



BIOREMEDIATION DES EAUX ET DES SOLS POLLUES PAR LE CYANURE : SITE DE ZOUNAZAGMILINE

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU
MASTER D'INGENIERIE DE L'EAU ET DE L'ENVIRONNEMENT
OPTION : **Eau et Assainissement**

Présenté et soutenu publiquement le ...juillet 2015 par

Nafissatou SAWADOGO

Travaux dirigés par :

Dr. Hela KAROUI

Enseignant chercheur

Dr. Anderson ANDRIANISA

Enseignant chercheur

Ing. Marcelin KOUAKOU

Chargé des projets

PhD. Christine RAZANAMAHANDRY

Jury d'évaluation du stage :

Président : Prénom NOM

Membres et correcteurs : Prénom NOM

Prénom NOM

Prénom NOM

Promotion [2014/2015]

Citation

« Celui qui aime la correction aime la science ; celui qui hait la réprimande est stupide »

Proverbes 12 :1

Dédicaces

Au Seigneur tout puissant pour son amour inconditionnel tout au long de ma vie.

A mon père SAWADOGO Albert et à ma mère SAWADOGO Mariam qui m'ont toujours épaulé et accordé leur confiance absolue pendant ces années de dur labeur,

A mes sœurs qui n'ont cessé de m'encourager et me témoigner leur amour,

A SAWADOGO Abdoul Salam qui a toujours été là pour moi.

Remerciements

Ce travail a été possible grâce au soutien de plusieurs acteurs.

Nous voudrions tout d'abord adresser mes sincères remerciements à:

Prof Hamma YACOUBA, Directeur de Recherche et Dr Yacouba KONATE Directeur du Laboratoire eau, dépollution, écosystème et santé(LEDES) de m'avoir permis d'intégrer l'équipe de recherche.

Dr. Hela KAROUI, Enseignant-chercheur pour sa disponibilité, ses conseils, son implication et son dévouement à la réussite de cette étude.

Dr. Anderson ANDRIANISA, Enseignant-chercheur qui n'a ménagé aucun effort pour nous appuyer à tous les niveaux pendant ma période de stage.

Ing. Marcelin KOUAKOU, Chargé des projets pour ses remarques constructives et ses encouragements.

Christine RAZANAMAHANDRY, doctorante, qui a eu confiance en nous incluant dans ses travaux de thèse.

Seyram SOSSOU et Boukary SAWADOGO pour le suivi et les conseils.

Messieurs Noel TINDOURE, Bernard ZONGO et Hema SOUHAMAI, personnel du laboratoire LEDES, pour leur appui technique au laboratoire.

A OUEDRAOGO Pascaline pour les conseils reçus lors de la rédaction.

Monsieur Adama SAWADOGO, mon co-stagiaire qui m'a toujours soutenu et épaulé quand il le fallait.

Marius KOLIA pour m'avoir accordé son aide.

Enfin Merci à tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin dont les noms ne figurent pas sur cette liste.

Résumé

La biorémediation des eaux et des sols pollués par le cyanure est une solution qui pourrait pallier aux problèmes de la détérioration des ressources en eaux et des terres cultivables au Burkina Faso. Un choix de cette solution serait important pour les pays sahéliens à forte activité d'orpaillage comme le nôtre. L'objectif général était de contribuer à la restauration des zones polluées par le cyanure en appliquant la biorémediation. Notre étude a donc consisté à rechercher des bactéries sur le site de Zougnazagmiline capables de dégrader le cyanure in situ et à estimer leur capacité à le faire. Nous avons procédé à un échantillonnage des eaux et des sols. Des ensemencements dans un milieu sélectif ont été effectués avec les échantillons afin de prouver leur présence in situ. Ensuite, des tests de biodégradation ont été menés avec ces bactéries pour connaître leur rendement de biodégradation et leur résistance au cyanure. C'est ainsi que 2 milieux, l'un contenant des nutriments tels le glucose en plus du cyanure et l'autre ne contenant que du cyanure ont été préparés à des concentrations de 40, 60 et 80 mg/L de cyanure. Grâce à l'ensemencement, la présence de ces microorganismes a été prouvée sur tous les points de prélèvement. Leur rendement de dégradation du cyanure a été estimé de l'ordre de 95 à 99%. La concentration létale pour ces bactéries était à partir de 100 mg/L.

Mots Clés :

Biorémediation / Cyanure /Pollution environnementale / Orpaillage/ Zougnazagmiline

Abstract

Bioremediation of water and the soil polluted by cyanide is a solution which could mitigate the problem of a decrease in the water resources and cultivable lands in Burkina Faso. Developing bioremediation is important for tropical countries where there is a high level of panning for gold, such as Burkina Faso. General objective is to contribute at the bioremediation of water and soil containing cyanide. This study consisted in looking for bacteria at Zougnazagmiline site which are able to degrade cyanide in situ and estimate their power of decomposition of cyanide. Samples of water and soil were collected from the site and were analyzed to show whether or not the microorganisms were present. Sowing of soil and water in a selective medium was done. Then, tests of biological breakdown were carried out for these bacteria to know their output of biological breakdown and their resistance to cyanide. Thus 2 mediums, one containing nutrients, such as glucose in addition to cyanide and the other containing only cyanide were prepared with cyanide concentrations of 40, 60 and 80 mg/L. The culture revealed that bacteria which could decompose cyanide existed in situ. We showed that these microorganisms prefer cyanide to nutrients. Moreover, their output of decomposition of cyanide was about 95 to 98%. Bacteria did not support cyanide concentrations higher than 100 mg/L. Bioremediation of water and soil is an economic and ecological alternative to safeguard and preserve the water resources and the land of the country.

Key words:

Biorémediation/Cyanide/environmental Pollution/Gold panning/Zougnazagmiline

Liste des abréviations

°C : degré Celsius

µg : microgramme

µL : microlitre

AFSSPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, 2010

DFNREAS : décret portant fixation des normes de rejets dans l'eau, l'air et le sol

h : heure

INERIS : Institut national de l'environnement industriel et des risques

Kg : kilogrammes

MECV : ministère de l'environnement et du cadre de vie

mg/L : milligrammes par litre

MMCE : Ministère des Mines, des Carrières et de l'Energie

nm : nanomètre

pH : potentiel hydrogène

PVD : pays en voie de développement

RE : rendement

rpm : tour par minute

Sp : espèce

ufc : unité formant colonies

WAD : WeakAcid Dissociable Cyanide

***Biorémediation du cyanure sur les sites d'orpaillages au Burkina Faso : Cas du site de
Zougnazagmiline***

Table des matières

Citation	i
Dédicaces	iii
Remerciements	iv
Résumé	v
Abstract	vi
Liste des abréviations	vii
Table des matières	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Introduction	1
Chapitre I : Revue bibliographique	3
I.1- Rôle du cyanure dans l'orpaillage.....	3
I.2- Différentes formes de cyanure	4
I.3- Impact de la pollution au cyanure	4
I.3.1- Sur la santé	4
I.3.2- Sur l'environnement.....	5
I.4- Différentes méthodes de traitements physico-chimiques du cyanure.....	5
I.4.1- Destruction par chloration	5
I.4.2- Destruction par le peroxyde d'hydrogène	6
I.4.3- Destruction par le sulfure d'oxygène	7
I.5- Différentes méthodes de traitements biologiques du cyanure	7
I.5.1- Traitement biologique du cyanure par les algues: cas du Scenedesmus obliquus ...	7
I.5.2- Traitement biologique du cyanure par les bactéries : cas de l'Agrobactérium tumeficiens SUTS 1	8
I.5.3- Traitement biologique du cyanure par les champignons : cas de Trametes Versicolor.....	9
I.6- Mise en place des traitements biologiques : la biorémediation	9
I.6.1- Biorémediation du sol	10
I.6.2- Biorémediation des pollutions profondes : sous-sol et eaux de nappe.....	11
I.7- Conditions de choix d'un procédé de biorémediation.....	12
I.8- Facteurs influençant la biorémediation	13
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	14
II.1- Choix du site.....	14

**Biorémediation du cyanure sur les sites d'orpaillages au Burkina Faso : Cas du site de
Zougnazagmiline**

II.2- Présentation de la zone d'étude	14
II.3- Travail de terrain	15
II.3.1- Détermination des points de prélèvement.....	15
II.4- Prélèvement des échantillons d'eau.....	16
II.5- Prélèvement des échantillons de sol	17
II.6- Isolation des familles de bactéries dégradeurs de cyanure	17
II.6.1- Dans l'eau	18
II.6.1- Dans le sol.....	18
II.7- Dosage du cyanure libre	23
II.8- Courbe d'étalonnage du cyanure libre.....	23
II.9- Test de biodégradation du cyanure libre par les bactéries dégradeurs	20
II.10- Expérience abiotique	23
Chapitre III : Résultats et discussions	25
III.1- Concentration de cyanure libre sur le site	25
III.2- Isolation des familles de bactéries dégradeurs de cyanure.....	26
III.2- Expérience abiotique	28
III.3- Test de biodégradation du cyanure libre par les bactéries	29
III.3.1- Dégradation du cyanure libre et croissance bactérienne.....	29
III.3.2- Concentration en ammonium.....	32
Conclusion.....	35
Recommandations	36
Références bibliographiques	37
Annexes	I

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des milieux préparés	21
Tableau 2 : Caractéristiques physiques des familles de bactéries	26
Tableau 3 : Rendements de volatilisation du cyanure	28
Tableau 4 : Vitesse de biodégradation du cyanure libre.....	29
Tableau 5 : Comparaison des croissances bactériennes des milieux au bout du même temps	32

Liste des figures

Figure 1 : Bassin de cyanuration	3
Figure 2 : Représentation schématique de la combinaison du compostage et de l'extraction aqueuse pour la décontamination du sol.	11
Figure 3 Représentation schématique d'un réacteur à boue pour la décontamination du sol.	11
Figure 4: Représentation schématique de la biorémediation du sous-sol et de la nappe par stimulation de la population microbienne autochtone.	12
Figure 5 : Carte de localisation de Zougnazagmiline	14
Figure 6: Carte des points de prélèvement d'eau et de sol	16
Figure 7: flacons en verre borosilicatés	Erreur ! Signet non défini.
Figure 8 : La tarière et tous ces équipements	17
Figure 9 : Méthode de carottage	17
Figure 10: Récapitulatif de la méthode de recherche des bactéries dégradeurs de cyanure dans les eaux de forage	18
Figure 11: Récapitulatif de la méthode de recherche des bactéries dégradeurs de cyanure dans le sol.	19
Figure 12: Récapitulatif de la méthode d'isolation des bactéries dégradeurs des eaux et des sols.	19
Figure 13: Courbe d'étalonnage du cyanure libre	24
Figure 14 : Récapitulatif du processus	23
Figure 15 : Concentration du cyanure dans les forages (F), puits (P) et trou d'or (T).	25
Figure 16 : Concentration du cyanure libre dans le sol	25
Figure 17: Vu au microscope des bactéries dégradeurs dans le sol.....	27
Figure 18: Vu au microscope des bactéries dégradeurs dans l'eau	27
Figure 19 : test de biodégradation et croissance bactérienne pour les milieux sans nutriments.....	30
Figure 20 : test de biodégradation et croissance bactérienne pour les milieux avec nutriments.	30
Figure 21 : Concentration en ammonium pour le milieu avec nutriments	33
Figure 22 : concentration en ammonium pour les milieux sans nutriments.	33

Introduction

Le secteur minier a connu un fort taux de développement au Burkina Faso cette dernière décennie. La production aurifère du Burkina est passée de 12,2 tonnes en 2009 à 25,2 tonnes en 2011 soit une hausse de plus de 100% (rapport public du CES). 10% de cette production provient de l'orpaillage. En effet l'orpaillage est très développé dans le pays puisqu'on recense environ 800 sites d'orpaillage dont 200 sites légaux (MMCE, 2011). Dans l'orpaillage 90% des produits utilisés pour le traitement des minerais sont le cyanure et le mercure. Ce qui a causé la pollution au cyanure de 6,34% des superficies cultivables du pays (MECV, 2011) suite au déversement de celui-ci dans l'environnement. Le cyanure et le mercure sont des poisons mortels pour les êtres vivants et des polluants néfastes pour l'environnement (Botz et al, 2005). Cependant la pollution par le cyanure est plus observée sur la majorité de ces sites car il contamine toutes les ressources en eaux et les sols des bassins versants des sites d'orpaillage (rapport public du CES). Pourtant au Burkina Faso, les études pour dépolluer les sols et les eaux cyanurés sont encore inexistantes (MMCE, 2011). Des techniques de traitements chimiques existent mais elles sont très onéreuses et ne sont pas à portée de main des pays en voie de développement car elles sont très onéreuses (Botz et al, 2005). Plusieurs microorganismes ont été étudiés ces dernières années et ont été classés comme bactéries capables de dégrader le cyanure (Akcil et Mudder, 2003). Parmi ces microorganismes on peut citer les algues, les champignons et les bactéries (Dash et al, 2008). Tous ces microorganismes vivent dans les eaux usées de toutes sortes, dans les eaux de surfaces et dans les boues et leur utilisation pour la dépollution des zones serait bénéfique pour les pays comme le Burkina Faso. Ainsi cette étude apporterait une solution au problème causé par le cyanure qui est la pollution des eaux et des sols les rendant inutilisables selon les normes de l'OMS qui fixe la concentration de cyanure dans l'eau à 0,07 mg/L et le sol à 0,5 mg/Kg de sol. Peu d'études ont été menées sur les bactéries présentes in situ capables de dégrader le cyanure. D'où la spécificité et l'importance de cette étude. Cette étude permettrait donc de poser les bases pour la biorémediation des eaux et des sols pollués par le cyanure au Burkina Faso et servirait aux pays en voies de développement. En outre, cette recherche est motivée par les arguments suivants :

- La décontamination des sols et des eaux pollués par le cyanure.
- L'assainissement des contaminants in situ.
- Le minimum de production des déchets après le traitement.

- L'élimination de la contamination des denrées alimentaires.
- La diminution du taux de maladies lié au cyanure.
- La dépollution sans aucun produit résiduel chimique.

La biorémediation est utilisée dans plusieurs secteurs en Amérique du Nord et s'avère efficace (Mudder et Akcil, 2003). Par ailleurs, la biorémediation présente des inconvénients majeurs : les installations sont assez lourdes, le processus de dégradation est très lent (peu prendre des décennies), souvent trop lent pour être acceptable par l'administration. L'objectif principal de notre étude est de contribuer à la biorémediation des sites d'orpaillage pollués par le cyanure. Pour atteindre cet objectif, nous avons recherché les bactéries capables de dégrader le cyanure, trouvé les concentrations de cyanure supportables par ces bactéries et enfin évalué leur rendement de dégradation.

Chapitre I : Revue bibliographique

La pollution par le cyanure est considérée comme un problème majeur au Burkina Faso du fait de sa toxicité pour l'environnement et la santé. Dans le secteur de l'orpaillage, cette substance est utilisée de façon illégale et clandestinement. En effet, le code minier du Burkina Faso interdit l'importation de toute forme de cyanure sur le territoire excepté les industries minières. Ainsi, sur les sites d'orpaillage, cette substance est utilisée anarchiquement et la qualité du cyanure utilisée ne respecte pas les normes (Romba, 2014).

I.1- Rôle du cyanure dans l'orpaillage

Le cyanure est utilisé dans l'orpaillage pour séparer l'or des autres minerais qui ne peuvent être séparés par de simples procédés physiques tels que le lavage (Romba, 2014). C'est la dernière étape de récupération de l'or sur le site et l'activité la plus dangereuse de l'orpaillage. C'est un processus qui consiste à extraire l'or des minerais dans un bassin à l'aide d'une solution cyanurée. Les produits utilisés sont le cyanure, l'acide sulfurique, l'acide nitrique et les copeaux de zinc. Les boues issues du lavage sont vendues aux orpailleurs pratiquant cette opération. Dans la commune de Bouroum, la cyanuration se fait sur plusieurs sites et la majorité des sites se trouvent en brousse loin des habitations (Romba, 2014). Seulement cinq (05) sites sont situés à quelques centaines de mètres du site Zougnazagmline (Romba, 2014). La solution après extraction de l'or des minerais est stockée dans des trous à cyanure et exposée à l'air libre et aux conditions naturelles pouvant causer des pollutions à tous les niveaux. La figure 1 montre un bassin de cyanuration en activité et l'insuffisance de mesures prises pour empêcher sa propagation.



Figure 1 : Bassin de cyanuration

I.2- Différentes formes de cyanure

Le cyanure peut être libéré dans l'environnement par des composés organiques et inorganiques (Santé Canada, 1979). Il existe trois formes de cyanure : le cyanure libre, les acides cyanuriques dissociables et les cyanures totaux. Le cyanure libre est l'ensemble comprenant la molécule de HCN incluant le cyanure d'hydrogène, l'acide cyanhydrique et l'acide prussique. Le cyanure d'hydrogène est un liquide ou un gaz incolore, inflammable et plus léger que l'air. Dans des solutions à pH supérieure à 9,2 il se dissocie en H^+ et CN^- et est complètement miscible avec l'eau (Towill et al, 1978 ; Eisler 1991). Les acides cyanuriques dissociables libèrent du HCN à pH avoisinant 4,5. Ce groupe est représenté par l'ion CN^- formant des molécules avec les ions de cuivre (Cu), le cadmium (Cd), le nickel (Ni), le zinc (Zn) et l'argent (Ag). Les cyanures totaux regroupent les cyanures libres, Les acides cyanuriques dissociables et les cyanures associés aux métaux tels que le cyanure de ferreux, le cyanure ferrique et bien d'autres.

I.3- Impact de la pollution au cyanure

I.3.1- Sur la santé

L'ion cyanure est un poison cellulaire toxique qui inhibe au moins 40 enzymes différents (Charlier et al, 2000). La forme la plus toxique du cyanure est le HCN. L'ion cyanure bloque la chaîne respiratoire mitochondriale (Charlier et al, 2000). Le cyanure a le même effet qu'une absence totale d'oxygène. Une personne intoxiquée à l'acide cyanhydrique meurt de son incapacité à utiliser l'oxygène. La dose létale par inhalation est de 100 ppm. Par ingestion, dès 0,65 mg/L de cyanures, l'intoxication est sévère et à partir de 2,5 mg/L elle entraîne la mort. L'intoxication au cyanure peut être classée en deux catégories : la forme aiguë et la forme foudroyante (AFSSPS, 2010). La forme foudroyante entraîne la mort en dix minutes avec un coma souvent convulsif avec apnée initiale, collapsus cardiovasculaire avec bradycardie puis arrêt cardiaque. Dans la forme aiguë, peuvent apparaître une perte de connaissance brutale, parfois précédée de céphalées, vertiges, ébriété, oppression thoracique, angoisse intense et troubles digestifs. Les troubles de conscience quasi constants sont accompagnés d'une respiration anormale qui peut être rapide puis se ralentir et s'arrêter. Des convulsions sont rapportées dans un tiers des cas. L'évolution se fait rapidement vers un coma profond précédant l'arrêt cardiaque. Le cyanure peut induire une modification de la coloration de la peau avec soit une coloration rose, soit une pâleur.

I.3.2- Sur l'environnement

La pollution de l'eau demeure sans équivoque la plus grande menace liée à l'exploitation des mines d'or. Le déversement du cyanure dans la nature entraîne la mort et l'intoxication d'une grande partie de la vie aquatique des rivières ainsi que des prédateurs qui en dépendent et rend l'eau impropre à la consommation. La concentration limite de cyanure dans l'environnement aquatique est d'environ 5 µg/L (Logsdon et al, 1999). A cette concentration, les espèces vivantes dans l'eau voient leur métabolisme inhibé.

Les sols sont aussi pollués par le cyanure car il réussit à traverser les bâches posées par les orpailleurs. Elles sont posées sans aucune sécurité et retirée avant l'évaporation des déchets liquides contenant le cyanure. Cette infiltration contribue à la pollution des nappes souterraines, des eaux de surfaces, à la destruction des terres et des plantes car les quantités libérées régulièrement sont élevées pour permettre une dégradation naturelle de la substance (Mekuto et al.2013). La concentration maximale de cyanure dans le milieu naturel doit être de 0,07 mg/L dans l'eau et de 0,5 mg/Kg de sol au Burkina Faso (DFNREAS, 2001).

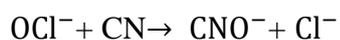
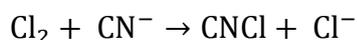
I.4- Différentes méthodes de traitements physico-chimiques du cyanure

Les traitements chimiques du cyanure visent à diminuer la toxicité de l'effluent cyanuré en la transformant à un autre composé plus stable (Meech, 1986). Plusieurs méthodes physiques et chimiques existent, cependant la méthode la plus utilisée est l'oxydation qui regroupe des techniques telles que la destruction par chloration, le peroxyde d'hydrogène, le sulfure d'oxygène, l'oxydation par l'ozone, la catalyse par le peroxyde d'hydrogène.

I.4.1- Destruction par chloration

La destruction par chloration est la méthode la moins coûteuse et la plus pratique. Elle oxyde le cyanure en cyanate, en dioxyde de carbone et en azote. Lors de la chloration plusieurs réactions se produisent pour la transformation du cyanure en ces différents composés. (Botz et al, 2005).

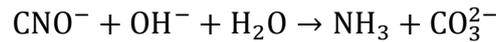
Plusieurs réactions se produisent lors du processus. Premièrement, le cyanure libre et les acides cyanurés dissociables sont transformés en chlorure de cyanure ou en hypochlorite. Ces réactions se déroulent très rapidement après contact de l'effluent cyanuré avec le chlore et s'effectue à un pH compris entre 10,5 et 11,5.



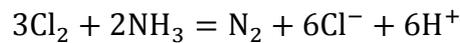
Ensuite, le cyanure de chlore est convertit en cyanate. Cette réaction se produit au bout de 15 minutes.



La réaction suivante se caractérise par l'hydrolyse du cyanate. Elle a une durée de 1 heure à 1,5 heure.



Lorsque le chlore est présent en excès, la formation de l'azote se produit.

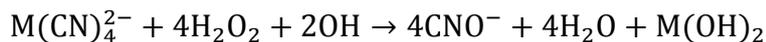
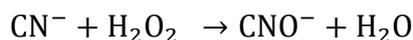


Cette méthode ne permet que le traitement du cyanure libre et des WeakAcidDissociable cyanide. Son efficacité est estimée à 83% d'élimination du cyanure libre et 99,9% pour les WAD. Cependant l'inconvénient majeur est que le traitement n'élimine que 40% du cyanate (CNO-) qui est un composé plus toxique que le cyanure pour la santé et l'environnement (Devuyst et al, 1991).

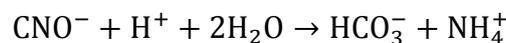
I.4.2- Destruction par le peroxyde d'hydrogène

Cette méthode est utilisée pour traiter les effluents pollués aux cyanures plutôt que des boues. Elle a connu une grande expansion ces dernières années et est surtout utilisée dans les usines. Cette méthode consomme beaucoup de molécules H_2O_2 et permet l'oxydation des acides cyanurés dissociables et du cyanure libre. Les réactions chimiques durant la phase de destruction sont complexes. (Botz et al, 2005)

Durant cette réaction, le cyanure est transformé en cyanate et de l'eau pour le cyanure libre. Pour les WAD, la conversion donne du cyanate, de l'eau et un composé hydroxyle associé au cadmium, zinc, nickel,...



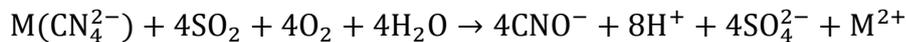
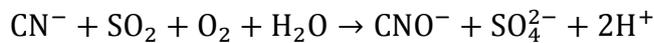
M représente la molécule de nickel, zinc,...



La destruction par le peroxyde d'hydrogène a une efficacité de traitement de 99.9% pour le cyanure total et libre et 99,1% pour le cyanure de cuivre et de fer. Cependant, les coûts des réactifs sont très élevés. Cette méthode produit des concentrations élevées de cyanate qui a un taux d'élimination de 10% lors du processus (Meech, 1986). Elle exige donc un autre système de traitement pour le cyanate vu la toxicité de ce composé.

I.4.3- Destruction par le sulfure d'oxygène

Le cyanure libre et les WAD sont oxydés en cyanate en présence du sulfure et d'oxygène. La réaction se produit à un pH d'environ 8 et 9 et une température autour de 5 à 60°C et nécessite donc un contrôle régulier de ce dernier (Botz et al, 2005). Le cyanure est détruit par les réactions suivantes :



A la fin de la réaction, l'élimination du cyanure libre et total est 99,7% (Devuyt et al, 1991). L'inconvénient pour cette méthode est la même que précédemment qui est la non élimination de la majeure partie du cyanate qui reste de 5 à 10% sans oublier le fait que le cyanure de complexes métalliques ne sont pas éliminés par cette méthode.

I.5- Différentes méthodes de traitements biologiques du cyanure

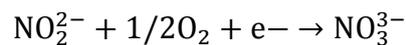
Les méthodes de traitement biologique du cyanure ont vu le jour du fait que les traitements chimiques sont coûteux et produisent des composés néfastes pour l'environnement. D'où le besoin de trouver des moyens de traitements écologiques s'est fait ressentir. Plusieurs méthodes de traitement biologique du cyanure ont été expérimentées en vue d'éliminer la pollution avec un rendement élevé sans affecter l'écosystème existant. Les traitements biologiques peuvent fournir une alternative rentable et simple au problème des eaux et des sols pollués par le cyanure (Mudder, 1987). Plusieurs études menées dans des laboratoires ont donné de bons résultats sur la dégradation du cyanure par les microorganismes.

I.5.1- Traitement biologique du cyanure par les algues: cas du Scenedesmus obliquus

L'étude faite par Gurbuz et al (2009) a montré que certaines algues comme le Scenedesmus obliquus peuvent dégrader le cyanure libre et dissociable issu des industries minières en l'utilisant comme source de carbone ou d'azote pour leur métabolisme. Ces algues sont

capables de dégrader le cyanure libre et les acides cyanuriques dissociables une fois inoculée dans un milieu liquide les contenant. La dégradation était optimum lorsque le pH tournait autour de 10,3. Ces algues ont été isolées en utilisant le milieu de culture Agar noble simple enrichi en KNO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeCl et incubée dans une solution de concentration en cyanure de 72 mg/L à la température ambiante et dans des conditions aérobies. La croissance algale et la dégradation du cyanure sont mesurées parallèlement par spectrophotométrie. La chlorophylle a été utilisée pour observer la croissance bactérienne et une courbe d'étalonnage a été conçue pour déterminer la variation de la concentration du cyanure.

Le traitement biologique du cyanure par *S. obliquus* aboutit à la formation d'ammonium, qui en présence de nitrobacter se transforme en nitrate puis nitrite enfin en azote par les équations suivante (Gurbuz et al, 2009) :



Cette étude a montré que le *S. Obliquus* dégrade 91% du cyanure en 77 heures. La croissance algale est observée 48 heures après le début de l'expérience. Cependant la présence des métaux tels que le zinc et le fer II à un certain taux dans l'effluent réduit le pouvoir de dégradation du *S. Obliquus* en l'inhibant. La dégradation du cyanure par les algues est économique et plus pratique car elle nécessite du matériel bon marché (Gurbuz et al, 2009).

I.5.2- Traitement biologique du cyanure par les bactéries : cas de l'Agrobactérium tumeficiens SUTS 1

Le *A. tumeficiens SUTS 1* est une bactérie qui a été isolée de la station de traitement des eaux usées et caractérisée par Potivichayanon et Kitleartpornpaioat (2010) afin de tester sa capacité à dégrader le cyanure et son rendement de dégradation. Elles ont été isolées dans le milieu agar noble enrichi avec du NaHPO_4 , Na_2SO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et du CaCl_2 . Le pH du milieu a été maintenu à 7,2 avec un dispositif de captage du HCN. Les concentrations en cyanure étaient de 25, 50 et 150 mg/L. Une quantité connue de microorganismes a été incubé pendant 7 jours à la température de 30°C. Les paramètres qui étaient suivis tout au long de l'expérience étaient la concentration en cyanure, l'ammonium, le nitrate, le nitrite, le pH et la croissance bactérienne. La croissance bactérienne a augmenté de $4,7 \cdot 10^8$ ufc/mL dans les 4 jours qui ont suivi l'incubation dans tous les milieux cyanurés. A 25

et 50 mg/L de cyanure, le taux de dégradation était de 87,5%. A 150 mg/L, le taux de dégradation a augmenté en atteignant 97,90%. Au fur et à mesure que la concentration en cyanure diminuait, la croissance bactérienne augmentait. La concentration en ammonium, en nitrate et le pH augmentaient lorsque la concentration en cyanure diminuait. Par contre aucune concentration en nitrate n'a été détectée tout au long de l'expérience. Potivichayanon et Kitleartpornpaioat ont montré que l'*Agrobacterium tumefaciens SUTS 1* dégradait non seulement le cyanure libre et total, mais l'utilisaient comme source de carbone. Elles dégradent le cyanure en ammonium puis lorsqu'on ajoute des nitrobacters, ces derniers transforment l'ammonium en nitrate. Cependant, d'autres espèces utilisent le cyanure à la fois comme source de carbone et d'azote (Mekuto et al, 2013). Après consommation du carbone de la molécule de cyanure, ces bactéries commencent à consommer l'azote libéré comme source de nutriments.

I.5.3- Traitement biologique du cyanure par les champignons : cas de *Trametes Versicolor*

De nombreux champignons tels que *Trametes versicolor ATCC 200801*, *Phanerochaetechrysosporium ME 496* et *Pleurotussajor-caju* ont été étudiés et consignés capables de dégrader le cyanure. Après isolement du champignon, Ahmet et al (2006) ont procédé à la recherche des conditions optimales de cultures. Suite aux différents tests, ces champignons ont été placés dans des milieux cyanurés à concentrations comprises entre 25 et 400 mg/L. La plus efficiente et la plus résistante de ces champignons est le *T.versicolor*, qui a pu dégrader 100% du cyanure d'une solution à 130 mg/L en 42 heures à 30°C et à pH 10,5. Padmaja et Balagopal (1985) ont montré que le *Rhizopusoryzae* dégradait la même concentration de cyanure en 120 heures à 28°C. Ceci était dû au fait que le *Rhizopus* avait un plus fort pouvoir d'oxydation. Raybuck (1992) et Ebbs (2004) ont démontrés que la dégradation du cyanure par le *T.versicolor* entraîne la formation de l'acide formique, de l'ammonium. Cette dégradation par ce champignon est une réaction d'oxydation du fait de la production finale de l'ammonium et du CO₂ par consommation d'oxygène.

I.6- Mise en place des traitements biologiques : la biorémediation

La biorémediation est un ensemble de techniques mettant en œuvre des procédés de biodépollution, utilisables pour réduire la toxicité, la mobilité ou le volume d'un contaminant dans les sols, le sous-sol, les eaux et les effluents gazeux. La biorémediation peut être in situ ou ex situ (Roger et Jack, 2000).

Pour une biorémediation in situ, on distingue deux techniques qui sont l'approche écologique microbienne et le traitement microbien (Roger et Jack, 2000). Pour l'approche écologique microbienne, il faut adapter les caractéristiques physiques et chimiques du site pour optimiser l'activité microbienne dépolluante après que la présence de ces derniers ait été prouvée. Pour le traitement microbien, soit la population microbienne capable de dégrader le cyanure doit être augmentée sur le site une fois que leur présence a été prouvée ou il faut déverser des microorganismes externes au site qui vont assurer la dégradation sur le site pollué.

I.6.1- Biorémediation du sol

La biorémediation des sols se fait rarement sur place. Le sol pollué est souvent excavé et traité puis remis en place (Baker et Herson, 1994).

I.6.1.1- Traitement par épandage

C'est une technique beaucoup utilisée pour traiter les sols pollués par les déchets pétroliers. Elle utilise l'activité dépolluante de la flore microbienne. L'ensemble des sols contaminés et les nutriments sont épandus à la surface du sol et sont brassés à intervalles réguliers par des moyens mécaniques pour créer des conditions d'aérobiose. C'est une technique efficace et moins chère, mais lente. Lorsqu'elle est utilisée sans précaution particulière, elle présente des effets néfastes tels que l'accumulation des polluants dans la zone traitée, en cas de non clôture du dispositif les zones voisines sont contaminées par le ruissellement des eaux ayant traversées la masse en traitement.

I.6.1.2- Compostage

Cette technique utilise les microorganismes aérobies et thermophiles utilisés pour dégrader les déchets végétaux. Elle peut être aussi appliquée au sol. Le sol excavé est disposé sur un film imperméable et traversé de drains pour permettre une ventilation de la masse (Hardman, 1993). Les nutriments favorables au développement des microorganismes sont apportés par des asperseurs sous forme de solution. Le liquide percolant à travers le tas de sol est évacué dans sa partie inférieure par un drain. Le sol à traité peut être enrichi en nutriments pour optimiser l'activité microbienne. Le dispositif peut être recouvert d'un toit pour limiter les infiltrations des eaux de pluies. Elle s'applique surtout aux sols contaminés par les produits protecteurs de bois, des carburants, des produits chimiques issus des explosifs (figure2).

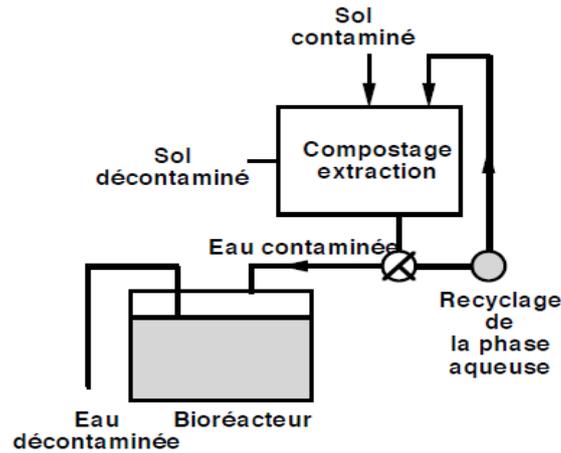


Figure 2 : Représentation schématique de la combinaison du compostage et de l'extraction aqueuse pour la décontamination du sol (Hardman, 1993).

I.6.13- Réacteurs à boues

Pour cette technique, le sol excavé est mélangé à un liquide pour avoir un liquide, homogène et enrichi en nutriments. Le mélange est aéré et le polluant est dégradé dans ce mélange ou est transféré à la phase liquide que l'on traite aussi après séparation. Le sol décontaminé est extrait ensuite (figure3).

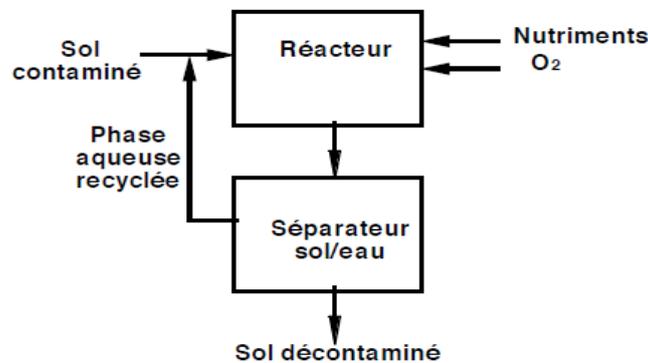


Figure 3 : Représentation schématique d'un réacteur à boue pour la décontamination du sol (Morgan et Watkinson, 1989).

I.6.2- Biorémediation des pollutions profondes : sous-sol et eaux de nappe

I.6.2.1- Percolation et traitement in situ

L'avantage de cette technique est qu'elle permet de traiter un grand volume de sol à un coût peu onéreux lié à l'excavation. Elle présente un double avantage celle de traiter les nappes d'eau et le matériau profond. Le principe est d'apporter au niveau de la zone contaminée les

éléments nutritifs et l'oxygène nécessaire à la stimulation à la croissance des bactéries (figure4).

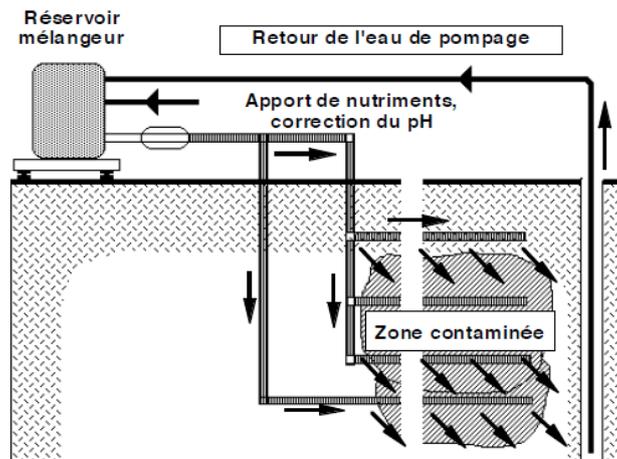


Figure 4: Représentation schématique de la biorémediation du sous-sol et de la nappe par stimulation de la population microbienne autochtone (Baker et Herson, 1994).

I.7- Conditions de choix d'un procédé de biorémediation

Plusieurs critères permettent de juger de la possibilité de réaliser ou non un procédé de biorémediation tels que le choix de la population bactérienne, son efficacité in situ ou ex situ, le choix du procédé et sa rentabilité. Il est aussi plus facile d'éliminer un polluant à un endroit précis que s'il est dispersé sur l'ensemble d'une zone donnée ; d'éliminer un seul polluant à la fois. L'estimation de la réalisation d'un procédé passe par 4 étapes qui sont la recherche des microorganismes performants, des tests de laboratoire pour définir les conditions optimales de la dégradation, le dispositif approprié, le contrôle de l'efficacité du procédé et le coût (Roger et Jaqc,2000).

Pour la recherche des microorganismes performants, il faut s'assurer qu'ils sont adaptés à la composition du sol ou du substrat. Il faut isoler les souches de microorganismes qui ne sont pas disponibles sur le site à dépolluer.

La détermination des conditions optimales de la dégradation et du dispositif doivent permettre de déterminer les valeurs des paramètres favorables et défavorables à la croissance des bactéries.

Les contrôles permettront de suivre la croissance bactérienne avec le temps, de déterminer les quantités des produits résiduels issus de l'activité microbienne et de vérifier si le traitement marche.

L'étude financière permet de connaître le coût d'un tel procédé mis en place à grande échelle.

I.8- Facteurs influençant la biorémediation

De nombreux facteurs peuvent avoir un effet sur la biorémediation. La nature, la concentration et le volume des produits à traiter influencent car les bactéries sont efficaces à des concentrations relativement faibles de polluant. Il y a aussi les difficultés d'adaptation des souches bactériennes in situ, les réalités au laboratoire sont différentes des réalités sur le terrain. Le fait que le polluant soit dispersé de façon hétérogène sur le site représente un facteur majeur. Le biotope peut subir des modifications pendant le changement de saison ce qui peut ralentir ou stopper l'activité microbienne. Enfin, il est important de vérifier que l'activité microbienne ne dégage pas des composés plus toxiques pouvant être nuisibles aux êtres vivants (Alexander 1994).

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1- Choix du site

Ce travail fait suite aux travaux de Romba (2014). Le choix du site a été porté sur Zougnazagmiline. Après divers examens des informations reçues à la direction générale du cadastre des mines, notamment sur les sites à fortes affluences, l'accessibilité au site et la disponibilité des données nécessaires à la réalisation du projet, ce site a été retenu pour l'étude antérieure. De plus, la bonne collaboration des autorités du site tout au long de l'étude menée par Romba en 2014 nous a amené à retenir ce site pour ces recherches vu la disponibilité et la coopération de ces derniers à nous fournir toutes les informations. Notons que ce milieu est très fermé.

II.2- Présentation de la zone d'étude

Le site d'orpaillage de Zougnazagmiline est situé dans la province du Namentenga, dans la région du Centre Nord du Burkina, plus précisément dans la commune rurale de Bouroum dans le village de Kayara. Le climat est de type sahélien et caractérisé par une saison sèche d'une durée de 7 à 8 mois allant d'octobre à mai et une saison pluvieuse de 4 à 5 mois allant de juin à septembre. Les sols sont de nature sableux, argilo-sableux, des argilo-gravillonnaires, ferrugineux et hydro-morphes.

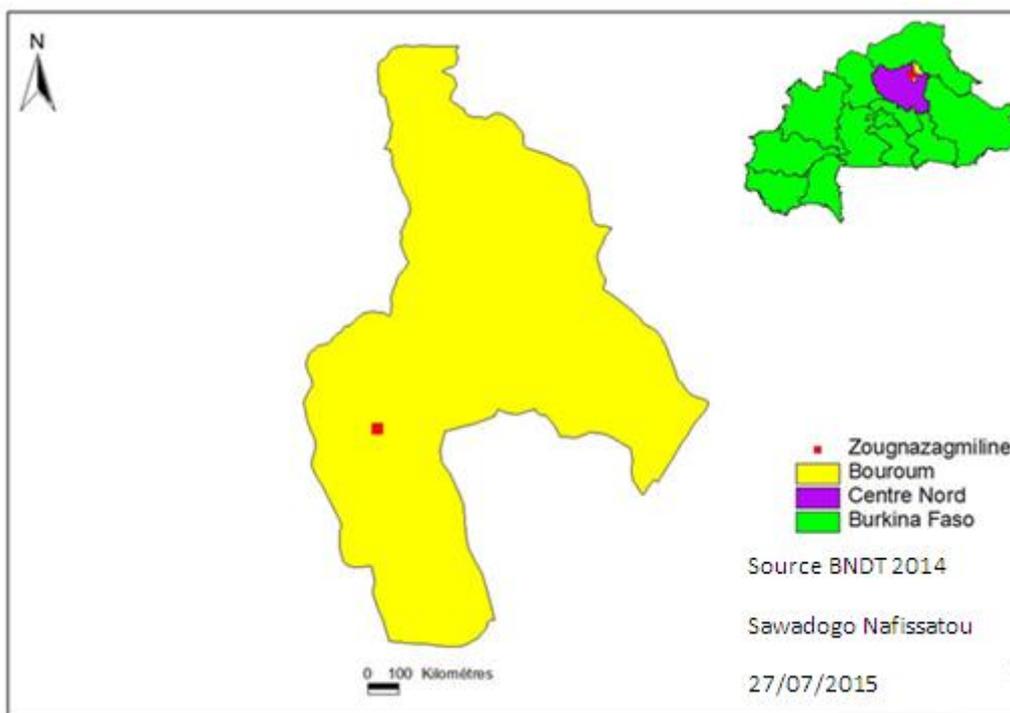


Figure 5 : Carte de localisation de Zougnazagmiline

Sur le site d'orpaillage, la chaîne d'extraction de l'or est établie (cf. annexes2). Après le fonçage, on trouve les zones de concassage, de broyage et de lavage, le comptoir et les bassins de cyanuration qui sont isolés du marché.

Les bassins de cyanuration sont situés plus loin du marché du fait de leur caractère clandestin. Les propriétaires des bassins de cyanuration achètent les boues issues du lavage pour les traiter au cyanure afin d'extraire le maximum de minerais. La cyanuration se fait dans des deux bassins rectangulaires entre lesquelles il existe un petit trou de profondeur n'excédant pas 2 mètres. Le fond et les parois des bassins sont équipés de bâches étanches pour éviter l'infiltration du cyanure. Pour chaque lavage au cyanure, il est utilisé 200 litres d'eau par bassin et 1 Kg de pastille de cyanure et 4,5 m³ des minerais (Romba, 2014). Les boues issues du traitement sont disposées autour des bassins en monticule et sont lessivées par les eaux de pluie pendant la saison pluvieuse. Les eaux cyanurées sont stockées dans les puits circulaires situés entre les bassins de cyanuration. Ces eaux s'infiltrent dans le sol et peuvent polluer les eaux de surfaces et souterraines créant ainsi l'intoxication des animaux qui viennent se désaltérer.

II.3- Travail de terrain

II.3.1- Détermination des points de prélèvement

Un travail préliminaire a été effectué avant la sortie de terrain afin de recueillir les échantillons. Ce travail a consisté au choix des points de prélèvement. Pour ce faire, nous nous sommes rendus à l'IGB pour obtenir certaines cartes et informations sur la zone. Grâce à Arcview, nous avons fixés les points de prélèvement en fonction du sens d'écoulement des eaux et de la théorie de Mathilde. Cette théorie dit qu'un polluant dont la source est sur la rive droite du bassin versant, il n'y a aucune raison que ce polluant se retrouve sur la rive gauche. Si c'est le cas, c'est que cette contamination a une autre source se trouvant sur la rive gauche. Notre site se trouvant sur la rive droite, nous avons concentré nos points de prélèvement sur celle-ci.

Selon plusieurs critères qui sont le sens de l'écoulement des eaux, les cours d'eaux existants, la position du site d'orpaillage et l'exutoire. Les points ont été dispersés sur tout le bassin versant de Kayara dont la superficie est de 22 km². L'objectif était d'avoir une idée sur la

pollution au cyanure des sols et des eaux et des bactéries dégradeurs de cyanure présents dans ce milieu.

La figure 6 nous montre l'emplacement des points de prélèvement des eaux et des sols sur le bassin versant considéré.

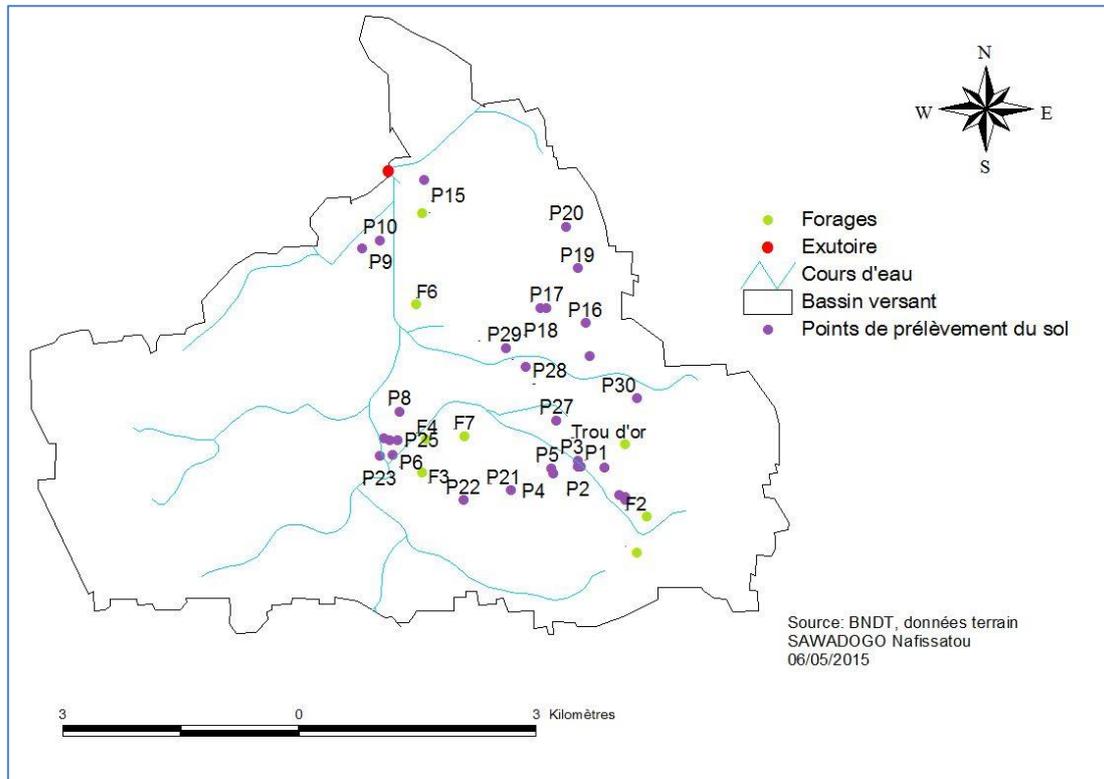


Figure 6: Carte des points de prélèvement d'eau et de sol

II.4- Prélèvement des échantillons d'eau

Les échantillons d'eau ont été prélevés dans des flacons en verre borosilicatés étiquetés de 500 mL préalablement stérilisés au four à 160°C pendant 15 minutes. Avant le prélèvement, les contours du forage sont stérilisés avec une flamme et l'eau est laissée couler pendant quelques minutes avant le prélèvement. Les échantillons sont conservés à 4°C dans des glacières en présence d'accumulateurs de froid pour maintenir la flore microbienne intacte. Les analyses ont été faites 48 heures après le prélèvement ce qui est dans la norme car le délai d'analyse pour les eaux est de 72 heures pour les paramètres microbiologiques. Au total, 07 échantillons d'eau ont été prélevés plus 30 échantillons de sol.

La figure 7 représente les flacons stériles utilisés pour l'échantillonnage des eaux.

II.5- Prélèvement des échantillons de sol

Les échantillons de sol ont été prélevés par carottage à l'aide d'une tarière manuelle (fig8). Le carottage s'est effectué sur une profondeur de 1m (fig9). Les échantillons ont été conditionnés par pas de 20 cm dans des sachets plastiques transparents, stériles et étiquetés. Après chaque prélèvement, la tarière était nettoyé afin d'éviter toute contamination d'un point à un autre. Les prélèvements sont ensuite conditionnés dans des glacières avec des accumulateurs de froid à 4°C avant les analyses. Les échantillons ont été analysés au laboratoire LEDES 2iE 3 jours après le jour du prélèvement pour éviter la dégradation des paramètres microbiologiques. L'échantillon étant des sols et ayant été conservés dans les normes, aucune caractéristique microbiologique n'a été compromise.



Figure 7 : La tarière et tous ces équipements



Figure 8 : Méthode de carottage

II.6- Isolation des familles de bactéries dégradeurs de cyanure

Les échantillons d'eau et de sol ont été analysés afin de savoir s'ils ne contiennent pas des bactéries dégradeurs de cyanure. Pour se faire, un milieu de culture composé de l'agar noble, des sels minéraux et de cyanure comme seule source de carbone et d'azote a été préparée (cf. Annexes2). La concentration de cyanure sera de 23mg/L car cette concentration se situe dans la fourchette de valeur (23 à 50mg/L) qu'une bactérie doit pouvoir dégrader pour que la biodégradation du cyanure soit efficace (INERIS, 2011). La concentration que nous avons choisie était la valeur minimale car nous voulions obtenir le maximum de familles de

bactéries possibles après ensemencement. Le milieu ainsi composé, est autoclavé à 121°C pour la préparation et la stérilisation. Le pH est ensuite ajusté à 9,5 pour éviter la volatilisation du HCN. Ce milieu est ensuite coulé dans des boites de pétris dans lesquelles seront ensemencées les échantillons.

II.6.1- Dans l'eau

Les eaux seront ensemencées directement en prélevant 100µL de chaque échantillon après une forte agitation et étalés sur une boite de pétris à l'aide d'un étaleur manuel stérile.

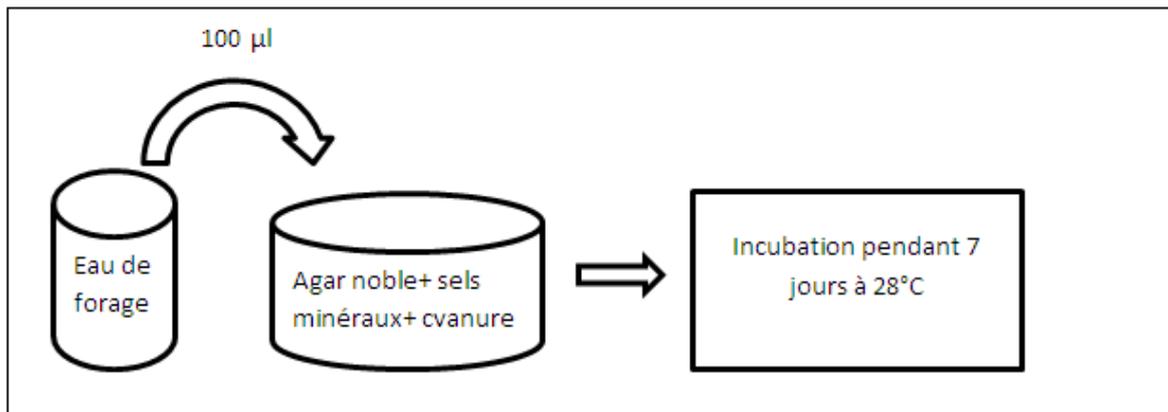


Figure 9: Récapitulatif de la méthode de recherche des bactéries dégradantes de cyanure dans les eaux de forage

II.6.1- Dans le sol

Les sols ont subi un traitement avant ensemencement. Les bactéries des sols étant fixées sur ce dernier, il a donc fallu les extraire de leur support avant tout ensemencement. Avec une solution d'eau peptone préparée et mis à autoclave à 121°C. L'opération d'extraction consiste à mélanger 10g de l'échantillon de sol à 9mL d'eau peptone. Après agitation et un temps de repos de 10 minutes minimum, cet échantillon peut être ensemencé en prélevant 100µL pour une boite de pétri. Ce milieu de culture est spécifique aux bactéries capables de dégrader le cyanure et sert à les isoler. Les boites de pétri ensemencées sont ensuite incubées à 28°C pendant 7 jours dans l'incubateur. Enfin le dénombrement des colonies apparaissant sur ces boites est réalisé. Dans le cas de notre étude, le but de la recherche de ces bactéries est de prouver ou non leur existence sur le site. Le dénombrement n'est donc pas nécessaire mais relever leur existence sur l'étendue de la zone contaminée. La hotte a été utilisée tout au long du processus pour garder les échantillons stériles. La figure 11 constitue un bref résumé de la procédure suivie.

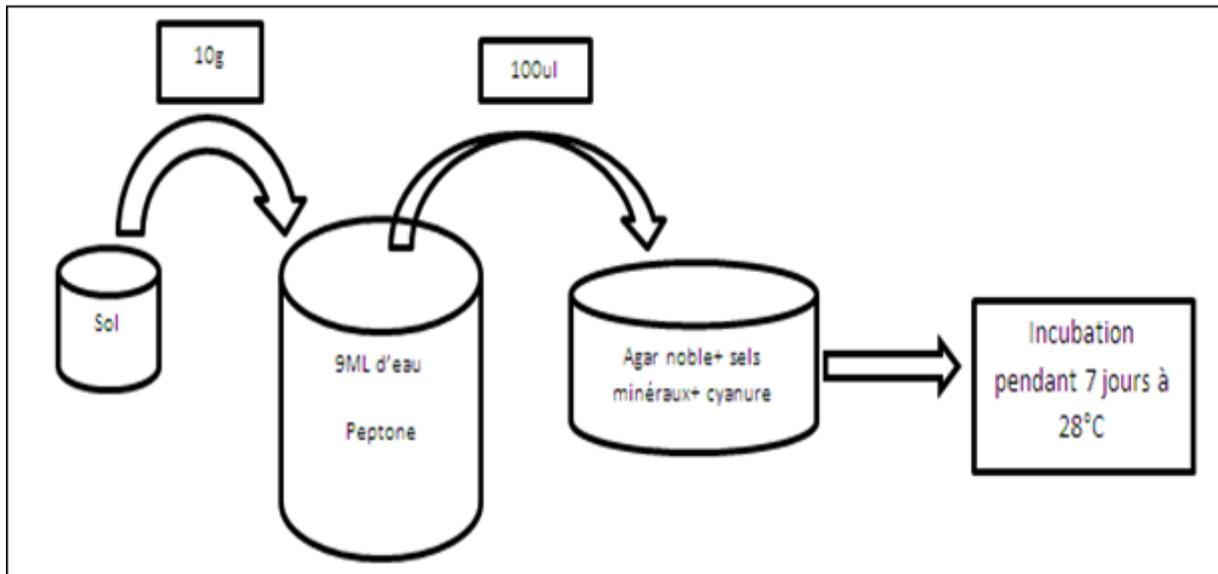


Figure 10: Récapitulatif de la méthode de recherche des bactéries dégradatrices de cyanure dans le sol.

Après ensemencement des bactéries pour en isoler celles capables de dégrader le cyanure, nous avons effectué une culture de ces bactéries. Pour se faire, un bouillon de culture est préparé dans un ballon à fond plat. Dans ce bouillon de culture, les colonies contenant les bactéries dégradatrices y sont ensemencées et conservées dans l'incubateur à 30°C pendant 24 heures, puis au réfrigérateur à 4°C en attendant son utilisation. Toute cette opération s'est effectuée sous une hotte pour éviter la contamination par des microorganismes étrangers. La figure 12 résume le processus.

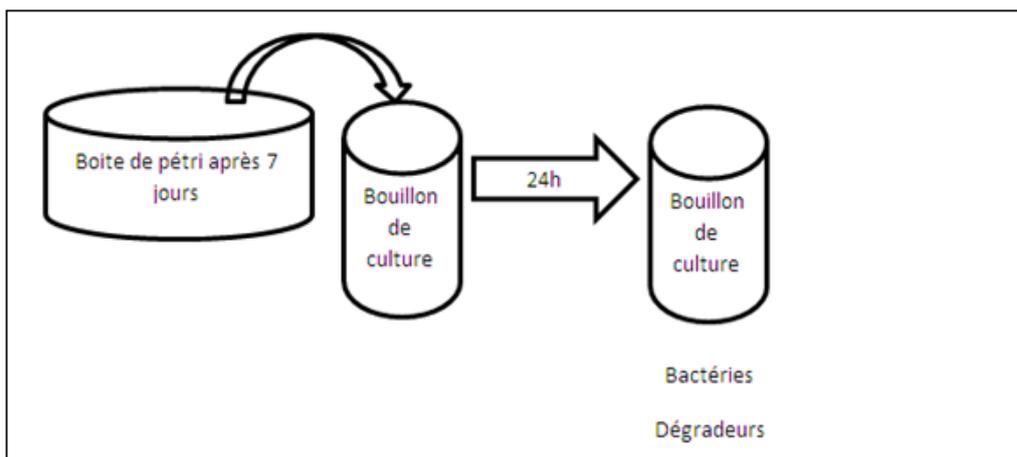


Figure 11: Récapitulatif de la méthode d'isolation des bactéries dégradatrices des eaux et des sols.

II.7- Test de biodégradation du cyanure libre par les bactéries dégradeurs

Ce test a pour but de déterminer la résistance des bactéries face au cyanure, leur capacité de dégradation et la nature des sous-produits issus de cette dégradation.

Pour se faire, 4 milieux de mêmes concentrations ont été préparés. Dans ces milieux, les bactéries dégradeurs ont été incubées. Le milieu 1 était composé des bactéries dégradeurs et d'une solution de cyanure d'une certaine concentration, le milieu 2 de bactéries, de nutriments et d'une solution de cyanure ; le milieu 3 d'une solution de cyanure et le milieu 4 d'une solution de cyanure et de bactéries inactivées. Les nutriments sont constitués de sels comme le phosphate de sodium, le phosphate de potassium, le sulfate d'ammonium, le sulfate d'ammonium, de magnésium, le nitrate de sodium et enfin le glucose. Le milieu 1 nous permettait ainsi d'apprendre que parmi les familles isolées, certaines sont autotrophes. Le milieu 2 nous renseignait sur l'existence des hétérotrophes et la préférence des bactéries face à un milieu riche en nutriment. Quant au milieu 3, il nous permettait de s'assurer que la réduction de la concentration de cyanure n'est pas due à la volatilisation de ce dernier. Enfin, le milieu 4 servait à s'assurer que la diminution du cyanure n'était pas dû au fait que les membranes des bactéries n'absorbaient pas une certaine quantité de cyanure. Tous ces milieux nous ont permis de nous assurer que la diminution du cyanure était due à l'activité métabolique des bactéries dégradeurs et de confirmer que nous sommes en phase de biorémediation. Le tableau 1 résume les différents milieux testés.

Biorémediation du cyanure sur les sites d'orpillages au Burkina Faso : Cas du site de Zougnazagmiline

Tableau 1 : Résumé des milieux préparés

Noms des milieux	Composition des milieux	Différentes concentrations en cyanure pour chaque milieu (mg/L)
M1	Bactéries vivantes+ eau ultra-pure+ cyanure	40
		60
		80
M2	Bactéries vivantes+ eau ultra-pure+ nutriments+ cyanure	40
		60
		80
M3	Eau ultra-pure+ cyanure	40
		60
		80
M4	Bactéries mortes+ eau ultra-pure+ cyanure	40
		60
		80

Pour le choix des concentrations de cyanure à préparer, nous nous sommes inspirées de la marge des concentrations utilisées dans les études de Gurbuz et al (2009) et bien d'autres (Ahmet et al, 2006). Les concentrations de cyanure variaient de 23 à 700mg/L pour toutes les études faites sur la biodégradation du cyanure, (Huertas et al, 2010). Les concentrations de 100, 150, 200 et 300mg/L ont d'abord été testée et il en est ressorti que ces concentrations inhibaient la croissance des bactéries. Nous avons donc réduit les concentrations à 40, 60 et 80mg/L. Pour chaque milieu, les 3 concentrations furent testées. Les milieux sont mis en agitation en aérobie à raison de 200rpm. Le suivi de la dégradation du cyanure est assuré par le prélèvement chaque 1heure pendant 27 heures de chaque échantillon pour le dosage du cyanure libre, la mesure de la concentration en ammonium et la croissance bactérienne.

- La concentration en ammonium :

Elle permet de déterminer si les bactéries utilisaient le cyanure comme source de carbone ou d'azote. Elle est déterminée par spectrophotométrie d'absorption moléculaire par la méthode

HACH. La concentration du cyanure est déterminée par la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre d'absorption moléculaire.

- La croissance bactérienne :

Elle est déterminée par deux méthodes : une au spectrophotomètre DR5000 à la longueur d'onde 600 nm et l'autre par ensemencement dans les boîtes de pétris. Les boîtes sont ensemencées par intervalle de temps de 1 heure pour observer le nombre de colonies. La formule suivante nous permet de déterminer la charge bactérienne pour 100 ml :

$$N = \frac{n * 100}{v * d}$$

N : nombre de bactéries pour 100 ml d'échantillon

d : taux de dilution de l'échantillon ensemencé

n : nombre de colonies compté sur la boîte de pétri

La constante de vitesse de dégradation : elle permet d'estimer l'efficacité des bactéries à dégrader le cyanure en fonction des différents milieux et des concentrations. La formule utilisée pour déduire cette vitesse est :

$$v = k[CN]^a [bactéries]^b \text{ or } [bacterie] \gg [cn] \text{ donc } v = k'[CN]^a$$

Pour $\alpha=1$: $v = k'[CN]$

Pour $\alpha=2$: $\frac{1}{CN_0} - \frac{1}{CN} = k't$

La constante de vitesse K retenu correspond à la droite d'équation $y = ax$ dont le coefficient de corrélation est le plus proche de 1.

Le pH des différents milieux a été élevé à 9.5 pour éviter la volatilisation du cyanure libre.

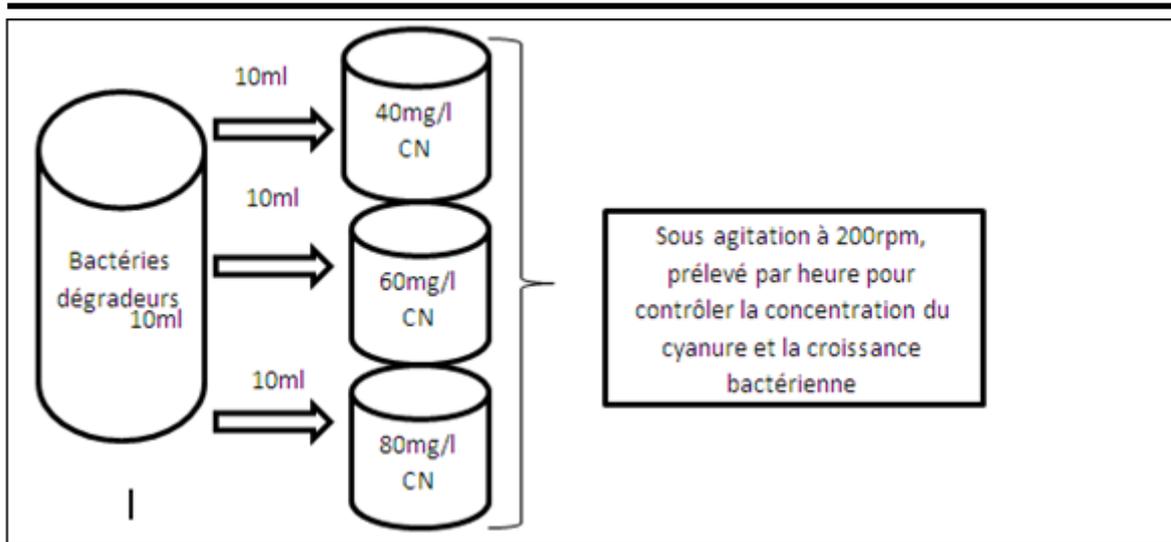


Figure 12 : Récapitulatif du processus

II.8- Dosage du cyanure libre

La méthode d'analyse du cyanure est la pyridine-pyrazalone. Le dosage a été effectué par spectrophotométrie avec la DR5000 en utilisant les réactifs cyaniver 3,4 et 5. Le principe de cette méthode est qu'en présence de cyanure, on observe une coloration bleue qui est détectable par spectrophotométrie d'absorption moléculaire à la longueur d'onde 612nm. Pour l'analyse des sols, le cyanure libre est extrait en utilisant 10 mL de soude à 1M pour 1g de sol (Sawadogo, 2015).

II.9- Courbe d'étalonnage du cyanure libre

On utilise une courbe d'étalonnage pour effectuer un dosage par une méthode physique. On réalise une série de mesures de l'absorbance pour des solutions de concentrations connues afin de tracer la courbe d'évolution de cette dernière en fonction de la concentration. Ces solutions sont appelées solutions étalons. Cette courbe d'étalonnage permet ensuite de retrouver la concentration inconnue de la solution à doser à partir de la mesure de l'absorbance.

Les solutions étalons préparées ont été choisies dans la gamme de lecture du spectrophotomètre que nous utilisons. Elles sont de 0, 50, 100, 150 et 200 µg/l.

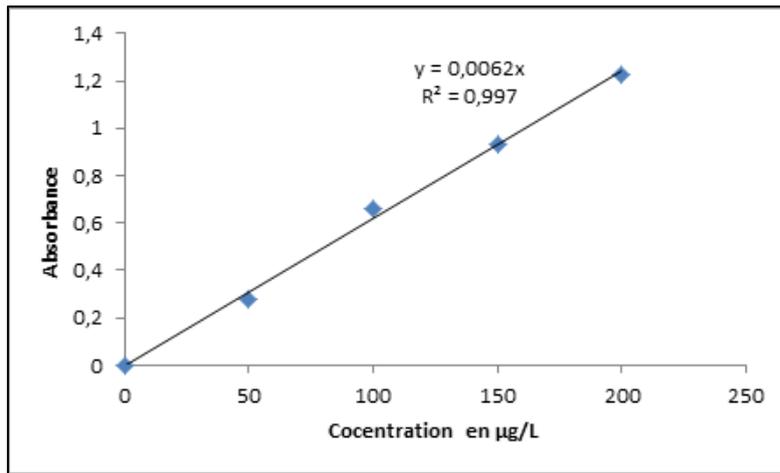


Figure 13: Courbe d'étalonnage du cyanure libre

II.10- Expérience abiotique

Le processus de biodégradation a été testé pour connaître le taux de volatilisation du cyanure libre. Un milieu contenant des solutions de cyanure de concentrations 40, 60 et 80 mg/L ont été mis en agitation dans les mêmes conditions que les milieux de test de biodégradation. Cette expérience nous permettrait d'extraire la volatilisation pour déterminer la valeur exacte de biodégradation. Un deuxième milieu contenant des bactéries mortes avec les mêmes concentrations de cyanure ont été préparées et testé dans les mêmes conditions que précédemment. Le but de ce test est de s'assurer que la diminution du cyanure dans le milieu était due à l'activité de bactéries vivantes et qu'il n'y avait pas d'adsorption par les membranes de ces bactéries. Ces milieux ont été mis en agitation à 200 rpm sous une hotte et suivis pendant 27 heures.

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1- Concentration de cyanure libre sur le site

Les analyses ont montrées que la concentration de cyanure libre dans les eaux de forage variaient de 0 à 0,0112 mg/L (figure 15). Dans le sol, nous avons obtenus des concentrations compris entre 0,023 et 0,902 mg/Kg de sol(figure 16). Les normes sont fixées à 0,07 mg/L de cyanure libre pour l'eau et 0,5 mg/Kg de sol. Nous constatons que la pollution des eaux n'est pas hors de la norme fixées par l'OMS. C'est au niveau des sols que nous observons une pollution significative qui nécessite une inquiétude.

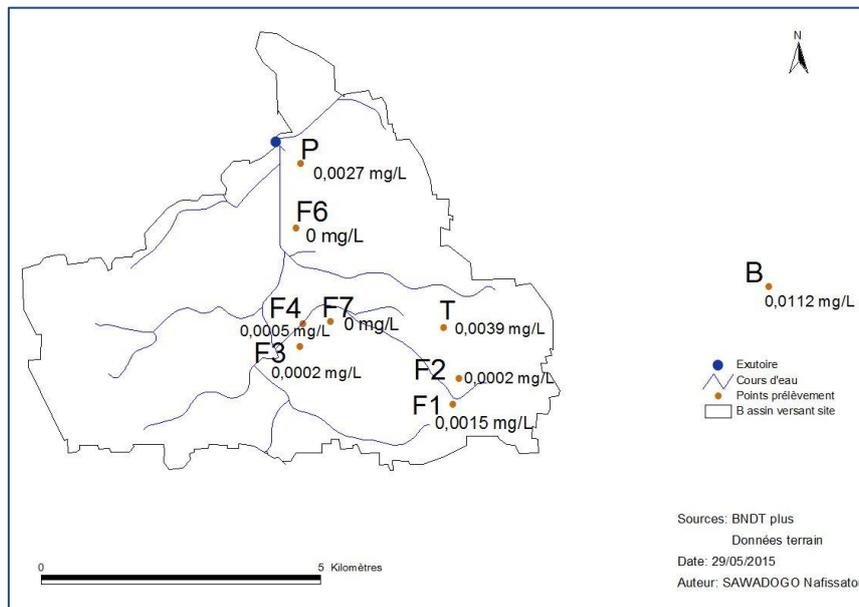


Figure 14 : Concentration du cyanure dans les forages (F), puits (P) et trou d'or (T).

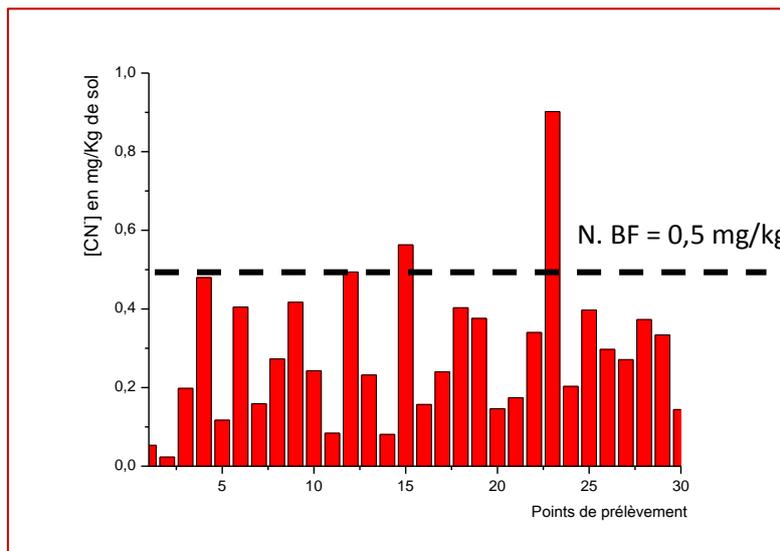


Figure 15 : Concentration du cyanure libre dans le sol

Nous pouvons présumer que les faibles valeurs du cyanure libre dans les eaux et les sols s'expliquent par le fait que plus de 50% du cyanure libre libéré par la cyanuration se complexe avec les différents éléments présents dans le sol ou l'eau pour donner le cyanure total. En effet, lorsqu'on contamine un sol avec une concentration de cyanure libre connue, on arrive à retrouver 50% de la concentration initialement utilisée pour la contamination : le reste s'étant complexé avec les autres éléments constitutifs du sol et des eaux (Sawadogo, 2015). Les eaux et les sols étant riches en sels minéraux et le cyanure un oxydant fort ; il s'associe facilement à ces éléments pour donner du WAD. De plus, le sol du site étant très argileux prédispose le cyanure libre à se complexer au fil du temps avec les métaux et les minéraux présents dans le milieu (UBALA, 2010). Le pH du sol, la teneur en argile, la présence ou non de matière organique et d'oxyde de fer ou d'autres métaux influence la stabilité du cyanure dans le sol.

III.2- Isolation des familles de bactéries dégradeurs de cyanure

Les résultats des ensemencements montrent que les bactéries existent sur l'ensemble des points de prélèvement et dans les eaux de forage du bassin versant de Zougnazagmiline (annexes4). Soulignons que le milieu de culture utilisé est spécifique à toutes bactéries capables de dégrader le cyanure. Dans les forages prélevés, elles ont une concentration de 200 à 11500 ufc/mL (annexes5). Dans les sols, elles sont de $2 \cdot 10^3$ à $1,67 \cdot 10^5$ ufc/Kg de sol(annexes4). Nous avons constaté que plus les eaux sont troubles plus la concentration des bactéries dégradeurs est élevée. Les observations au microscope nous ont permis de connaître les caractéristiques physiques de ces familles de bactéries. Le tableau et l'image ci-dessous montrent l'aspect qu'elles ont au microscope. Elles sont blanchâtres, luminescentes et de taille variable. Ces colonies peuvent être celles de plusieurs familles de bactéries vu leur différence physique.

Tableau 2 : Caractéristiques physiques des familles de bactéries

Type	Dimensions des colonies	Morphologie externe des colonies vues à l'œil nu	Couleur des colonies	Aspect au microscope
inconnu	7-22 nm	Ponctiforme, circulaire	blanchâtre	Filiforme, circulaire



Figure 16: Vu au microscope des bactéries dégradeurs dans le sol

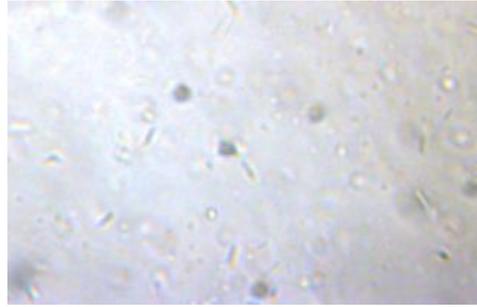


Figure 17: Vu au microscope des bactéries dégradeurs dans l'eau

Bien que la présence des bactéries ait été prouvée sur tous les points de prélèvement, nous ne pouvons pas en déduire leur dispersion. En effet pour effectuer une dispersion de bactéries, il est impérativement nécessaire de procéder à un maillage du terrain concerné ou du cours d'eau concerné. Les bactéries capables de dégrader le cyanure vivent dans l'environnement comportant le cyanure ou pas et peuvent avoir pour fonction de dépolluer les sites contaminés de façon naturelle si les concentrations en cyanure ne sont pas élevées (Dash et al, 2009). Elles peuvent aussi avoir une préférence pour le cyanure en l'utilisant comme source de carbone ou d'azote. Certaines de ces bactéries sont dépendantes du cyanure, c'est-à-dire que leur présence montre celle du cyanure. Par contre, d'autres peuvent vivre en sa présence ou en son absence. Nous présumons que ces bactéries sont présentes en tout point du site en émettant comme hypothèse qu'au moins certaines sont dépendantes d'elle. L'Agrobactérium tumeficiens SUTS 1 a été isolé en utilisant le même composé pour le milieu de culture et les tests ont montré qu'elle était capable de dégrader le cyanure ; ce qui a prouvé l'efficacité du milieu (Potivichayanon and Kitleartpornpaioat, 2010). Les colonies trouvées regroupent plusieurs types de bactéries car le milieu n'est pas sélectif pour une seule espèce mais pour toutes bactéries pouvant dégrader le cyanure. En effet, Ingvorsen et al (1991) ont isolé des eaux usées des bactéries pouvant dégrader le cyanure par cette méthode et effectué des tests qui se sont avérés concluant; les colonies isolées avaient les mêmes caractéristiques. Cependant en faisant des tests ADN, ils ont découvert que c'était plusieurs bactéries différentes telles que *Klebsiellapneumoniae*, *Moraxella*, *Serratia*, et *Alcaligenes* qui ont été identifiés comme bactéries dégradeurs de cyanure par cette méthode. La concentration de ces bactéries est liée à la turbidité des eaux et nous amène donc à dire que ces bactéries existent dans les eaux car elles ont été contaminées par les sols (d'où la turbidité). Nous pouvons ainsi conclure que les eaux et les sols regroupent les mêmes familles de bactéries en tenant en compte aussi de l'aspect au microscope. De nos jours, les études sur la biodégradation du

cyanure en utilisant des bactéries présent sur les sites contaminés restent peu nombreuses. La majorité des études utilisent soit des souches pures issues de laboratoire, soit des bactéries issues des eaux usées. Il était donc intéressant et économique de chercher ces bactéries sur le site pollué.

III.2- Expérience abiotique

Les différents milieux l'un composé uniquement de cyanure libre et l'autre de cyanure libre et de bactéries mortes ont été suivie pendant 25 heures. Les concentrations préparées sont de 40, 60 et 80 mg/L. Le tableau3 présente la diminution du cyanure libre au bout de 27 heures.

Tableau 3 : Rendements de volatilisation du cyanure

Milieux	concentrations de cyanure (mg/L)	Perte %
Milieux avec cyanure uniquement	40	2,8
	60	2,84
	80	2,4
Milieux avec cyanure et bactéries mortes	40	2,4
	60	1,8
	80	2,2

La diminution de la concentration en cyanure montre qu'il y'a volatilisation de cyanure libre présent dans les milieux. Le cyanure libre est un composé très volatil surtout lorsque le pH est en dessous de 9,5. Cependant il est quasi impossible d'empêcher la volatilisation du cyanure libre sans un dispositif destiné à piéger le HCN qui se dégage (Huertas et al, 2010). Le taux de volatilisation du cyanure libre peut aller jusqu'à 10% s'il n'y a pas de dispositif pour piéger le gaz. Notre taux de perte n'excédant pas 3%, nous pouvons confirmer que la perte de cyanure est due à la volatilisation de ce dernier. Nous pouvons affirmer par la suite que toute diminution de la concentration en cyanure au-delà de 3% environ dans les tests de biodégradation est causée par la dégradation de ce dernier. Par cette méthode, Mekuto et al ont trouvé un pourcentage de volatilisation de 9% pour des concentrations de 200 mg/L de cyanure dans les mêmes conditions d'expérimentation avec *Bacillus Safensis*, *LichenformisetTequilensis Strains* dans le même milieu.

III.3- Test de biodégradation du cyanure libre par les bactéries

III.3.1- Dégradation du cyanure libre et croissance bactérienne

La dégradation du cyanure et la croissance bactérienne ont été observées à des concentrations de cyanure libre de 40, 60 et 80 mg/Le. Le rendement de biodégradation est de l'ordre de 95 à 99% (annexes 4) avec le meilleur rendement pour 60 mg/L quel que soit le milieu. La vitesse de biodégradation est consignée dans le tableau 4. Pour des milieux différents, leurs valeurs changent. Les figures 19 et 20 montrent l'évolution du cyanure pendant 30 heures d'expérience. Dans les trois cas, la diminution du cyanure commence à partir de la 5^{ème} heure. On observe trois phases de variation du cyanure durant l'expérience. La première phase se déroule au bout des 3 premières heures ou la variation du cyanure est négligeable. La deuxième phase, se déroule entre la 5^{ème} heure et la 12^{ème} heure. Au niveau de cette phase, on observe une diminution rapide de la concentration en cyanure. La dernière phase s'observe de la 12^{ème} heure à la 30^{ème} heure. A cette phase, la diminution de la concentration du cyanure est très ralentie. La croissance bactérienne qui a été suivie en même temps que la concentration du cyanure montre que les deux variables évoluent en sens contraire. Pendant que la concentration en cyanure diminue, la croissance bactérienne augmente. Pour toutes les concentrations en cyanure, la croissance bactérienne évolue aussi en trois phases. Une première phase où on observe qu'il n'y a pas de croissance bactérienne. Cette stabilité de la population bactérienne se déroule sur les 3 premières heures. Suivie d'une phase où la croissance se fait mais de façon ralentie. Au niveau de la dernière phase, la croissance est rapide. Tout au long de l'expérience on constate que la croissance bactérienne se fait de manière exponentielle. Les figures 19 et 20 montrent l'évolution de la concentration en cyanure en mg/L et la croissance bactérienne lue par spectrophotométrie.

Tableau 4 : Vitesse de biodégradation du cyanure libre.

Milieux cyanurés	[CN⁻] mg L⁻¹	k (Cte de vitesse)	R² (coef. de corrélation)	Ordre
avec nutriments	40	0.1255	0.9469	Ordre 1
	60	0.1433	0.9138	
	80	0.2155	0.9594	
sans nutriments	40	0.1115	0.9644	
	60	0.0897	0.98	
	80	0.1588	0.9584	

Biorémédiation du cyanure sur les sites d'orpillages au Burkina Faso : Cas du site de Zougnazagmiline

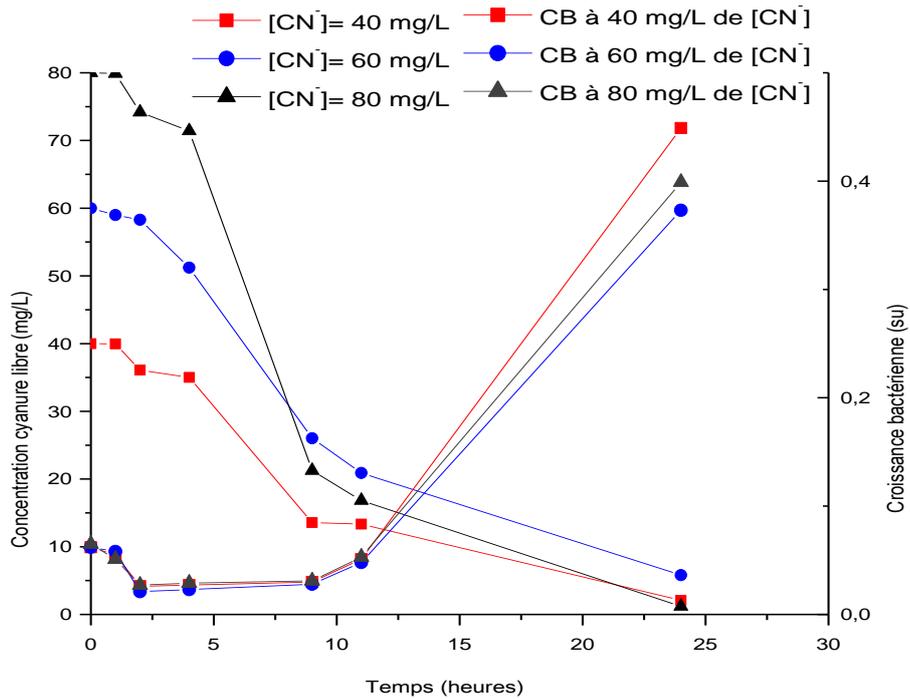


Figure 18 : test de biodégradation et croissance bactérienne pour les milieux sans nutriments.

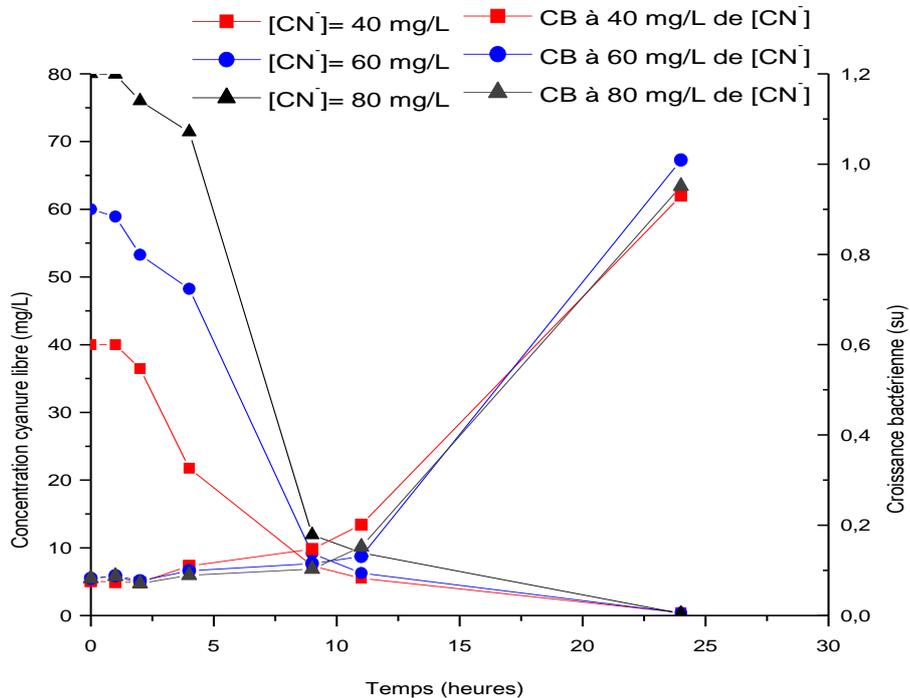


Figure 19 : test de biodégradation et croissance bactérienne pour les milieux avec nutriments.

La concentration en cyanure varie peu au début de l'expérience. La faible variation de la population bactérienne pourrait s'expliquer par le fait que les bactéries ont un temps de latence. Le temps de latence d'une bactérie est le temps qu'elle met pour s'habituer à son nouvel environnement en particulier les ressources et à utiliser ces ressources de manière optimale (Prescott et al, 2002). Cette phase est nécessaire car le milieu peut être différent de celui que les microorganismes étaient habitués (Prescott et al, 2002). Dans ce cas, ces cellules pourraient avoir besoin de sécréter de nouvelles enzymes pour utiliser ces nouveaux nutriments. Les bactéries ont en effet besoin de temps pour s'adapter à un changement d'environnement (Mekuto et al, 2013). Mekuto et al ont trouvé que le temps de latence du *bacillus Sp consortium* à une concentration en cyanure de 200mg/L était de 3 jours, la nôtre est de 3 heures. Cette phase peut aussi être plus longue pour les mêmes microorganismes en fonction de l'âge des microorganismes. Par contre, Akcil et al en 2003 ont trouvé un temps de latence de 5 à 8 heures pour le *Pseudomonas Sp* avec une concentration de 100 mg/L. Le temps de latence varie donc en fonction de la bactérie et aussi de la concentration en cyanure dans le milieu. Il leur a donc fallu du temps pour s'adapter à la nouvelle concentration de cyanure. L'augmentation de la population bactérienne en même temps que la diminution du cyanure, prouve que les bactéries consomment le cyanure comme source de nutriments (Potivichayanon et Kitleartpornpaioat, 2010). La phase de croissance rapide correspond à la phase exponentielle. Pendant cette phase, les microorganismes se développent et se divisent à la vitesse maximale car elles sont habituées au milieu et ont sécrété les enzymes nécessaires pour utiliser le cyanure présent (Prescott et al, 2002). Malgré la présence de nutriment dans l'un des milieux, les bactéries ont une préférence pour le cyanure. La vitesse de dégradation montre que les nutriments n'inhibent en aucun cas l'activité bactérienne. Bien au contraire, elles permettent aux bactéries de dégrader plus rapidement le cyanure. Car le nombre de bactéries en présence de nutriments est plus important qu'en leur absence au bout du même temps de réaction comme le montre le tableau 5. La présence de ces nutriments (sels minéraux) accélère le métabolisme de ces microorganismes en agissant comme un facteur de croissance pour elles. La concentration de 60 mg/L obtient le plus important rendement de dégradation (99%) quel que soit le milieu. Nous pouvons donc qualifier cette concentration d'optimale car on y obtient une biodégradation optimale.

Tableau 5 : Comparaison des croissances bactériennes des milieux au bout du même temps

[CN ⁻] mg L ⁻¹	Milieux cyanurés sans nutriments			Milieux cyanurés avec nutriments		
	40 mg/L	60 mg/L	80 mg/L	40 mg/L	60 mg/L	80 mg/L
0	2,10E+04	2,10E+04	2,10E+04	2,10E+04	2,10E+04	2,10E+04
1	1,58E+04	1,57E+04	1,55E+04	1,81E+04	1,81E+04	1,81E+04
3	1,57E+04	1,52E+04	1,50E+04	1,58E+04	1,62E+04	1,58E+04
8	4,50E+04	4,56E+04	4,75E+04	4,91E+04	5,14E+04	6,22E+04
27	1,01E+06	1,34E+06	9,90E+05	1,80E+06	1,20E+06	9,95E+05

III.3.2- Concentration en ammonium

La concentration en ammonium a été observée tout au long de 25 heures. Trois étapes de variation de la concentration en ammonium ont été observées. La première montre une augmentation de la concentration en ammonium. La deuxième phase montre une diminution de cette concentration et la troisième une augmentation de l'ammonium dans le milieu. Les figures 22 et 23 permettent de bien observer ces étapes.

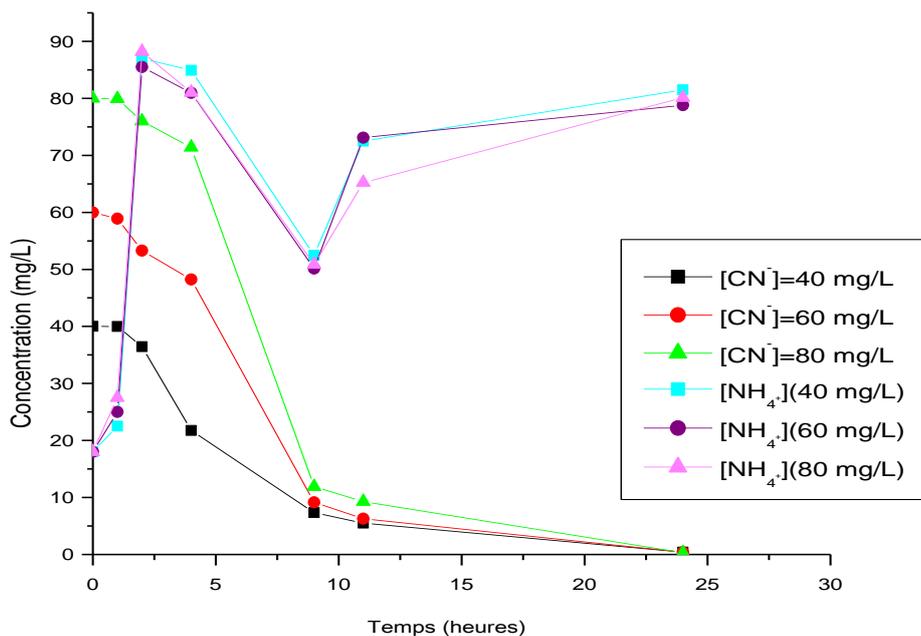


Figure 20 : Concentration en ammonium pour le milieu avec nutriments

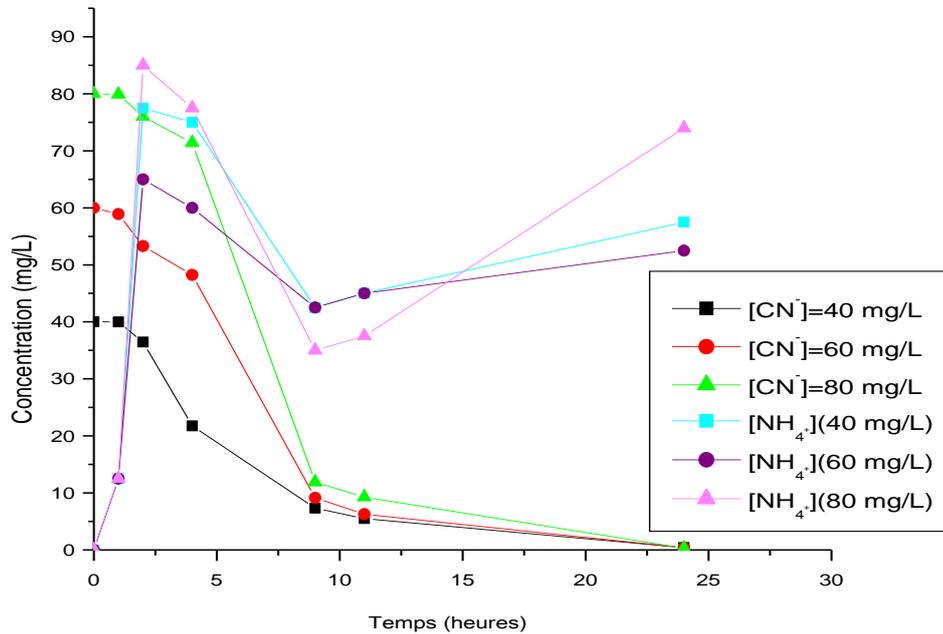


Figure 21 : concentration en ammonium pour les milieux sans nutriments.

La présence d'ammonium dans le milieu montre qu'il y'a libération de NH_4^+ . L'azote libéré provient de la dégradation du cyanure vu que le cyanure est la seule source d'apport d'azote du milieu ; en considérant que rien ne se crée tout se transforme. Son augmentation montre que le cyanure est directement utilisé comme source de carbone par ces bactéries, ce qui a entraîné la formation d'ammonium grâce à la libération de l'atome d'azote (Mekuto et al, 2013). Cependant la diminution de l'ammonium dans le milieu pourrait être due à sa consommation par d'autres bactéries du milieu. En effet dans certains cas, certaines bactéries capables de dégrader le cyanure en l'utilisant comme source de carbone se mettent à consommer l'ammonium produit par la dégradation du cyanure au bout d'un certain temps comme source d'azote ; ces bactéries ont donc une préférence pour l'ammonium par rapport au cyanure si ce dernier est présent en grande quantité (Mekuto et al, 2013). Le fait que l'on ait plusieurs familles de bactéries, certaines utilisent l'ammonium au bout d'un certain temps et d'autres continuent à utiliser le carbone du cyanure. Pendant que la concentration en ammonium diminue, celle du cyanure continue à diminuer ce qui prouve que la dégradation se poursuit parallèlement. Certaines bactéries utilisent donc le cyanure comme source de carbone uniquement. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer ce phénomène est que les bactéries

dégradent le cyanure en premier lieu comme source de carbone. Ensuite, les bactéries ayant une préférence pour l'azote ou capables d'utiliser le cyanure comme source d'azote aussi se mettent à consommer l'azote libéré lorsque sa concentration atteint une certaine valeur (Mekuto et al, 2013). La présence de ces bactéries ralentit la biodégradation, il est donc nécessaire de connaître la nature de toutes les familles existantes afin de n'utiliser que celles utilisant le cyanure comme source de carbone.

Conclusion

Le développement de l'orpaillage au Burkina Faso a causé bien de dommages pour l'environnement (Romba, 2014), comme la pollution des eaux et des sols par le cyanure. Cette pollution est responsable de la détérioration des ressources en eaux et des sols cultivables sur ces sites. Des procédés biologiques de traitement présentent une bonne alternative pour la réhabilitation par rapport aux procédés chimiques qui sont plus coûteux.

Notre étude s'est concentrée sur la biorémediation des sols et des eaux polluées par le cyanure in situ. Une phase terrain nous a permis de recueillir les échantillons d'eau et de sol du site choisi pour effectuer l'isolation des bactéries capables de dégrader le cyanure et le test de biodégradation.

Les analyses d'isolation ont prouvé la présence de microorganismes capable de dégrader le cyanure sur tous les points de prélèvement avec des concentrations allant jusqu'à 11500 ufc/mL pour l'eau et $1,67 \cdot 10^5$ ufc/Kg dans le sol.

Les microorganismes isolés montrent une préférence pour le cyanure par rapport aux autres nutriments tel le glucose. L'abattement du cyanure est de l'ordre de 95 à 99% au bout de 27 heures d'expérience. La concentration optimale de biodégradation est de 60 mg/L quel que soit les milieux car elle a le meilleur abattement de cyanure. Cependant, l'ammonium libéré suite à la biodégradation du cyanure constitue un inhibiteur de la réaction. En effet, certains de ces microorganismes se mettent à consommer cet ammonium une fois qu'il a atteint une certaine valeur.

Nous avons pu déterminer qu'au-delà de 80 mg/L de cyanure libre, la croissance bactérienne est inhibée et que 100 mg/L est la dose létale pour elle.

La détermination de la cinétique de dégradation du cyanure libre a montré que la vitesse de dégradation dans le milieu avec nutriments est plus élevée que dans celui sans nutriments car cette dernière accélère le métabolisme des bactéries accélérant ainsi leur multiplication.

La particularité de cette étude réside dans le fait que les microorganismes dégradeurs ont été localisés sur le site d'étude. Ce qui facilitera et rendra le traitement moins onéreux une fois les études terminées. Toutefois, l'utilisation de ces microorganismes pour la biodépollution peut s'avérer risquée pour l'environnement et l'homme si nous n'avons pas une connaissance totale de ces microorganismes

Recommandations

Il est nécessaire de compléter cette étude en caractérisant les familles de bactéries détectées et en développant une technique qui permettrait de tester ces bactéries à grande échelle. Cette caractérisation serait bénéfique car elle permettrait de tester les différents microorganismes et d'utiliser la plus résistante et la plus efficace.

De plus, il faudrait tester le pouvoir de nos bactéries à différents pH et température. Cela permettrait de connaître leur comportement dans le milieu naturel et face aux conditions les plus rudes.

Aussi, nous aurons une connaissance sur la nature des microorganismes que nous utiliserons pour prédire leur comportement et contrôler leur population une fois la dégradation terminée afin de respecter l'équilibre microbiologique de l'écosystème. Il faudra enfin envisager de tester ces bactéries à la dégradation du cyanure total surtout qu'il est la forme la plus retrouvée dans les sols.

De plus, une carte représentant la dispersion des bactéries est nécessaire pour comprendre leur comportement vis-à-vis du cyanure. Pour se faire, un maillage de 100 à 250 mètres doit être effectué afin d'obtenir des résultats fiables.

Références bibliographiques

A. Akcil, A.G. Karahan, H. Ciftci, O. Sagdic.(2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas* species), *Miner.Eng.* 16.page 560–567.

Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. (Edition du 30 novembre 2010).
Groupe de travail piratox/piratone.

Ahmet Cabuk, Arzu Taspinar Unal, Nazif Kolankaya. (2006). Biodegradation of cyanide by a white rot fungus, *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letter*. P 1313–1317.

Ata Akciland Terry Mudder.(2003). Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining. *Process review Biotechnology Letters* 25. P 445–450.

Baker K H, Herson D S. (1994). *Bioremediation of cyanide*.Mc Graw Hill Inc. Pub.P71-76.

CES : Conseil Economique et Social. EXPANSION DU SECTEUR MINIER ET DEVELOPPEMENT DURABLE AU BURKINA FASO : CAS DE L'EXPLOITATION AURIFERE OBSERVATOIRE ÉCONOMIQUE ET SOCIAL,Décembre 2012.

Corinne CHARLIER, Thirry GOUGNARD, Denis LAMIABLE, Pierre LEVILLAIN, Guy PLOMTEUX .(2000).Cyanides and thiocyanates in a hospital toxicology laboratory.*Annals de toxicology analytique*, vol XII, n° 2.

Décret n°2001-185/ PRES/PM/MEE portant fixation des normes de rejets de polluants dans l'air, l'eau et le sol.

Décret n°2001-185/PRES/PM/MEE portant fixation des normes de rejets dans l'eau, l'air et le sol.

Ebbs S. (2004). Biological degradation of cyanide compounds. *Cur Opin biotechnology* 15. P 231–236.

Fatma GURBUZ, Hasan CIFTICI, Ata AKCIL.(2009). Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*.*Journal of Hazardous Materials*.162.p 74–79.

HARDMAN D, Mc ELDOWNEY S, WAITE S.(1993).*Pollution: ecology and biotreatment*. Longman Scientific & Technical.Harlowe.UK, vol X, n°1.

Huertas et al. (2010). Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor: Influence of pH. *Journal of Hazardous Materials* 179.p 72–78

INERIS. (2011). Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Cyanures,DRC-11-118962-11076A,81p.(<http://rsde.ineris.fr/ouhttp://www.ineris.fr/substances/fr/>)

J.A. MEECH. (1986). Cyanide effluent control by freeze.The processing, *Environmental Geochemistry and Health*. P 80-84.

K. Ingvorsen, B. Hojer-Pedersen, and S. E. Godtfredsen.(1991). Novel Cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylooxidans* sub sp. *Denitrificans*. *Environmental Microbiology*.vol. 57. P 1783–1789.

Lansing M. Prescott. John P. Harley. Donald A. Klein. (2002). *Microbiologie 2ème édition française, Traduction de la 5ème édition américaine par Claire Michelle Bacq Calberg et Jean Dusart (Université de Liège).*

M. Botz, T.I. Mudder, and A.U. Akcil.(2005). Cyanide treatment: Physical, chemical and biological processes . *Developments in Minerals Processing*, 15 (2005) 672 – 701.

M.J. Huertas, L.P. Sáez, M.D. Roldán, V.M. Luque-Almagro, M. Martínez-Luque, R. Blasco,F. Castillo , C. Moreno-Vivián, I. García-García. (2010). alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor: Influence of pH. *Journal of Hazardous Materials* 179. P 72–78.

Mark J. Logsdon, MSc Karen Hagelstein, Terry I. Mudder. (1999). the management of cyanide in the gold extraction. *International Council on Metals and TheEnvironment*.p 45-51.

Mekuto et al.(2013)., Biodegradation of Free Cyanide Using *Bacillus* Sp. Consortium dominated by *Bacillus Safensis*, *Lichenformis* and *Tequilensis* Strains: A Bioprocess Supported Solely with Whey. *Bioremed Biodegradation*.

Mekuto L, Jackson VA, Ntwampe SKO.(2013). Biodegradation of Free Cyanide Using *Bacillus* Sp. Consortium Dominated by *Bacillus Safensis*, *Lichenformis* and *Tequilensis* Strains: A Bioprocess Supported Solely with Whey. *J Bioremed Biodeg* S18:004.doi:10.4172/2155-6199.S18-004.p 2-7.

Mudder.T.I, Botz.M. (1987). Microbial treatment of industrial and hazardous wastes in the Cyanide Monograph second. Mining Journal Books, London, England, UK.

Padmaja G, Balagopal. C. (1985).Cyanide degradation by Rhizopusoryzae.Can J Microbial 31. P 663–669.

Pierre ROGER et Vincent JACQ. (2000). Laboratoire de Microbiologie IRD Institut de Recherche pour le Développement IRD (ex ORSTOM).

Raybuck S.A (1992).Microbes and microbial enzymes for cyanidedegradation. Biodegradation 3. P 3–18.

Joel ROMBA. (2015). Mémoire: risques environnementaux et sanitaires sur les sites d'orpaillage au burkinafaso : cycle de vie des principaux polluants et perceptions des orpailleurs (cas du site zougnazagmligne dans la commune rurale de bouroum, region du centre-nord).

S.K. Dubey and D.S. Holmes (1995). Biological cyanide destruction mediated by microorganisms». World Journal of Microbiology and Biotechnology 11. P 257-265.

S.Potivichayanon and R. Kitleartpornpaioat.(2010). Biodegradation of Cyanide by a Novel Cyanide degrading Bacterium. World Academy of Science, Engineering and Technology.p 66.

Santé Canada. (2011). Le cyanure. de <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/cyanide-cyanure/index-fra.php>.

Sonia Tarnawski. (2004). Thèse : Réponse des populations de Pseudomonas Sp à une augmentation de la concentration en CO2 atmosphérique dans la rhizosphère de Lolium Perenne et Molinia coerulea. PP 61.

Towill. H and R. Gaucher (2010). Apport des MTD pour respecter les objectifs de réduction des rejets de substances dangereuses dans le milieu aquatique et l'atteinte du bon état des masses d'eau : étude de cas appliquée au traitement de surface. Rapport d'étude INERIS n°DRC-10-109429-08790A.

Towill. L.E, J.S. Drury, B.L. Whitfield, E.B. Lewis, E.L. Galyan and A.S. Hammons. (1978). Reviews of the environmental effects of pollutants: Part V, Cyanide. EPA 600/1-78-027. U.S.

Biorémediation du cyanure sur les sites d'orpaillages au Burkina Faso : Cas du site de Zougnazagmiline

Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Health Effects Research Laboratory, Cincinnati, OH.

Ubala OA .(2010).Cyanogenic glycosides and the fate of cyanide in soil. AJCS 4(4):223-237.

Annexes

Tables des annexes

Annexes 1 : Définition des terminologies	II
Annexes 2 : Les activités de la chaîne d'orpaillage	III
Annexes 3 : Protocole d'ensemencement des bactéries dégradeurs de cyanure	V
Annexes 4 : Rendement de biodégradation du cyanure libre	XI

Annexes 1 : Définition des terminologies

Cyanure : Le cyanure désigne le radical anionique $C\equiv N$. C'est un poison toxique présent naturellement en faible quantité dans la nature et dont les grandes quantités sont produites par l'homme.

Orpaillage : c'est la recherche et l'exploitation artisanale de l'or.

Pollution environnementale : c'est la dégradation d'un milieu naturel par des substances extérieures, introduites de manière directe ou indirecte par les activités humaines. La santé humaine, la qualité des écosystèmes et de la biodiversité aquatique et terrestre peuvent être affectés et modifiés de façon durable par la pollution.

Bio-remédiation: elle désigne un ensemble de techniques utilisées pour dépolluer un site naturel (sols, sédiments, eaux de surface et souterraine), mais qui font appel à l'utilisation de micro-organismes, de champignons, de végétaux divers ou d'enzymes qu'ils produisent. Les techniques utilisées sont respectueuses de l'environnement et de la santé humaine.

Autotrophe : Organismes capables d'élaborer eux-mêmes leur matière organique à partir d'éléments minéraux.

Hétérotrophe : sont des organismes qui ne peuvent pas élaborer leur propre matière organique autrement qu'à partir de matières organiques déjà élaborées par d'autres organismes

Abiotique : Un milieu ou des organismes vivants ne peuvent y être.

Nitrobacter : oxydent les nitrites

Nitrosomonas : oxydent l'ammonium.

Annexes 2 : Les activités de la chaîne d'orpaillage

Le fonçage se fait sur plusieurs zones autour du marché. Le fonçage consiste à creuser des puits trous circulaires ou rectangulaires de profondeur allant jusqu'à quatre-vingt-dix mètres (90m) conduisant à des galeries. Les zones de fonçage sont dispersées autour du marché et se fait de manière anarchique.

Le marché constitue le cœur du site d'orpaillage. Pour le concassage, des hangars sont aménagés pour que cette activité soit menée moyennant une certaine somme. Le concassage consiste à écraser la roche contenant le minerai en granulats. Il est surtout mené par les femmes et les enfants et se fait de manière manuelle. Le broyage se fait mécaniquement. Des hommes équipés de broyeurs électriques effectuent cette tâche pour une rémunération. Le broyage réduit le granulats en poudre très fins. Des hangars sont spécialement aménagés pour la récupération des minerais par lavage à l'eau.

Le comptoir se situe à l'entrée du marché. A ce niveau, les orpailleurs ayant trouvé l'or viennent l'y vendre. Le propriétaire du comptoir vend à son tour les minerais à Ouagadougou.

La récupération par le mercure se fait par amalgamation des particules issues du lavage. Les particules sont donc mélangées à du mercure communément appelé « med » sur le site et malaxées avec les mains nues pour former l'amalgame. En effet, pour chaque sac de 50 Kg de minerai lavé sur le site, une boule de mercure métallique Hg⁰ de 14,4 g est utilisée. L'amalgame est ensuite mis dans un morceau de tissu et pressé pour le débarrasser de son eau. Enfin, il est chauffé à l'aide d'un chalumeau à une très haute température. Le mercure s'évapore et l'or obtenu est vendu sur le site après pesée.

La cyanuration est un processus qui consiste à extraire l'or des minerais dans un bassin à l'aide d'une solution cyanurée. C'est la dernière étape de la chaîne d'orpaillage. Les produits utilisés sont le cyanure, l'acide sulfurique, l'acide nitrique et les copeaux de zinc. La cyanuration se fait dans des bassins rectangulaires dont 2 grands bassins larges de 2 m, longs de 4 m et profonds de 0,5 m. Entre les 2 bassins se trouve un petit bassin communément appelé piscine de largeur 0,5m, long de 1m et profond de 1,5m. Le mélange eau-cyanure-minerai est laissé pendant une journée entière pour la dissolution du cyanure et les réactions cyanure-or. Le liquide cyanure-or est dirigé à l'aide de petits orifices vers des tubes en forme de U contenant les copeaux de zinc et disposés dans la piscine. L'eau cyanurée débordante des tubes de la piscine est puisée avec un puisard et reversée dans les grands bassins. Après

Biorémediation du cyanure sur les sites d'orpaillages au Burkina Faso : Cas du site de Zougnazagmiline

trois (03) jours, les tubes sont retirés du bassin et le zinc riche en or est mis dans des bacs. Une solution d'acide sulfurique à 98% est versée dans les récipients contenant le zinc. L'acide sulfurique réagit avec le zinc pour former une solution concentrée. On ajoute de l'acide nitrique à la solution riche en or pour nettoyer les impuretés telles que le fer et l'aluminium. Il se passe une réaction violente dégageant de la fumée rougeâtre (l'acide cyanhydrique) après l'ajout de d'acide nitrique. Dans les récipients, on y ajoute de l'eau et le mélange est laissé au repos pendant au moins 2H. Après décantation, le concentré est mis dans des bacs en aluminium et chauffé à haute température pendant au moins 4H. Les cendres obtenues sont ensuite acheminées à Ouagadougou dans les fonderies pour récupérer l'or.

Annexes 3 : Protocole d'ensemencement des bactéries dégradeurs de cyanure

Objectif

L'objectif de cette manipulation est de découvrir s'il existe parmi les micro-organismes ceux qui se nourrissent de cyanure.

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 trypticsoybroth (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).

Note : Réaliser l'expérience en duplicata

- Boîtes de Pétri pré-identifiées (12 boîtes par échantillon, soit 4 dilutions en triplicatas) ;
- 2 boîtes de Pétri pour contrôle par échantillon qui seront notées 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 ;

Biorémediation du cyanure sur les sites d'orpillages au Burkina Faso : Cas du site de Zougnazagmiline

- Pipetman à embouts stériles (autoclavés) (100µl) ;
- Dispensette de 25 ml ou plus ; Billes en verre pour l'extraction ;
- Pétri en verre avec couvercle contenant environ 3ml 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)
- MSM (voir page 9) ;
- Agar noble (Agar bactériologique OXOID, 500 g code L11 CJNIPATH LTD. Hampshire, England) ;
- Eau purifiée (désionisée) ;
- Eau stérilisée (autoclavée) ;
- Alcool dénaturé (éthanol 85 %) (4 litres, A 407 P-4, Fisher Scientific, Nepean Ontario) ;

***Biorémediation du cyanure sur les sites d'orpillages au Burkina Faso : Cas du site de
Zougnazagmiline***

- 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 Kentucky 4036 1) ;

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

Préparation

- 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 1 en commençant par l'étape 2.

Distribution sur les boites

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 rouvrir au complet. Refermer la boîte et la garder sur le comptoir stérilisé. Procéder ainsi pour les boîtes de Pétri suivantes. Empiler ainsi jusqu'à 5 boîtes de Pétri. NB : l'utilisation de poignets en caoutchouc lors du versement est recommandée pour cet effet.

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 placées 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.

Préparation de la solution saline

Biorémediation du cyanure sur les sites d'orpaillages au Burkina Faso : Cas du site de Zougnazagmiline

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) 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).

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- Brasser 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.

Préparation de l'étalement

1- A l'aide du pipetman, transférer 0,1 ml (100µl) de chaque dilution sur les boîtes de pétri préparés. Jeter L'embout après chaque utilisation.

2- Par un mouvement rotatif en utilisant le tourne disque, étaler la dilution sur le milieu gélatinifié 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}).

3- Après étalement sur boîtes de Pétri, inverser ces dernières, et les empiler une fois de plus, les remettre dans leurs sacs originaux. Ils sont prêts pour l'incubation.

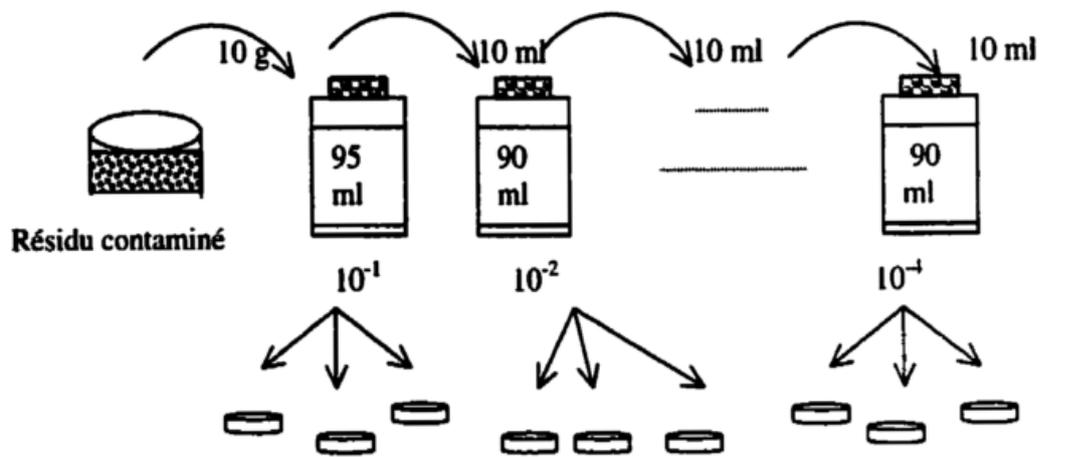
4- L'incubation des boîtes de Pétri s'effectue à 28°C dans l'incubateur, pendant 7 jours (la première lecture), et 15 jours (la deuxième lecture) (Dumestre, 1995)

L'incubateur assure les conditions favorables pur la réalisation de cette méthode (aérobie, température).

5- Remarque : seuls les milieux contenant entre 30 et 300 colonies serviront à énumérer une population.

Procédure pour le comptage des colonies

Les boîtes de Pétri sont retirées au 7^{ème} jour de l'incubateur. Seulement ceux contenant entre 30 et 300 colonies sont considérées. 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.



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
- K_2HPO_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
- 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
- $\text{Al}(\text{SO}_4)_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	474.39	0.4743
- 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

Annexes 4 : Rendement de biodégradation du cyanure libre

Milieux	concentrations de cyanure (mg/L)	rendements %
Milieux sans nutriments	40	95,71
	60	99,38
	80	96,61
Milieux avec nutriments	40	98,61
	60	98,52
	80	95,57