAYA, O.K., KUMAR, K.P. & WOLFRAM, J.H. (1998). Biodegradation of cyanides, cyanates, and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 20, 28-33.

CHAPATWALA, K. D., BABU, G.R.V. & WOLFRAM, J.H. (1993). Screening of encapsulated microbial cells for the degradation of inorganic cyanides. Journal of Industrial Microbiology, 11, 69-72.

CHAPMAN, H.D. (1965). Cation exchange capacity. Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties, 891-901.

CHATWIN, T.D. and TREPANOWSKI, J.J. (1987). Utilization of soils to mitigate cyanide releases. Proceeding of the Third Western Regional Conference on Precious Metals, Coal and Environment, Rapid City, SD, 201-220.

CHATWIN, T.D., ZANG, J. & GRIDLEY, G.M. (1988). Natural Mechanisms in Soil to Mitigate Cyanide Releases. In: Superfund'88: Proceedings of the 9<sup>th</sup> National Conference and Exhibition on Hazardous Waste, Washington, D.C., November 28-30. Hazardous Materials Control Research Institute. Silver Springs, MD, 467-479.

CHATWIN, T.D. and HENDRIX, J. (1988). The fate of cyanide in soils. Randol Gold Forum 88, Scottsdale, AZ, 343-348.

CHERRYHOLMES, K.L., CORNILS, W.J. McDONALD, D.B., and SPLINTER R.C. (1985). Biological degradation of complex iron cyanides in natural aquatic systems. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium, ASTM STP Materials, Philadelphia, 502-511.

CHURCH, R.H. and BOYLE, J.R. (1990). A study of long term cyanide residuals at an historically significant site. In: Proceedings of the Western Regional Symposium on Mining and Mineral Processing Wastes, Berkeley, California, May 30 - June 1, 1990.

DOYLE, F.M. (ed.), Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, Inc. Littleton, Colorado, 105-114.

DODGE and ZABON. (1952). Cited in : Report on the lower monongahela river study water quality conditions. Point and Non point Source Wastes Loads and Waste load Allocation, 1 et 2. Prepared for the U.S. Steel Corporation, Coraopolis, PA.

DORR, P.K. and KNOWLES, C.J. (1989). Cyanide oxygenase and cyanide activities of *pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. FEMS Microbiology Letters, 60, 289-294.

DUMESTRE, A. (1995). Biodégradation des cyanures contenus dans des résidus de la fabrication de l'aluminium. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy I. 416p.

DUMESTRE, A., BOUSSERRHINE, N. et BERTHELIN, J. (1997a). Biodégradation des cyanures libres par le champignon *Fusarium solani*: relation avec le pH et la distribution des espèces cyanurées en solution. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la terre et des planètes/Earth & Planetary Sciences, 325, 133-138.

DUMESTRE, A., CHONE, T., PORTAL, J-M., GERARD, M., BERTHELIN, J. (1997b). Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soils. Applied and Environmental Microbiology, 2729-2734.

DVORÁK, P., GÜNTHER, M., ZORN, U., and CATSCH, A. (1971). Metabolisches Verhalten von kolloidalem ferrihexacyanoferrat(II). Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak, 269, 48-56.

ENGELHARDT, P.R. (1985). Long-term degradation of cyanide in an inactive leach heap. In: Cyanide and the Environment: proceedings of a conference, Tucson, Arizona.

December 11-14, 1984, Van Zyl D. (ed.), Fort Collins, Col.: Geotechnical Engineering Program, Department of Civil Engineering, Colorado State University, 539-547.

ERMANS, A.M., DELANGE, F., VANDER VELDERN, M et KINTHAERT, J. (1972). Adv. Exp. Med. Biol. **30**, 455-486.

FEDEL-MOEN, R., RAGUSA, S.R., KIMBER, R.W.L. and WILLIAMS, B.D. (2000). Degradation of metal cyanide complexes by microorganisms. Minerals and Metallurgical Processing, **17**, 69-76.

FIGUEIRA, M.M., CIMINELLI, V.S.T., DE ANDRADE, M.C., LINARDI, V.R. (1996) Cyanide degradation by an *Escherichia coli* strain. Canadian Journal of Microbiology, **42**, 519-523.

FINNEGAN, I., TEORIEN, S., ABBOT, L., SMIT, F., and RAUBENHEIMER, H.G. (1991). Identification and characterization of an *Acinobacter sp.* capable of assimilation of range of cyano-metal complexes, free cyanide ions and simple organic nitriles. Applied Microbiology and Biotechnology, **36**, 142-144.

FREEMAN, L.R., ANGELINI, P., SILVERMAN, G.J. and MERRITT, C. (1975). Production of hydrogen cyanide by *Pseudomonas fluorescens*. American Society for Microbiology, **229**, 24, 560-561.

FRY, W.E. and EVANS, P.H. (1977). Association of formamide hydrolyase with fungal pathogenicity to cyanogenic plants. Phytopathology, **67**, 1001-1006.

FRY, W.E and MILLAR, R.L. (1972). Cyanide degradation by an enzyme from *Stemphylium loti*. Arch. Biochem. Biophys., **151**, 468-474.

GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., COSTILOW, R.N.M NESTER, E.W., WOOD, W.A. and KRIEG, N.R. (1981). Manual of methods for general bacteriology, PHILLIPS G.B. (ed.), American Society for Microbiology, Washintong, D.C.

GONEN, N., DEMIR, E., KOSE, H.M. and OZDIL, G. (1996). Natural degradation, chemical destruction and regeneration process of cyanide. Changing Scopes In Mineral Processing. KERMAL, ARSLAN, AKAR AND CANBAZOGLU (eds.), In Balkema, Rotterdam, 603-606.

HARRIS, R. and KNOWLES, C.J. (1983). Isolation and growth of Pseudomonas species that utilizes cyanide as a source of nitrogen. Journal of General Microbiology, 129, 1005-1011.

HENDERSHOT, W.H., LALANDE, H., DUQUETTE, M. (1993a). Soil reaction and exchangeable acidity. Soil Sampling and Methods of Analysis. Carter M.R (ed.), Canadian Society of Science, Boca Raton, Fla, Lewis Publishers.

HENDERSHOT, W.H., LALANDE, H., DUQUETTE, M. (1993b). Cultural methods for soil microorganisms. Soil Sampling and Methods of Analysis. Carter M.R (ed.), Canadian Society of Science, Boca Raton, Fla, Lewis Publishers.

HENDRICKSON, T.M. and DAIGNAULT, L.W. (1973). Treatment of complex cyanide compounds for re-use or disposal: EPA Report #EPA-R2-73-269, 151p.

HENRY, M-F. (1981). Bacterial cyanide-resistant respiration: a review. Cyanide in Biology. Nennesland *et al.* (eds.) (Academic Press), 415-436.

HENRY, M-F. and NYNS, J. (1975). Cyanide-insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway. Sub-cell. Biochem., 4,1-65.

HOMMELGAARD, H., MUCH, S.K., MOSBAEK, H. and KJELDEN, P. (1998). Natural attenuation of iron-complexed cyanides in soil and groundwater at former gasworks sites. Contaminated Soil'98 Edinburgh (UK), 17-21 May, 1998. Thomas Telford, London, 819-820.

HOWE, R.H.L. (1984). The presence of cyanide in nature. In: Cyanide and the Environment: proceedings of a conference, Tucson, Arizona, December 11-14, 1984. Van Zyl D. (ed.), Fort Collins, Col.: Geotechnical Engineering Program, Department of Civil Engineering, Colorado State University, 2, 331-339.

HUIATT, J.L., KERRIGAN, J.E., OLSON, F.A. and PETTER, G.L. (1982). Cyanide from mineral processing. Proceedings of a Workshop, National Science Foundation, Salt Lake City, Utah, February 2-3.

INGVORSEN, K., HODJER-PEDERSEN, B. and GODTGEREDSEN, S.E. (1991). Novel cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylosoxidans subsp. denitrificans*. Applied and Environmental Microbiology, 57, 6, 1783-1789.

ISOME, G.E., LIU, D.H.W. and WAY, J.L. (1975). Effect of sub-lethal doses of cyanides on glucose catabolism. Biochem. Pharmac., 24, 871-875.

JONES, C.W. and REDFEARN, E.R. (1967). The cytochrome system of *Azotobacter vinelandii*. Biochim. Biophys. Acta 143, 340-353.

KJELDEN, P. (1999). Behavior of cyanides in soil and groundwater: a review. Water, Air and Soil Pollution, 115, 1-4, 279-307.

KNOWLES, C.J. (1976). Microorganisms and cyanide. Bacteriological Reviews, **40**, 652-680.

KNOWLES, C.J. (1988). Cyanide utilisation and degradation by microorganisms. Ciba Found Symposium, **140**, 3-15.

KNOWLES, C.J. and BUNCH, A.W. (1986). Microbial cyanide metabolism. Advances in Microbial Physiology, 73-109.

KUMARAN, P. and SHIVARAMAN, N. (1988). Biological treatment of toxic industrial wastes. Biotreatment Systems. D.L. Wise (ed.). CRC Press Inc., Boca Raton, 249-255.

KUNZ, D.A., NAGAPPAN, O., SILVA-AVALOS, J. and DELONG, G. (1992). Utilization of cyanide as a nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluoresces* NCINB 11764: evidence for multiple pathways of metabolic conversion. Applied and Environmental Microbiology, 2022-2029.

KUNZ, D.A., WANG, C.S., CHEN, J.L. (1994). Alternative routes of enzymatic cyanide metabolism in *Pseudomanas fluorescens* NCIMB 11764. Microbiology, **140**, 1705-1712.

KYLE, J.H. (1997). Stability of metal-cyanide and hydroxide complexes. In: World Gold'97 Conference, Singapore, September 1-3, 1997. Australian Institute of Mining & Metallurgy, Parkville Victoria, 163-169.

LAHA, S. and LUTHY, R.G. (1991). Investigation of microbial degradation of fixed cyanide. Rep. to Aluminium Assoc., Washington, D.C., and Gas Res. Inst., Chicago, Ill., 44.

LAILLER, K. J. (1950) Chemical Kinetics. First Edition, McGraw-Hill book Company, New York, Toronto, London, 408p.

LANDAHL, H.D. and HERRMANN, R.G. (1950). Retention of vapors and gases in the human nose and lung. Arch. Ind. Hyg. Occup. Med., **1**, 36-45.

LEE, J.S., DEORKAR, N.V. and TAVLARIDES, L.L. (1998). Adsorption of copper cyanide on chemically active adsorbents. Ind. Eng. Chem. Res., **37**, 2812-2820.

LIBAUDE, J. (1994). Minerais d'or. La recherche, **265**, 547-554.

MADERSAN J. and HOUSE J. (1992). The chemistry of gold extraction. ELLIS HORWOOD (ed.), England.

MANSFELDT, T., GEHRT, S.B. and FRIEDL, J. (1998). Cyanides in a soil of a former coking plant site. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde, **161**, 229-234.

MATTEAU, Y. (1996). Traitement des BTEX : élaboration d'un système à base de compost actif. Mémoire de maîtrise ès sciences appliquées (M.Sc.A.). Département de génie chimique. École Polytechnique de Montréal, 131p.

MEEUSSEN, J.C.L., KEIZER, M.K. and DE HAAN, F.A.M. (1992a). Chemical stability and decomposition rate of iron cyanide complexes in soils solutions. Environmental Science and Technology, **26**, 511-516.

MEEUSSEN, J.C.L., KEIZER, M.K., VAN REIMSDIJK, W.H. and DE HAAN, F.A.M. (1992b). Dissolution behavior of iron cyanide (Prussian Blue) in contaminated soils. Environmental Science Technology, **26**, 1832-1838.



MEEUSSEN, J.C.L., KEIZER, M.G., VAN RIEMSDIJK, W.H. and DE HANN, F.A.M. (1994). Solubility of Cyanide in Contaminated Soils. Journal of Environmental Quality, 23, 785-792.

MEEUSSEN, J.C.L., VAN RIEMSDIJK, W.H. and VAN DER ZEE, S.E.A.T.M. (1995). Transport of complexed cyanide in soil. Geoderma, 67, 73-85.

MENV (Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec). (1999). Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés. Annexe 2, Critères génériques pour les sols et pour les eaux souterraines, tiré du site Internet : <http://www.mef.gouv.qc.ca/>.

MENV (Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec), Direction des laboratoires. (1985). Procédure d'évaluation des caractéristiques des déchets solides et des boues pompables. 28p.

MEYERS, P.R., GOKOOL, P., RAWLINGS, D.E. and WOODS, D.R. (1991). An efficient cyanide-degrading *Bacillus pumilus* strain. Journal of General Microbiology, 137, 1397-1400.

MICHAELS, R. and CORPE, W.A. (1965). Cyanide formation by *Chromobacterium violaceum*. American Society for Microbiology, 89, 1, 106-112.

MIHAYLOV, B.V. and HENDRIX, J.L. (1994). Biological decomposition of cyanide in sewage sludge. Minerals Engineering, 7, 1, 61-69.

MILETTE, D., BARKER, J.F., COMEAU, Y., BUTLER, B.J., FRIND, E.O., CLÉMENT, B. and SAMSON, R. (1995). Substrate Interaction during Aerobic

Biodegradation of Creosote-Related Compounds: A Factorial Batch Experiment. Environmental Science and Technology, **29**, 1944-1952.

NESBITT, J.B., KOHL, H.R. and WAGNERS, E.L. (1959). The aerobic metabolism of potassium cyanide. 14<sup>th</sup> Ind. Waste. Conf. Purdue University. 518-534.

NIELSEN, P., DRESOW, B., FICHER, R., and HEINRICH, H. C. (1990). Bioavailability of iron and cyanide from oral potassium ferric hexacyanoferrates (II) in humans. Arch. Toxicol., **64**, 420-422.

OWENBACK, D. (1978). The instability of free cyanide in photographic process effluents. J. App. Pht. Eng., **4**, 72-76.

PARUCHURI, Y.L., SHIVARAMAN, N. and KUMARAN, P. (1990). Microbial transformation of thiocyanate. Environmental Pollution, **68**, 15-28.

PERRY, R.H. and GREEN, D.W. (1997). Perry's Chemical Engineers' Handbook. 7<sup>th</sup> edition, R. H. PERRY, D. W. GREEN and J. O. (eds.), Maloney, New-York, Montreal: McGraw-Hill.

PESCE, L.D. (1993). Kirk-Othmer Encyclopedia of chemical Technology, 4<sup>th</sup> edition. Kroschwitz, J.L. & Howe Grant, M. (eds.), Wiley, New York, USA, **7**, 753-782.

PINES, K.L. and CRYMBLE, M.M. (1952). In vitro conversion of thiocyanate to cyanide in the presence of erythrocytes. Proc.Soc. Exp. Biol. Med., **81**, 160-163.

PRESCOTT, HARLEY, KLEIN. (1995). Microbiologie. 3<sup>ème</sup> édition, Boeck-Wesmael S.A. (ed.), Bruxelles.

RADER, W., SOLUJIC, L., MILOSAVLJEVIC, E.B., HENDRIX, J.M. and NELSON, J. (1995). Photocatalytic detoxification of cyanide and metal cyano-species from precious-metal mill effluents. Environmental Pollution, **90**, 3, 331-334.

RAY, W.R. (1984). A simple leach procedure for determining the total cyanide content of heap leach tailings. In: Cyanide and the Environment: proceedings of a conference, Tucson, Arizona, December 11-14, 1984. Van Zyl D. (ed.), Fort Collins, Col.: Geotechnical Engineering Program, Department of Civil Engineering, Colorado State University, **1**, 201-211.

RAYBUCK, S.A. (1992). Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. Biodegradation, **3**, 3-18.

ROBERTS, T.M. and GEMMEL, R.P. (1979). Establishment of vegetation on gas works waste. Paper F.11 presented at the Conference on Reclamation of Contaminated Land, Eastbourne. Soc. Chem. Ind., London, England.

RRCC (Resource Recovery and Conservation Consultants) (1987). Attenuation of cyanide in soils, Phase 1, Report for Dupont Company.

SCHMIDT, J.M., SIMOVIC, L. and SHANNON, E. (1981). Natural degradation of cyanide in gold milling effluents. Industry Seminar, Waste Water Technology Center, Technology Development Branch Water Pollution Control Directorate, Environment Canada.

SCOTT, J. and INGLES, J. (1987). State of the art process for the treatment of gold mill effluents. Mining, Mineral and Metallurgical Process Division, Environment Canada.

SCOTT, J.S. (1984). An overview of cyanide treatment methods for gold mill effluents. In: Cyanide and the Environment: proceedings of a conference, Tucson, Arizona, December 11-14, 1984. Van Zyl D. (ed.), Fort Collins, Col.: Geotechnical Engineering Program, Department of Civil Engineering, Colorado State University, 2, 307-325.

SHIFRIN, N.S., BECK, B.D., GAUTHIER, T.D., CHAPNICK, S.D. and GOODMAN, G. (1996). Chemistry, toxicology, and human health risk of cyanide compounds in soils at former manufactured gas plant sites. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 23, 106-116.

SILVA, S. and BEONE, G.M. (1999). Cyanide degradation in soils polluted by an accidentally spillage of acetone cyanohydrin. Toxicological and Environmental Chemistry, 69, 157-163.

SILVA-AVALOS, J., RICHMOND, M.G., NAGAPPAN, O. and KUNZ, D.A. (1990). Degradation of the metal-cyano complex tetracyanonickelate (II) by cyanide-utilizing bacterial isolates. Applied and Environmental Microbiology, 3664-3670.

SIMOVIC, L. (1984). Kinetics of natural degradation of cyanide from gold mill effluents. M.Eng. Thesis, McMaster University, Hamilton, Ontario. 358p.

SIMOVIC, L., SNODGRASS, W.J., MURPHY, K.L. and SCHMIDT, J.W. (1994). Development of model to describe the natural degradation of cyanide in gold mill effluent. In: Cyanide and the Environment: proceedings of a conference, Tucson, Arizona, December 11-14, 1984. Van Zyl D. (ed.), Fort Collins, Col.: Geotechnical Engineering Program, Department of Civil Engineering, Colorado State University, 2, 413-432.

SMITH A. (1988). Cyanide degradation and detoxification in a heap leach. Introduction to Evaluation, Design, and Operation of precious Metal Heap Leaching Projects, Society of Mining Engineers, Littleton, Colorado, 293-305.

SMITH, A. and STRUHSACKER, D. (1987). Cyanide geochemistry in an abandoned heap leach system and regulations for cyanide detoxification. Presented at the Gold Mining Conference, 1987, Vancouver, BC, Canada, 412-430.

SMITH, A. and MUDDER, T. (1991). The chemistry and treatment of cyanidation wastes. Mining Journal Books, London.

SPOERKE, D.G., SMOLINSKE, S.C., WRUK, K.M., and RUMACK, B.H. (1986). Infrequently used of antidotes : Indications and availability. Vet. Hum. Toxicol., 28, 69-75.

THEIS, T. L., YOUNG, T.C., HUANG, M. and KNUTSEN, K.C. (1994). Leachate Characteristics and Composition of Cyanide-Bearing Wastes from Manufactured Gas Plants. Environ. Sci. Technol., 28, 99-106.

THEIS, T.L. and WEST, M.J. (1986). Effects of cyanide complexation on adsorption of trace metals at the surface of goethite. Environmental Technology Letters, 7, 309-318.

THOMPSON, L.C. and GERTEIS, R.L. (1990). New technologies for mining waste management biotreatment process for cyanide, nitrates and heavy metals. In: Proceedings of the Western Regional Symposium on Mining and Mineral Processing Wastes, Berkeley, California, May 30 - June 1, 1990. F.M. DOYLE (ed.), Berkeley, CA. 271-278.

TORSVIK, V., DAAE, F.L., SANDAA, R., ØVEÅS, L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. Journal of Biotechnology, **64**, 53-62.

UL'BERG, Z.R., PODOL'SKAYA, V.I., SANAKULOV, K.S., VEMBER, V.E., GRISHCHENKO, N.I., GARBARA, S.V. (1994). Degradation of cyanides by *Pseudomonas fluorescens* VKM V-5040. Prikladnaia Biokhimiia Mikrobiologiya, **30**, 2, 260-264.

UMBACH, A.L. and SIEDOW, J.N. (1993). Covalent and non covalent dimmers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. Plant. Physiol., **103**, 845-854.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA) (1984). Health effects assessment for cyanide. Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). (1978). Reviews of the environmental effects of pollutants. V. Cyanide. EPA-600/1-78-027, Office of Research and Development, Health Effects Research Laboratory, Cincinnati, OH.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). (1992). Drinking water criteria document for cyanide. (Final Revised January 1992). Environmental Criteria and Assessment Office. Cincinnati, OH.

VON LOSECKE, A. (1871). Zur chemie und physiologie des agaricus oreades. Bolt. Arch. Pharm. Berlin Ser., **147**, 2, 36-39.

WESLEY, J. (1988). Mammalian cyanide detoxification with sulphane sulfur. In: Evered, D. & Harnett, S. (eds.), Cyanide Compounds in Biology, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 201-218

WESTON, J.A., COLLINS, A. P. and KNOWLES, C. J. (1974). The respiratory system of the marine bacterium *Beneckea natrigens*. II: Terminal branching of respiration to oxygen and resistance to inhibition by cyanide. Biochim. Biophys. Acta, **368**, 148-157.

WHITE, J.M., JONES, D.D., HUANG, D. and GAUTHIER, J.J. (1988). Conversion of cyanide to formate and ammonia by a *Pseudomonas* obtained from industrial wastewater. Journal of Industrial Microbiology, **3**, 263-272.

WOLF, D.C., DAO, T.H., SCOTT, H.D. and LAVY, T.L. (1989). Influence of sterilization methods on selected soil microbiological, physical, and chemical properties. Journal of Environmental Quality, **18**, 39-44.

YOUNG, T.C. and THEIS, T.L. (1991). Determination of cyanide in manufactured gas plant purifier wastes. Environmental Technology, **12**, 1063-1069.


YOUNG, C.A. (1998). Mechanism for the photocatalytic destruction of cyanide species. The Minerals, Metals & Materials Society. B. MISHARA (ed.), EPD Congress 1998, 877-886.

ZAGURY, G.J. (1997). Étude d'un traitement par biolixiviation au moyen de la microflore indigène ferroxydante des sols contaminés aux métaux lourds (Zn, Cu, Mn). Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke, Québec, 176p.

**ANNEXES**



**ANNEXE I P33-A- Détermination de la matière organique par combustion à  
550°C**

 <p>Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites</p>	<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # :P33-A	Nombres de pages :04	
Version :02	Date :08/06/99	
Auteur(s): <u>Jean-Philippe Bertrand</u> <u>Kahina Oudjehani</u>		
Approuvé par : Gérald Zagury	Signatures : <input checked="" type="checkbox"/>	Date :
Sandra Estrela	<input checked="" type="checkbox"/>	
	<input type="checkbox"/>	
Titre : Détermination de la matière organique par combustion à 550°C.		
Mots clés : Matière organique, matière volatile, cendres, résidu.		

## 1 OBJECTIF

La méthode de détermination de la matière organique par combustion du résidu à 550°C permet de déterminer le pourcentage des cendres (matière minérale). Cette donnée est ensuite utilisée pour calculer le pourcentage de la matière organique contenue dans le résidu. L'étape de séchage à 105°C permet également de déterminer le pourcentage d'eau.

## 2 MATÉRIELS

- Four à 550 °C ;
- Creuset en porcelaine, 30 ml résistant à des températures élevées, préalablement nettoyé ;
- Dessiccateur ;
- Balance analytique (précision de 0.0001 g) ;
- Spatule, cuillère, etc. (propres) ;
- Four réglable à une température constante et uniforme de 105 °C ± 5 °C ;
- Gants de protection contre la chaleur ;
- Paire de pinces en acier à long manche.

## 3 MÉTHODOLOGIE

### À réaliser en duplicata

1. Peser environ précisément 5 g de résidu dans un creuset de porcelaine préalablement pesé ;
2. Mettre à sécher dans le four à 105 °C pendant 12 h au minimum ;
3. Placer au dessiccateur pendant 30 mn au minimum ;
4. Peser le creuset ;
5. Remettre à l'étuve pour une période de deux heures et reprendre les étapes 3 et 4 ;
6. Reprendre l'étape 5 jusqu'à l'obtention d'un poids constant (différence de 5 mg au maximum) ;
7. Placer le creuset + résidu dans le four à 550 °C ;
8. Laisser l'échantillon dans le four pendant un minimum de 16 h ;
9. Placer l'échantillon dans le dessiccateur, le laisser au minimum 1 h ;
10. Peser l'échantillon après refroidissement dans le dessiccateur ;
11. Noter le poids creuset + cendres ;
12. Remettre l'échantillon dans le four à 550 °C pour environ 2 h ;
13. Répéter les opérations 9 à 11 ;
14. Si le poids entre la première pesée et la deuxième est constant (différence de 5 mg au maximum) passer aux calculs, sinon refaire les étapes 12 et 13 jusqu'à ce que le poids soit constant.

## 4 CALCULS

1. Calcul du % d'eau

$$\% \text{ d'eau} = [(a-c)-(b-c)]/(a-c) \times 100$$

Où, a = poids initial (g) du creuset + échantillon humide

b = poids final (g) du creuset + échantillons sec  
c = poids du creuset vide

2. Calcul du % des cendres

$$\% \text{ Cendres} = [(a - c)/(b - c)] \times 100$$

Où, a = poids final (g) du creuset + cendres  
b = poids initial (g) du creuset + résidu (séché à 105 °C)  
c = poids (g) du creuset vide

3. Calcul du % de la matière organique

$$\% \text{ matière organique} = 100 - \% \text{ cendres (calculé dans 2)}$$

**Notes :**


- Les poids sont notés à 0.0001 g près.
- Les creusets ne doivent pas être manipulés à main nues.
- Les manipulations dans le four à 550 °C se font à l'aide de gants de protection contre la chaleur et d'une paire de pinces à long manche.
- Avant de mettre l'échantillon dans le four à 550 °C, il est préférable de maintenir la température de celui-ci à 375 °C pendant 1 h. Ensuite mettre l'échantillon. Dans notre cas le four n'est pas réglable, donc il nous est impossible d'obtenir un profil de température.

**5 RÉFÉRENCES**

ASTM D2974 1988 (Soil Sampling and Methods of Analysis. M.R. Carter (Ed)  
Canadian Society of Science.

Protocole P33-A version ½

**ANNEXE II P33-B- Méthode de détermination de la Capacité d'Échange  
Cationique (CEC) pour un résidu minier**

 <p>Chaire Industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites</p>		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # :P33-B		Nombres de pages :09	
Version :02		Date :01/12/98	
Auteur(s): <u>Kahina Oudjehani</u>			
Approuvé par :		Signatures :	
<u>Gérald Zagury</u>		<input checked="" type="checkbox"/> _____ Date :	
<u>Manon Leduc</u>		<input checked="" type="checkbox"/> _____	
_____		<input type="checkbox"/> _____	
Titre : Méthode de détermination de la Capacité d'Échange Cationique (CEC) pour un résidu minier.			
Mots clés : CEC, NaOAc, NH4OAc, cations, métaux, absorption atomique.			

## 1 OBJECTIF

L'objectif principal de la CEC est d'estimer la quantité de cations échangeables dans le résidu minier. Celle-ci nous permettra par la suite de connaître sa capacité de rétention ou de relargage des métaux lourds.

## 2 PRINCIPE

La méthode de détermination de la CEC est simple, elle s'effectue en trois étapes. La première étape consiste à enlever les cations échangeables adsorbés sur le résidu et les remplacer par le sodium ( $\text{Na}^+$ ) et cela par un premier lavage avec la solution d'acétate de sodium ( $\text{NaOAc}$ ). La deuxième étape est un lavage successif du résidu avec l'alcool isopropylique pour enlever l'excès de sodium. Enfin, la troisième étape est un dernier lavage qui consiste cette fois-ci à récupérer le sodium en remplaçant par l'ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) contenu dans la solution d'acétate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ). Le sodium qui a occupé les sites vacants des cations échangeables est ensuite dosé par absorption atomique.

## 3 MATÉRIEL ET RÉACTIFS

### 3.1 MATÉRIEL

**Note :** La verrerie et les tubes à centrifugeuse doivent être préalablement lavés à l'acide ;

**Procédure :** Faire un premier trempage dans l'acide nitrique (10%) (laisser environ 3 heures), ensuite rincer 3 fois à l'eau distillée et 3 fois à l'eau purifiée. Refaire un deuxième trempage toujours dans l'acide nitrique (10 %) (Laisser environ 3 heures), puis rincer 3 fois à l'eau distillée et 3 fois à l'eau purifiée.

- Balance de 0.01 de précision ;
- Agitateur de type Wrist action et de marque Burrel ;
- Centrifugeuse ;
- Agitateur magnétique ;
- Barreau magnétique ;
- Cylindre gradué de 50 ml ;
- Tubes à centrifugeuse 50 ml en polypropylène de base ronde et de col étroit.
- Pipettes neuves et stériles 10 ml (jetables) (ne pas laver à l'acide) ;
- Pipette 50 ml ;
- Spatules en acier inoxydable ;
- Bouteilles en HDPE ou en PE (pour l'entreposage des solutions finales) ;
- Bêcher en verre 500 ml ;
- Poire à pipette ;
- Pipetman 1ml ;

- pH mètre ;
- Ballon volumétrique (100, 1000 et 2000 ml).

### 3.2 RÉACTIFS

- Acétate de sodium  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ou bien Acétate de sodium anhydre  $\text{CH}_3\text{COONa}$  ;
- Acide acétique glacial (99.5%) ;
- Eau purifiée (eau nanopure, résistivité  $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ) ;
- Solution de NaOH, 10 N ;
- Hydroxyde d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ;
- Alcool isopropylique 99% ;
- Acide nitrique 10% ( $\text{HNO}_3$ ) ;
- Acétate d'ammonium  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (au cas où vous choisissez la deuxième possibilité de préparer l'acétate d'ammonium 1 N).

## 4 MÉTHODOLOGIE

### 4.1 Préparation des solutions

1. **Acétate de sodium (NaOAc), 1 N** : Peser 136 g de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ou bien 82 g d'acétate de sodium anhydre ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) dans un ballon de 1000 ml. Dissoudre avec 500 ml d'eau purifiée, puis agiter la solution sur l'agitateur magnétique pendant 15 mn, mettre le chauffage à 4 (ceci va permettre d'accélérer la dissolution des cristaux). Une fois que la solution est bien homogène, compléter jusqu'à 980 ml. Le pH de cette solution doit être 8.2. Au besoin, ajouter quelques gouttes d'acide acétique ou bien d'une solution de NaOH (selon le cas) pour ramener la solution d'acétate de sodium à pH = 8.2. Lorsque le pH devient égal à 8.2 compléter la dilution jusqu'au volume de 1000 ml.
2. **Acétate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) 1 N** : Dans un ballon volumétrique de 2000 ml, mesurer 114 ml d'acide acétique glacial (99.5%) à l'aide des pipettes de 50 et 10 ml. Ajouter environ 1000 ml d'eau purifiée, ensuite ajouter 138 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Compléter avec de l'eau purifiée jusqu'au volume de 1980 ml. Vérifier le pH pour la solution résultante. Rajouter au besoin du ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ou de l'acide acétique glacial pour obtenir une solution de pH = 7, puis compléter jusqu'au volume 2000 ml avec de l'eau purifiée.

**Acétate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) 1 N (deuxième possibilité) :**



Il y a une autre façon plus simple de préparer la solution d'acétate d'ammonium 1N :

- Peser 77.08 g de  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  dans un ballon volumétrique de 1000 ml, dissoudre avec environ 300 ml d'eau purifiée ensuite compléter avec de l'eau purifiée jusqu'à environ 980 ml. Lire le pH de la solution résultante. Rajouter au besoin du  $(\text{NH}_4\text{OH})$  ou de l'acide acétique glacial pour obtenir une solution de  $\text{pH} = 7.0$ , puis compléter jusqu'au volume 1000 ml avec de l'eau purifiée.

#### 4.2 Procédure d'extraction

**Note: À réaliser en duplicata.**

1. Peser 4 g de résidu minier dans le tube à centrifugeuse.
2. Déterminer en parallèle sur un autre échantillon la teneur en eau (PSO A7), (les résultats seront exprimés en poids sec).
3. Mesurer 33 ml de la solution NaOAc 1 N dans un cylindre de 50 ml, ensuite les ajouter dans le tube à centrifugeuse. Fermer bien le tube puis agiter pendant 5 mn dans l'agitateur Wrist action à vitesse 5.
4. Centrifuger à 10,000 rpm jusqu'à ce que le surnageant soit clair (approximativement 10mn).
5. Pipetter le surnageant à l'aide des pipettes 10 ml et s'en défaire en évitant de prendre des particules de sols (prendre des pipettes neuves pour chaque échantillon). NB : pour pipetter le fond du tube utiliser le pipetman 1 ml.
6. Répéter les étapes 3, 4 et 5 deux autres fois.
7. Mesurer maintenant 33 ml d'alcool isopropylique 99% à l'aide du cylindre gradué 50 ml, ajouter les ensuite dans le tube à centrifugeuse. Fermer bien le tube puis agiter pendant 10 mn dans l'agitateur Wrist action à vitesse 5.
8. Faire exactement les étapes 4 et 5.
9. Refaire les étapes 7 et 8 deux autres fois.
10. Ajouter maintenant 33 ml de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  1N, fermer bien le tube puis agiter pendant 5 mn dans l'agitateur Wrist action à vitesse 5.
11. Centrifuger à 10,000 rpm jusqu'à ce que le surnageant soit clair (approximativement 10 mn).
12. Retirer à l'aide des pipettes 10 ml le surnageant et le récupérer dans un ballon volumétrique de 100 ml (prendre des pipettes neuves pour chaque échantillon).
13. Répéter les étapes 10, 11 et 12 deux autres fois en additionnant les surnageants de l'étape 12 dans le même ballon de 100 ml.
14. Diluer la solution récupérée dans le ballon jusqu'au volume exact de 100 ml avec la solution de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  1N, (car le volume total récupéré sera inférieur à 100 ml).
15. Le sodium Na est dosé par absorption atomique.

## 5 CALCULS

$$CEC = \left(\frac{a}{10}\right) \times \left(\frac{1}{23}\right) \times \left(\frac{100}{b}\right) \quad [meq / 100g \text{ residu sec}]$$

Où,

a = Concentration de sodium (mg/l);

b = Masse du résidu sec (g).

### Remarques

- Ne pas laisser les solutions de sodium dans les ballons volumétriques une fois l'expérience finie, entreposer les dans des bouteilles en HDPE ou en PE à 4 °C et doser les à l'absorption atomique le plutôt possible.
- On peut réaliser l'expérience de la CEC pour 4 échantillons en duplicata en même temps, mais pas plus, car on ne peut utiliser que 8 tubes à centrifugeuse à la fois.

## 6 RÉFÉRENCES

Chapman, H.D. 1965. Cation exchange capacity. Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties, 891-901.

Bower, C.A., Reitmeir, R.F., and Fireman, M. 1952. Exchangeable cation analysis of saline and alkali soils. Soil Science. A : 63-79.


## 7 RECOMMANDATIONS

- La détermination de la CEC est une expérience délicate à réaliser. Pour ce faire, il faut toujours s'assurer qu'au moment de pipetter le surnageant, les particules de résidu ne soient pas prises.
- Il est recommandé de réaliser cette expérience en duplicata ou en triplicata pour pouvoir comparer vos résultats. Pour réaliser cette expérience en triplicata vous ne pouvez l'effectuer que sur 2 échantillons à la fois, car l'espace dans la centrifugeuse est disponible uniquement pour 8 tubes. Par

contre vous pouvez l'effectuer sur 4 échantillons si vous décidez de la faire en duplicata.

- Il est à conseiller d'envoyer avec les échantillons pour le dosage du sodium un blanc (juste de l'eau purifiée), et une solution dont la concentration en Na est connue (préparée avec du NaCl).
- Si vous avez plusieurs échantillons à faire en même temps, utilisez des pipettes propres (jetables) pour chacun des échantillons et pour chacun des réplicats.

**ANNEXE III P33-C- Dénombrement de microflores tolérantes aux cyanures et dénombrement sélectif par la méthode du comptage sur boîtes de Pétri ou méthode des comptes viables**

 <p>Chaire industrielle CRNG en assainissement et gestion des sites</p>		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # :P33-C		Nombres de pages :16	
Version :1		Date :08/02/99	
Auteur(s): <u>Kahina Oudjehani</u>			
Approuvé par :		Signatures :	
<u>Gérald Zagury</u>		<input checked="" type="checkbox"/> _____ Date :	
<u>Louise Deschênes</u>		<input checked="" type="checkbox"/> _____	
_____		<input type="checkbox"/> _____	

**Titre : Dénombrement de microflores tolérantes aux cyanures et dénombrement sélectif par la méthode du comptage sur pétris ou méthode des comptes viables.**

**Mots clés : Cyanure, KCN, pétris, dénombrement sélectif, microflores tolérantes aux cyanures.**

## 1 OBJECTIF

L'objectif de cette manipulation est de découvrir s'il existe parmi les micro-organismes comptés à l'étape précédente (hétérotrophes totaux) ceux qui sont capables de croître en présence des cyanures ajoutés au milieu nutritif.

## 2 PRINCIPE

Le principe de cette technique est la dilution en série de l'échantillon de sol contenant les micro-organismes. Des aliquots de chaque dilution sont déposés sur différents milieux de culture cyanurés. L'un des milieux contient du tryptic soy broth (milieu complet qui est constitué de nutriments et d'une source de carbone). Ce milieu est destiné à prouver si les micro-organismes ont la capacité de croître en présence des cyanures additionnés sous forme de solution de KCN (les tolérants). Un second milieu où les cyanures sont ajoutés comme seule source de carbone est destiné à savoir si des micro-organismes peuvent utiliser les cyanures comme source unique de carbone (les sélectifs).

Chaque colonie qui se développe est présumée être issue d'une unité viable, soit un seul organisme ou bien un groupe d'organismes. Les résultats seront exprimés en UFC/g de résidu sec (UFC étant Unités Formant des Colonies).

## 3 MATÉRIELS

### **Note : Réaliser l'expérience en duplicata**

- Boîtes de Pétri pré-identifiés (12 boîtes par échantillon, soit 4 dilutions en triplicatas) ;
- 2 boîtes de Pétri pour contrôle par échantillon qui seront notés C(#)A, C(#)B ;
- Bouteille de dilution de 125 ml (4 bouteilles par échantillon) ;

### **Note : il faut prévoir toujours plus de bouteilles au cas où il y aurait un problème;**

- Erlenmeyer (il faut prévoir un erlenmeyer plus grand que la quantité du milieu à préparer. Par exemple un erlenmeyer de 2 L peut être rempli avec 1.7 L de milieu au maximum pour pouvoir être autoclavé de façon sécuritaire) ;
- Bouchons en mousse + papier aluminium pour fermer les erlenmeyers lors de l'autoclavage ;
- Papier d'autoclavage ;
- Pipettes stériles de 10 ml (jetables) ;
- Poire à pipette ;
- Pipetman à embouts stériles (autoclavés) (100 µl) ;
- Dispensette de 25 ml ou plus ;
- Billes en verre pour l'extraction ;
- Pétri en verre avec couvercle contenant environ 30 ml d'éthanol 95 % ;
- Tige de verre recourbée sous forme de bâton de hockey ;

- Tourne disque pour les étalements sur boîtes de Pétri ;
- Ventouses en caoutchouc (s'en servir pour manipuler les erlenmeyers lors du coulage) ;
- Spatule, cuillère, etc. (suivre les instructions pour travailler en conditions stériles) ;
- Balance de 3200 g (précision 0.01 g, préalablement calibrée) ;
- Papier pH (pour vérifier le pH du milieu de culture) ;
- Autoclave ;
- Incubateur ;
- Bain-marie;
- Agitateur magnétique ;
- pH-mètre (préalablement calibré) ;
- Flamme pour la stérilisation ;
- Becher de 100 ml ;
- Seringue (50ml) + filtre de stérilisation (0.45 µm).

#### 4 RÉACTIFS

- Tryptic soy broth sans dextrose (500 g, 0862-17-8 DIFCO Laboratories, Detroit MI 48232-7058 USA) ;
- Acide nitrique 10 % v/v (2.25 litres, AC6525 UN2031, réactifs A.C.S., Anachemia Canada, Montréal) ;
- MSM ( voir page 9 ) ;
- Agar purifié (500 g, 11853 BBL BECTON DICKINSON, Cockeysville MD 21030 USA) ;
- Agar noble (Agar bactériologique OXOID, 500 g code L11 UNIPATH LTD. Hampshire, England) ;
- Eau purifiée (désionisée) ;
- Eau stérilisée (autoclavée) ;
- Alcool dénaturé (éthanol 85 %) (4 litres, A 407 P-4, Fisher Scientific, Nepean Ontario) ;
- Chlorure de sodium NaCl (2 Kg, AC 8304, réactifs A.C.S., Anachemia Canada Montréal) ;
- Soude caustique (NaOH) 10 N p/v (NaOH solide : 10 Kg, AC 8370, réactifs A.C.S. Anachemia Canada Montréal, Toronto, Vancouver) ;
- Cyanure de potassium KCN (500 g, UN 1680 réactifs A.C.S., Mallinckrodt Backer Inc, Paris Kentuckey 40361) ;

## 5 MÉTHODOLOGIE

Dans cette méthode on propose de faire pousser les micro-organismes sur trois différents milieux soit :

**Milieu I** : Tryptic Soy Agar (TSA) + agar purifié (15g/l) KCN (57.5 mg/l) – 23 mg/l cyanures libres

**Milieu II** : Agar noble (15 g/l) + MSM + KCN (57.5 mg/l) - 23 mg/l cyanures libres

### 5.1 Préparation des milieux sélectifs

#### **Milieu I** :

- 1- Dans un erlenmeyer de 2 litres peser 4.5 g de tryptic soy broth sans dextrose et 22.5 g d'agar purifié (le mélange donne le Tryptic Soy Agar (TSA), puis compléter avec 1450 ml d'eau purifiée).

(calculer le volume du mélange qu'il faut pour tout le nombre de boîtes de Pétri que vous prévoyez faire. Pour les 122 boîtes de Pétri calculés pour mon cas (voir cahier de lab p.40) il faut prévoir 3 litres de solution (TSA) soit 2 erlenmeyers contenant chacun 1.5 l);

- 2- Laisser agiter sur l'agitateur magnétique environ 5 mn (ne pas enlever le barreau);
- 3- Fermer l'erlenmeyer à l'aide d'un bouchon de mousse et couvrir son col de papier aluminium, poser ensuite un papier autoclave dessus et mettre à autoclaver pendant 20 mn à température de 121 °C;
- 4- Refroidir le milieu autoclavé à une température de versement d'environ 60 °C ensuite, le mettre dans un bain marie afin de maintenir sa température à 60 °C ;
- 5- Préparer une solution de cyanures libres (34.5 mg/ 50 ml) sous la hotte ventilée :

dans un becher de 100 ml peser 86.25 mg de KCN. Compléter à 50 ml avec l'eau purifiée préalablement ajustée à pH 12.0 avec la solution de NaOH 10 N (ceci est pour empêcher la formation et la volatilisation du HCN).

**Remarque** : ces quantités sont calculées pour une solution finale (TSA + KCN) de 1.5 l. NB : 86.25 mg de KCN dans 1.5 l de solution TSA + KCN donne une concentration finale de 23 mg/l de cyanures. Le pH de cette solution doit être égal à 9.2.



- 6- Préparer le matériel pour ajuster le pH du milieu autoclavé (pH-mètre, tampon à température de 60 °C, agitateur magnétique, acide nitrique, eau stérile, NaOH 10 N, seringues et filtres).

#### **Ajustement du pH :**

- Premièrement calibrer le pH-mètre à l'aide des 3 standards chauffés au bain-marie (60 °C) ; assurez-vous que les tampons sont agités au moment de la calibration (noter la T° des trois valeurs) ;
  - Nettoyer l'électrode à l'acide, puis rincer avec l'eau stérilisée par autoclave.
  - Retirer l'erlenmeyer contenant le milieu du bain-marie et le mettre sur l'agitateur magnétique après avoir stérilisé le col à la flamme.
  - Lire le pH du milieu et commencer à ajouter quelques gouttes de NaOH 10 N stérilisées par filtration (0.45 µm). Ajuster le pH du milieu à 8.5, ensuite ajouter la solution de cyanures (préparée au point 5) en la passant sur le filtre 0.45 µm. Le pH du milieu devrait monter jusqu'à 8.7, rajouter du NaOH pour ramener ce dernier à pH = 9.2. Noter le pH exact.
- 7- Remettre le bouchon de mousse de l'erlenmeyer et agiter pendant 10 minutes sur l'agitateur magnétique.
  - 8- Passer tout de suite après à l'étape de la distribution sur boîtes de Pétri (paragraphe 5.2).

#### **Milieu II :**

- Dans un erlenmeyer de 2 litres peser 22.5 g d'agar noble. Y ajouter le mélange de MSM, puis compléter avec 1450 ml d'eau purifiée. (calculer le volume qu'il faut pour tout le nombre de boîtes de Pétri que vous prévoyez faire);
- Suivre exactement la même procédure que celle du **Milieu I** en commençant par l'étape 2.

### **5.2 Distribution sur boîtes de Pétri**

- 1- En travaillant dans des conditions stériles à proximité de la flamme, distribuer environ 20 ml du milieu cyanuré dans une boîte de pétri en essayant de ne pas l'ouvrir au complet. Refermer la boîte et la garder sur le comptoir stérilisé. Procéder ainsi pour les boîtes de Pétri suivants. Empiler ainsi jusqu'à 5 boîtes de Pétri. N.B : l'utilisation de poignets en caoutchouc lors du versement est recommandé pour cet effet.
- 2- Une fois le **Milieu I** distribué, passer au **Milieu II**.

- 3- Laisser l'agar se solidifier à température de la pièce pendant 1 heure toujours sous la hotte ventilée.
- 4- Après solidification de l'agar, les boîtes de Pétri sont placés en position inversée 24-48 heures (toujours sous la hotte ventilée) afin d'éviter que les gouttes résultant de la condensation de l'eau ne retombent à la surface de la gélose.
- 5- Empiler les boîtes de Pétri (appartenant au même milieu) ensemble, puis les mettre dans leurs sacs originaux. Identifier les sacs et garder les au réfrigérateur (4 °C) pendant au moins 24 h avant leur utilisation.

### 5.3 Préparation de la solution saline

- 1- Préparer une solution de NaCl 0.85 % p/v (8.5 g NaCl dans 1 l d'eau purifiée) (en prévoir toujours assez pour tous le nombre de bouteilles)
- 2- Verser un volume de 95 ml dans les bouteilles de dilution qui serviront à l'extraction (une bouteille par échantillon) à l'aide d'une dispensette de 25 ml. Ajouter 30 billes de verre dans chaque bouteille.
- 3- Prendre maintenant le reste des bouteilles de dilution (3 bouteilles/éch) et verser 90 ml de la solution NaCl dans chacune.
- 4- Autoclaver toutes les bouteilles à 121 °C pendant 20 mn, puis laisser refroidir jusqu'à température ambiante (pour accélérer le refroidissement on peut placer les bouteilles dans la chambre froide à 4 °C pendant environ 3 heures).

### 5.4 Préparation des dilutions en série

- 1- Travailler stérilement près de la flamme toujours sous la hotte ventilée. Peser environ 10 g de résidu humide (noter le poids exact) à l'aide d'une cuillère stérilisée (trempée dans l'éthanol ensuite brûlée à la flamme) dans la bouteille à dilution 95 ml contenant les billes de verre (préparées ci-dessus).
- 2- Faire un poids sec (PSO A7) en duplicata.
- 3- Boucher bien les bouteilles et agiter mécaniquement pendant 30 mn. **Cette bouteille contenant la suspension de sol représente la dilution  $10^{-1}$ .**
- 4- Utiliser la hotte biologique pour faire les dilutions et l'étalement sur boîtes de Pétri.
- 5- Brassier encore manuellement la bouteille avant de prélever les aliquots.
- 6- Prendre une série de 3 bouteilles de dilution autoclavées contenant la solution saline et les identifier de  $10^{-2}$  jusqu'à la dilution  $10^{-4}$ .
- 7- Réaliser les dilutions jusqu'à  $10^{-4}$  en transférant 10 ml à chaque fois à partir de la bouteille qui contient la plus petite dilution par rapport à la prochaine. La dilution  $10^{-1}$  à celle de  $10^{-2}$ , la  $10^{-2}$  à  $10^{-3}$  et enfin la  $10^{-3}$  à la  $10^{-4}$  (voir le schéma opératoire). Effectuer le transfert à l'aide de la pipette stérile jetable (10 ml).

Brasser les bouteilles énergiquement avant chaque prélèvement afin de bien homogénéiser la suspension. Jeter la pipette après chaque utilisation.

8- Une fois les dilutions prêtes passer à l'étalement sur boîtes de Pétri.

### 5.5 Préparation des étalements sur boîtes de Pétri

- 1- Attention à la contamination ! Travailler toujours stérilement près de la flamme.
- 2- À l'aide du pipetman, transférer 0.1 ml (100 µl) de chaque dilution sur les boîtes de pétri préparés. Jeter l'embout après chaque utilisation.
- 3- Par un mouvement rotatif en utilisant le tourne disque, étaler la dilution sur le milieu gélatinisé à l'aide d'une tige de verre recourbée stérilisée (il faut tremper la tige dans l'éthanol, la passer à la flamme puis la laisser refroidir (1 mn) avant de procéder à l'étalement). L'étalement s'effectue toujours de la plus haute dilution à la plus petite ( $10^{-4}$  à  $10^{-1}$ ).
- 4- Après étalement sur boîtes de Pétri, inverser ces derniers, et les empiler une fois de plus, les remettre dans leurs sacs originaux. Ils sont prêts pour l'incubation.
- 5- L'incubation des boîtes de Pétri s'effectue à 28 °C dans l'incubateur, pendant 7 jours (la première lecture), et 15 jours (la deuxième lecture) (Dumestre, 1995). L'incubateur assure les conditions favorables pour la réalisation de cette méthode (aérobie, température).
- 6- **Remarque** : seuls les milieux contenant entre 30 et 300 colonies serviront à énumérer une population.

### 5.6 Procédure pour le comptage des colonies

Les boîtes de Pétri sont retirés au 7<sup>ème</sup> jour de l'incubateur. Seulement ceux contenant entre 30 et 300 colonies sont considérés. Le comptage se fait manuellement à l'aide du compteur Québec. Les boîtes de Pétri contenant de la contamination sont exclus du compte final, les colonies étendues le sont aussi.

## 6 CALCULS

Calculer pour chacun des triplicatas le nombre de UFC/g de résidu sec pour une dilution donnant entre 30 et 300 colonies. Effectuer une moyenne et un écart type sur les trois résultats. La détermination du nombre de UFC/g de résidu sec se calcule comme suit :

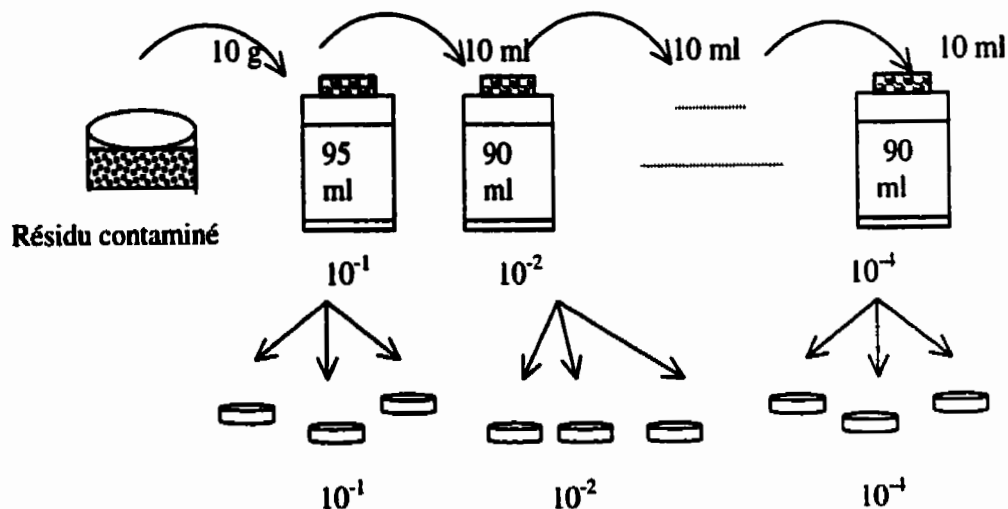
$$\text{Nombre de UFC / g de residu sec} = \frac{(\text{compte} * \sqrt{\text{dilution}}) (FC)}{\text{Poids sec du residu}}$$

Où,

FC = le facteur de correction pour l'étalement. Ce facteur est égal à 10 car lors de l'étalement on ne prélève que 0.1 ml.

$$\text{Poids sec} = \text{poids residu humide} \times \left(1 - \frac{\% \text{ humidite}}{100}\right)$$

## 7 SCHÉMA OPÉRATOIRE



## 8 PRÉPARATION DU MÉLANGE MSM

Préparer une solution 1 M de chacun des composés suivants :

	(PM g/mol)	quantité prélevée
pour 1.5 l d'agar		
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [sodium phosphate]	137.99	9.6 ml
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ [potassium phosphate]	174.18	19.49 ml
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [ammonium sulfate]	132.14	12.49 ml
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [magnésium sulfate]	246.48	0.59 ml
- $\text{NaNO}_3$ [sodium nitrate]	84.99	17.69 ml

Préparer une solution de 1 litre contenant tous les composés suivants, ensuite ajouter 1.5 ml de cette solution dans 1.5 l d'agar :

	PM (g/mol)	quantité pesée (g/l)
- $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	291.03	0.2903
- $\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	474.39	0.4743
- $\text{CuSO}_4$	159.66	0.1596
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.56	0.2875
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.01	2.7801
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169.02	1.6902
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241.95	0.4839

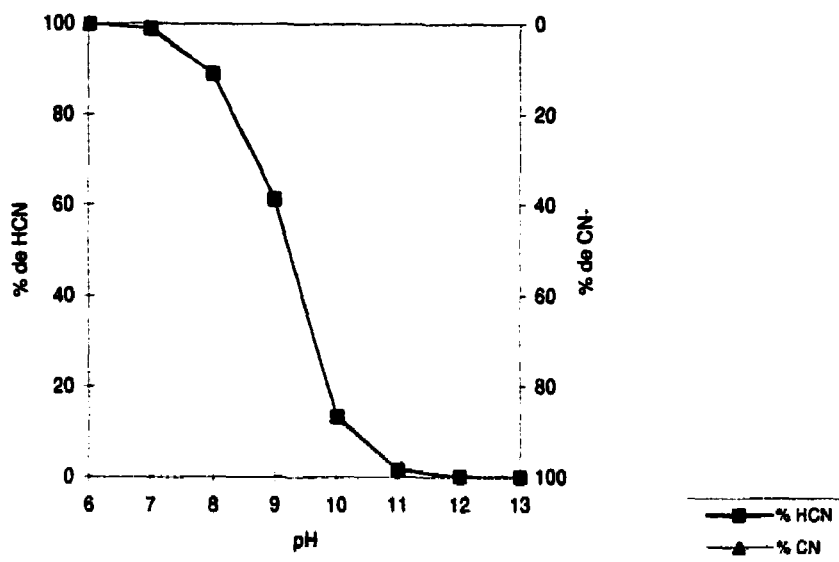
Laisser agiter la solution pendant environ 15 mn. Ajuster le pH (~ 7).

## 9 ESTIMATION DE LA VOLATILISATION DU HCN

Le problème de volatilisation de l'acide cyanhydrique (HCN) lors de la manipulation rend cette expérience très difficile à maîtriser si des précautions ne sont pas prises dès le départ. Donc il faut travailler en gardant à l'esprit qu'à tout moment de la manipulation il peut y avoir des quantités de HCN qui se volatilise dans l'air.

La perte des cyanures sous forme de HCN pourrait surestimer les quantités administrées dans les milieux nutritifs, ceci va fausser les interprétations des étapes de sélection sur gélose. Pour ce faire, il est primordial de maintenir un pH assez alcalin du milieu nutritif pour éviter la formation et la volatilisation du HCN (voir figure 1). Sauf dans notre cas il est plus intéressant de travailler à pH proche de la neutralité car l'objectif de cette manipulation est le dénombrement de microflores tolérantes aux cyanures dans les mêmes conditions du terrain.

D'après Dumestre (1995), La croissance des micro-organismes est inhibée à pH supérieur à 10.6. Ceci confirme qu'il faut travailler à pH inférieur à 10.6, mais pH = 10 demeure trop loin de notre objectif. Pour travailler à un pH encore plus bas que 10 il va falloir estimer les pertes du HCN dues à la volatilisation dans les conditions de la manipulation (température, volume de la solution, volume d'air en équilibre avec la solution et le pH). Les pertes seront ensuite compensées en élevant la concentration des cyanures au départ.



**Figure 1 : Équilibre entre les formes cyanurées moléculaires (HCN) et ioniques (CN<sup>-</sup>) en solution en fonction du pH (Smith et Mudder 1991).**

### 9.1 Calcul de la volatilisation

Ce calcul est basé sur la loi de conservation de la masse qui se traduit dans notre cas comme suit :

$$Q_{CN_{tot}} = [HCN]_g V_g + [HCN + CN^-]_L V_L \quad (1)$$

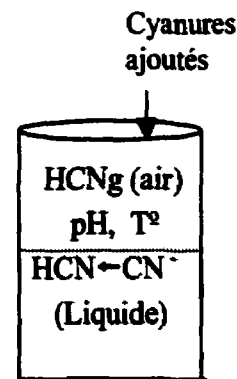
$Q_{CN_{tot}}$  : Quantité en mole de cyanures ajoutée au départ.

$[HCN]_g$  : Concentration en mol/l du HCN dans le gaz

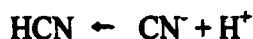
$[HCN + CN^-]_L$  : Concentration en mol/l du HCN et CN<sup>-</sup> dans le liquide

$V_g$  : Volume du gaz en équilibre avec la solution

$V_L$  : Volume du liquide (solution) en équilibre avec le gaz



D'autre part en solution on a :



$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{CN}^-]}{[\text{HCN}]} \Rightarrow \frac{[\text{CN}^-]}{[\text{HCN}]_L} = 10^{\text{pH} - \text{pKa}} \quad (2)$$

pH = pH de la solution

pKa = 9,2 (Perry's handbook, 1997).

**Loi de Henry à l'équilibre :**

$$P_{(\text{HCN})_g} = K_H [\text{HCN}]_L \quad (3)$$

$P_{(\text{HCN})_g}$  : pression partielle de HCN dans le gaz

$[\text{HCN}]_L$  : concentration en mol/l de HCN dans le liquide

$K_H$  : constante de Henry pour le HCN (Landolt-Börnstein, 1976) qui vaut :

$$K_H = 7.33 \cdot 10^{-2} \text{ atm.l/mol} \quad \text{à } 20 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$K_H = 10.33 \cdot 10^{-2} \text{ atm.l/mol} \quad \text{à } 25 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$K_H = 14.51 \cdot 10^{-2} \text{ atm.l/mol} \quad \text{à } 30 \text{ }^\circ\text{C}$$

**La loi des gaz parfaits :**

$$P_{(\text{HCN})_g} V = n RT \quad (4)$$

$P_{(\text{HCN})_g}$  : pression partielle de HCN dans le gaz (atm)

V : volume du gaz (L)

T : température en kelvin du gaz (K)

R : constante des gaz parfait = 0.082 L atm/mol K

n : nombre de moles de HCN dans le gaz

Afin d'estimer le  $[\text{HCN}]_g$  on procède comme suit.

De (2) on a

$$[\text{CN}^-] = [\text{HCN}]_L (10^{\text{pH} - \text{pKa}}) \quad (2')$$

Puis de (3) et (4) on peut écrire

$$[HCN]_g = \frac{K_H [HCN]_L}{RT} \quad (5)$$

En substituant ces deux dernières équations dans (1) on trouve

$$Q_{CN_{tot}} = [HCN]_L \left[ \frac{K_H}{RT} V_g + \left( 1 + 10^{pH - pK_a} \right) V_L \right]$$

De cette dernière équation il reste juste à déterminer  $[HCN]_L$ .

$Q_{CN_{tot}}$ ,  $V_g$ ,  $V_L$ ,  $pH$  sont des données fixées dès le départ.  $R$ ,  $pK_a$  et  $K_H$  sont des constantes.  $T$  est la température du gaz au moment de la manipulation. Donc toutes les variables sont connues.

Une fois  $[HCN]_L$  calculé, on trouve  $[HCN]_g$  à l'aide de l'équation (5) en mol/l. On peut ensuite exprimer ce dernier en pourcentage par rapport à la quantité ajoutée au départ ( $Q_{CN_{tot}}$ ).

**NB : La quantité de  $HCN_g$  trouvée représente la quantité lorsque l'équilibre est atteint.**

## 9.2 Calcul pratique

Dans notre cas on veut calculer le pourcentage du HCN qui se volatilise dans l'air, pour ce faire on a créé un chiffrier dans lequel on fait varier le pH et le volume du gaz, ce chiffrier a été réalisé pour trois températures d'équilibre différentes, 30 °C, 25 °C, 20 °C (voir tableau des calculs).

## 9.3 Choix du pH

Le pH qu'on doit choisir doit nous permettre d'avoir le moins de volatilisation possible tout en restant le plus proche de la neutralité. Le  $pH = 9.2$  semble offrir cette possibilité. Le pourcentage de volatilisation correspondant est de 55.5 % à  $T^\circ = 20 \text{ °C}$  pour un volume de 1.5 l de solution d'agar, donc en utilisant une concentration de 23 mg/l de cyanures qui correspond à 57.5 mg/l de KCN, il devrait rester seulement 10.23 mg/l de cyanures en solution ceci bien entendu est vrai lorsque l'équilibre est atteint. Donc, 57.5 mg/l de KCN correspond à 10.23 mg/l de cyanures libres en tenant compte de la volatilisation.

Maintenant il reste le problème de l'équilibre, nous on prévoit perdre au plus 55.5



% de la quantité initiale de cyanure, mais ce n'est pas le cas tant que l'équilibre n'est pas atteint ce qui veut dire qu'on aura une concentration en cyanures libres comprise entre 10 et 23 mg/l en solution si on considère 55.5 % et 0 % de volatilisation respectivement. la plage de concentration 10 - 23 mg/l ne dérange en rien car l'objectif de la manipulation est de voir si les micro-organismes sont tolérants aux cyanures à des concentrations raisonnables et non pas de savoir exactement quelle concentration sont-ils capable de tolérer. On s'attend à perdre plus de cyanures au moment du coulage de la solution d'agar, une fois cette dernière solidifiée on présume que les pertes seront minimales. Le HCN peut continuer à se volatiliser lors de l'incubation (Figueira et al. 1996).

Remarque : Dumestre dans ses expériences de dénombrement de la microflore tolérante aux cyanures il a utilisé des concentrations de 20 et 125 mg/l (Dumestre, 1995).

## 10 RÉFÉRENCE(S)

PSO A4; `` Dénombrement total de colonies bactériennes hétérotrophes par la méthode du comptage sur boîtes de Pétri ou méthode des comptes viables``. Auteur, Sandra Estrela 1996.

Dumestre A. (1995). Biodégradation des cyanures contenus dans des résidus de la fabrication de l'aluminium. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré Nancy I.

Figueira M.M., Ciminelli V.S.T., de Andrade M.C., Linardi V.R. (1996). Cyanide degradation by *Escherichia coli* strain. Can. J. Microbiol. 42 : 519-523.

Germida, J.J. (1993). Cultural Methods for Soil Microorganisms. Soil Sampling and Methods of Analysis, Carter, M.R. (Ed). Canadian Society of Soil Science. p 263-268.

Landolt-Börnstein, (1976). IV Band "TECHNIK" -4.Teil "Wärmetechnik", Ed. Springer-Verlag.

Perry, R.H., Green, D.W. (1997). Perry's Chemical Engineers' Handbook. 17 Ed.

Smith, A., Mudder, T. (1991). The chemistry and treatment of cyanidation wastes. Edt Mining Journal Books.

## 11 RECOMMANDATION(S)

- Pour être plus sûr de la présence des cyanures dans les lors de l'incubation, il est important de faire analyser quelques boîtes de Pétri pour les cyanures totaux. Faire analyser quelques échantillons avant la mise en incubation, une semaine et ensuite deux semaines après l'incubation (les analyses se font par Maxxam pour une matrice solide).
- Il est préférable de fermer les boîtes à Pétri avec du parafilm. Ce dernier permettra de minimiser les pertes de cyanures lors de l'incubation et permettra

aux micro-organismes de respirer.

- Le temps de réalisation de l'expérience pour un seul milieu est de 5 jours et ceci pour quatre échantillons en duplicatas.

## Tableaux des calculs

Température à l'équilibre = 30 °C

[CN] <sup>tot</sup> (mg/l)	V <sub>L</sub> (L)	Q <sub>obs</sub> (mol)	V <sub>g</sub> (L)	pH	(K <sub>a</sub> /RT)*V <sub>g</sub>	[HCN] <sub>L</sub> (mol/l)	[HCN] <sub>g</sub> (mol/l)	Q <sub>HCN</sub> (mol)	% HCN <sub>g</sub>
23	1,5	1,33E-03	1000	7,0	5,8400	1,81E-04	1,06E-06	1,06E-03	79,46
23	1,5	1,33E-03	2000	7,0	11,6799	1,01E-04	5,80E-07	1,10E-03	80,56
23	1,5	1,33E-03	1000	8,0	5,8400	1,78E-04	1,04E-06	1,04E-03	78,55
23	1,5	1,33E-03	1000	8,5	5,8400	1,74E-04	1,01E-06	1,01E-03	76,45
23	1,5	1,33E-03	1000	9,0	5,8400	1,60E-04	9,36E-07	9,36E-04	70,46
23	1,5	1,33E-03	2000	9,0	11,6799	9,39E-05	5,40E-07	1,10E-03	82,66
23	1,5	1,33E-03	1000	9,2	5,8400	1,50E-04	8,77E-07	8,77E-04	66,06
23	1,5	1,33E-03	2000	9,2	11,6799	9,04E-05	5,29E-07	1,06E-03	79,56
23	1,5	1,33E-03	1000	9,5	5,8400	1,28E-04	7,50E-07	7,50E-04	56,52
23	1,5	1,33E-03	1000	10,2	5,8400	5,94E-05	3,47E-07	3,47E-04	26,14
23	1,5	1,33E-03	1000	10,5	5,8400	3,58E-05	2,08E-07	2,08E-04	15,67
23	1,5	1,33E-03	1000	11,0	5,8400	1,30E-05	7,60E-08	7,60E-05	5,73
23	1,5	1,33E-03	1000	11,5	5,8400	4,33E-06	2,53E-08	2,53E-05	1,90
23	1,5	1,33E-03	1000	12,0	5,8400	1,39E-06	8,12E-09	8,12E-06	0,61
23	5	4,42E-03	1000	7,5	5,8400	4,04E-04	2,38E-06	2,38E-03	53,38
23	5	4,42E-03	3000	7,5	17,5199	1,98E-04	1,14E-06	3,43E-03	77,46

pKa	R (l atm/mol K)	T(gaz) (K)	K <sub>a</sub> (atm l/mol)
9,2	0,082	3,03E+02	0,1451

Température à l'équilibre = 20 °C

[CN] <sup>tot</sup> (mg/l)	V <sub>L</sub> (L)	Q <sub>obs</sub> (mol)	V <sub>g</sub> (L)	pH	(K <sub>a</sub> /RT)*V <sub>g</sub>	[HCN] <sub>L</sub> (mol/l)	[HCN] <sub>g</sub> (mol/l)	Q <sub>HCN</sub> (mol)	% HCN <sub>g</sub>
23	1,5	1,33E-03	1000	7,0	3,0509	2,91E-04	8,88E-07	8,88E-04	66,90
23	1,5	1,33E-03	2000	7,0	6,1017	1,74E-04	5,32E-07	1,06E-03	80,17
23	1,5	1,33E-03	1000	8,0	3,0509	2,86E-04	8,71E-07	8,71E-04	65,67
23	1,5	1,33E-03	1000	8,5	3,0509	2,74E-04	8,35E-07	8,35E-04	62,90
23	1,5	1,33E-03	1000	9,0	3,0509	2,41E-04	7,36E-07	7,36E-04	55,50
23	1,5	1,33E-03	2000	9,0	6,1017	1,56E-04	4,74E-07	8,47E-04	71,38
23	1,5	1,33E-03	1000	9,2	3,0509	2,19E-04	6,89E-07	6,89E-04	50,42
23	1,5	1,33E-03	2000	9,2	6,1017	1,48E-04	4,48E-07	8,90E-04	67,04
23	1,5	1,33E-03	1000	9,5	3,0509	1,78E-04	5,37E-07	5,37E-04	40,44
23	1,5	1,33E-03	1000	10,2	3,0509	6,79E-05	2,07E-07	2,07E-04	15,60
23	1,5	1,33E-03	1000	10,5	3,0509	3,85E-05	1,17E-07	1,17E-04	8,85
23	1,5	1,33E-03	1000	11,0	3,0509	1,34E-05	4,08E-08	4,08E-05	3,08
23	1,5	1,33E-03	1000	11,5	3,0509	4,37E-06	1,33E-08	1,33E-05	1,00
23	1,5	1,33E-03	1000	12,0	3,0509	1,40E-06	4,26E-09	4,26E-06	0,32
23	5	4,42E-03	1000	7,5	3,0509	5,43E-04	1,68E-06	1,68E-03	37,43
23	5	4,42E-03	3000	7,5	9,1528	3,10E-04	8,47E-07	2,84E-03	64,22


pKa	R (l atm/mol K)	T(gaz) (K)	K <sub>a</sub> (atm l/mol)
9,2	0,082	2,93E+02	0,0733

Température à l'équilibre = 25 °C

[CH <sub>3</sub> ] (mg/l)	V <sub>L</sub> (L)	Q <sub>CH<sub>3</sub></sub> (mol)	V <sub>g</sub> (L)	pH	(K <sub>a</sub> /RT)*V <sub>g</sub>	[H <sub>2</sub> C=O] (mol/l)	[HCN] (mol/l)	Q <sub>HCN</sub> (mol)	% HCN <sub>g</sub>
23	1,5	1,33E-03	1000	7,0	4,2274	2,31E-04	9,76E-07	9,76E-04	73,69
23	1,5	1,33E-03	2000	7,0	8,4547	1,33E-04	5,63E-07	1,13E-03	84,85
23	1,5	1,33E-03	1000	8,0	4,2274	2,28E-04	9,63E-07	9,63E-04	72,61
23	1,5	1,33E-03	1000	8,5	4,2274	2,20E-04	9,31E-07	9,31E-04	70,14
23	1,5	1,33E-03	1000	9,0	4,2274	1,89E-04	8,41E-07	8,41E-04	63,34
23	1,5	1,33E-03	2000	9,0	8,4547	1,22E-04	5,15E-07	1,03E-03	77,56
23	1,5	1,33E-03	1000	9,2	4,2274	1,84E-04	7,76E-07	7,76E-04	59,49
23	1,5	1,33E-03	2000	9,2	8,4547	1,16E-04	4,90E-07	9,79E-04	73,81
23	1,5	1,33E-03	1000	9,5	4,2274	1,52E-04	6,43E-07	6,43E-04	48,48
23	1,5	1,33E-03	1000	10,2	4,2274	6,40E-05	2,71E-07	2,71E-04	20,40
23	1,5	1,33E-03	1000	10,5	4,2274	3,72E-05	1,57E-07	1,57E-04	11,86
23	1,5	1,33E-03	1000	11,0	4,2274	1,32E-05	5,59E-08	5,59E-05	4,21
23	1,5	1,33E-03	1000	11,5	4,2274	4,36E-06	1,84E-08	1,84E-05	1,39
23	1,5	1,33E-03	1000	12,0	4,2274	1,39E-06	5,89E-09	5,89E-06	0,44
23	5	4,42E-03	1000	7,5	4,2274	4,74E-04	2,00E-06	2,00E-03	45,32
23	5	4,42E-03	3000	7,5	12,6821	2,49E-04	1,05E-06	3,15E-03	71,32

pKa	P (atm/mol K)	T (gaz) (K)	K <sub>a</sub> (atm/mol)
9,2	0,082	2,99E+02	0,1033

**ANNEXE IV P33-D- Tests de biodégradation en microcosmes des cyanures  
contenus dans un résidu minier**

 <p>Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites</p>		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # :P33-D		Nombres de pages :14	
Version :01		Date :06/03/2000	
Auteur(s): <u>Kahina Oudjehani</u>			
Approuvé par :		Signatures :	
<u>Gérald Zagury</u>		<input checked="" type="checkbox"/> _____	
<u>Louise Deschênes</u>		<input checked="" type="checkbox"/> _____	
_____		<input type="checkbox"/> _____	
_____		_____	
_____		_____	

**Titre :** Tests de biodégradation en microcosmes des cyanures contenus dans un résidu minier.

**Mots clés :** Cyanures, K14CN, biodégradation, microorganismes, NH<sub>3</sub>, microcosmes, minéralisation, formate, formamide.

## 1 OBJECTIF

Cette expérience comprend deux objectifs, le premier est de savoir si la microflore contenue dans le résidu minier a la capacité de dégrader les cyanures libres avec des essais de minéralisation, et le deuxième est de vérifier la biodégradation naturelle des cyanures présents initialement dans le résidu en suivant les produits de dégradation dans le temps.

## 2 PRINCIPE

Les essais de biodégradation regroupent trois expériences. La première (série A) représente des tests de minéralisation en microcosme. Du KCN radiomarqué est utilisé pour détecter la présence de  $^{14}\text{CO}_2$  s'il y a minéralisation des cyanures. Le test de minéralisation suit exactement le PSO A10. La deuxième expérience (série B) est un essai de biodégradation naturelle où les cyanures contenus dans le résidu ainsi que les produits de biodégradation comme le formate et le formamide sont suivis dans le temps. Enfin la troisième expérience (série C) consiste à suivre le  $\text{NH}_3$  gazeux un autre produit de biodégradation des cyanures.

Tous les tests seront réalisés en triplicatas pour être sûr de la reproductibilité des résultats.

## 3 MATÉRIEL ET RÉACTIFS

- Le matériel utilisé est le même que celui décrit dans le PSO A 10 sur les tests de minéralisation ;
- Eau nanopure ;
- $\text{K}^{14}\text{CN}$ , KCN ;
- Solution NaOH 1 N (peser 40 g de pastilles de NaOH puis diluer avec 1000 ml d'eau désionisée).
- Acide borique coloré (voir PE P33-E) ;
- KOH (1 N) ;
- Azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) ;
- Chlorures de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ).

## 4 MÉTHODOLOGIE

### 4.1 Essai préliminaire

Afin de savoir si la microflore indigène du résidu a la capacité de dégrader les cyanures, un essai préliminaire semble nécessaire pour la série A. Quatre essais sont prévus pour cet effet (voir l'encadré ci-dessous). Le premier essai est dans le but de détecter la présence de  $^{14}\text{CO}_2$  en cas de minéralisation du contaminant radiomarqué. Le deuxième essai est de savoir si on obtient une minéralisation en ajoutant une concentration connue de KCN au résidu. Le troisième et le quatrième essai sont réalisés dans le cas où les deux premiers ne fonctionneraient pas par manque de minéraux et/ou de source d'azote. Dans l'essai III le MSM (solution minérale minimale) est ajouté au résidu. Dans l'essai IV est ajouté le MSMm (solution minérale de laquelle a été retirée la source d'azote).

L'essai préliminaire sera réalisé sur trois échantillons en triplicata (Dy3 (0.2), Dy9 (0.2), Yv6 (0.2)). La méthodologie à suivre est la même que celle décrite pour la série A dans le paragraphe 4.2.

Dans le cas où l'on obtiendrait une minéralisation, cet essai préliminaire servira aussi à déterminer la vitesse à laquelle le  $^{14}\text{CN}$  est minéralisé qui sera utile pour définir l'intervalle d'échantillonnage dans les futurs tests.

---

<b>Essai I</b> : résidu minier + $\text{K}^{14}\text{CN}$ (100 000dpm)	→	témoin abiotique
<b>Essai II</b> : résidu minier + $\text{K}^{14}\text{CN}$ + KCN (1ml d'une solution de 100 mg/l $\text{CN}^-$ donne une contamination de 5ppm dans le résidu)	→	témoin abiotique
<b>Essai III</b> : résidu minier + $\text{K}^{14}\text{CN}$ + MSM (0.5ml)	→	témoin abiotique
<b>Essai VII</b> : résidu minier + $\text{K}^{14}\text{CN}$ + $\text{MSM}_m^*$ (0.5ml)	→	témoin abiotique

---

\* $\text{MSM}_m$  (MSM modifié): MSM sans source d'azote.

#### 4.2 Montage de l'expérience

Dans la partie de littérature on a vu que les produits de biodégradation du cyanure en conditions aérobie sont le formate, le formamide, le  $\text{NH}_3$  et le  $\text{CO}_2$ . Dans notre cas nous sommes tenus à doser ces quatre produits. Trois séries seront réalisées : séries A, B et C.

**La série "A"** comprend un microcosme (bouteille de 125ml) en triplicata plus un témoin abiotique. Une trappe à  $\text{CO}_2$  qui contient du KOH est ajoutée au microcosme. Dans cette série on suit uniquement la formation du  $^{14}\text{CO}_2$  dans le temps (voir tableau 1). Trois essais sont envisagés dans cette série : résidu minier +  $\text{K}^{14}\text{CN}$  (chaud), résidu minier +  $\text{K}^{14}\text{CN}$  + une contamination de 5 ppm et résidu minier +  $\text{K}^{14}\text{CN}$  + une contamination de 10 ppm (voir l'encadré ci-dessous), pour le calcul de la concentration voir le paragraphe 7.2. Les autres produits ne seront pas analysés à cette étape à cause de la présence d'un composé radioactif. Les microcosmes sont incubés à la noirceur à 25 °C.

**La série "B"** par contre est destinée à suivre les métabolites de biodégradation (formamide, acide formique,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CN}_T$ ). Les conditions de travail seront les mêmes que la série "A", sauf que le  $\text{K}^{14}\text{CN}$  et les cyanures libres ne seront pas ajoutés. La série "B" sera réalisée en triplicata plus un témoin abiotique sur les échantillons Yv6 (0.2m) et Dy3 (0.2) dans des macrocosmes (réacteurs de 1.5 litres). À cette étape aucune quantité de cyanure n'est ajoutée au résidu, on suit uniquement les cyanures présents initialement dans la matrice.

**La série "C"** est réalisée sur tous les échantillons, et uniquement le  $\text{NH}_3$  est suivi. Cette série sera réalisée dans des microcosmes (bouteilles de 125ml), le  $\text{NH}_3$  est quantifié



selon le PE P33-E. Les microcosmes sont incubés à la noirceur à 25 °C.

**Remarque :** Le poison utilisé dans les témoins abiotiques des séries B et C est le  $\text{HgCl}_2$  au lieu du  $\text{NaN}_3$  car ce dernier peut favoriser la production de l'ammoniaque.

☐ La série "A" dont l'analyse est réalisée au laboratoire on propose les essais suivants :

---

<b>Essai I :</b> résidu minier + $\text{K}^{14}\text{CN}$ (0 ppm)	→	témoin abiotique
<b>Essai II :</b> résidu minier + $\text{K}^{14}\text{CN}$ + KCN (5 ppm)	→	témoin abiotique
<b>Essai III :</b> résidu minier + $\text{K}^{14}\text{CN}$ + KCN (10 ppm)	→	témoin abiotique

---

**Remarque :** Les mêmes étapes décrites dans le PSO A10 seront entreprises lors de cette manipulation pour les différents types d'essais proposés.

☐ La série "B" est un test de biodégradation naturelle sans ajout de cyanure. Elle est réalisée sur 2 échantillons à une seule profondeur (Yv6 (0.2m), Dy3 (0.2)). Les  $\text{CN}^-$ , le formate, le formamide et le  $\text{NH}_4^+$  sont suivis dans le temps et sont analysés par un laboratoire externe (Maxxam et CEAEQ).

☐ La série "C" est réalisée pour suivre uniquement le  $\text{NH}_3$ , cette série va être réalisée sur tous les échantillons aux deux profondeurs.

**Remarque :** Le  $\text{pK}_a$  du couple acide/base ( $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ) est égal à 9.2, à pH neutre le  $\text{NH}_4^+$  est majoritaire (c'est la forme protonnée).

### 4.3 Concentration de cyanure dans le microcosme radioactif

Le choix de la concentration des cyanures ajoutée au résidu est basé sur la littérature et sur les précédentes expériences de dénombrement sur boîte de Petri.

#### 4.3.1 Concentration dans le milieu liquide

La concentration de cyanure utilisée dans les multiples essais de biodégradation varie selon les publications et les objectifs de l'étude effectuée. Une concentration supérieure à 1 mM de  $\text{CN}^-$  est inhibitrice à la croissance de *P. fluorescens* biotype II non acclimaté aux cyanures (Harris et Knowles, 1983). D'autres chercheurs ont travaillé avec des concentrations plus élevées allant jusqu'à 200 mg/l (Babu *et al.* 1992), le cyanure a été utilisé par la bactérie isolée comme source de carbone et d'azote. La bactérie immobilisée dans l'alginat était capable d'utiliser des concentrations élevées de

cyanures car cette matrice la protégeait contre leur toxicité. Cependant, Harris & Knowles (1983) ont choisi de travailler avec une concentration de 1 mM en considérant le cyanure comme seule source d'azote. Ils ont remarqué que c'était plus facile d'isoler des bactéries qui utilise le cyanure comme source d'azote plutôt que substrat de croissance. La croissance bactérienne nécessite une teneur en carbone qui correspond à une concentration supérieure à la limite d'inhibition. L'utilisation de cyanure comme source d'azote permet cependant l'assimilation d'une concentration inférieure à la limite d'inhibition, puisque le besoin nutritif en azote est largement inférieur à celui du carbone (La teneur moyenne en azote pour les besoins nutritifs des micro-organismes est estimée à 0.15 g/l, alors que celle de carbone l'est à 0.65 g/l (Dumestre 1995)).

#### **4.3.2 Concentration dans un milieu solide**

Peu d'articles ont parlé de la concentration de cyanure inhibitrice dans un solide. Thompson et Gerteis (1990) ont fait plusieurs essais de détection de présence de bactéries sur des résidus à différentes concentrations de cyanures totaux. Les micro-organismes n'ont commencé à pousser que lorsque la concentration est devenue inférieure à 30 mg/kg.

#### **4.3.3 Choix de la concentration**

La concentration initiale dans les essais de tolérance des micro-organismes était de 23 mg/l. Cette concentration a été vérifiée en fonction du temps d'incubation des boîtes de Petri, à  $t = 0$  la concentration dosée était de 10 mg/kg d'agar solide. Ces essais ont prouvé que la microflore est résistante à cette concentration.

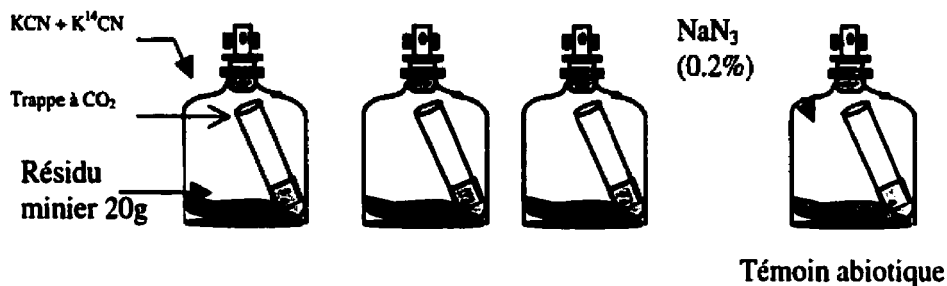
En tenant compte de ces considérations, une concentration de 5 mg/kg de cyanure semble correspondre aux objectifs de cette expérience car il faut tenir compte des cyanures déjà présents dans le résidu, en présence de l'eau ils risquent d'être lixiviés (voir résultats des  $CN_{WAD}$  de l'essai de lixiviation pour les échantillons Dy3(0.2, 1)). Aussi, il faut se rappeler que le but de cette expérience est l'étude de l'atténuation naturelle qui n'est envisageable que lorsque les concentrations sont faibles.

D'un autre côté, 5 mg/kg est inférieur à la concentration inhibitrice de 30 mg/kg observée par Thompson et Gerteis (1990).

Une autre concentration de 10 ppm va être étudiée pour voir l'effet de cette dernière sur la microflore.

#### 4.4 Schéma opératoire

oSérie "A" : Dosage du  $^{14}\text{CO}_2$  (triplicata + suivi dans le temps de tous les échantillons)



Réaliser avec 3 concentrations différentes en CN<sup>-</sup> : 0ppm, 5ppm, 10 ppm

oSérie "B" : Essai de biodégradation naturelle sans ajout de cyanure. Dosage du HCOOH, HCONH<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et CN<sub>T</sub> (essai en triplicata sur les échantillons Yv6 (0.2m et Dy3 (0.2))).



oSérie "C" : Dosage du  $\text{NH}_3$  (essai en triplicata sur tous les échantillons).



Les paramètres à analyser dans ces différentes séries sont résumés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 1** Suivi des paramètres pour les différentes séries de l'expérience

Paramètres	Série A	Série B	Série C
$\text{CN}_T$		X	
HCOOH		X	
HCONH <sub>2</sub>		X	
$\text{NH}_4^+$		X	
$^{14}\text{CO}_2$	X		
$\text{NH}_3$			X

#### 4.5 Procédure d'échantillonnage dans la série "B"

Homogénéiser les échantillons Yv6 (0.2m) et Dy3 (0.2) dans des sacs ziploc, ensuite peser 400 g de chacun de ces échantillons dans les contenants de 1.5 litres (quatre contenants). Ajouter 0.2 % de chlorures de mercure dans le réacteur qui va servir de témoin abiotique.

Avant de fermer les réacteurs effectuer la caractérisation initiale des paramètres décrits dans le point 5.5.1. À l'aide d'une cuillère transférer de chaque contenant environ 10 g du résidu dans des pots pour l'analyse du formate et formamide. Dans un autre pot transférer environ 20 g du résidu pour analyse de cyanure totaux et de l'ammoniaque. Expédier les échantillons aux laboratoires CEAEQ et Maxxam respectivement pour les analyses.

Échantillonner dans le temps les mêmes paramètres en suivant le **tableau 2**.

**Tableau 2** Paramètres à analyser au début et au cours de l'expérience des 3 séries.

Paramètres	Caractérisation initiale	Dosage des paramètres au cours de l'expérience			
	T = 0 j	T = 4 j	T = 12 j	T = 61j	T = 96 j
<b>CN<sub>T</sub></b>	X	X	X	X	X
<b>HCOOH</b>	X	X	X	X	X
<b>HCONH<sub>2</sub></b>	X	X	X	X	X
<b>NH<sub>3</sub></b>		?	?	?	?
<b><sup>14</sup>CO<sub>2</sub></b>	X	X	X	X	X
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	X	X	X	X	X

? Échantillonnage si la couleur lavande vire au vert, sinon ce n'est pas possible de titrer.

j : jour

## 5 MÉTHODES ANALYTIQUES

Le <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> sera suivi régulièrement et analysé par le compteur à scintillation. Le formate et le formamide sont dosés par HPLC munie d'un détecteur UV par le laboratoire d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ). L'ammoniaque dissout NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sera dosé par une méthode colorimétrique chez Maxxam. L'ammoniaque gazeux NH<sub>3</sub> est dissous dans l'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) puis titré avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (voir PE P33-E) et enfin les cyanures totaux seront analysés chez Maxxam.

## 6 CALCULS

### 6.1 Calcul pour la série "A"

#### 6.1.1 Calcul du volume de la solution radioactive

Cette partie concerne les microcosmes radioactifs pour un nombre de 56.

Volume de la solution radioactive ajouté au microcosme = 10 µl (100 000 dpm / 10 µl, pour 56 éch et 15 fois pour vérifier la solution (56 + 15) x 100 000 dpm = 7 100 000 dpm)

Solution mère radioactive (C<sub>1</sub>) = 1 000 000 dpm / µl (inscrit dans l'inventaire)

Solution fille radioactive (C<sub>2</sub>) = 100 000 dpm / 10 µl = 10 000 dpm / µl

Volume total requis ( $V_2$ ) = 56 microcosmes avec injection de 10  $\mu$ l = 560  $\mu$ l plus 15 vérifications = 710  $\mu$ l

Volume de la solution mère ( $V_1$ ) :

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_1 = C_2 V_2 / C_1 = (10\,000 \times 710) / 1000\,000 = 7.1 \mu\text{l}$$

Volume de solvant (eau basifiée) à ajouter : 710  $\mu$ l – 7.1  $\mu$ l = 702.9  $\mu$ l

### 6.1.2 La concentration de KCN ajoutée dans le microcosme

#### 1) Concentration 5 ppm

La concentration de CN ajoutée à l'échantillon dans l'essai II est **5 mg/kg de résidu (5 ppm)**.

Le volume de la solution de cyanure à ajouter dans le microcosme est fixé à **1ml**. Il reste à savoir quelle est la concentration de la solution de KCN à préparer.

5 mg (CN)  $\longrightarrow$  1000 g de résidu  
 0.1 mg (CN)  $\longleftarrow$  20 g de résidu  
 0.1 mg  $\longrightarrow$  1 ml  
 100 mg  $\longleftarrow$  1000 ml

La concentration finale de CN<sup>-</sup> dans la solution est **100 mg/l**.

- Peser 25 mg de KCN dans une bouteille de 125 ml, puis y ajouter 100 ml d'eau désionisée mesurée à l'aide d'un cylindre de 100 cc.
- Fermer tout de suite après la bouteille hermétiquement avec un bouchon en téflon en se servant du «crimper».

#### 3) Concentration 10 ppm

La concentration de CN ajoutée à l'échantillon dans l'essai III est **10mg/kg de résidu (10 ppm)**.

Le volume de la solution de cyanure à ajouter dans le microcosme est fixé à **1ml**. Il reste à savoir quelle est la concentration de la solution de KCN à préparer.

10 mg (CN)  $\longrightarrow$  1000 g de résidu  
 0.2 mg (CN)  $\longleftarrow$  20 g de résidu  
 0.2 mg  $\longrightarrow$  1 ml

200 mg ← 1000 ml

La concentration finale de  $CN^-$  dans la solution est 200 mg/l.

- Peser 50 mg de KCN dans une bouteille de 125 ml, puis y ajouter 100 ml d'eau désionisée mesurée à l'aide d'un cylindre de 100 cc.
- Fermer tout de suite après la bouteille hermétiquement avec un bouchon en téflon en se servant du «crimper».

### 6.1.3 Mélange du chaud et du froid

**N.B. Avant chaque utilisation et entre chaque échantillon laver les seringues en verre trois fois au méthanol et trois fois à l'eau distillée.**

- Pour préparer par exemple 15 ml d'une solution de mélange de chaud et de froid incluant les contrôles (pour une série de 12 microcosmes), prendre une fiole de 40 ml munie d'un bouchon en téflon (contenant pour les volatils) et la fermer hermétiquement. Préparer une seringue de radioactivité de 1 ml en verre ;
- À l'aide d'une seringue en plastique jetable de 5 ml et d'une aiguille Luerlok, transférer 15 ml de solution de cyanure (préparée dans la partie 6.2) de la bouteille à la fiole (afin d'équilibrer les pressions retirer toujours 5 ml d'air de la fiole avant de mettre la solution et vis versa en ce qui concerne la bouteille) ;
- Après avoir transféré les 15 ml de la bouteille à la fiole ajouter 150 $\mu$ l de solution radioactive préparée à l'étape 6.1 à l'aide d'une seringue de radioactivité de 100  $\mu$ l, et ensuite bien agiter.
- Vérifier le nombre de dpm du mélange chaud et froid à l'aide du compteur à scintillation en injectant 1 ml du mélange dans 10 ml de cocktail à scintillation. Ce nombre devrait être proche de 100 000 dpm.
- À l'aide d'une seringue de radioactivité de 1 ml distribuer dans chaque microcosme 1 ml du mélange de chaud et du froid ensuite fermer rapidement avec les valves mininerts.

## 7 RÉFÉRENCES

Babu, G.R.V., Wolfram, J.H., Chatwala, K.D. (1992). Conversion of sodium cyanide to carbon dioxide and ammonia by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. Journal of Industrial Microbiology, 9, 235-238.

Dumestre A.(1995). Biodégradation des cyanures contenus dans des résidus de la fabrication de l'aluminium. Ph.D. thesis. Université Henry Poincaré (Nancy I),

Vandoeuvre-les-Nancy, France.

Harris, R., Knowles, C.J. (1983). Isolation and Growth of *Pseudomonas* Species that Utilizes Cyanide as a Source of Nitrogen. Journal of General Microbiology, **129**, 1005-1011.

PSO A 10. (1997) Test de minéralisation en microcosmes. Sandra Estrela et Katia Santini.

Thompson, L.C.& Gerteis, R.L. (1990). New Technologies for Mining Waste Management-Biotreatment processes for cyanide, Nitrates and Heavy Metals. Proceedings, Western Regional Symposium on Mining and Mineral Processing Waste, Ed.F.M. Doyle, May 30-June 1, Berkeley, CA, AIME/SME Publication, Littleton, Co.

## 8 RÉSULTATS

### 8.1 Résultats de l'essai préliminaire

Les résultats des tests de minéralisation réalisés sur les trois échantillons (Yv6 (0.2), Dy9 (0.2) et Dy3 (0.2)) sont très concluants. On a observé un potentiel de minéralisation des cyanures dans les 4 essais (voir figure dans l'annexe). L'échantillonnage dans les essais I et II a été poursuivi jusqu'à 30 jour pour les échantillons Yv6 (0.2), Dy9 (0.2) et jusqu'à 70 jour pour l'échantillon Dy3 (0.2). Cependant, lorsqu'on a vu que les 2 premiers essais fonctionnaient l'échantillonnage a été arrêté au jour 15 dans les essais III et IV (où le MSM a été ajouté), car le but de l'expérience est l'étude de l'atténuation naturelle (sans améliorations des conditions environnementales).

Les échantillons Yv6 (0.2), Dy9 (0.2) dans les essais I, III et IV ont atteint un % maximum (%MAX) de 100% au bout de 15 jours seulement. Cependant, la vitesse de dégradation semble plus importante lorsque le résidu a été additionné de MSM et de MSMm. Par exemple, l'échantillon Dy9 (0.2) au jour 1.8 a atteint un % de minéralisation de 71 et 68 % dans les essais IV et III respectivement comparativement à 49% dans l'essai I. Le taux de minéralisation des cyanures dans les échantillons Yv6 (0.2), Dy9 (0.2) lorsque le résidu a été contaminé à 5 ppm (essai II) est inférieur à celui de 0 ppm. Ce résultat montre que la microflore a été sensible aux cyanures libres ajoutés au résidu.

L'échantillon Dy3 (0.2) offre le plus faible taux de minéralisation. La cinétique de dégradation est plus lente comparée aux échantillons Yv6 (0.2), Dy9 (0.2). Le %MAX atteint au jour 70 est de 68.6 % dans chacun des essais I et II. Cependant, aucune différence dans le taux et la vitesse de minéralisation n'a été observée lorsque le résidu a été contaminé à 0 et 5 ppm.



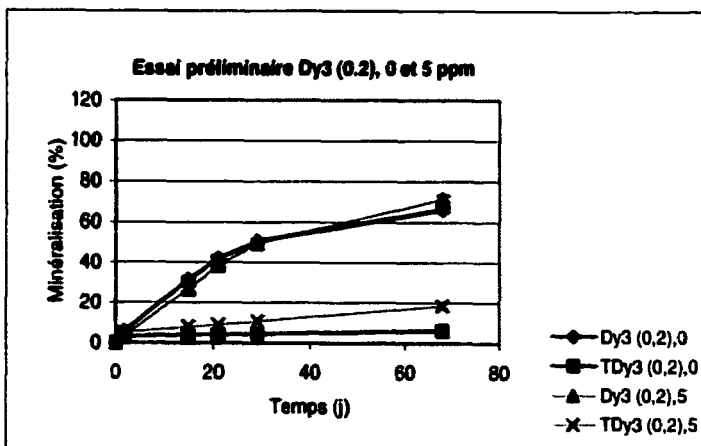
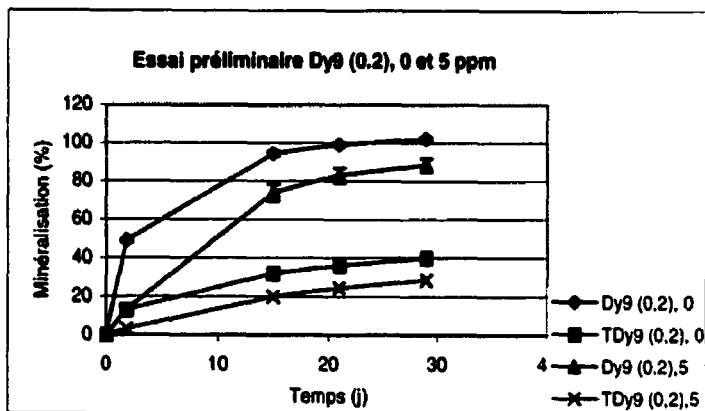
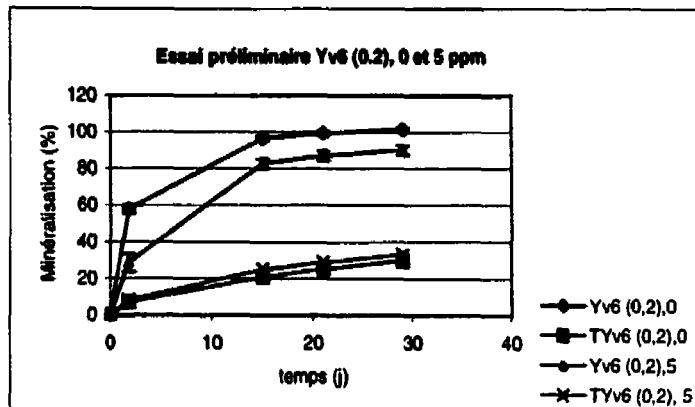
## **8.2 Conclusion**

Effectivement les échantillons testés ont une capacité de minéralisation des cyanures naturelle sans ajout de nutriments ou de minéraux. Pour ce faire, uniquement l'essai I et II vont être repris dans l'expérience de biodégradation avec, cette fois-ci, beaucoup de points d'échantillonnage. Tous les échantillons (06) seront utilisés dans les futurs tests de minéralisation. Une autre concentration de 10 ppm sera aussi utilisée pour voir son effet sur la minéralisation.

## 10 ANNEXE

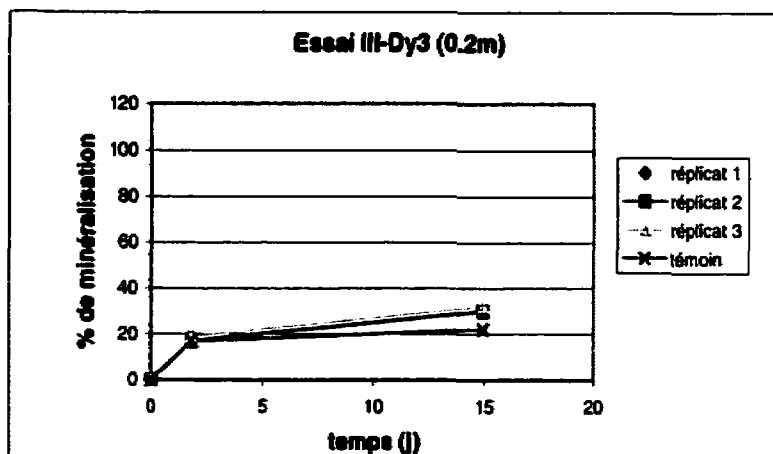
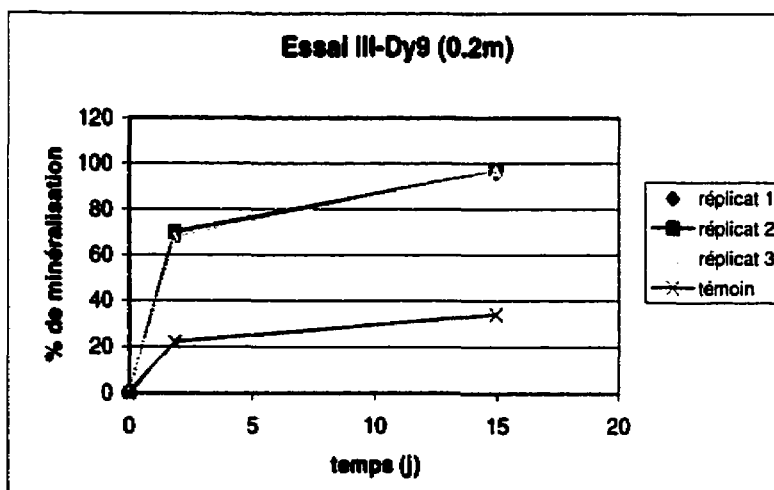
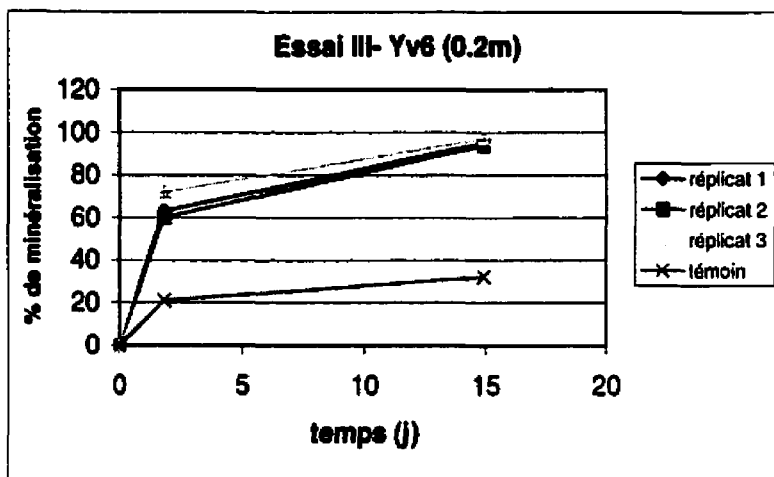
## ESSAI PRÉLIMINAIRE

janv-00

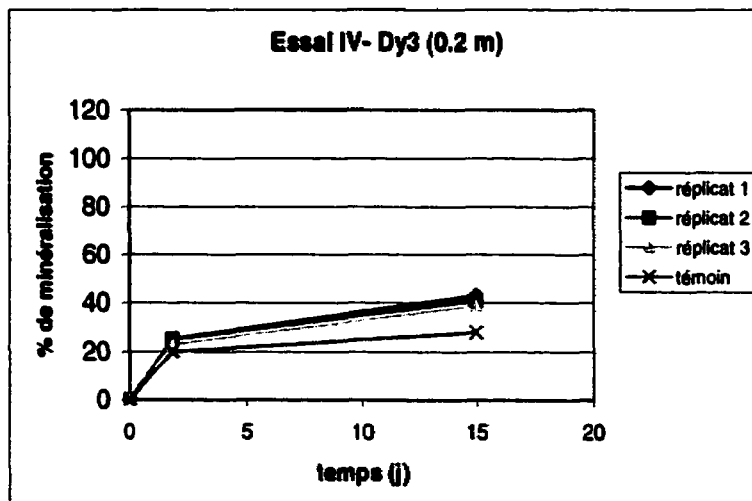
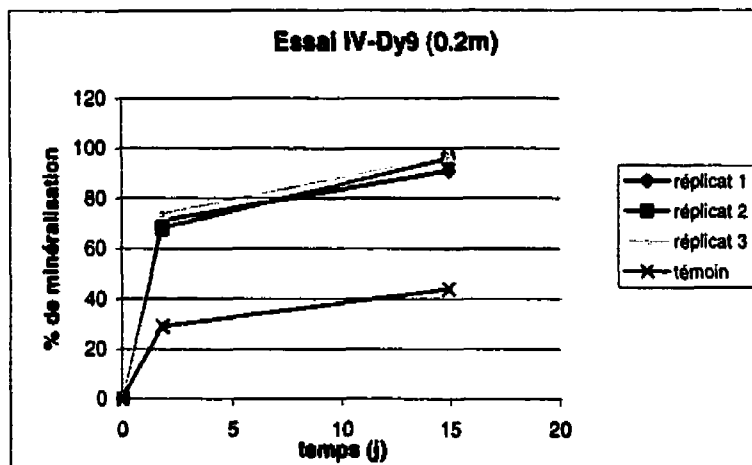
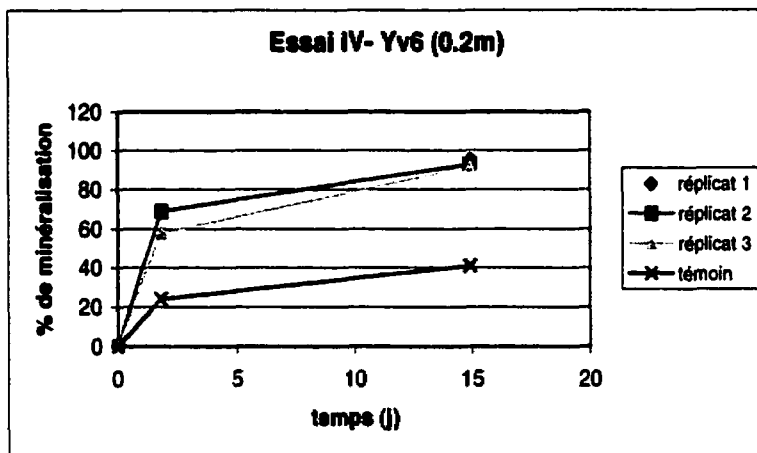
ESSAI I Résidu minier+ K<sup>14</sup>CNESSAI II Résidu minier+ K<sup>14</sup>CN+5 ppm de CN

**ESSAI PRÉLIMINAIRE**  
Résidu minier +  $K^{14}CN$  + MSM


**ESSAI III**    **janv-00**



**ESSAI PRÉLIMINAIRE      ESSAI IV      janv-00**  
**Résidu minier+ K<sup>14</sup>CN+MSMm**



**ANNEXE V P33-E- Dosage du NH<sub>3</sub> gazeux absorbé dans l'acide borique**

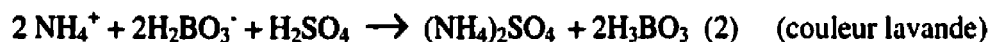
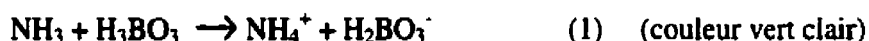
		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # :P33-E		Nombres de pages :12	
Version :1		Date :04/08/99	
Auteur(s): <u>Kahina Oudjehani</u> <u>Manon Leduc</u>			
Approuvé par :		Signatures :	
<u>Gérald Zagury</u>		<input checked="" type="checkbox"/> _____ Date :	
<u>Louise Deschênes</u>		<input checked="" type="checkbox"/> _____	
_____		<input type="checkbox"/> _____	
Titre : Dosage du NH <sub>3</sub> gazeux absorbé dans l'acide borique.			
Mots clés : NH <sub>3</sub> gazeux, ammoniacque, acide borique (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ), titrage, point d'équilibre.			

## 1 OBJECTIF

L'objectif de cette expérience est de détecter la présence de NH<sub>3</sub> gazeux (produit de biodégradation de cyanure) dans l'acide borique. Cette expérience fait partie du test de biodégradation des cyanures en microcosmes (PE P33-D).

## 2 PRINCIPE

Le  $\text{NH}_3$  gazeux dégagé par les micro-organismes, lors de la biodégradation des cyanures, est absorbé dans la solution d'acide borique ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) dans laquelle est rajouté un mélange d'indicateur coloré (méthyle rouge + bleu de méthylène). Dans la trappe le  $\text{NH}_3$  se transforme en  $\text{NH}_4^+$  et l'acide borique en borate ( $\text{H}_2\text{BO}_3^-$ ) la couleur du milieu devient alors vert clair (milieu basique) (1). L'acide borique est trop faible pour être titré, mais le borate, qui est présent dans un ratio 1:1 avec l'ammonium, est considéré selon la théorie de Brønsted comme une base forte qui peut être titrée avec un acide. L'acide borique est tellement faible qu'il ne peut pas interférer et sa concentration n'est pas calculée dans les bilans molaires (analytical chemistry). L'acide proposé par Standard Methods est l'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0.02 N. À l'équilibre une teinte lavande commence à apparaître et domine lorsque le milieu est complètement acide (2).



## 3 MATÉRIEL

- Burette 25 ml graduée à 0.1 ml ;
- Erlenmeyers (50 ml) ;
- Four à  $105 \pm 5$  °C ;
- Dessiccateur ;
- Agitateur et barreau magnétique ;
- Ballons volumétriques 1000 ml ;
- Cuillères, spatules, etc. ;
- Balance, précision de 0.0001 g ;
- Bouteilles d'entreposage (250 ml, 1000 ml) ;
- Erlenmeyers 250 ml.;

- Pipette 25.00ml
- Pipette 3.00ml;
- Pipette 15.00ml;
- Bêcher 50ml;

#### 4 RÉACTIFS

- Acide borique ( $H_3BO_3$ )  $M = 61.811 \text{ g/mol}$  ;
- Méthyle rouge ;
- Bleu de méthylène ;
- Alcool isopropylique (95 %) ;
- $Na_2CO_3$  ;
- Acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) concentré

#### 5 MÉTHODOLOGIE

##### 5.1 Généralités

##### 5.1.1 Manipulation de la burette pour un titrage

- **Choix de la burette :** Choisir la burette pour que le volume du titrant utilisé représente la presque totalité de son volume maximal. La précision de la lecture d'une burette de 25ml est +/- 0.03ml (lorsque le volume du titrant est à 0ml). À la lecture du volume du titrant (lorsque celui ci est supérieur à 0ml) une autre erreur s'additionne, l'incertitude est donc +/-0.06ml. L'incertitude relative est inversement proportionnelle au volume total utilisé.
- **S'assurer de la propreté :** Rincer la burette avec de l'eau déionisée et la laisser se vider. Une burette propre va retenir une mince et uniforme couche de liquide lorsqu'elle se vide, une burette sale présentera des gouttelettes sur la paroi.
- **Nettoyage de la burette :** Laver avec une solution de détergent "sparkleen". Ne pas utiliser de brosse pour nettoyer l'intérieur de la burette car ceci risque de produire des éraflures qui altère le volume contenu par celle-ci. Pour une souillure vraiment tenace chauffer la solution de détergent. Rincer la burette avec l'eau du robinet pour enlever le savon. Ensuite rincer plusieurs fois avec de l'eau déionisée.
- **Remplissage de la burette :** La burette doit être rincée trois fois avec la solution qui sera utilisée, une portion de rinçage représente un minimum de 20 pour-cent du



volume de la burette. La burette est remplie, avec le robinet en position « ouvert », jusqu'au dessus du trait de 0ml. Lorsqu'il n'y a plus de bulles d'air dans la pointe de la burette fermer le robinet (la présence de bulles d'air dans la pointe de la burette engendre des erreurs de lecture lorsqu'elles se retirent). Si des bulles d'air persistent dans la pointe de la burette ou près du robinet, les enlever en ouvrant et fermant rapidement le robinet et en tapotant des doigts près de la bulle (robinet en position « ouvert »). **Remarque** : la présence de bulles d'air sur les parois interne de la burette nous indique quelle est sale, procéder au nettoyage.

- **Vérification de fuite** : Installer la burette sur un support à burette à position « fermé », la remplir jusqu'au volume de 0 ml. Attendre quelques minutes pour vous assurer qu'il n'y a pas de fuite.
- **Lecture du volume** : Toujours lire le ménisque au même niveau que les yeux. Il s'agit de placer la burette et le ménisque de telle manière qu'ils soient perpendiculaires au regard des yeux, ceci minimise l'erreur de parallaxe. Le volume initial est lu après avoir abaissé le ménisque lentement au trait 0.00ml, attendre quelques secondes pour que le film de liquide des parois internes de la burette est rejoint le ménisque, vérifier la lecture. Lire le volume à la précision la plus rapprochée du ménisque, 0.01ml pour une burette de 25ml .
- **Le titrage** : Le titrage s'effectue avec l'échantillon contenu dans un erlenmeyer. L'erlenmeyer est déposé sur une surface blanche et la pointe de la burette introduite dans l'ouverture de l'erlenmeyer. Le flacon est agiter à l'aide d'un barreau magnétique. Au fur et a mesure que le titrage progresse le changement de couleur de l'indicateur du à l'excès local devient de plus en plus important. Lorsque le point d'équivalence approche ce phénomène s'accroît, le retour à la couleur initiale devient de plus en plus long. À ce moment arrêter le titrage et rincer les parois de l'erlenmeyer avec un flacon laveur contenant de l'eau déionisée pour rajouter à l'échantillon les gouttes qui ont éclaboussé sur les parois. Une goutte provenant de la burette a un volume d'environ 0.05ml et le volume est lu au 0.02ml. Il est donc nécessaire de subdiviser les gouttes près du point d'équivalence. Pour subdiviser une goutte, ouvrir le robinet jusqu'à ce qu'une fraction de goutte apparaisse sur la pointe de la burette ensuite le fermer. La fraction de goutte est mouchée sur les parois interne de l'erlenmeyer, cette fraction de goutte est entraînée dans l'échantillon par rinçage des parois avec un flacon laveur contentant de l'eau déionisée. Procéder à l'ajout de titrant jusqu'à l'obtention d'un changement de couleur permanent (au moins 30 secondes). Après le ou les titrages, le titrant non utilisé dans la burette est jeter, ne jamais remettre dans la bouteille d'origine.
- **Entreposage de la burette** : Après l'utilisation bien nettoyer de la burette. Trois rinçages à l'eau déionisée est normalement suffisant. Quand la burette n'est pas utilisée la remplir d'eau déionisée et la surmonter d'un bouchon. La burette entreposée de cette façon reste propre pour plusieurs semaines.

### 5.1.2 Préparation de la solution d'indicateur coloré (Préparer une solution fraîche chaque mois)

- Dans un ballon volumétrique (propre et sec) de 100 ml dissoudre 200 mg de méthyle rouge dans l'alcool isopropylique puis compléter à 100 ml.
- Dans un autre ballon de 50 ml (propre et sec) dissoudre 100 mg de bleu de méthylène dans l'alcool isopropylique puis compléter à 50 ml.
- Mélanger les deux solutions et conserver dans une bouteille de 200 ml (propre et sèche).
- Identifier et dater la bouteille.

### 5.1.3 Préparation de la solution d'acide borique colorée (Préparer une solution fraîche chaque mois)

- Rincer un ballon jaugé de 1 litre trois fois avec de l'eau déionisée.
- Dans le ballon de 1000 ml dissoudre 20 g d'acide borique ( $H_3BO_3$ ) dans 300 ml d'eau désionisée, ajouter 10 ml de la solution d'indicateur coloré, puis compléter à 1000 ml avec de l'eau désionisée.
- Conserver dans une bouteille (propre et sèche), identifier et dater.

### 5.1.4 Préparation de la solution d'acide sulfurique (0.02 N)

**\*Attention ! :** Pour préparer les solutions d'acide de 1 litre additionner un minimum de 800ml d'eau au ballon **avant** l'ajout de la portion d'acide.

#### A. Préparer une solution d'acide sulfurique de normalité approximative de 1N

- Rincer un ballon jaugé de 1 litre trois fois avec de l'eau déionisée.
- Introduire environ 800ml d'eau déionisée dans le ballon de 1litre.
- Sous la hotte chimique, transvider environ 30 ml d'acide sulfurique concentré dans un bécher propre et sec.

- Prélever avec une pipette de verre volumétrique graduée (25 et 3ml), 28 ml d'acide sulfurique concentré (36N), additionner au ballon jaugé de 1 litre contenant 800ml d'eau déionisée.
- Compléter à 1000ml.
- Boucher et agiter par inversion treize fois.
- Conserver dans une bouteille (propre et sèche), identifier et dater.

#### **B. Préparation de la solution d'acide sulfurique de normalité approximative 0.02 N**

- Rincer un ballon jaugé de 1 litre trois fois avec de l'eau déionisée.
- Introduire environ 800ml d'eau déionisée dans le ballon de 1 litre.
- Sous la hotte chimique, transvider environ 30 ml d'acide sulfurique 1N, préparer à l'étape A, dans un bécher propre et sec.
- Prélever, avec une pipette volumétrique (20ml) 20ml d'acide sulfurique 1N, puis additionner au ballon jaugé de 1 litre contenant 800ml d'eau déionisée.
- Compléter à 1000ml.
- Boucher et agiter par inversion treize fois.
- Conserver dans une bouteille (propre et sèche), identifier et dater.

### **5.2 Standardisation de la solution d'acide sulfurique**

#### **A. Préparation d'une solution de $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0.05N (PM 106.00) (cette solution n'est valable que pour une semaine)**

1. Sécher 3 à 6 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  au four à 150 °C durant 4 h et refroidir ensuite au dessiccateur pendant 1h.
2. Rincer un ballon jaugé de 500 ml trois fois à l'eau déionisée.
3. Peser environ exactement 1.325 g (noter)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Anachemia 8290N Étalon Primaire, dans un pèse-matière.
4. Transvider de façon quantitative dans le ballon jaugé de 500 ml, bien rincer le pèse-matière avec un flacon laveur contenant de l'eau déionisée, s'assurer de tout transvider le  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .
5. Compléter à 500 ml avec de l'eau déionisée.
6. Calculer la normalité exacte de la solution à l'aide du poids de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  utilisé.

7. Conserver dans une bouteille (propre et sèche), identifier et dater.

### B. Étalonnage de la solution d'acide sulfurique

1. Transvider environ 20 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.05N (préparé à l'étape A) dans un bécher propre et sec ;
2. Dans un bécher de 250ml pipetter 15.00ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.05N ;
3. Ajouter environ 60ml de solution d'acide borique colorée dans le bécher ( la couleur devient verte);
4. Titrer avec l'acide sulfurique 0.02 N jusqu'au virage lavande. Noter le volume utilisé x.xx ml ;
5. Sur une plaque chauffante placer le bécher muni d'un verre de montre ;
6. La solution est portée à légère ébullition pour une période de 3 à 5 minutes (cette étape sert à enlever le  $\text{CO}_2$ , la couleur de la solution retourne au vert à ce moment (Voire remarque\*));
7. Refroidir à la température de la pièce pendant environ 6 mn ;
8. Rincer le verre de montre, avec un flacon laveur, de façon à récupérer l'eau dans le bécher ;
9. Le titrage est poursuivi jusqu'au changement de couleur brusque du vert au lavande ;
10. Noter le volume x.xx ml ;

### Calculs de la normalité

Normalité,  $N = A * B / 53.00 * C$

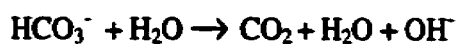
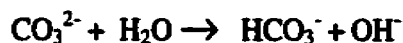
A = g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pesé dans le ballon de 500 ml

B = ml total de la solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  utilisé pour le titrage

C = ml d'acide utilisé

### \* Remarque

Le sodium de carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) est une base de Brønsted et sert comme standard pour la standardisation des acides forts. Il s'hydrolyse en deux étapes :



À cause de la formation du  $\text{CO}_2$  le point d'équilibre peut être erroné. C'est pour cette raison qu'on fait buller la solution afin de faire volatiliser le  $\text{CO}_2$  qui augmente l'acidité

de la solution. Après l'enlèvement du  $\text{CO}_2$  la solution redevient basique (retour de la couleur verte) en gardant seulement le  $\text{HCO}_3^-$  (Christian 1986).

Pour cette raison on pense que le  $\text{CO}_2$  interfère dans le dosage du  $\text{NH}_3$ . C'est pourquoi après le titrage de l'acide borique dans les essais de biodégradation, il va falloir faire buller l'acide après le point de virage pour expulser le  $\text{CO}_2$  de la même manière que décrit dans la partie **B** du point 5.5.

### 5.3 Préparation des microcosmes

- Peser 20.00 g de résidu minier dans des fioles de 125 ml pré-identifiées ;
- Ajouter 0.5% de  $\text{HgCl}_2$  (Wolf *et al.* 1989) dans les microcosmes qui servent de témoin abiotique . **N.B.** : Pour être sûr d'avoir éliminer la microflore, 10 fois le pourcentage en  $\text{HgCl}_2$  recommandé dans l'article de Wolf *et al.* (1989) sera utilisé (soit 0.5% au lieu de 0.05%) ;
- Dans chaque microcosme ajouter une trappe contenant 4 ml d'acide borique coloré préparé à l'étape 5.3 ;
- Fermer les microcosmes à l'aide de valves mininerts ;
- Mettre les microcosmes dans un endroit sombre et à température ambiante ;
- Surveiller le changement de couleur de l'acide borique, si celui-ci devient vert procéder au dosage en suivant les prochaines étapes.

### 5.4 Procédure de prélèvement

1. Prélever 4 ml d'acide borique dans le microcosme et le transférer dans un erlenmeyer de 50 ml ;
2. Rincer la trappe deux fois avec 2 ml d'acide borique et les additionner au 4 ml prélevé précédemment;
3. Insérer de nouveau 4 ml d'acide borique dans le même tube qui les contenait ;
4. Remettre le microcosme à température ambiante.

### 5.5 Procédure de dosage

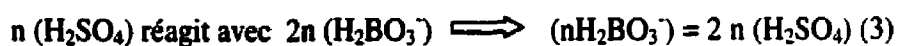
1. Prendre l'erlenmeyer qui contient les 4 ml d'acide borique coloré (s'il y a du  $\text{NH}_3$  absorbé la couleur devrait être verte) ;
2. À l'aide d'une burette titrer l'acide borique coloré avec le  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.02 N), noter le volume d'acide sulfurique consommé à l'équilibre (la couleur vire à lavande pâle).

## 6 CALCULS



Soit  $C_s$  et  $V_s$  la concentration (mol/l) et le volume (l) à l'équilibre de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et  $n(\text{H}_2\text{BO}_3^-)$  le nombre de mole (mol) à l'équilibre du borate ( $\text{H}_2\text{BO}_3^-$ ). Lorsque l'équilibre est atteint dans la réaction (2) :

$n$ : nombre de mole



$$C_s V_s \text{ eq} = n(\text{H}_2\text{SO}_4)$$

On connaît  $n(\text{H}_2\text{SO}_4)$ , on retrouve le nombre de mole du borate à l'aide de l'équation (3).

Comme 1 mole de borate réagit avec 1 mole de  $\text{NH}_4^+$  donc  $n(\text{H}_2\text{BO}_3^-) = n(\text{NH}_4^+) = n(\text{NH}_3)$  moles.

Pour convertir  $n(\text{NH}_3)$  mol:

$$n(\text{NH}_3) \times 17\text{g/mol} \times 1000 = \text{mg NH}_3$$

Ou simplement faire :

$$N(\text{H}_2\text{SO}_4) \text{ (eq/l)} \times V_s \text{ (l)} = \text{nombre d'équivalent gramme (NH}_3\text{) (eq.g)}$$

$$\text{NH}_3 \text{ (eq.g)} = n(\text{NH}_3) \text{ mol car } (N(\text{NH}_3) = M(\text{NH}_3))$$

$$n(\text{NH}_3) \times 17\text{g/mol} \times 1000 = \text{mg NH}_3$$

**N**: Normalité (équivalent gramme/l) ( $N = M \times \text{nombre équivalent gramme}$ )

**n** : nombre de moles (mol)

**V<sub>s</sub>** : Volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à l'équilibre.

## 7 RÉFÉRENCE(S)

AWWA, WEF, APHA (1998). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 20 th Edition.

Christian, G.D. (1986) Analytical chemistry, Fourth Edition.

Wagner, E.C. (1940). Titration of Ammonia in Presence of Boric Acid In the Macro-, Semimicro-, and Micro-Kjeldahl Procedures, using Methyl Red Indicator and the color-Matching End Point. Industrial and Engineering chemistry, Analytical Edition, 12, 771-772.

Wolf, D.C., Dao, T.H., Scott, H.D. and Lavy, T.L. (1989). Influence of Sterilization Methods on Selected Soil Microbiological, Physical, and Chemical Properties. Journal of Environmental Quality, 18, 39-44.

## 8 RECOMMANDATION(S)

1. Faire un essai préliminaire pour trapper le  $\text{NH}_3$  dans l'acide borique coloré en mettant 10 ml d'ammoniac (14.8 N) dans un microcosme qui contient une trappe remplie de 4 ml d'acide borique. Laisser pour la nuit et ensuite doser l'acide avec la méthode décrite dans ce PE (voir essais préliminaires au point 9).
2. La solution d'indicateur coloré ainsi que celle de l'acide borique doivent être renouvelées mensuellement.
3. Standardiser la solution d'acide sulfurique avant chaque utilisation.

## 9 ESSAIS PRÉLIMINAIRES ET RÉSULTATS

Les essais préliminaires pour cette expérience représentent une simulation des tests de biodégradation en microcosmes. Ils consistent à mettre 10 ml de solution concentrée de  $\text{NH}_3$  (Hydroxyde d'ammonium, 14.8 N) et une trappe qui contient 4 ml d'acide borique coloré dans un microcosme. La solution d'hydroxyde d'ammonium a une concentration massique de 251.6 g/l.

**Essai 1** (réalisé en triplicata) :

Lors du premier essai, 10 ml de la solution concentrée contenant 2.516 g de  $\text{NH}_3$  a été ajoutée à un microcosme muni d'une trappe à l'acide borique coloré.

**Résultat 1** :

La couleur lavande de l'acide borique a viré au vert instantanément lorsqu'il a été mis dans la trappe. Le même résultat a été observé avec les deux autres réplicats.

**Essai 2 (réalisé en triplicata) :**

La solution concentrée (251.6 g/l) a été diluée 100 fois pour avoir 25.16 mg de  $\text{NH}_3$  dans 10 ml de la solution diluée.

**Résultat 2 :**

Les trappes à l'acide borique des trois microcosmes ont été échantillonnées après 6h. Le volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à l'équilibre pour les trois réplicats est : 32 ml, 28.79 ml et 29.83 ml qui correspond respectivement aux quantités de  $\text{NH}_3$  suivantes : 11.97 mg, 10.76 mg et 11.16 mg.

De l'acide borique frais a été remis dans la trappe juste après l'échantillonnage. La couleur a viré au vert après environ 10 mn. Un autre échantillonnage a été réalisé. Les quantités de  $\text{NH}_3$  retrouvés à ce moment là, étaient de 0.374 mg, 0.262 mg, 0.293 mg.

De l'acide borique frais a été remis dans la trappe pour la troisième fois, et a été échantillonné aussitôt après. Les quantités de  $\text{NH}_3$  dosés sont : 0.15 mg (150  $\mu\text{g}$ ), 0.082 mg (82  $\mu\text{g}$ ) et 0.187 mg (187  $\mu\text{g}$ ).

**Conclusion :** On remarque bien que l'acide borique coloré est sensible à des quantités de  $\text{NH}_3$  de l'ordre de  $\mu\text{g}$ . Mais, lors du deuxième et troisième dosage le  $\text{NH}_3$  était présent dans la phase gazeuse avant qu'il ne soit solubilisé dans l'acide borique frais c'est pourquoi la couleur lavande de l'acide a viré au vert aussitôt que la solution fraîche a été ajoutée. On pense que les petites quantités de  $\text{NH}_3$  dosées étaient dues à la présence de  $\text{NH}_3$  dans la phase gazeuse.

**Essai 3 (réalisé en triplicata) :**

Pour simuler réellement une petite quantité de  $\text{NH}_3$  dégagée par les micro-organismes, il a fallu préparer une dilution qui contenait à l'origine une petite quantité de  $\text{NH}_3$ . Une dilution de 2000 fois de la solution d'hydroxyde d'ammonium donne une concentration de 125.8 mg/l. Cette solution a été encore diluée 10 fois pour avoir 12.58 mg/l, 10 ml de cette dilution qui contient 125.8  $\mu\text{g}$  de  $\text{NH}_3$  a été mis dans 3 microcosmes.

**Résultat 3 :**

La couleur lavande de l'acide borique a viré au vert après 3 semaines. Ceci prouve qu'en présence de petites quantités de  $\text{NH}_3$  l'acide borique est sensible. La réaction est lente car l'équilibre dans ce cas là prend beaucoup de temps pour s'établir.


**Conclusion générale**

Ces essais nous ont permis de connaître la sensibilité de l'acide borique coloré face à des quantités de  $\text{NH}_3$  de l'ordre de  $\mu\text{g}$  et aussi de voir en présence de ces quantités le temps que prend la réaction pour que l'acide borique vire de la couleur lavande à la couleur vert pâle.

Effectivement la méthode de dosage de  $\text{NH}_3$  décrite dans ce protocole est sensible à des concentrations très faibles en azote. D'après Standard Methods 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  correspond à 280  $\mu\text{g}$  de N. Même si le  $\text{NH}_3$  est présent à des quantités inférieures à 280  $\mu\text{g}$  cette méthode peut nous le faire savoir qualitativement et quantitativement si la quantité dosée est en équilibre avec au moins 0.1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .



**ANNEXE VI P33-F -Test de volatilisation des cyanures contenus dans un résidu  
minier**

 <p>Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites</p>	<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # :P33-F	Nombres de pages :07	
Version :2	Date :14/06/00	
Auteur(s): <u>Kahina Oudjehani</u>		
Approuvé par : <u>Gérald Zagury</u>	Signatures : <input checked="" type="checkbox"/> _____	Date :
<u>Louise Deschênes</u>	<input checked="" type="checkbox"/> _____	_____
<u>Mánon Leduc</u>	<input checked="" type="checkbox"/> _____	_____

Titre : Test de volatilisation des cyanures contenus dans un résidu minier
Mots clés : Cyanure, volatilisation, résidu minier.

## 1 OBJECTIF

Le but de cette expérience est d'estimer la quantité de HCN susceptible de se volatiliser du résidu minier.

## 2 INTRODUCTION

Cette version du protocole de volatilisation est réalisée suite aux résultats des essais préliminaires de la version 1/2. Lors des essais de cinétique on ne retrouvait que 0.09 mg/l de cyanures totaux dans le NaOH après 5 jours lorsque le résidu a été contaminé à 100 ppm. La récupération du HCN est donc très faible par la méthode d'aspiration et de bullage du gaz. Dans la présente version seulement la partie "récupération totale du HCN" sera considérée. Dans ce cas le réacteur muni d'une trappe à NaOH agit comme un système ouvert puisque la soude aspire le HCN en permanence. On risque alors d'avoir plus de volatilisation.

## 3 THÉORIE

L'acide cyanhydrique (HCN) et sa base conjuguée forment un couple acide/base selon l'équation (1), et possède un  $pK_a$  de 9,2 à 25 °C.



Cette équation dépend fortement du pH (voir figure 1, PE P33-C). Les milieux acides favorisent la formation du HCN, à pH neutre essentiellement tous les cyanures libres sont présents sous cette forme et à pH 9.2 les quantités de HCN et  $\text{CN}^-$  sont équimolaires (Smith & Mudder 1991). L'acide cyanhydrique a donc tendance à se volatiliser à température de 25 °C et à pression atmosphérique lorsque le pH est en dessous du  $pK_a$  du couple acide/base.

La volatilisation du HCN dans un milieu liquide dépend de plusieurs facteurs tels que le pH, la température, le contact avec l'air, la concentration initiale des cyanures et la lumière UV (Simovic 1984). Par contre dans un sol, la volatilisation des cyanures dépend de la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur et la concentration. Les propriétés du sol qui affectent la volatilisation incluent : le pourcentage d'humidité, les caractéristiques d'adsorption et de diffusion du sol, la matière organique, la porosité, la densité et le contenu en argile. Les paramètres météorologiques qui affectent la volatilisation de HCN sont la température, l'humidité et le débit d'air à travers le sol (Chatwin *et al.* 1988).

Dans le présent travail les deux facteurs considérés sont le pH et la concentration initiale des cyanures. Ces deux facteurs ne seront pas modifiés car l'objectif de cette expérience est l'étude de l'atténuation naturelle des cyanures. Il faut donc respecter les caractéristiques originales du résidu minier.

#### 4 PRINCIPE

Le principe de la méthode consiste à suivre dans le temps la volatilisation des cyanures présents dans le résidu minier.

L'expérience proposée pour la volatilisation tient compte des propriétés naturelles (concentration et pression de vapeur) des cyanures. Elle consiste à mettre une quantité déterminée de résidu minier dans un réacteur fermé de 750 ml muni d'une trappe à NaOH (0.5N) (Aronstein *et al.* 1994). À chaque fois qu'une quantité de HCN est diffusée du résidu le NaOH va la dissoudre. L'échantillon de soude est ensuite analysé pour les  $CN_t$  chez Maxxam. L'autre point à considérer est la production du HCN par les micro-organismes cyanogéniques (Aronstein *et al.* 1994, Knowles 1976). Il est donc intéressant de suivre la volatilisation issue uniquement des transformations chimiques (abiotique). Pour ce faire, une deuxième série (série B), montée en parallèle avec l'essai biotique (série A), est prévue. Elle consiste à ajouter du  $HgCl_2$  au résidu afin d'éliminer la microflore.

#### 5 MATÉRIEL ET RÉACTIFS

- Réacteur en verre ambré de capacité de 750 ml avec couvercle muni de valve mininert ;
- Vials en verre ambré de 40 ml avec couvercle muni de septa en caoutchouc ;
- Eau désionisée ;
- NaOH 0.5 N ;
- KCN (UN1680, 500g, Mallinckrodt Baker, Paris, Kentucky) ;
- Pipette en verre de volume 5 ml ;
- 02 Seringues (gastight Hamilton) en verre munie d'une aiguille amovible à vice de 5 cc (précision 1%) ;
- Seringue (gastight Hamilton) (10 cc) en verre munie d'une aiguille Luerlock ;
- Spatule en acier inoxydable, cuillère, etc.;
- Cylindre gradué, 50 ml ;
- Balance analytique capacité 3200 g (précision 0.01 g).

## 6 MÉTHODOLOGIE

### 6.1 Essai préliminaire

IL est conseillé de faire un essai préliminaire avant de commencer cette expérience. **Suggestions :** Pour savoir si on est capable de retrouver du HCN par la méthode détaillée au paragraphe 6.2, contaminer, avec des cyanures libres, 100 g de résidu (Dy3 (0.2)) contenu dans un réacteur muni d'une trappe à NaOH (0.5N). Ensuite, échantillonner la soude et l'analyser pour les  $CN_T$ .

#### Procédure

1. Peser 100g de résidu (Dy3 (0.2)) minier dans un réacteur en verre ambré munie de couvercle en téflon et de valves mininerts munie d'une trappe à NaOH ;
2. À l'aide d'une pipette de 5 ml, prendre 5 ml de la solution de NaOH (0.5N) et les déposer dans la trappe. Fermer le réacteur hermétiquement.
3. Sous la hotte chimique peser 25.09 mg de KCN et les disperser sur le résidu. Mesurer 10ml d'eau désionisée (dont on a, préalablement, mesuré le pH) à l'aide d'un cylindre et ajouter au résidu (**Remarque :** 25.09 mg de KCN/10ml d'eau donne une concentration de 1000mg/l ( $CN^-$ ) et une concentration de 100ppm dans le résidu en plus de celle qui existe déjà) ;
4. Laisser à 25 °C, et échantillonner à 4j ;
5. Suivre la procédure d'échantillonnage décrite ci-après pour échantillonner le NaOH;
6. Envoyer l'échantillon chez Maxxam pour analyse des cyanures totaux ;

### 6.2 Préparation de l'échantillon

1. Préparer les échantillons (Yv6 (0.2) et Dy3 (0.2)) qui vont être utilisés pour cette expérience. Peser 2 kg de chaque échantillon. Ensuite mélanger le résidu dans un sac fermé hermétiquement. **N.B. :** 2 kg comprend toute la quantité nécessaire pour les deux séries (A et B) en triplicata.
2. Pour chaque échantillon, prendre, à l'aide d'une spatule, un échantillon composé de 5 sous échantillons de 5 g chacun et les mettre dans un pot en verre sans agent de conservation pour analyse des  $CN_T$  chez Maxxam. Ce pot devrait contenir 25g de résidu.
3. Refaire l'étape 2, deux autres fois pour pouvoir analyser les  $CN_T$  en triplicata.
4. Mesurer le pH du résidu de chacun des échantillons (Yv6 (0.2) et Dy3 (0.2)) juste avant de commencer l'étape 6.2.

### 6.3 Récupération de la quantité totale de HCN g (3 réacteurs)

**Remarque : Réaliser cet essai en triplicata pour chacune des série A et B.**

- Utiliser un réacteur en verre ambré en triplicata pour chaque série,
- préparer 1000 ml de NaOH (0.5N) : peser 20 g de pastille de NaOH dans un ballon de 1 litre et dissoudre avec 1000 ml d'eau désionisée. Lire le pH du NaOH (0.5N) qui doit être  $\geq 12$ .
- ajouter dans chaque réacteur une trappe contenant 5ml de NaOH (0.5 N) (mesuré à l'aide d'une pipette de 5 ml), et faire les étapes de la série A et B ;

#### **Série A (Essai biotique, 3 réacteurs) :**

1. Peser 300.00 g de résidu minier dans chacun des trois réacteurs ;
2. placer les réacteurs à  $25 \pm 1$  °C sous la tente en plastique ;

#### **Série B (Essai abiotique, 3 réacteurs) :**

1. Peser 300.00 g de résidu minier dans chacun des trois réacteurs ;
2. Ajouter 0.5% de HgCl<sub>2</sub> (Wolf *et al.* 1989) au résidu de chaque réacteur. **N.B. :** Pour être sûr d'avoir éliminer la microflore, 10 fois le pourcentage en HgCl<sub>2</sub> recommandé dans l'article de Wolf *et al.* (1989) sera utilisé (soit 0.5% au lieu de 0.05%).
3. placer les réacteurs à  $25 \pm 1$  °C sous la tente en plastique ;

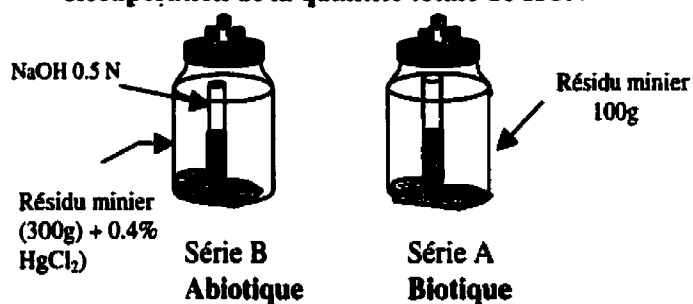
#### **Procédure d'échantillonnage**

1. Prendre les échantillons à 0 j, 1semaine, 3 semaine, 6 semaine et 8 semaine, Aronstein *et al.* (1994) ont suivi l'accumulation du <sup>14</sup>CN jusqu'à 400 h (le pH du milieu était 7.2) et Mihalov et Hendrix (1994) ont suivi la volatilisation du HCN dans un milieu à pH=10 jusqu'à 25 h. (**Remarque :** le temps d'échantillonnage réel sera fixé en fonction des premiers résultats) ;
2. à l'aide de la seringue "gastight Hamilton (10ml)" et d'une aiguille luer-lock échantillonner les 5 ml de NaOH et les transférer dans des vials de 40 ml (vide ne contenant pas de NaOH) ;
3. en se servant de la seringue "gastight Hamilton (5 ml)" rincer la trappe qui contenait le NaOH deux fois avec 2.5ml de NaOH (0.5N), puis les additionner à l'échantillon recueilli dans le vial à l'étape 2 ;
4. fermer le vial hermétiquement et envoyer chez Maxxam pour analyse des CN<sub>x</sub>.

## 7 SCHEMA OPERATOIRE

T = 25 °C

### Récupération de la quantité totale de HCN



## 8 CALCULS

### 8.1 Récupération de la quantité totale de HCN g

Soit P mg/l de CN<sub>t</sub> analysés chez Maxxam à un temps donné, le volume envoyé de NaOH est de 10ml (les 02 rinçages sont compris).

Pmg (CN<sub>t</sub>) → 1000 ml (NaOH)  
 Q mg (CN<sub>t</sub>) ← 10 ml (NaOH)

Q mg (CN<sub>t</sub>) → 750 ml (volume d'air approximatif dans le réacteur)  
 W mg ← 1 ml d'air

W mg/ml d'air représente la concentration de cyanures totaux qui se sont volatilisés du résidu.

## 9 RÉFÉRENCE(S)

Aronstein, B., N., Maka, A., Srivatava, V.J. (1994). Chemical and biological removal of cyanides from aqueous and soil-containing systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 700-707.

Chatwin, T. D., Zhang, J. Griddley, G. M.(1988) Natural mechanisms in soil to mitigate cyanide releases. In: *Superfund'88: Proceedings of the 9<sup>th</sup> National*

Conference and Exhibition on Hazardous Waste. Washington, D.C., November 28-30. Hazardous Materials Control Research Institute. Silver Springs, Md., 467-479.

Knowles, C.J. (1976). Microorganisms and cyanides. *Bacteriological Reviews*, 40, 652-680.

Mihaylov, B.V., Hendrix, J.L. (1994). Biological decomposition of cyanide in swage sludge. *Minerals Engineering*, 7, no 1, 61-69.

Simovic, L. (1984). Kinetics of Natural Degradation of Cyanide from Gold Mill Effluents. Thesis, Mc Master University, Toronto.

Smith, A., Mudder, T. (1991). The chemistry and treatment of cyanidation wastes. Edt. Mining Journal Books.

Wolf, D.C., Dao, T.H., Scott, H.D. and Lavy, T.L. (1989). Influence of Sterilization Methods on Selected Soil Microbiological, Physical, and Chemical Properties. *Journal of Environmental Quality*, 18, 39-44.


## **10 RÉSULTATS**

### **Résultats de l'essai préliminaire**

L'essai préliminaire détaillé au point 6 a donné le résultat suivant : 170mg de  $CN^-$  /l de NaOH après 4 jour. Ceci veut dire que 1.7 mg de  $CN^-$  (17%) se sont retrouvés dans la trappe après 4 jour. Ce résultat est très encourageant montrant que le NaOH absorbe réellement les cyanures. Cet essai préliminaire nous a prouvé que la méthode de récupération totale de HCN fonctionne bien. Cette méthode sera donc en mesure de quantifier les cyanures volatils si leur concentration est supérieure à la limite de détection.



**ANNEXE VII P33-G- Test de lixiviation des cyanures contenus dans un résidu  
minier**

 <p>Chaire industrielle CRNG en assainissement et gestion des sites</p>		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # :P33-G		Nombres de pages :08	
Version :2		Date :09/02/2000	
Auteur(s): Kahina Oudjehani			
Approuvé par :		Signatures :	
Gérald Zagury		<input checked="" type="checkbox"/> _____ Date :	
Louise Deschênes		<input checked="" type="checkbox"/> _____	
_____		<input type="checkbox"/> _____	

Titre : Test de lixiviation des cyanures contenus dans un résidu minier.
Mots clés : Cyanure, cyanure lixiviable, résidu minier.

## 1 OBJECTIF

L'objectif de cette expérience est d'évaluer la quantité de cyanures lixiviables (CN<sup>-</sup>, HCN, CN simple, complexe-CN) pouvant être relarguée par le résidu minier.

## 2 INTRODUCTION

Cette version est réalisée suite aux problèmes rencontrés dans la version 1/2 de ce protocole. Avec l'ancienne version la quantité de  $CN_T$  dosée dans la partie aqueuse était supérieure à celle retrouvée dans le résidu. D'après Young et Theis (1991) et Theis *et al.* (1994) il fallait d'abord extraire les cyanures (surtout les CN complexés) par une lixiviation à pH 12, ensuite rapporter les quantités de CN retrouvées par la lixiviation normale (sans ajustement de pH) à celles retrouvées à pH 12. À ce pH, les cyanures complexés sont solubilisés dans l'eau. Cette étape n'est pas obligatoire dans la méthode d'analyse (4500- $CN^-C$ ) de Standard Methods, et par conséquent les CN complexés ne sont pas dosés par Maxxam. C'est pourquoi on retrouvait plus de  $CN_T$  dans le lixiviat (qui a un pH initial de 9) que dans le résidu.

La période totale de lixiviation dans cette version sera de 48 h au lieu de 192 h car dans les analyses précédentes la concentration de cyanures lixiviés est devenue stable à 48 h. De plus, Young et Theis (1991) ont remarqué lors de leurs essais que la période totale d'équilibre dans la lixiviation des cyanures était de 48 h.

## 3 PRINCIPE

Une quantité déterminée de résidu minier est mise en contact avec une solution de 10 % de NaOH (Standard Methods 1998, Theis *et al.*, 1994) pendant une période de 24 et 48 h sous agitation mécanique. Les cyanures dosés dans ce lixiviat représente la quantité maximale de  $CN_T$  pouvant être extraite du résidu. En parallèle, la même quantité de résidu est mise en contact avec de l'eau désionisée pendant une période similaire de 24 et 48 h. Les cyanures totaux ( $CN_T$ ) sont, par la suite, analysés dans la phase aqueuse par la méthode (4500- $CN^-C$ ) de Standard Methods. De plus, à la période de 48 h des  $CN_{WAD}$  sont analysés sur tous les échantillons sauf sur celui de la lixiviation avec NaOH à 10%.

Afin de rejoindre les objectifs de cette expérience, il faut faire l'extraction des cyanures dans l'eau désionisée sans ajout de tampon ou d'autres produits chimiques. Un ratio solide liquide de 1/5 devra être maintenu pour l'extraction des cyanures (Ray, 1984, Theis *et al.*, 1994).

## 4 MATÉRIEL ET RÉACTIFS

- Bouteilles ambrées en verre de 750 ml munies de bouchons en Téflon ;
- Eau désionisée (eau nanopure, résistivité  $\geq 18.2 M\Omega.cm$ ) ;
- Eau osmosée (distillée) ;
- NaOH solide (pastilles) ;
- Solution de NaOH 10N (dans un ballon de 100 ml peser 40 g de NaOH ensuite

- diluer avec 100 ml d'eau désionisée) ;
- Thermomètre, chronomètre ;
  - pH-mètre (préalablement calibré) ;
  - Balance de capacité 3200 g (précision 0.01 g), préalablement calibrée ;
  - Agitateur à culbutage ;
  - Cylindre gradué de 1000 ml ;
  - Trois seringues jaugées en verre (volume 10 ml, précision 1%) ;
  - Support à filtre en acier inoxydable muni d'un filtre en Téflon de 0.45  $\mu\text{m}$  fixé sur la seringue ;
  - Spatule, cuillère, etc.

## 5 MÉTHODOLOGIE

**Note :** À cause de l'espace disponible sur l'agitateur à culbutage chaque expérience sera réalisée sur 1 seul échantillon à une seule profondeur.

### 5.1 Prélèvement et homogénéisation de l'échantillon

- Réaliser l'expérience **en triplicata** sur les trois échantillons Yv 6 ans, Dy 9 ans et Dy 3 mois aux deux profondeurs (0.2 et 1 m).
- Dans un grand bac homogénéiser bien chaque échantillon à chacune des deux profondeurs sous la hotte chimique. Transférer 600 g de chaque échantillon dans un sac, puis fermer hermétiquement. Pour les trois échantillons et les 2 profondeurs il y a 6 sacs à faire.
- Entreposer à 4 °C et dans un endroit sombre jusqu'à utilisation.

### 5.2 Préparation de la solution de NaOH à 10 % (p/v)

- Dans un ballon volumétrique de 1000 ml peser 100 g de NaOH en pastilles et compléter avec de l'eau désionisée (dont on a mesuré et noté le pH à l'aide du pH-mètre) jusqu'au volume de 1000 ml.

### 5.3 Lixiviation avec NaOH 10%

- Peser environ précisément 130.00 g de résidu provenant du sac (voir étape 5.1) dans une bouteille de 750 ml ; noter le poids exact mis dans la bouteille ;
- Faire un poids sec selon le PSO A7 ;
- À l'aide d'un cylindre gradué de 1000 ml, ajouter 650 ml de la solution de

NaOH à 10 % (voir 5.2), fermer la bouteille et bien mélanger, ensuite lire le pH du mélange qui doit être supérieur ou égal à 12 ( $\text{pH} \geq 12$ ) (N.B. : pour lire le pH placer la sonde directement dans le contenant). Si le pH n'est pas  $\geq 12$  ou s'il descend en bas de 12 lors de la manipulation ajuster avec quelques gouttes de la solution de NaOH 10N et vérifier le pH à l'aide du pH-mètre ;

- Placer cette bouteille avec celles qui seront réalisées à l'étape 5.4 dans l'agitateur à culbutage et suivre la même procédure d'échantillonnage que celle décrite au point 5.5.

#### 5.4 Extraction des cyanures (en triplicata)

- Peser environ précisément 130.00 g de résidu provenant du sac (voir étape 5.1) dans une bouteille de 750 ml ; noter le poids exact mis dans la bouteille (note : réaliser en triplicata) ;
- Faire un poids sec selon le PSO A7 de manière à pouvoir rapporter les résultats en mg CN lixivié/kg de résidu sec ;
- À l'aide d'un cylindre gradué de 1000 ml, ajouter 650 ml d'eau désionisée (dont on a mesuré et noté le pH à l'aide du pH-mètre) fermer la bouteille et bien mélanger, ensuite lire le pH du mélange qui représente la lecture à temps 0 (N.B. : pour lire le pH placer la sonde directement dans le contenant). Le volume total du mélange dans la bouteille devra laisser peu d'espace de tête pour minimiser la volatilisation du HCN présent dans la phase liquide ;
- Assurez-vous de bien fermer la bouteille afin d'empêcher les fuites de HCN, ensuite placer la dans l'agitateur à culbutage à  $R = 30 \text{ rpm}$  (MEF 1985) (Remarque : l'agitateur n'est pas doté d'un compteur de fréquence il faut l'ajuster manuellement et vérifier ensuite les rotations par minute à l'aide d'un chronomètre, noter la fréquence exacte). À l'aide d'un thermomètre fixé dans la pièce où a lieu l'expérience mesurer la température ambiante (choisir un endroit où la température varie entre 23 et 25 °C) ;
- Démarrer l'agitation.

#### 5.5 Procédure d'échantillonnage

L'expérience est en continu, la période d'agitation totale est de 48 h. Au moment d'échantillonner arrêter l'agitation, prendre l'échantillon (voir procédure) et ensuite redémarrer l'agitation. Ne pas tenir compte du temps d'échantillonnage dans la période totale prévue pour l'agitation.

### Procédure

- Faire venir des bouteilles d'analyses en verre opaque pour analyse de cyanure (avec agent de préservation) de chez Maxxam ;
- Prendre des échantillons aux périodes suivantes : 24h et 48h et lire le pH à chaque point d'échantillonnage ;
- Pour effectuer un échantillonnage arrêter l'agitation et transférer les bouteilles sous la hotte chimique ;
- Laisser décanter 10 mn ;
- Ouvrir la bouteille d'extraction, puis à l'aide de la seringue jaugée en verre de 10 cc prendre précisément 10 ml de lixiviat et filtrer sur un filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  environ 5 ml dans la bouteille d'analyse ensuite fermer hermétiquement, l'autre 5 ml le conserver pour lire le pH et s'en défaire par la suite. **N.B. : prendre l'échantillon le plus rapidement possible et refermer la bouteille d'extraction aussitôt après ;**
- Répéter ces opérations pour le reste des répliquats ainsi que pour l'échantillon de lixiviation avec NaOH à 10%. Entre chaque répliquat changer le filtre, laver le support à filtre trois fois à l'eau désionisée et changer la seringue en verre ;
- A la fin de la filtration laver plusieurs fois à l'eau osmosée et trois fois à l'eau déionisée les trois seringues en verre utilisées et préserver pour la prochaine utilisation.

### 5.6 Analyse des échantillons de l'extrait

- Placer les bouteilles contenant l'extrait dans une boîte et les envoyer chez Maxxam le plus rapidement possible. Considérer une demande d'analyse normale de 5 jours ouvrables ;
- Pour chacun des échantillons demander l'analyse des  $\text{CN}_T$  ;
- Pour la période de 48 h demander chacune des analyses  $\text{CN}_T$  et WAD pour tous les échantillons **sauf** pour la lixiviation à pH 12 où il faut considérer uniquement l'analyse des  $\text{CN}_T$  ;

**N.B : Refaire toutes les étapes depuis 5.2 pour tous les autres échantillons.**

## 6 CALCULS

- **Calcul en pourcentage**

### 1. Lixiviation à pH 12

Soit Y mg/l la concentration de  $CN_T$  déterminée par le laboratoire Maxxam dans le lixiviat avec NaOH 10% (pH = 12). Cette concentration représente 100% des  $CN_T$  récupérés.

### 2. Lixiviation à pH du résidu

Soit X mg/l la concentration de  $CN_T$  déterminée par le laboratoire Maxxam dans le lixiviat. Cette concentration représente la quantité de  $CN_T$  lixiviable retrouvée dans l'eau.

$$\boxed{\% \text{ CN lixivié} = \frac{X}{Y}}$$

- **Calcul en mg/kg**

- **Lixiviation à pH du résidu**

Calculer pour chacun des échantillons la quantité de cyanures lixiviés/kg de résidu sec. **N.B.** corriger le volume d'eau (0.65 l à t=24h) pour le deuxième point d'échantillonnage (48h) en soustrayant 10 ml.

$$mg \text{ CN lixiviés} / Kg \text{ de résidu sec} = \frac{X(mg/l) * 0.65(l) * 1000}{poids \text{ sec du résidu}(g)}$$

$$\text{Poids sec} = \text{poids residu humide} \times \left( 1 - \frac{\% \text{ humidite}}{100} \right)$$

## 7 RÉFÉRENCES

Ministère de l'Environnement et de la Faune (MEF), Direction des laboratoires (1985). Procédure d'évaluation des caractéristiques des déchets solides et des boues pompables.

Theis, T. L., Young, T.C., Huang, M., Knutsen, K.C. (1994). Leachate Characteristics and Composition of Cyanide-Bearing Wastes from Manufactured Gas Plants. *Environ. Sci. Technol.* 28, 99-106.

Ray, W.R. (1984). A simple leach procedure for determining the total cyanide content of heap leach tailings. Conference on Cyanide and the Environment. Tucson, Arizona. 201-211.

Standards Methods for examination of water and wastewater (1998). 20<sup>th</sup> Edition, Clesceri L.S., Greeberg, A.E. & Eaton A.D. (eds).


Yong, T.C. & Theis, T.L. (1991). Determination of cyanide in manufactured gas plant purifier wastes. *Environmental Technology*, 12, 1063-1069.

## 8 RECOMMANDATIONS

- Il est recommandé d'utiliser uniquement des bouteilles ambrées dans cette expérience de manière à éviter une éventuelle photodégradation des cyanures.
- À défaut d'avoir des bouteilles opaques pour l'expédition des échantillons, utiliser des contenants ordinaires recouverts de papier aluminium.
- La quantité utilisée de 130 g de résidu était dans le but d'éviter les problèmes d'homogénéité. Ceci dit, le choix de cette quantité n'est pas obligatoire à condition de respecter le rapport solide liquide 1/5.
- Le pH de l'eau peut être augmenté (pour éviter la volatilisation) si le but de l'expérience n'est pas l'étude de l'atténuation naturelle.



•  
**ANNEXE VIII P32-E -Détermination de la capacité tampon des échantillons de sol  
provenant des six sites entourant des poteaux appartenant à Bell Canada**

 <p>Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des altes</p>		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # :P32-E		Nombres de pages :08	
Version :01		Date :19/07/99	
Auteur(s): <u>Jean-Philippe Bertrand</u>			
Approuvé par :		Signatures :	
<u>Gérald Zagury</u>		<input checked="" type="checkbox"/>	Date :
<u>Sandra Estrela</u>		<input checked="" type="checkbox"/>	
		<input type="checkbox"/>	
Titre : Détermination de la capacité tampon dans des échantillons de sol provenant de six sites entourant des poteaux appartenant à Bell Canada.			
Mots clés : Capacité tampon, pH, sol.			

## 1 OBJECTIF

L'objectif d'une mesure de la capacité tampon d'un sol est de déduire une indication de sa résistance à une variation de pH.

## **2 MATÉRIEL ET RÉACTIFS**

### **2.1 MATÉRIEL (pour échantillons et trois blancs de méthode)**

- Balance de 0.0001 g de précision ;
- Agitateur de type Wrist action ;
- Cinquante-six (56) tubes à centrifugeuse en plastique et bouchons ;
- Micropipette de 5 ml et embouts ;
- Pipette de mohr de 100 ml ;
- Pipette de mohr de 50 ml ;
- Pipette de mohr de 25 ml ;
- Un (1) ballon jaugé de 500 ml avec bouchon ;
- Six (6) ballons jaugés de 250 ml avec bouchons ;
- Deux (2) béchers de 150 ml ;
- Dessiccateur ;
- pH-mètre et standards ;
- Poire à pipette ;
- Six (6) spatules en téflon ;
- Six (6) coupelles en aluminium ;
- Bécher de 2l ;
- Sept (7) béchers de 150ml.

### **2.2 RÉACTIFS**

- Acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) concentré ;
- Acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) 0.01 M ;
- Acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) 0.02 M ;
- Acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) 0.05 M ;
- Acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) 0.1 M ;
- Acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) 0.2 M ;
- Acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) 0.5 M ;
- Acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) 1 M ;

### 3 MÉTHODOLOGIE

#### 3.1 Préparation des solutions d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) (les solutions sont préparées pour 18 échantillons et trois blancs de méthode).

La préparation des solutions acides requiert certaines précautions. Il faut travailler sous la hotte en tout temps, porter sarrau et lunettes de sécurité. Le port des gants protecteurs non sensibles à l'acide est recommandé. De plus, il ne faut JAMAIS VERSER DE L'EAU DANS UN ACIDE. Toujours verser de l'acide dans l'eau.

##### Préparation de l'eau osmosée

1. Standardiser le pH-mètre (PSO-A19) ;
2. Prendre le pH de 1.5 l d'eau osmosée dans un bécher de 2 l (PSO-A20) ;
3. Si le pH est inférieur à 6, buller avec de l'air pendant une période d'au moins 20 min ;
4. Prendre de nouveau le pH de l'eau ;
5. Répéter les étapes 3 et 4 si le pH de l'eau osmosée n'est toujours pas compris entre pH 6 et 7 ;
6. Reprendre la préparation de l'eau osmosée lorsque toute la quantité préparée est épuisée (ne pas préparer une trop grande quantité d'eau osmosée pour éviter la dissolution du  $\text{CO}_2$  au contact de l'eau à l'air ambiant).

##### Acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ), 1M

1. Verser environ 250 ml d'eau osmosée dans le ballon jaugé de 500 ml ;
2. Mesurer à l'aide d'une pipette graduée (50 ml) 31.44 d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) concentré et transvaser dans le ballon jaugé de 500 ml ;
3. Compléter au trait de jauge avec de l'eau osmosée.

##### Acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) dilué

1. Préparer les solutions d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) dilué dans des ballons jaugés de 250 ml (contenant préalablement environ 100 ml d'eau osmosée) et en utilisant
2. les instruments de mesure indiqués dans le tableau suivant :

**Tableau de préparation des standards d'acide nitrique**

Molarité de l'acide nitrique concentré (M) = 15,9		
Concentration (M)	Solution mère	Volume de la solution mère (ml)
1,0000	Acide nitrique concentré	31,44
0,5000	Acide nitrique 1 M	125,00
0,2000	Acide nitrique 1 M	50,00
0,1000	Acide nitrique 1 M	25,00
0,0500	Acide nitrique 1 M	12,50
0,0200	Acide nitrique 1 M	5,00
0,0100	Acide nitrique 1 M	2,50

inst 1 Pipette de mohr de 50 ml

inst 2 Pipette de mohr de 100 ml (pipeter 2 fois avec 60 + 65 ml)

inst 3 Pipette de mohr de 25 ml

inst 4 Pipette automatique de 5 ml

3. Compléter au trait de jauge des ballons avec de l'eau osmosée

### 3.2 Procédure de dosage (le protocole de dosage est donné pour un seul échantillon)

#### Pourcentage d'humidité dans le sol

1. Peser environ précisément 5 g de sol dans une coupelle en aluminium préalablement pesée et conditionnée à 105 °C (conditionnée : placer à l'étuve pendant une heure et refroidie au dessiccateur une demi-heure) ;
2. Placer à l'étuve pour une période d'un minimum de douze heures ;
3. Laisser refroidir au dessiccateur au minimum 30 min ;
4. Peser à la balance analytique (précision 0.0001g) ;
5. Replacer à l'étuve pour une période de 2 heures ;
6. Laisser refroidir au dessiccateur au minimum 30 min ;
7. Peser à la balance analytique (précision 0.0001 g)
8. Reprendre le cycle étuve, dessiccateur, peser jusqu'à l'obtention d'un poids constant (différence de 5 mg au maximum entre les pesées).

### Mesure de la capacité tampon (blanc)

1. Numéroté huit (8) tubes à centrifugeuses de 50 ml en plastiques;
2. Placer dans le premier tube à centrifuge 10 ml d'eau osmosée à l'aide de la micropipette de 5 ml (2 x 5 ml) ;
3. Placer dans 7 tubes à centrifugeuse de 50 ml en plastique 10 ml de chacune des solutions acides préparées soit 1 M, 0.5 M, 0.2 M, 0.1 M, 0.05 M, 0.02 M et 0.01 M;
4. Mettre le bouchon et agiter vigoureusement à l'aide de l'agitateur Wrist action pour une période de trente minutes ;
5. Laisser reposer 24 heures (+/- une heure) puis prendre le pH (PSO-A20) ;
6. Laisser reposer à nouveau pendant 24 heures (+/- une heure) puis reprendre le pH (PSO-A20).

### Mesure de la capacité tampon (échantillon)

1. Numéroté huit (8) tubes à centrifugeuse de 50 ml en plastique;
2. Peser dans les huit (8) tubes à centrifugeuses en plastique précisément environ 5 g de sol à analyser;
3. Ajouter au premier 10 ml d'eau osmosée à l'aide de la micropipette de 5 ml (2 x 5 ml) ;
4. Ajouter aux autres tubes 10 ml de chacune des solutions acides préalablement préparées soit 1 M, 0.5 M, 0.2 M, 0.1 M, 0.05 M, 0.02 M et 0.01 M à l'aide de la micropipette de 5 ml (2 x 5 ml) ;
5. Mettre le bouchon et agiter vigoureusement à l'aide de l'agitateur Wrist action pour une période de trente minutes;
6. Laisser reposer 24 heures (+/- une heure) puis prendre le pH (PSO-A20) ;
7. Laisser reposer à nouveau pendant 24 heures (+/- une heure) puis reprendre le pH (PSO-A20) ;
8. Si le pH a varié de plus de 0.03 unités de pH, conserver la valeur du pH à 48 h sinon, conserver la valeur du pH après 24 h.

## **4 CALCULS**

La capacité tampon d'un sol ( $\beta$ ) s'exprime en cmol d'acide par Kg de sol sec. Il faut donc, pour y parvenir, tracer un graphique du pH en fonction de la quantité d'acide ajoutée en cmol  $H^+$ / Kg sol. On peut utiliser la masse de sol humide ou la masse de sol sec pour le calcul des points du graphique. Cependant, en utilisant la masse de sol sec on obtient directement la capacité tampon du sol autrement, il y a une correction à faire. La capacité tampon est, par convention, la quantité d'acide que l'on doit ajouter à un sol pour que son pH diminue d'une unité par rapport à son pH initial. Cette quantité d'acide se traduit par la pente de la droite au début de la courbe, lorsque le pH chute d'une unité.


## **5 RÉFÉRENCES**

Zagury, G.J. *et al.* (1997). Stabilisation de résidus acides miniers par des résidus alcalins d'usines de pâtes et papiers, *Environmental Technology*, vol.18, pp 959-973.

Zagury, G.J. (1997). Étude d'un traitement par biolixiviation au moyen de la microflore indigène ferroxydante des sols contaminés aux métaux lourds (Zn, Cu, Mn). Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke, Québec, 176 p.

**ANNEXE IX PSO A10-Test de minéralisation en microcosmes**



		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : PSO A10		Nombres de pages : 14	
Version : 01		Date : 01/04/97	
Auteur(s) : <u>Sandra Estrella</u>			
<u>Katia Santini</u>			
Approuvé par : <u>Josée Gagnon</u>		Signatures :	Date :
		<input checked="" type="checkbox"/>	
		<input checked="" type="checkbox"/>	
		<input type="checkbox"/>	
Titre : Test de minéralisation en microcosmes			
Mots clés : Minéralisation, radioactivité, microcosmes, microorganismes, dpm			

### 1.00 Domaine d'application

Ce protocole s'applique aux sols et à toute autre substance susceptible de posséder un potentiel de biodégradation.

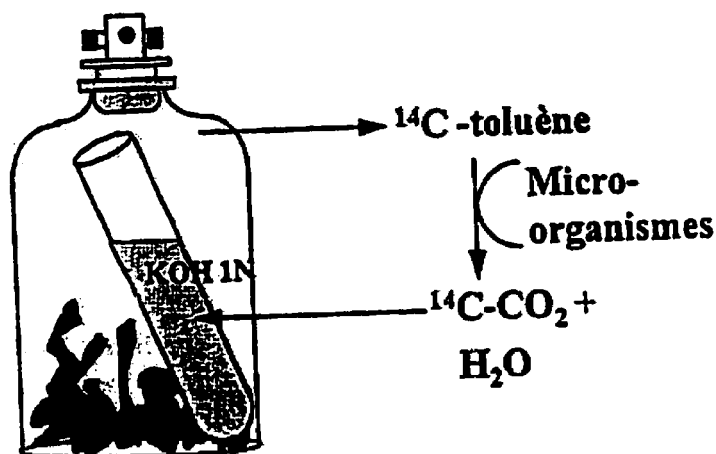
## 2.00 Principes de la méthode

La biodégradation ultime d'un contaminant est appelée la **minéralisation**. Elle implique que le contaminant est transformé complètement en CO<sub>2</sub>.

Pour déterminer la biodégradabilité des polluants dans les sols ou toute autre matrice, il s'agit de mettre certains composés radioactifs témoins représentatifs du type de pollution dans un microcosme contenant la matrice d'intérêt et de vérifier s'il y a minéralisation de la part des micro-organismes présents (Samson et al., 1991; Millette et al., 1995, Otte et al., 1994). Un poids de 20 g de sol (eau souterraine, compost ou autre) est déposé dans une bouteille sérologique de 120 ml. La solution de polluant marqué au carbone-14 est utilisée pour obtenir dans les microcosmes une activité totale de 100 000 dpm (désintégrations/minute). Chacun des microcosmes est muni d'une trappe à CO<sub>2</sub> constituée de 1 ml de KOH 1 N déposé dans un tube de verre de 5 ml à l'intérieur de la bouteille. Le microcosme est scellé et incubé sans agitation à la température mesurée dans la matrice au moment de l'échantillonnage (ex.: pour l'eau souterraine, le microcosme est incubé à 10 °C). Périodiquement, le KOH contenant le [<sup>14</sup>C]CO<sub>2</sub> est échantillonné et déposé dans un vial pour le comptage de la radioactivité dans un compteur à scintillation alors qu'il est remplacé par une solution fraîche. La minéralisation du polluant radiomarqué est ainsi mesurée par la production de [<sup>14</sup>C]CO<sub>2</sub> (issue de la minéralisation du polluant) qui a réagi avec la solution de KOH selon la réaction chimique suivante:



La radioactivité enregistrée représente donc ce qui a été minéralisé par les micro-organismes. Par ailleurs, afin de tenir compte des pertes abiotiques des composés radioactifs, des témoins empoisonnés contenant 0.2% (p/p) d'azoture de sodium sont préparés. La figure 2.1 résume le principe de la minéralisation en microcosme.



**Figure 2.1:** Principe de minéralisation en microcosme (exemple donné pour la minéralisation du toluène).

### 3.00 Matériel

- Compteur à scintillation Wallac 1409 avec unité de disquette 3.5 et imprimante Epson LX300 (Fisher Scientific);
- Cocktail à scintillation OptiPhase Hisafe 3 (Fisher Scientific);
- Bouteilles sérologiques 120 ml (Fisher Scientific);
- Valves mininert avec septums (pour les composés volatils) (Supelco);
- ou
- Septums étanches avec anneaux métalliques (Fisher Scientific);
- Tubes en verre de 5 ml (diamètre 10 ou 12 mm) (Fisher Scientific);
- KOH (Anachemia);
- Vials à scintillation en verre de 20 ml avec bouchons (Fisher Scientific);
- Support pour vials à scintillation (Fisher Scientific);
- Produit radioactif (Sigma);
- Azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) (Anachemia);
- Balance analytique Mettler Toledo AB204 ou PB302 (précision de  $\pm 0.002$  g);
- Papier absorbant;
- Resserreur de bouchon « crimper »;
- Seringues en verre Gastight de 1, 10, 50, 100, 250 et 1000  $\mu\text{l}$ ;
- Seringues en plastique de 30 ml et 5 ml;
- Aiguille en acier inoxydable de 6 '';
- Vial ambré de 1.8 ml avec bouchon contenant un septum.

## 4.00 Mode Opérateur

### 4.10 Préparation de la solution radioactive: généralités

Avant même de débiter le test de minéralisation en microcosmes, il faut préparer la solution radioactive qui servira de substrat aux micro-organismes.

Deux cas peuvent survenir:

- 1) Le polluant radioactif en question vient d'être livré;
- 2) Une solution mère du polluant radioactif existe déjà.

**Dans le premier cas**, il faut consulter le PSO portant sur la manipulation de produits radioactifs spécifiques d'intérêt (PSO G4).

**Dans le second cas**, il faut procéder à une dilution de la solution mère afin d'effectuer une solution de travail (ou solution fille) diluée qui servira à l'expérience (voir les étapes préliminaires 4.20). Les dilutions s'effectuent toujours avec le solvant dans lequel arrive le produit radiomarké (ex.: le PCP vient dans le toluène, il faut donc le diluer avec ce solvant). En cas de doute sur le solvant approprié, consulter le certificat d'analyse fourni par le manufacturier.

Noter bien qu'il faut s'inscrire dans le manuel de radioprotection avant même de procéder à l'expérience de même qu'au manuel de l'inventaire pour les produits radioactifs. Il est recommandé d'être assisté par une personne ayant suivi le cours de radioprotection lors de vos premières manipulations. Toujours noter la date, le nom, le produit radioactif et la quantité de dpm utilisée tel que décrit dans les documents de l'annexe.

### 4.20 Étapes préliminaires

- 1- Prévoir le nombre d'échantillons de l'expérience et le nombre de fois que l'on vérifiera la solution radioactive avec des **contrôles** (avant l'expérience et pendant l'ajout dans les microcosmes afin de vérifier la stabilité de la solution et la reproductibilité des manipulations, environ à tous les 6 microcosmes);
- 2- Effectuer une estimation de la quantité de dpm requise pour l'expérience. En général, une injection spontanée de 100 000 dpm / microcosme est choisie (ex.: pour 10 microcosmes, il faut une solution mère ayant au moins 1 000 000 de dpm);
- 3- Calculer le volume de solution mère requis pour effectuer la solution de travail.

#### 4.21 Exemple pour les calculs préliminaires

##### exemple:

Solution mère radioactive ( $C_1$ ) = 204 000 dpm /  $\mu\text{L}$  (inscrit dans l'inventaire ou évalué à l'aide du compteur à scintillation)

Solution fille radioactive ( $C_2$ ) = 100 000 dpm / 10  $\mu\text{L}$  \*

$$= 10\,000 \text{ dpm} / \mu\text{L}$$

Volume total requis ( $V_2$ ) = 150 microcosmes avec injection de 10  $\mu\text{L}$  de solution radioactive à 100 000 dpm

$$= 1\,500 \mu\text{L}$$

Volume de la solution mère requis = ?

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1} = \frac{10\,000 \text{ dpm} / \mu\text{L} * 1500 \mu\text{L}}{204\,000 \text{ dpm} / \mu\text{L}} = 73.5 \mu\text{L}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume de solvant nécessaire} &= 1500 \mu\text{L} - 73.5 \mu\text{L} \\ &= 1426.5 \mu\text{L} \end{aligned}$$

→ 1427  $\mu\text{L}$  de toluène + 73  $\mu\text{L}$  de solution stock  $^{14}\text{C}$ -PCP = 1500  $\mu\text{L}$  d'une solution diluée à 100 000 dpm / 10  $\mu\text{L}$

\* Il est courant d'utiliser une injection instantannée de 10  $\mu\text{L}$  de solution radioactive contenant 100 000 dpm par microcosme. Le 10  $\mu\text{L}$  est issu d'un choix personnel basé sur la facilité de manipulation et la reproductibilité de l'injection. Une quantité entre 5 et 100  $\mu\text{L}$  peut quand même être utilisée.

#### 4.30 Préparation de la solution radioactive de travail (solution fille)

Tous les produits radiomarqués sont entreposés dans la boîte en plexiglas dans le réfrigérateur à 4 °C.

- 1- Porter en tout temps sarrau et deux paires de gants + lunettes;
- 2- Réserver la hotte radioactive pour la période de travail;
- 3- Installer un papier absorbant dans la hotte utilisée pour les manipulations radioactives (hotte A) et fixer le papier à l'aide de ruban gommé;
- 4- Aller chercher le produit radioactif à 4 °C et déposer la boîte qui le contient sur le papier absorbant dans la hotte, baisser la vitre de la hotte;
- 5- Préparer un vial en verre de 20 ml avec le solvant propre avec lequel on veut diluer un certain volume de la solution mère. Prévoir un second vial dans lequel sera déposé le solvant-déchet (solvant utilisé pour le rinçage des seringues);
- 6- Déposer la quantité de solvant, préalablement calculée à l'étape 4.20.3, dans un vial ambré en verre de 1.8 ml à l'aide d'une seringue en verre *Gastight* préalablement rincée trois fois au solvant propre et mettre le bouchon en teflon;
- 7- Prendre la quantité nécessaire de produit radioactif à l'aide d'une seringue en verre (se trouvant dans la hotte A) rincée trois fois au solvant propre et déposer dans le même vial ambré de 1.8 ml. Boucher le vial de 1.8 ml avec un bouchon à couverture de teflon;
- 8- Bien agiter;
- 9- Vérifier le nombre de dpm /  $\mu\text{L}$  de cette solution de travail en injectant 1  $\mu\text{L}$  (quantité minimale) dans un vial à scintillation contenant 10 mL de cocktail à scintillation puis en le faisant compter au compteur à l'aide du protocole EASY COUNT (00) pour une lecture de 1 min. par vial;
- 10- Lire la colonne DPM (désintégrations par minute) sur la feuille sortant de l'imprimante;
- 11- Identifier la bouteille en indiquant combien de dpm /  $\mu\text{L}$  elle contient et indiquer la quantité de produit radioactif utilisée dans la feuille d'inventaire (voir ex. en Annexe).

#### 4.30 Préparation des microsomes

- 1- Préparer d'abord une feuille de travail qui tiendra compte des ajouts à effectuer aux microcosmes (voir modèle suivant) :

Tableau 4.1 : Feuille de travail pour la préparation des microcosmes

N <sup>o</sup>	description	température	jour 0	sol (g)	eau (ml)	NaN <sub>3</sub> (g)
1	SOL1	20 <sup>o</sup> C	970101, 10:00	20	-	
2	SOL2	20 <sup>o</sup> C	970101, 10:00	20	-	
3	TEMOIN	20 <sup>o</sup> C	970101, 10:00	20	-	0.04
4	EAU1	10 <sup>o</sup> C	970101, 10:00	-	20	
5	EAU2	10 <sup>o</sup> C	970101, 10:00	-	20	
6	TEMOIN	10 <sup>o</sup> C	970101, 10:00	-	20	0.04

- 2- Réserver la hotte radioactive pour la période de travail;
- 3- Peser 20 g de sol ou 20 mL d'eau selon le cas dans des bouteilles sérologiques bien identifiées (120 ml). Effectuer tout autre ajout à ce moment selon les besoins de l'expérience (ex: polluant non marqué, MSM<sup>1</sup>, glucose, conditions anoxiques: purger à l'azote; dénitrifiantes: NaNO<sub>3</sub>, sulfato-réductrices: NaSO<sub>4</sub>,

<sup>1</sup> voir PSO pour connaître la composition de la solution de MSM méthanogéniques...).

Il est recommandé d'ajouter une quantité connue de polluant non radiomarké (« froid ») afin que le substrat ne devienne pas limitant pour la flore indigène des micro-organismes. Il faudra par ailleurs s'assurer que la quantité ajoutée n'est pas toxique pour les micro-organismes;

- 4- Ajouter l'azoture de sodium (NaN<sub>3</sub>) 0.2% (p/p) soit 0.04 g, dans les microcosmes témoins à la toute fin. Ceux-ci constitueront les témoins abiotiques;
- 5- Placer le tube de verre de 5 ml contenant 1 ml de KOH 1N à l'intérieur du microcosme;

*À ce stade, porter en tout temps sarrau et deux paires de gants et lunettes. Installer un papier absorbant dans la hotte utilisée pour les manipulations radioactives (hotte A). Fixer le papier à l'aide de ruban gommé.*

- 6- Installer les microcosmes sur un chariot recouvert de papier absorbant près de la hotte de travail;
- 7- Injecter la quantité de solution radioactive de travail requise (généralement 10 µL) dans le microcosme à l'aide d'une seringue en verre *Gastight* préalablement rincée trois fois au solvant propre. **Attention: ne pas injecter dans le tube à KOH;**
- 8- Effectuer des contrôles (environ à chaque 6 microcosmes) en injectant 10 µl de la solution radioactive de travail dans un vial à scintillation contenant 10 ml de cocktail.
- 9- Sceller le microcosme avec la valve mininert contenant un septum (produit radioactif volatil) ou bien avec un septum recouvert de teflon et son anneau métallique à l'aide du resserreur de bouchon et passer au microcosme suivant;
- 10- Entreposer les microcosmes à la température voulue, à la noirceur si nécessaire (cabinet gris d'entreposage des microcosmes radioactifs).
- 11- Placer tous les vials contenant les contrôles dans le support à vials et ajouter une languette identifiée PROTOCOLE 1 sur le côté du support marqué d'un point rouge;
- 12- Faire compter dans le compteur à scintillation liquide en plaçant le support point rouge vers la droite et en choisissant les commandes START (2x) puis SELECT;
- 13- Bien indiquer les échantillons sur la feuille d'inventaire du compteur en notant aussi le numéro de fichier (voir ex. en Annexe).
- 14- Lire la colonne DPM (désintégrations par minute) sur la feuille sortant de l'imprimante;

#### 4.40 Échantillonnage des microsomes

L'échantillonnage des microsomes s'effectue de façon périodique pouvant aller d'un échantillonnage aux heures à un échantillonnage hebdomadaire dépendamment du polluant en question de même que de la matrice. Il est recommandé de suivre de façon continue la cinétique de dégradation du polluant afin d'arrêter l'expérience après l'obtention de la phase dite « plateau » (voir graphique 5.1.1).

- 1- Préparer une solution de KOH 1N (56.11 g/l d'eau distillée);
- 2- Porter en tout temps sarrau et deux paires de gants + lunettes;
- 3- Réserver la hotte radioactive pour la période de travail;
- 4- Installer un papier absorbant dans la hotte utilisée pour les manipulations radioactives (hotte A) et fixer le papier à l'aide de ruban gommé;
- 5- Installer dans la hotte les deux béciers identifiés EAU DE RINÇAGE et EAU REJETÉE. Remplir le premier avec de l'eau distillée (utiliser l'évier réservé pour la radioactivité);
- 6- Retirer les microsomes du lieu d'entreposage et installer les microsomes sur un chariot recouvert de papier absorbant près de la hotte de travail;
- 7- Numéroter tous les bouchons avec le numéro de microcosme, vos initiales, le numéro d'échantillonnage et la date;
- 8- Placer les vials à scintillation dans le support noir en commençant par le côté opposé au point rouge sur le support;
- 9- Amener le support contenant les vials de même que les bouchons dans la hotte;
- 10- Remplir la seringue en plastique de 30 cc avec la solution de KOH 1N et la déposer dans la hotte après avoir retiré l'aiguille;
- 11- Effectuer un blanc en déposant 10 ml du cocktail à scintillation (à l'aide du distributeur) dans le premier vial de 20 ml et en y ajoutant 2 ml de KOH 1N à l'aide de la seringue en plastique;
- 12- Effectuer l'échantillonnage du premier microcosme: prélever la solution de KOH en introduisant une aiguille en acier inoxydable de 6'' connectée à une seringue de 5 ml dans le tube se trouvant à l'intérieur du microcosme;
- 13- Vider la trappe à l'aide de la seringue;
- 14- Retirer la seringue en laissant l'aiguille dans le microcosme;
- 15- Mettre le contenu de la seringue dans un vial à scintillation. Moucher la dernière goutte sur le côté du vial;
- 16- Rincer la trappe avec 1 ml de KOH frais en utilisant toujours l'aiguille insérée et additionner ce volume au même vial;
- 17- Ajouter 1 ml de KOH frais dans la trappe et enlever la seringue (ce KOH sera prélevé au prochain échantillonnage);
- 18- Aérer le microcosme en introduisant environ 5 à 10 ml d'air à l'aide d'une seringue en plastique (cette étape est parfois éliminée lorsqu'il s'agit d'un polluant volatil);



- 19- Laisser équilibrer les pressions intérieures et extérieures avec l'aiguille puis reconnecter la seringue à l'aiguille et déposer celles-ci dans le bécher contenant l'eau de rinçage;
- 20- **Ajouter 10 ml de cocktail à scintillation** au vial à scintillation et mettre le bouchon; **ATTENTION: le cocktail à scintillation doit être ajouté à ce moment. Éviter de remplir les vials avec le cocktail avant l'échantillonnage.**
- 21- Agiter le vial à scintillation (contenant le  $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ );
- 22- Recommencer les étapes 12 à 21 pour tous les autres microcosmes en prenant soin de rincer la seringue de 5 ml à l'eau distillée trois fois entre chaque microcosme et à la toute fin. Les solution de rejet sont déposées dans le bécher identifié « rejet »;
- 23- Placer tous les vials dans le support à vials et ajouter une languette identifiée **PROTOCOLE 1** sur le côté du support marqué d'un point rouge;
- 24- Faire compter dans le compteur à scintillation liquide en plaçant le support point rouge vers la droite et en choisissant les commandes START (2x) puis SELECT;
- 25- Bien indiquer les échantillons sur la feuille d'inventaire du compteur en notant aussi le numéro de fichier (voir ex. en Annexe).
- 26- Entreposer à nouveau les microcosmes à la température voulue, à la noirceur si nécessaire (cabinet gris d'entreposage des microcosmes radioactifs) jusqu'au prochain échantillonnage;

#### 4.50 Nettoyage

- 1- Laver au CONTRAD® les béchers ayant servi au rinçage des seringues dans l'évier, les remplir d'eau distillée et de CONTRAD® puis laisser tremper;
- 2- Retirer le papier absorbant en l'enroulant sur lui-même et le jeter à la poubelle;
- 3- Nettoyer à fond la hotte avec du détergent CONTRAD®;
- 4- Retirer les deux paires de gants de façon à ne pas toucher l'extérieur de ces derniers puis jeter les gants à la poubelle;
- 5- À la toute fin de l'expérience de minéralisation (après l'obtention du plateau) consulter le PSO S2 pour connaître la procédure de décontamination des microcosmes radioactifs.

#### 5.00 Calculs

##### Pourcentage de minéralisation:

$$\% \text{ de minéralisation} = \frac{\text{nb de dpm au temps X} * 100}{\text{nb de dpm moyen dans les contrôles de départ}} + \% \text{ min. au temps X-1}$$

Les résultats des expériences de minéralisation en microcosmes sont reportés sous forme de graphiques du % de minéralisation en fonction du temps et possède l'allure suivante:

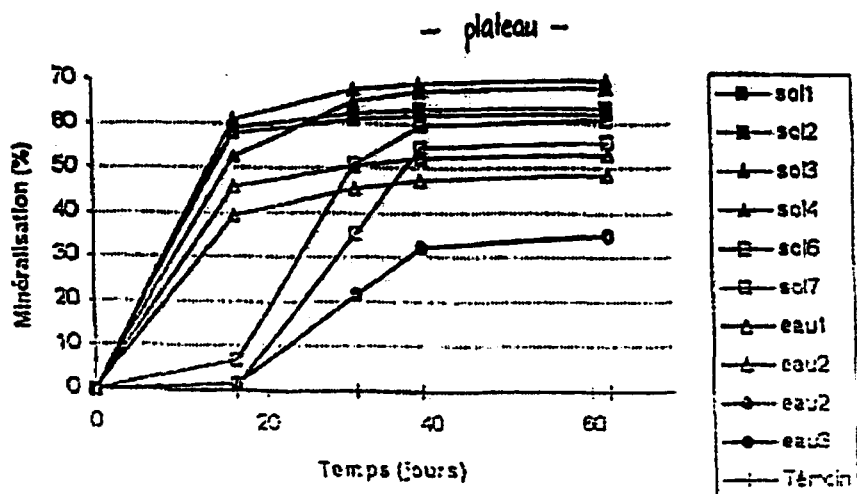


Figure 5.1: Graphique de la minéralisation du PCP en fonction du temps (ex. fictif).

### 6.00 Limites de la méthode

Cette technique ne tient pas compte du  $^{14}\text{C}$  incorporé dans la biomasse.

### 7.00 Références

Samson, R.Cseh, T. Hawari, J. Demeter, A. Al-Bashir et B. Leduc. Effect of redox conditions, soil/contaminant interaction and chemical structure on the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in flooded soil (1991). World Environment, Acta Press, Calgary.

Otte, M - P. Gagnon, J. Comeau, Y. Matte, N. Greer, C. W. et Samson, R. Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/creosote contaminated soil (1994). Applied microbiology and biotechnology, vol. 40 : 926-932.

Millette, D., Baker, J., Comeau, Y. Butler, B. Frind, E. O. Clément, B. et Samson, R. Substrate interaction during aerobic biodegradation of creosote-related compounds : a factorial experiment (1995). Environ. Sci : Technol. 29: 1744-1952

## 8.00 Notes

- Pour tout problème avec le compteur à scintillation, consulter le guide d'utilisation ou le responsable du laboratoire.
- Le **PROTOCOLE 1** indique au compteur de procéder à une lecture de 5 minutes pour chaque vial. Le **PROTOCOLE 00** (Easy count) équivaut à une lecture de 1 minute / vial. Il existe par ailleurs d'autres protocoles à votre disposition correspondant à d'autres temps de lecture. De plus, il est possible de programmer des protocoles pour des temps spécifiques.
- Un bon compte ou un compte significatif possède un SaQM près de 100%, si ce n'est pas le cas, vérifier les autres indices de qualité.
- Échantillonner autant de fois qu'il en sera nécessaire jusqu'à l'obtention du plateau avec un minimum de 1000 dpm par échantillonnage pour l'obtention d'un compte significatif.
- Les résultats sont exprimés en % de radioactivité récupérée.
- Disposer de l'eau de rinçage dans le lavabo tout en laissant couler l'eau du robinet généreusement.