

ANNEXE #4

Protocole du montage des bioréacteurs type colonnes pour le traitement passif du drainage minier acide

Montage des colonnes – bioréacteurs pour le traitement passif du drainage minier acide

<p style="text-align: center;">Environnement et gestion des rejets miniers</p>  <p style="text-align: center;">Chaire industrielle CRSNG Polytechnique-UQAT</p>	<p>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</p>
<p>Protocole #: 101-C</p>	<p>Nombre de pages:</p>
<p>Version: 2/2</p>	<p>Date : 4.07.2007</p>
<p>Auteur(s): Carmen-Mihaela Neculita</p>	
<p>Approuvé par :</p> <p>Gérald Zagury _____</p> <p>Étienne Bélanger _____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>Signatures :</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> _____</p> <p><input type="checkbox"/> _____</p> <p><input type="checkbox"/> _____</p>
<p>Titre : Montage des colonnes – bioréacteurs pour le traitement passif du drainage minier acide</p>	
<p>Mots clés: drainage minier acide (DMA), traitement passif, bioréacteur, colonnes</p>	

1. OBJECTIF GÉNÉRAL

Évaluer la capacité d'un mélange réactif contenant plusieurs sources de matière organique (copeaux et sciure de bois d'érable, fumier de volaille et compost de feuilles), des agents structurants (sable et sédiment de rivière), nutriment (urée) et un agent neutralisant (carbonate de calcium) de promouvoir la sulfato-réduction et de traiter du DMA à long terme.

Objectifs spécifiques

- 1. évaluer l'efficacité d'un mélange réactif, testé avec succès en bioréacteur batch (système discontinu), pour la neutralisation de l'acidité, pour l'enlèvement des sulfates par sulfato-réduction et pour la précipitation des métaux d'un DMA synthétique en bioréacteur type colonne (système continu)**
- 2. évaluer les changements des caractéristiques hydrodynamiques (porosité et perméabilité) durant le fonctionnement des colonnes pour une durée d'au moins 9 mois**
- 3. évaluer/quantifier les mécanismes d'enlèvement des métaux présents dans le DMA par analyses géochimiques destructives et minéralogiques non-destructives des boues à la fin des essais en colonne**
- 4. évaluer la toxicité de l'effluent traité à l'aide des essais écotoxicologiques.**

2. MATÉRIEL

Montage des colonnes

- Réservoirs en plastique de 10 L (18 seaux en plastique avec couvercles)
- Connecteurs droits pour tubes flexibles avec sortie NPT ¼ pouces
- Connecteurs droits pour tubes flexibles ID ¼ pouces
- Connecteurs en Y pour tubes flexibles avec sortie NPT ¼ pouce en nylon
- Raccords « swagelock » ¼ pouce avec NPT ¼ pouces en nylon
- Valve en téflon ¼ pouces
- Connecteurs « quick disconnect » en plastique ¼ pouces
- Pompe péristaltique Masterflex (1 à 100 rpm)
- Tête de pompe Masterflex easy-load
- Tubes flexibles en PVC clair ¼ pouces
- Tubes flexibles en silicone 13 et 14 mm
- Unions pour tubes Masterflex 13 et 14 mm
- Colonnes en plexiglas de 3,5 L ($\text{Ø}_i = 10 \text{ cm}$, $h = 45 \text{ cm}$) avec joints d'étanchéité en caoutchouc pour les colonnes
- Géotextile non-tissé (geomat MTC54)
- Pilon métallique
- Gants en caoutchouc longs
- Flacons d'échantillonnage en plastique (15 mL) stériles
- Flacons d'échantillonnage en plastique (50 mL) non-stériles
- Vials à centrifuger en PPHD de 50 mL
- Centrifugeuse Beckman model J2-21 avec rotor #
- Bombonne d'Azote grade HP+ avec détendeur basse pression (0-60 psig)

Drainage minier acide

- La qualité du DMA sera la même que celle utilisée pour les essais en batch (Protocole #: P62B).

- Pour la préparation du DMA l'eau distillée sera bien désaérée juste avant utilisation.

Mélange réactif

- **Gravier** de diamètre moyen ¼ pouces
- **Sable** (École Polytechnique)
- Copeaux de bois d'érable non traité d'environ 1 pouce carré (MWI Industries)
- Sciure de bois d'érable non traité (MWI Industries)
- Fumier de volaille composté (Fertilo de Fafard)
- Compost de feuilles (ville de Montréal)
- **Sédiment anaérobie** caractérisé provenant d'un site minier (ex. Cupra)
- Urée (réactif ACS, Fisher Scientific)
- Carbonate de calcium (réactif ACS, Fisher Scientific).

Milieu Postgate B :

- 3,5 g/L lactate de sodium ($C_3H_5NaO_3$) ou 4,67 mL d'une solution 56,8%
- 2,0 g/L sulfate de magnésium ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 1,0 g/L chlorure d'ammonium ($MgNH_4Cl$)
- 1,265 g/L sulfate de calcium ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$)
- 1,0 g/L extrait de levure (yeast extract)
- 0,5 g/L phosphate de potassium (KH_2PO_4)
- 0,5 g/L sulfate de fer ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 0,1 g/L acide thioglycolique ($C_2H_4O_2S$) ou 77,3 µL d'une solution 98%
- 0,1 g/L acide ascorbique ($C_6H_8O_6$)
- 1 L eau distillé.

Réactifs et équipements pour analyses expérimentales

- Pipettes graduées de 10 et 25 mL
- Seringues en plastique de 50 mL
- Filtre en plastique disposables de 0,45 µm non-stériles

- Agitateur magnétique
- pH-mètre HACH avec électrode à pH et sonde à potentiel d'oxydoréduction (POR) à référence combinée Ag/AgCl
- Spectrophotomètre HACH modèle DR2010
- Spectrophotomètre LaMotte modèle Smart spectro (2001)
- Cuvette de 10 et 25 mL pour l'analyse du sulfate, du fer ferreux, des sulfures et de l'ammonium
- Réactifs HACH ou LaMotte pour le sulfate, le fer, les sulfures et l'ammonium
- Acide nitrique grade environnemental
- Eau déionisée
- Bêchers de 10, 25, 50, et 100 mL

Extraction séquentielle - fractionnement des métaux

- Chlorure de potassium (MgCl_2) 1M (pH=7)
- Nitrate de potassium (KNO_3) 1M
- Acide nitrique (HNO_3) concentré
- Acide fluorhydrique (HF) concentré
- Acide perchlorique (HClO_4) concentré
- Hydroxyde de potassium (KOH) 1M
- Acétate de sodium NaOAc 1M (pH=5)
- Hydroxylamine hydrochlorure ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) 0,04 M dans 25% (v/v) acide acétique
- Peroxyde de hydrogène (H_2O_2) 30% ajusté à pH=2 avec de l'acide nitrique concentré
- Acétate d'ammonium (NH_4OAc) 3,2 M dans 20% (v/v) acide nitrique
- Tubes à centrifugeuse de 50 mL en polypropylène copolymérisé (PPCO)
- Agitateur type wrist-action
- Plaques chauffantes
- Bêchers en téflon
- Micropipette de 5 et 10 mL
- Tubes en plastique de 50 mL

Extraction simultanée des sulfures volatiles et des métaux solubles en milieu acide

- Hydroxyde de sodium (NaOH) 2M
- Acide ascorbique 0,1 M
- Sel disodique d'éthylène-diamino-tétra-acétique acide (EDTA) 0,1 M
- Acide chlorhydrique 6M
- Cylindres gradués de 25 mL
- Bouteilles de réaction de 50 mL prévues avec des couvercles en caoutchouc (stopper).

3. MÉTHODOLOGIE

Montage des colonnes

Afin de tester deux temps de rétention hydraulique (TRH), six colonnes seront montés dont trois colonnes pour un TRH de 2,5 jours et trois colonnes pour un TRH de 5 jours (URS Report, 2003; Zaluski et al., 2003; Kuyucak et al., 2006). Les six colonnes seront remplies du même mélange réactif (#3) dont la composition est donnée dans le tableau 1.

Tableau 1. Composition du mélange réactif #3

	Composant	g/100 g mélange sec
	Sources de carbone	
*	Copeaux bois d'érable	10
*	Sciure bois d'érable	20
*	Fumier volaille	10
*	Compost feuilles	20
	Agents structurants	
*	Sable	20
*	Sédiment	15
	Nutriment	
*	Urée	3
	Agent neutralisant	
*	Carbonate de calcium	2

Étapes de préparations

- Préparer d'abord le mélange réactif (les sources de carbone, les agents structurants, le nutriment et l'agent neutralisant). Pour ce faire, les composants seront utilisés humides (prévenir la ségrégation des particules), dans des quantités nécessaires pour respecter la composition du mélange en poids sec. L'humidité de chaque composant sera déterminée le jour d'avant le montage des colonnes.
- Le mélange doit être homogénéisé dans un bac de plastique à l'aide d'une paire de gant de caoutchouc. L'homogénéisation est meilleure si on mélange après l'ajout de chaque composant. Préparer environ 2 kg de mélange (en équivalent sec) pour

chaque colonne qui a un volume environ de 3,5 L, noter le poids du mélange préparé. L'humidité du mélange sera déterminée le jour du montage en prélevant un échantillon de chaque sceau.

- Peser la colonne lorsqu'elle est vide et propre, que les deux couvercles sont installés (bien scellés avec des garnitures en caoutchouc et serrés avec des rondelles et des boulons) et que tous les accessoires sont à l'intérieur de la colonne (les plaques poreuses du bas et du haut et les deux géomembranes). Celui-ci est **le poids total de la colonne vide**.
- Enlever ensuite le couvercle supérieur, la géomembrane et la plaque poreuse du haut et monter (serré) en place un couvercle de montage (découpé, pour permettre le remplissage de la colonne). Repeser la colonne et noter le poids.
- Mesurer la hauteur de la colonne vide de la façon suivante: placer une règle sur le couvercle de montage et mesurer la hauteur intérieure aux bords et au milieu. Prendre au moins 5 valeurs. Mesurer également le poids et la hauteur du couvercle de montage.
- Placer une couche de gravier d'environ 5 cm sur le géotextile du bas, tasser-le un peu avec un pilon métallique et noter le poids de la colonne avec gravier, ainsi que la hauteur de la colonne, mesurée de la même façon que la hauteur de la colonne vide.
- Passer ensuite au remplissage avec de mélange réactif. Pour ce faire, prendre du sceau une certaine masse (ex. 325g) pesée de mélange réactif à l'aide d'une pelle et la placer sur une tare. Vider dans la colonne la première couche de mélange réactif. **Tasser-la un peu avec un pilon métallique pour lui conférer les propriétés d'un solide légèrement compacté**. Repeser la colonne et reprendre la hauteur.
- Répéter les mêmes manipulations pour les autres couches (6-7) de mélange réactif, jusqu'à ce que la colonne soit remplie. Lorsque la colonne est pleine ajouter en haut de la colonne, sur le dessus du mélange réactif un dernier rang de gravier d'environ 1,5 cm. Faire un dernier pesage de la colonne et noter la hauteur finale du lit.

- Enlever le couvercle de montage, ajouter la géomembrane supérieure, la plaque poreuse et le couvercle du haut. Fermer la colonne et la peser. Celui-ci est **le poids total de la colonne remplie du solide**.
- Pour chaque colonne, environ 2L (**à vérifier pendant l'évaluation de la perméabilité du mélange**) de milieu Postgate doit être préparé et autoclavé. Le milieu doit être bullé à l'azote au moins 10 minutes avant son utilisation.
- Saturer la colonne en milieu Postgate sur le principe du test de perméabilité (perméamètre à parois rigide). À cette fin, vider la solution dans un réservoir muni d'une valve « quick disconnect » et d'un tuyau connecté à la valve située à la partie inférieure de la colonne. Ouvrir la valve « quick disconnect », la valve du bas de la colonne, ensuite celle du haut de la colonne et régler le débit de saturation pour que la saturation du solide se fait lentement.
- Repeser la colonne remplie de milieu Postgate. Celui-ci est **le poids total de la colonne remplie du solide et du milieu Postgate**.
- Bien envelopper la colonne en papier aluminium, pour empêcher que la lumière pénètre à l'intérieur (simuler les conditions de terrain) et le développement des bactéries chemolithotrophes (Waybrant et al., 2002).
- Répéter les mêmes étapes pour les 5 autres colonnes.
- Incuber les 6 colonnes à température ambiante du laboratoire (environ 24-27°C) pendant au moins 3 semaines, le temps que les conditions réductrices s'établissent dans le bioréacteur.
- Vérifier le POR après 3 semaines afin s'assurer que les conditions sont devenues réductrices.
- Si $POR > -150$ mV, incuber une semaine de plus. Revérifier le POR.

Attention!

Si une colonne coule (des fuites) procéder de la manière suivante:

- détecter le point de fuite
- vider du liquide de la colonne jusqu'à un niveau inférieur au point de fuite

- bien sécher la surface de fuite
- appliquer de la silicone pour obturer la zone de fuite
- laisser durcir la silicone pendant au moins 24 heures
- re-saturer la colonne en ajoutant d'abord le liquide récupéré (gardé à 4°C) et par la suite, si besoin, de milieu Postgate fraîchement préparé.

Préparation du DMA synthétique

La composition du DMA synthétique sera la même que celle utilisée pour les essais en batch (Protocole #: P62B).

Étapes de préparation:

- S'assurer que le sceau de préparation soit propre et sèche, sinon bien la laver à HCl concentré (100 mL) et ensuite bien rincer à l'eau distillée (au moins 6 fois)
- Mesurer le volume d'eau distillée nécessaire, dont 1 litre d'eau distillé qui sera gardé séparément dans un bécher de 1,5-2,0 litres.
- Ajouter 500 mg/L de CaCO_3 , placer le sceau de préparation du DMA sur une plaque agitatrice et agiter la solution pendant 24h à l'aide d'un barreau magnétique.
- Ajouter ensuite tous les sulfates tout en agitant la solution afin de bien homogénéiser le mélange (on peut également l'agiter en bullant avec de l'azote), à l'exception du FeSO_4 .
- Dans le bécher qui contient le 1L d'eau gardé séparément, ajouter de H_2SO_4 concentré pour obtenir une solution de 0.5 m H_2SO_4 et rajouter ensuite la masse nécessaire de FeSO_4 . Bien homogénéiser à l'aide d'un barreau magnétique et d'une plaque agitatrice, jusqu'à dissolution complète des cristaux de FeSO_4 .
- Mélanger les deux solutions dans le sceau de préparation du DMA et bien agiter.
- Vérifier le pH; si le pH est inférieur à 5,5 corriger la valeur avec de solution 1N NaOH.
- Fermer non hermétiquement le réservoir en déposant son couvercle sans appuyer dessus.

- S'il y a de la formation des oxydes/ hydroxydes de fer dans le sceau de préparation, laisser se décanter, pendant au moins 2 heures.
- Par la suite, prélever de la solution surnageant de DMA et rajouter dans les sceaux d'alimentation des colonnes (bien lavés et rincés).

Opération de la colonne

- Au début les colonnes seront saturées avec du milieu Postgate. Une fois les conditions sulfato-réductrices développées, les colonnes seront alimentées avec du DMA. L'alimentation sera réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique qui permet d'opérer à un débit faible et constant. Le DMA synthétique est préparé dans un sceau de 5 L qui sert de réservoir d'alimentation. Un autre sceau de 5 L est placé à la sortie afin de recueillir l'effluent traité par la colonne. Un troisième sceau doit être disponible pour préparer de la nouvelle solution de DMA synthétique.
- Le volume initial de milieu Postgate utilisé pour saturer les colonnes peut être utilisé pour calculer la porosité du mélange de chaque colonne selon la formule suivante:

$$n = V_v/V_t$$

ou V_v - volume des vides

V_t - volume total

Cette porosité sera comparée à celle déterminée pendant le test de perméabilité.

- L'opération des colonnes peuvent être démarrée après 3-4 semaines d'incubation, le temps que les conditions réductrices s'établissent. Elles seront opérées pendant 11 mois.
- Calibrer les pompes péristaltiques avec de l'eau distillée le jour d'avant le montage des colonnes. Le débit devrait être ajusté pour permettre un TRH initial de **2,5 et 5 jours**, c'est-à-dire de **60 et 120 heures**. Estimer le débit à l'aide de la porosité à l'aide de différentes valeurs de porosité obtenues.
- Préparer un volume suffisant de DMA dans le réservoir d'alimentation pour environ une semaine (voir tableau en annexe). Par exemple, si le volume total de la colonne est de 3,5 L et que sa porosité est de 0,30, le volume disponible à travers lequel le

liquide peut circuler est de 1,05 L. Si le TRH est fixé à 60 heures, le débit sera de 0.292 mL/min soit un volume de 420mL pour 24 heures. De manière similaire le volume utilisé pour 24 heures par une colonne à un TRH de 120 heures sera de 210 mL. On peut ainsi calculer le débit d'alimentation de la colonne pour un TRH donné. Le TRH pourra par la suite être ajusté avec le débit de la pompe, selon les performances du bioréacteur.

- La solution de DMA doit être changée à intervalles réguliers, au moins une fois par semaine, afin d'éviter l'oxydation et la précipitation du fer.
- Deux colonnes (une pour chaque TRH) seront instrumentées pour l'évaluation de la porosité et de la perméabilité hydraulique du mélange utilisé durant le fonctionnement. À cet effet, les deux colonnes concernées seront équipées des 2 portes latérales couplées à des burettes, afin de déterminer la perméabilité du mélange à charge constante. Les portes seront également utilisées pour mesurer la conductivité d'un fluide durant un test de traçage afin de déterminer la porosité du mélange.
- Les TRH peuvent être modifiés après un certain temps de fonctionnement, ainsi que la qualité du DMA. Dans le cas de ce projet, les TRH ont été modifiés de 2,5 et 5 jours à 7,3 et 10 jours respectivement, tandis que la concentration du Fe du DMA a été réduite d'environ 1000 mg/L à autour de 500 mg/L après 3-4 mois d'opération des colonnes. La concentration en SO_4^{2-} a été gardée constante par addition de Na_2SO_4 .

Échantillonnage et analyses

Après le mois d'incubation, les paramètres physico-chimiques seront suivis tout au long de l'opération des colonnes, tandis que les décomptes de BSR seront réalisés une fois par mois. La manière dont l'échantillonnage sera réalisé est la suivante :

- Prélever deux échantillons d'environ 30 mL, un dans le réservoir d'alimentation et l'autre dans le réservoir à la sortie de la colonne à l'aide d'une seringue afin d'effectuer l'analyse du pH, du POR, de l'alcalinité, des métaux (Ca, Mg, Na, K, Fe,

Mn, Cd, Ni et Zn) et du sulfate. Sur l'effluent à la sortie une analyse supplémentaire du COT et du COD sera faite.

- Prélever deux autres échantillons d'environ 5 mL juste à l'entrée de la colonne et à la sortie (dans les vials des plastiques de 50 mL), afin de vérifier si les concentrations de fer et de sulfate sont les mêmes que dans les réservoirs d'entrée et de sortie.
- Prélever d'autres échantillons après deux jours d'opération. Si les concentrations à l'entrée et à la sortie de la colonne semblent stables entre les échantillonnages, espacer le délai entre chaque collecte d'échantillon à une semaine. Sinon, continuer l'échantillonnage à chaque 2 jours, jusqu'à ce que les paramètres à la sortie semblent stables. L'échantillonnage du DMA dans le sceau d'alimentation sera réalisé au début à chaque semaine et par la suite, il peut être espacé à chaque mois, si la qualité reste constante.
- Les échantillons pour les analyses physico-chimiques seront prélevés dans des tubes en plastique de 15 mL, non-stériles.
- Pour l'analyse du pH, POR, COT et BSR l'effluent sera utilisé non-filtré. Pour toutes les autres analyses physico-chimiques, il sera filtré à 0,45 µm. Pour l'analyse des métaux, les échantillons d'abord filtrés à 0,45 µm seront ensuite acidifiés avec 1 mL de HCl concentré.
- L'échantillon utilisé pour le dénombrement des BSR sera prélevé dans un tube en plastique de 15 mL, stérile et il sera analysé non-filtré.

Les analyses à effectuer tout au long des essais en colonne sont présentées dans le tableau 2.

Tester la toxicité de l'effluent traité

Essais écotoxicologiques

Des échantillons (un pour chaque colonne) d'effluent traité seront envoyés pour l'évaluation du potentiel écotoxique dans un laboratoire externe. L'échantillonnage sera réalisé après 4-5 mois de fonctionnement des colonnes.

Tableau 2. Paramètres suivis pendant l'opération des colonnes

Paramètre	Volume nécessaire	Conservation	Méthode d'analyse	Fréquence
pH	10 mL	Analyse immédiate	pH-mètre	1/semaine
POR	10 mL	Analyse immédiate	pH-mètre	1/semaine
Alcalinité	3 mL	Analyse immédiate	Titration	1/semaine
Fer ferreux (Fe ²⁺)	100 µL-1 mL	Analyse immédiate	Spectrophotomètre UV-VIS	1/semaine
Sulfures (S ²⁻)	100 µL-1 mL	Analyse immédiate	Spectrophotomètre UV-VIS	1/semaine
Sulfate (SO ₄ ²⁻)	200 µL	28 jours à 4°C	Spectrophotomètre UV-VIS	1/semaine
COT	3 mL	Analyse immédiate ou conserver à 4°C	Analyseur carbone	1/semaine
COD	3 mL	Analyse immédiate ou conserver à 4°C	Analyseur carbone	1/semaine
NH ₄ ⁺ -NH ₃	1 mL	Analyse immédiate	Spectrophotomètre UV-VIS	1/mois
Métaux: Calcium (Ca) Magnesium (Mg) Sodium (Na) Potassium (K) Fer total (Fe) Manganèse (Mn) Cadmium (Cd) Nickel (Ni) Zinc (Zn)	10 mL au total	Acidifier à pH ≤ 2 avec HCl concentré (noter le volume ajouté)	Spectrophotomètre AAS	1/semaine
BSR*	min. 15 mL	Analyse immédiate	Dénombrement NPP	1/mois
Toxicité - algues - invertébrés - plantes - poissons		Analyse immédiate ou conservation à 4°C	Tests standard écotoxicologiques	À voir

Démantèlement

- Deux colonnes pour chaque TRH (pour un total de 4 colonnes) seront démantelées après au moins 11 mois d'opération.
- Une fois le solide récupéré, il sera coupé transversalement en tranches de 10 cm afin d'analyser la microbiologique (les bactéries sulfato-réductrices et les bactéries hétérotrophes totales anaérobies), la minéralogie par MBE (microscope à balayage électronique), et la spéciation des métaux par une extraction séquentielle et une analyse simultanée des métaux dissous et des sulfures volatiles et les BSR dans le mélange réactif.
- Les tranches pour les analyses physico-chimiques et microbiologiques seront gardées à 4°C dans des contenants (ziploc) bien identifiés et scellés. Les tranches pour l'analyse minéralogique seront remaniées et séchées à une température <65°C, afin d'empêcher l'oxydation des carbonates/sulfures. Elles seront ensuite envoyées à UQAT.

Déterminer la spéciation/ le fractionnement des métaux dans les boues à la fin des essais

La stabilité des boues dans le temps et les précautions à prendre pour leur entreposage dépendent de la forme sous laquelle les métaux sont précipités (ex. oxy(hydroxy)des, carbonates, sulfures).

La spéciation/ le fractionnement des métaux dans le solide à la fin des essais sera analysée par deux méthodes soient:

- I. Une procédure d'extraction séquentielle (Zagury et al., 1999) consistant dans la séparation des groupes de composés suivants :
 - Solubles et échangeables
 - Option 1: 1 g solide humide est traité avec 8 mL de $MgCl_2$ (0,5 M, pH=7) en agitant pendant 1 heure à la température de la pièce

- Associés aux carbonates ou spécifiquement adsorbés (phase soluble dans l'acide)
 - Le résidu de l'étape 1 (option 1) est extrait avec 8 mL de NaOAc (1 M, pH 5) en agitant continuellement pendant 5 heures à la température de la pièce
- Associés aux oxydes et aux hydroxydes de Fe et de Mn (phase réductible)
 - Le résidu de l'étape 2 est extrait avec 20 mL d'hydroxylamine hydrochlorure $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ à 0,04 M dans 25% (v/v) d'acide acétique à $96\pm 3^\circ\text{C}$ en agitant occasionnellement pendant 6 heures
- Associés à la matière organique ou aux sulfures (phase oxydable)
 - Le résidu de l'étape 3 est extrait avec 3 mL de HNO_3 et 5 mL de H_2O_2 à 30% ajusté à pH 2 avec HNO_3 . Le mélange est chauffé à $85\pm 2^\circ\text{C}$ pendant 2 heures en agitant occasionnellement. Par la suite, 3 mL de H_2O_2 à 30% ajusté à pH 2 avec HNO_3 est ajouté et le mélange est chauffé à $85\pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 heures en agitant occasionnellement. Après refroidissement, 5 mL de NH_4OAc à 3,2 M dans 20% (v/v) de HNO_3 seront ajoutés, le mélange sera dilué à 20 mL avec de l'eau déionisée et agité continuellement pendant 0,5 heures.
- Présents dans la fraction minérale résiduelle
 - Le résidu de l'étape 4 sera digéré dans HNO_3 , HF et HClO_4 selon les directives de l'APHA (méthodes standard).

L'extraction séquentielle sera réalisée en triplicatas dans des tubes à centrifugeuse de 50 mL en PPCO. Entre chaque extraction, une séparation solide-liquide sera effectuée par centrifugation à 10000 rpm ($12\ 000 \times g$) pendant 30 minutes. Le surnageant sera séparé à l'aide d'une micropipette et pipeté dans un tubes de 50 mL en plastique. Le résidu sera rincé deux fois avec 8 mL d'eau déionisée et centrifugé pendant 30 minutes. Le surnageant obtenu après chaque rinçage sera mélange avec l'extrait obtenu lors de la fraction précédente et analysé au AAS afin de déterminer la teneur en métaux.

II. Une extraction simultanée des sulfures volatiles et des métaux solubles en milieu acide (HCl 6N) (Jong et Parry, 2004) qui comportent les étapes suivantes :

- Peser 2,5 g des boues humides dans une bouteille de réaction de 50 mL. Placer dans la bouteille un petit vial (tube Durhame) dans lequel ajouter 5 mL de solution sélective de captage du sulfure d'hydrogène (tampon antioxydant). Ce tampon contient NaOH 2 M (pour transformer H_2S en S^{2-}), acide ascorbique 0,1 M (pour prévenir l'oxydation du S^{2-}) et EDTA 0,1 M (pour complexer les métaux qui peuvent catalyser l'oxydation du S^{2-}) (Brouwer et Murphy, 1994). Pour la préparation de cette solution, utiliser exclusivement de l'eau déionisée et désaérée.
- Ajouter dans la bouteille de réaction 25 mL HCl 6M à l'aide d'un cylindre gradué et sceller immédiatement
- Placer les récipients sur un agitateur rotatif et agiter pour 1 heure à 150 rpm
- Récupérer d'abord la solution sélective de captage du sulfure d'hydrogène qui se trouve dans le vial et faire analyser les sulfures selon la méthode standard (méthylène bleu)
- Récupérer ensuite le lixiviat acide, filtrer à 0,45 μm et analyser les métaux dissous par spectrophotométrie d'absorption atomique (AAS).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Beaulieu, S., & Zagury, G.J. (1999). Bioaugmentation d'un biofiltre sulfato-réducteur à l'aide d'une tourbe granulaire bioactivée en bactéries sulfato-réductrices. (Protocole #: PE28-D, version: 3).
2. Brouwer, H., & Murphy, T.P. (1994). Diffusion method for the determination of acid-volatile sulfides (AVS) in sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, 1273-1275.
3. Dudal, Y., & Dêschènes, L. (2000). Évaluation de la toxicité d'échantillons provenant d'élutions de PCP à l'aide de la méthode Microtox. (Protocole #: 7E, version: 1).
4. Jong, T., & Parry, D.L. (2004). Heavy metal speciation in solid-phase materials from a bacterial sulfate reducing bioreactor using sequential extraction procedure combined with acid volatile sulfide analysis. *Journal of Environmental Monitoring*, 6, 278-285.
5. Kulnieks, V., & Zagury, G.J. (2004). Analyse des sources de carbone qui seront utilisées pour le traitement du drainage minier acide au moyen d'un mur réactif sulfato-réducteur. (Protocole #: P62-B, version: 9)
6. URS (United Registrar of Systems) Report. (2003). Passive and semi-active treatment of acid rock drainage from metal mines-state of the practice. Final Draft. Prepared for U.S. Army Corps of Engineers, Concord, Massachusetts, by URS Corporation, Portland, ME.
7. Zagury, Gérald J. (1997). Étude d'un traitement par biolixiviation au moyen de la microflore indigène ferroxidante des sols contaminés aux métaux lourds (Zn, Cu, Mn). Thèse Ph.D., Département de génie civil, Faculté des sciences appliquées, Université de Sherbrooke, Québec, Canada. 176p.
8. Zaluski, M.H., Trudnowski, J.M., Harrington-Baker, M.A., & Bless, D.R. (2003). Post-mortem findings on the performance of engineered SRB field-bioreactors for acid mine drainage control. p. 845-853. *In Proceedings of the 6th International Conference on Acid Rock Drainage*, Cairns, QLD. 12-18 July, 2003.