

Protocoles et procédures
20 octobre 2005
Laboratoire de chimie environnementale
Sébastien Sauvé

Table des Matières

1. Manipulations Générales.....	2
1.1. Utilisation de pipettes automatiques.....	3
1.2. Utilisation des balances analytiques	6
1.3. Utilisation de la centrifugeuse	8
1.4. Conditionnement de la verrerie pour analyses d'éléments traces.....	9
1.5. Manipulations et élimination des sols de provenance étrangère importés pour la recherche	10
1.6. Préparation des solutions standards	12
2. Traitements d'échantillons.....	15
2.1. Digestion acide de sols pour métaux totaux récupérables (<i>total-recoverable</i>) sur plaque chauffante.....	16
2.2. Digestion acide « eau régale- <i>aqua regia</i> » d'un sol au four à micro-ondes « Milestone ».....	20
2.3. Extraction d'une solution de sol pour détermination des métaux dissous	25
2.4. Broyage de sol en poudre	27
2.5. Ajustement du taux d'humidité d'un sol.....	28
2.6. Mesures du pH d'un sol	30
2.7. Fractionnement des extraits organiques en composants aliphatiques et aromatiques	31
3. Procédures et équipements analytiques	33
3.1. Détermination de la teneur en eau d'un échantillon solide.....	34
3.2. Détermination du cuivre libre par électrode à ion spécifique.....	36
3.3. Détermination des Cu et Cd totaux dans les échantillons de sols contaminés via l'absorption atomique (AAS).....	38
3.4. Préparation de gels diffusifs et gels de résine (DGT).....	40
3.5. Utilisation de l'appareil TOC pour les échantillons solides (Carbone total dans les sols)	43
3.6. Utilisation de ICP-AES IRIS	50
3.7. Détermination de l'activité de la déshydrogénase dans les sols	60
3.8. Détermination de l'activité de l'uréase dans les sols	64
3.9. Mesure du potentiel de nitrification dans les sols	68
3.10. La respiration induite	74

1. Manipulations Générales

1.1. Utilisation de pipettes automatiques

Par: Carmen Donisa et Sébastien Sauvé

Dernière révision: 9 février 2004

Source initiale: n/a

1. *But et application*

Utiliser les pipettes automatiques avec précision et sans les endommager. Permet de mesurer et délivrer des volumes de 10 μL à 10 mL. Ne pas utiliser pour les acides concentrés, pour les acides, veuillez plutôt utiliser soit les pipettes de verre standard, soit les pipettes fixées aux bouteilles qui sont résistantes aux produits corrosifs.

2. *Matériel*

- Pipettes de grosseurs variées
- Embouts de pipettes assortis

3. *Aspiration des solutions*

Fixer le volume à mesurer (l'afficheur est constitué de 3 chiffres, la lecture se fait de haut en bas).

Monter le cône approprié sur l'embout port-cône.

Ne jamais manipuler un liquide avec une pipette sans l'avoir au préalable équipée d'un cône! **Faire très attention de ne pas aspirer de liquide à l'intérieur de la pipette**, si c'est le cas, la rincer immédiatement avec de l'eau distillée et dans la mesure du possible la rincer et l'assécher à l'intérieur. Si vous êtes incapable de bien utiliser les pipettes automatiques, utilisez les pipettes de verres avec des poires. **En cas de négligence de votre part vous pourriez être responsable de l'achat d'une nouvelle pipette de remplacement (300 à 500\$).**

Chaque fois que vous utilisez une pipette, vous devez vérifier sa calibration : aspirez le volume d'eau MQ à mesurer (fixé sur l'afficheur) et pesez-le avec une balance pour vérifier si le volume est correct. Il faut bien savoir que le volume indiqué sur les contrôles de pipettes correspond rarement au volume exact livré, il est par contre critique que ce volume soit répétable d'une mesure à l'autre.

Ne jamais aspirer les solutions standard directement de la bouteille! Vous pouvez contaminer toute la bouteille!

Vous devez mettre une petite quantité de solution dans un bécher et après utiliser la pipette.

Pour assurer l'étanchéité appuyer fermement le cône sur l'embout en effectuant un mouvement de rotation.

Peser le bouton poussoir jusqu'à la première butée positive (A).

En maintenant la pipette verticale plonger l'extrémité du cône dans l'échantillon à prélever.

Relâcher **lentement** et **régulièrement** le bouton poussoir pour aspirer le liquide dans le cône (B).

Attendre 1 seconde et retirer le cône du liquide. Essuyer éventuellement les gouttelettes de liquide qui pourraient adhérer sur la paroi extérieure du cône avec un papier non tissé (par exemple un mouchoir de laboratoire Kimwipe).

Prendre soin de ne pas toucher l'orifice du cône! Pour vous assurer que vous ne touchez pas les cônes il est mieux de les garder dans un sac de plastique de type Ziploc.

Il est important de faire un pré-rinçage de la pipette avec la solution à mesurer lorsque les solutions ont une densité différente de celle de l'eau (telles que les solvants organiques) et qui peuvent adhérer sur la paroi interne du cône.

4. Distribution des solutions

Placer l'extrémité du cône de façon à former un angle de 10 à 40° contre la paroi interne du tube récepteur. Presser **doucement** le bouton poussoir jusqu'à la première butée positive (C). Attendre 1 seconde. Presser complètement le bouton poussoir afin d'expulser la dernière fraction de liquide. (D).

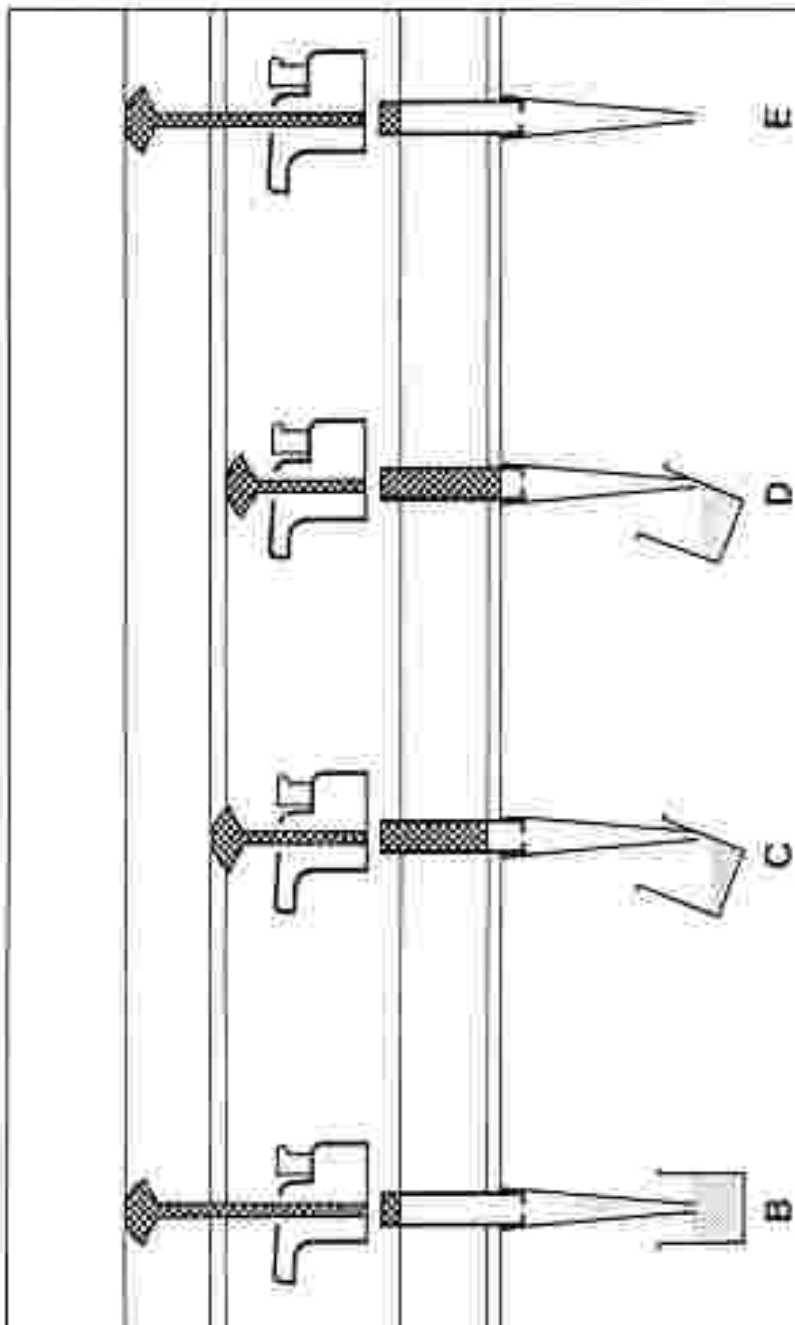
Tout en maintenant le bouton poussoir complètement pressé, retirer la pipette tout en glissant le cône le long de la paroi du tube récepteur.

Relâcher complètement le bouton poussoir (E).

Pour les solutions modérément denses et visqueuses, il est possible d'effectuer une compensation en augmentant la valeur du volume par rapport à la valeur désirée (en se calibrant à l'aide d'une balance analytique).

Pour les solutions moins denses et visqueuses que l'eau il est possible d'effectuer une compensation en diminuant la valeur du volume par rapport à la valeur désirée.

Lors de la distribution de liquides denses ou visqueux, avant d'expulser la dernière fraction de liquide, attendre une seconde supplémentaire à la première butée positive.



1.2. Utilisation des balances analytiques

Par: Carmen Donisa

Dernière révision: 24 avril 2003

Source initiale: n/a

1. Matériel

- Balance d'analyse électronique Sartorius A 200 S

2. Préparation

Avant de commencer à peser on doit s'assurer de la PROPRETÉ de la balance. Pour ça on doit enlever le plateau et tout les autres pièces et en utilisant la brosse nettoyer la chambre de la balance.

Il est important de s'assurer que la balance est parfait équilibre et que la bulle, dans le coin à droite, soit à l'intérieur du cercle noir.

Pour mettre la balance en fonction on doit appuyer la touche ON/OFF. De plus, vous pouvez effectuer la mise sous tension par la touche de tare (T).

Avant d'effectuer une pesée, on doit tarer la balance si on utilise un récipient ou si l'affichage n'indique pas 0,0000 g (ou bien une autre unité de poids correspondante).

3. Calibration de la balance

Il est possible de faire une calibration interne et externe de la balance.

Calibration interne:

Décharger la balance et tarer. Lorsque 0,0000 g apparaît à l'affichage, appuyer sur la touche CAL. À l'affichage du poids apparaît la lettre « C ». À l'affichage de « CE » tarez et appuyez à la nouveau sur la touche CAL. Au bout de quelques secondes il apparaît « CC » à l'affichage, puis 0,0000 g. Un bip sonore vous indique la fin de la procédure de calibration.

Calibration externe:

Calibration possible seulement avec un poids de calibration précis.

Procédures expérimentales—Laboratoire de chimie analytique environnementale (Sauvé)

Avec cette balance vous pouvez peser en grammes mais aussi dans d'autres unités de poids internationales. Pour ça vous devez utiliser le programme d'exploitation de la balance (voir le manuel d'utilisation!).

1.3. Utilisation de la centrifugeuse

Par: Sébastien Sauvé

Dernière révision: 24 avril 2003

Source initiale: n/a

1. But

Séparer une phase solide et une phase liquide.

2. Matériel

- Tubes de centrifugeuses de 50 ml (capacité maximale ~40 ml).
- Centrifugeuse Sorvall RC 2B

3. Précautions

Veillez à toujours bien équilibrer le nombre de tubes et leurs poids dans la centrifugeuse pour éviter les accidents et les bris d'appareils.

Donc, si vous avez un nombre d'échantillons impair, utilisez un tube identique rempli de suffisamment d'eau pour équilibrer le poids de chaque côté.

4. Manipulations

Augmenter la vitesse graduellement jusqu'à (11 500 rpm ~10 000g).

Pour les extraits de sols, une centrifugation de 15 min devrait suffire, pour les sols ou les médiums très organiques, une période plus longue pourrait s'avérer nécessaire.

1.4. Conditionnement de la verrerie pour analyses d'éléments traces

Par: Luc Lavoie

Dernière révision: 24 avril 2003

Source initiale: n/a

1. But

Nettoyer la verrerie pour s'assurer qu'il n'y ait pas de contaminants.

2. Matériel

- Contenant de plastique
- Acide nitrique qualité réactifs ACS (PAS NÉCESSAIRE d'utiliser la qualité trace, trop dispendieux inutilement)

3. Procédure

Dans un contenant en plastique de 15 à 20 litres, on prépare 10 litres d'une solution d'acide nitrique ~10% par dilution de 1.5 litres d'acide nitrique concentré 70% dans 8.5 litres d'eau déionisée (DI).

La verrerie à conditionner est plongée dans cette solution pendant au moins 2 heures et idéalement pour la nuit, puis rincée abondamment à l'eau déionisée.

La verrerie est alors séchée à l'air, au besoin.

1.5. Manipulations et élimination des sols de provenance étrangère importés pour la recherche

Par: Sébastien Sauvé

Dernière révision: Mai 2002

Source initiale: Entente avec l'Agence canadienne d'inspection des aliments du Canada

1. But

Assurer la protection de l'environnement canadien contre les pathogènes étrangers potentiellement présents dans les sols importés.

2. Contexte

Les sols importés représentent un risque de propagation de pathogènes, parasites et/ou d'autres agents biologiques. Pour remédier à cette situation les sols et les solutions exposés aux sols doivent être traités avant leur élimination et un protocole strict doit être suivi pour pouvoir rendre compte des échantillons que nous avons et de ce que nous en faisons.

3. Procédures

Un permis d'importation distinct est requis pour chaque chercheur et/ou provenance.

À l'arrivée au laboratoire assurez-vous avec Sébastien Sauvé (au D-646, téléphone: 343-6749) que les échantillons sont enregistrés dans le registre à cet effet. L'inscription au registre doit inclure l'origine, les caractéristiques, le responsable du projet et un numéro d'identification approprié. Inclure une copie du permis d'importation dans le registre.

Les sols étrangers seront conservés dans l'armoire barrée #5, face qu D-644, soit dans des sacs de plastiques résistant ou dans des contenants de plastique. L'ensemble des sols d'une provenance quelconque seront conservés dans une boîte spécialement identifiée « Sols étrangers – Manipulation particulière » ainsi que le nom de la personne responsable du projet et son local.

Les sols après leur utilisation ainsi que les solutions exposées aux sols doivent être récupérés, disposés dans un contenant à moins de 2.5 cm d'épaisseur et mis à l'étuve

Procédures expérimentales—Laboratoire de chimie analytique environnementale (Sauvé)

à 121°C (minimum). Les résidus doivent être conservés à cette chaleur pour au moins 12 heures.

Les résidus solides seront étiquetés « résidus chimiques » et doivent être confiés au service de gestion des déchets de l'Université de Montréal (a/s Suzanne Deguire, local G-535, téléphone 343-6111, poste 4000) qui s'occupera de les faire acheminer vers un site d'enfouissement approprié. Une preuve de prise en charge des résidus de sols doit être envoyée au responsable de l'Agence canadienne d'inspection des aliments (voir ci-dessous).

Pour des questions contacter Sébastien Sauvé (local D-646).

Pour obtenir un permis :

Louis-Alix André

Agence canadienne d'inspection des aliments

Importation/protection des végétaux

7101 Jean-Talon est, Suite 600

Anjou, QC, H1M 3N7

Tel : 514 493-6674 poste 232

Fax : 514 493-6154

1.6. Préparation des solutions standards

Par: Luc Lavoie

Dernière révision: 24 avril 2002

Source initiale : n/a

1. *But*

2. *Contexte*

Les instruments d'analyse (ex. AAS, ICP–AES, etc.) ne donnent pas les résultats directement en unités de concentration des métaux analysés. Pour obtenir ces concentrations, il est nécessaire de construire les courbes d'étalonnage qui donnent la relation entre les indications des appareils et la concentration du métal analysé.

3. *Procédures*

4. *Préparation des solutions standards de Cu;*

- La teneur des sols étudiés en Cu est entre 20 et 200 ppm (mg / kg de sol).
- Le domaine de linéarité de l'analyse du Cu par Absorption Atomique sur l'appareil Perkin-Elmer 703 va de 0.077 mg/L à 5 mg/L pour $\lambda = 324.8$ nm (manuel Perkin-Elmer, January 1982)

Préparation du standard 5 mg/L. On verse quelques ml de la solution étalon de cuivre dans un bécher 10 ml et on prélève à la micropipette 500 μ l de cet étalon dans une fiole jaugée 100 ml identifiée. On complète au trait de jauge avec environ 100 ml de solution HNO₃ 20%.

Préparation du standard 2.5 mg/L. On prélève 50 ml du standard 5 ppm à la pipette de 50 ml que l'on transfère dans une autre fiole jaugée 100 ml identifiée. On complète au trait de jauge avec environ 50 ml de solution HNO₃ 20%. Il reste donc 50 ml de la solution standard 5 mg/L.

Préparation du standard 1 mg/L. On prélève 20 ml du standard 5 mg/L à la pipette de 20 ml et on transfère dans une troisième fiole jaugée 100 ml identifiée. On complète au

trait de jauge avec environ 80 ml de solution HNO₃ 20%. Il reste alors 30 ml de la solution standard 5 mg/L.

Préparation du standard 0.5 mg/L. On prélève 20 ml du standard 2.5 mg/L à la pipette de 20 ml et on transfère dans une quatrième fiole jaugée 100 ml identifiée. On complète au trait de jauge avec environ 80 ml de solution HNO₃ 20%. Il reste alors 80 ml de la solution standard 2.5 mg/L.

Préparation du standard 0.25 mg/L. On prélève 50 ml du standard 0.5 mg/L à la pipette de 50 ml et on transfère dans une cinquième fiole jaugée 100 ml identifiée. On complète au trait de jauge avec environ 50 ml de solution HNO₃ 20%. Il reste finalement 50 ml de la solution standard 0.5 mg/L et 100 ml de la solution standard 0.25 mg/L.

5. Préparation des solutions standards de Cd;

- La teneur des sols étudiés en Cd est entre 0.3 et 1.6 ppm (mg / kg de sol).
- Le domaine de linéarité de l'analyse du Cd par Absorption Atomique sur l'appareil Perkin-Elmer 703 va de 0.028 mg/L à 2 mg/L pour $\lambda = 228.8$ nm (manuel Perkin-Elmer, January 1982).

Préparation du standard 2 mg/L. On verse quelques ml de la solution étalon de cadmium dans un bécher 10 ml, et on prélève à la micropipette 200 μ l de cet étalon de cadmium que l'on transfère dans une fiole jaugée 100 ml identifiée. On complète au trait de jauge avec environ 100 ml de solution HNO₃ 20%.

Préparation du standard 1 mg/L. On prélève 50 ml du standard 2 mg/L à la pipette de 50 ml que l'on transfère dans une autre fiole jaugée 100 ml identifiée. On complète au trait de jauge avec environ 50 ml de solution HNO₃ 20%. Il reste donc 50 ml de la solution standard 2 mg/L.

Préparation du standard 0.5 mg/L. On prélève 50 ml du standard 1 mg/L à la pipette de 50 ml et on transfère dans une troisième fiole jaugée 100 ml identifiée. On complète au trait de jauge avec environ 50 ml de solution HNO₃ 20%. Il reste alors 50 ml de la solution standard 1 mg/L.

Préparation du standard 0.1 mg/L. On prélève 20 ml du standard 0.5 mg/L à la pipette de 20 ml et on transfère dans une quatrième fiole jaugée 100 ml identifiée. On complète au trait de jauge avec environ 80 ml de solution HNO₃ 20%. Il reste alors 80 ml de la solution standard 0.5 mg/L.

Préparation du standard 0.05 mg/L. On prélève 50 ml de la solution standard 0.1 mg/L à la pipette de 50 ml et on transfère dans une cinquième fiole jaugée 100 ml identifiée. On complète au trait de jauge avec environ 50 ml de solution HNO₃ 20%. Il reste finalement 50 ml de la solution standard 0.1 mg/L et 100 ml de la solution standard 0.05 mg/L.

Les solutions sont ensuite transférées dans des bouteilles de plastique de type Nalgene.

6. Exemple de calcul : préparation du standard 5 mg/L de Cu :

De la solution étalon stock de 1000 mg/L, on veut obtenir une solution 5 mg/L de 100 mL. Le facteur de dilution sera de : $1000 \text{ mg/L} / 5 \text{ mg/L} = 200$

De $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, on a $1000 \text{ mg/L} \cdot V_1 = 5 \text{ mg/L} \cdot 100 \text{ mL}$

où:

$C_1 = 1000 \text{ mg/L}$ (concentration de l'étalon de cuivre)

V_1 , le volume d'étalon Cu à prélever pour obtenir 100 mL de solution 5 mg/L

$C_2 = 5 \text{ mg/L}$, la concentration de la solution standard que l'on vise à obtenir

$V_2 = 100 \text{ mL}$, le volume de la solution standard que l'on vise à obtenir

On détermine V_1 ;

$$V_1 = \frac{C_2}{C_1} \cdot V_2 = \frac{5 \text{ mg/L}}{1000 \text{ mg/L}} \cdot 100 \text{ mL} = 500 \text{ mL}$$

Donc, en ajoutant 500 mL de l'étalon de cuivre 1000 mg/L dans une fiole jaugée 100 mL et en complétant le volume au trait de jauge avec 100 mL d'acide nitrique 20% (matrice), on obtient 100 mL de standard 5 mg/L de cuivre.

2. Traitements d'échantillons

2.1. Digestion acide de sols pour métaux totaux récupérables (*total-recoverable*) sur plaque chauffante

Par: Sébastien Sauvé, Michel Villena et Luc Lavoie

Dernière révision: 9 février 2004

Source initiale: n/a

1. But et application

Préparation des échantillons pour la détermination de la quantité totale des éléments dans les eaux souterraines, les eaux de surface, l'eau potable, les eaux résiduelles et à l'exception de la silice, dans les sédiments, les boues et les déchets solides.

Dans ce cas, le but est de transformer la quasi-totalité des éléments traces présents dans une matrice solide et de solubiliser dans un acide concentré. Comme on cherche à obtenir la concentration exacte, il est important de bien mesurer le poids sec exact de la matrice utilisée (e.g. même un sol qui à l'air pas mal sec pourrait avoir 15% p/p d'humidité). Comme c'est un rapport de masse sur le volume d'acide, il est aussi critique de récupérer totalement l'acide utilisé (sans perte par vapeur ou autre).

2. Précautions

L'usage des gants, sarrau, et lunettes de protection est obligatoire.

3. Matériels

- 1 plaque chauffante
- Papier aluminium
- 1 cylindre gradué 10 ml
- Pipettes
- Béchers 100 mL
- Verres de montre de 9 cm
- Spatules de plastique
- Flacon laveur d'eau distillée
- Entonnoirs à filtration de plastique de 7,2 cm
- Support à entonnoirs en bois
- Filtres de papier Whatman No. 41 ou Fisher 5

- Fioles jaugées: 50 mL, 100 mL ou 200 mL
- Membranes 0.45 µm
- Support à membranes

4. Réactifs

- Acide nitrique concentré, (qualité Fisher-Trace metal grade ou supérieur).
- Eau déionisée (DI)
- échantillon(s) de sol(s) préalablement séché(s) et broyé(s).

5. Manipulations

- Tout le matériel doit être propre et préalablement lavé au savon de laboratoire, trempé dans l'acide nitrique dilué (1 nuit) et rincé abondamment à l'eau déionisée.
- Mélanger l'échantillon préalablement séché dans une étuve (70°C), pour l'homogénéiser.
- Peser exactement environ 0,5000 g (de 0,3 à 1,0 g) par échantillon, on utilise moins d'échantillon quand c'est très contaminé et inversement quand on est proches des limites de détection. Il est aussi préférable de diminuer la masse utilisée pour les échantillons très organiques qui pourraient faire des bouillons et de l'écume.
- Transférer l'échantillon dans un bécher de 100 mL. Utiliser un papier de pesée si nécessaire.
- Ajouter 10 mL d'acide nitrique concentré et ensuite couvrir avec un verre de montre.
- Déposer les béchers préparés sur la plaque chauffante et amener graduellement la température juste sous le point d'ébullition (assez pour voir quelques bulles fines se former dans l'acide mais sans avoir de gros bouillons). Maintenir juste sous le point d'ébullition pendant 1 heure.
- Lors de la digestion quelques bulles peuvent apparaître mais la forte ébullition doit être évitée. Si ça se produit, tenter de tourner légèrement les béchers pour vous assurer qu'il n'y ait pas de résidus qui collent sur les parois du bécher sans être dans l'acide.
- Note : Pour l'ajustement et le contrôle de la température de la plaque chauffante, un bécher rempli d'eau découvert placé au centre de la plaque chauffante doit être maintenu à une température d'environ 85°C (au maximum).
- **Laisser refroidir les échantillons sur la plaque** avant de les manipuler, l'acide bouillante est très corrosif.
- Un papier filtre est installé sur un entonnoir et on fixe cet entonnoir sur le support à entonnoirs avec une fiole jaugée de 50 ml ou 100 mL identifiée en-dessous. Le papier filtre se plie en 4 et après est mouillé légèrement à l'aide du flacon laveur

d'eau DI. Le contenu du bécher est ensuite filtré par gravité dans la fiole jaugée de 50 ml (ou 100 mL).

- On veille à bien recueillir tout l'acide du bécher et sur le verre de montre à l'aide du flacon laveur. Une fois l'acide filtré et complètement refroidit, on rince le papier filtre avec le flacon laveur et on complète le volume de la fiole jaugée au trait (N'oubliez pas que la densité et le volume changent avec la température).
- Si la solution est turbide, il peut s'avérer nécessaire de filtrer la solution avec des membranes 0.45 µm placée sur un support de plastique approprié.
- On transfère une quantité suffisante d'acide dans des contenants de plastiques de type Nalgene bien fermés et identifiés. Les solutions sont suffisamment concentrées en acide qu'elles n'ont pas besoin d'être conservées au frigo. On ne laisse pas les digestions dans les ballons jaugés, on dispose de l'acide en surplus et on les lave pour usage ultérieur.
- L'échantillon est maintenant prêt à être soumis à une analyse par spectroscopie d'absorption atomique ou si les concentrations sont plus basses par spectrométrie d'émission atomique par plasma (ICP), ou une autre méthode de détection appropriée.
- Pour une analyse par ICP, pipeter 10 mL de l'échantillon dans une fiole 50 mL et si l'échantillon est trop concentré, compléter au volume avec l'eau et agiter (la solution finale devrait être à 2% HNO₃ ou même 0.2% selon le cas).
- Pour chaque série de 8 échantillons, inclure un blanc d'acide (donc un bécher traité de façon identique à tous les échantillons mais dans lequel il n'y a que l'acide) et un échantillon de contrôle de qualité d'une matrice similaire mais pour laquelle vous avez des valeurs de concentrations certifiées.
- Les digestions acides des sols doivent être faites en duplicata ou en triplicata selon le niveau de variabilité attendue (et la disponibilité de l'échantillon). Donc pour chaque sol, on pèse deux ou trois aliquots et on effectue la digestion acide sur chacun de ces aliquots.
- Pour éviter les effets de matrice sur la stabilité des échantillons dilués, les analyses doivent être faites le plus tôt possible après la fin de la préparation des échantillons. Les solutions de digestion d'acides concentrés devraient cependant se conserver assez longtemps.

6. Calculs

Formule générale:

$$mg \cdot kg^{-1} M = \frac{mg \cdot L^{-1} M \cdot V}{m}$$

où :

M = métal

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ = valeur lue par AAS / ICP- AES

V = volume flacon jaugé (mL)

m = la masse du sol pesé (g)

7. Exemple :

1.0733 g de sol sec sont digérés avec 10 mL de HNO_3 conc. et complété à 50 mL avec de l'eau déionisée et la concentration de cuivre est ensuite mesurée absorption atomique ou autre.

La concentration de la solution en mg/L (ppm) doit être corrigée pour le blanc (digestion de l'acide seul).

Par exemple, une concentration en solution dans l'échantillon de 0.3685 mg/L et une concentration dans le blanc de 0.0021 mg/L va donc donner 0.3664 mg/L de cuivre dans l'acide de la digestion de l'échantillon.

Or on veut trouver la concentration en Cu dans le sol (en mg/kg de sol sec).

On trouve la quantité de cuivre dans la solution 50.0 mL est de :

$$0.3664 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \cdot 50.0 \text{ ml} \text{ est équivalent à } 0.3664 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \cdot 0.0500 \text{ l} \text{ ou encore}$$

0.0183 mg de cuivre dans l'échantillon.

Comme on avait au départ 1.0733g de sol sec, on a donc : $\frac{0.0183 \text{ mg de Cu}}{1.0733 \text{ g de sol sec}}$

En assumant une digestion complète, on a alors une concentration de :

$$\frac{0.0183 \text{ mg de Cu}}{1.0733 \text{ g de sol sec}} \cdot \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} = 17.05 \text{ mg Cu/kg sol sec}$$

2.2. Digestion acide « eau régale-*aqua regia* » d'un sol au four à micro-ondes « Milestone »

Par: Sébastien Sauvé

Dernière révision: 31 Mai 2004

Source initiale: Digestion Application Report # 03-001 (du Manuel Milestone)

1. But et application

Le but de cette expérience est d'effectuer une digestion acide d'un sol (ou une autre matrice) à haute température et pression. À préférer à la plaque chauffante si on tient à analyser les éléments volatils (eg. Se, Hg) ou encore si on cherche à solubiliser une portion des silicates ou qu'on a affaire à une matrice ou un analyte récalcitrant (eg. Pt) où encore que les masses à analyser sont petites et que les blancs doivent être excessivement propres.

2. Matériels et réactifs

- HNO₃ concentré (Trace metal grade).
- HCl concentré (Trace metal grade).
- Sol à étudier.
- Ballons jaugés.
- Four à micro-ondes Milestone.
- Rotor à 12 monoblocs pour digestion.
- Agitateur magnétique de Teflon.
- Bombe de digestion de Teflon.
- Flacon laveur d'eau distillée
- Entonnoirs à filtration de plastique de 7,2 cm
- Support à entonnoirs en bois
- Filtres de papier Whatman No. 41 ou Fisher 5
- Fioles jaugées: 50 mL, 100 mL ou 200 mL
- Membranes 0.45 µm
- Support à membranes

3. Précautions

- Pour des raisons de sécurité, il est impératif de veiller à n'utiliser que du matériel Milestone pour acide
- Toutes les manipulations, avant et après la digestion, doivent être effectuées sous la hotte.
- La sonde du thermomètre est très fragile et très dispendieuse (+ de 1000\$). Il faut prendre beaucoup de précautions en la manipulant : pour cela, on ne l'installe qu'en dernier, et on l'enlève en premier dès que la digestion est terminée.
- Chaque élément de monobloc est numéroté de 0 (température de référence) à 12 (il n'y a pas de numéro 1) : veiller à ne pas intervertir ces éléments entre eux.

4. Manipulations

Dans un flacon de Teflon (TFM), peser exactement environ 0.3000 g de sol sec broyé (voir méthode). Faites attention d'utiliser l'ensemble de bombes de Teflon dédié aux digestions acide et non l'ensemble pour extraction avec solvants organiques.

À l'aide d'une éprouvette de verre graduée, ajouter lentement 9.0 mL d' HNO_3 concentré (Trace metal grade), puis 3.0 mL d' HCl concentré (Trace metal grade).

Placer un agitateur magnétique Milestone « spécial acide ».

Refermer le flacon, remonter l'ensemble des pièces dans le segment monobloc, puis le serrer à l'aide de la clé dynamométrique.

Placer le tout dans le four à micro-ondes.

5. Programmation du four

NB : La puissance utilisée dépend du nombre d'échantillon ; au delà de 4 échantillons, il est préférable de laisser la puissance du four à micro-ondes à 1000 W.

Étape	Temps	Puissance	Température
1	5 min	1000 W	220 °C
2	10 min	1000 W	220 °C

6. Précautions

- L'acide chaud est maintenant sous haute pression.
- Pour des raisons de sécurité, il faut d'abord refroidir chacun des segments (jusqu'à ce qu'on soit capable de les manipuler à main nue).

- Une fois la paroi extérieure du cylindre refroidie à température ambiante, l'acide à l'intérieur est toujours chaud et sous pression : il faut dévisser le segment très lentement, et en gardant le côté le plus large tourné vers soi, en cas de projections d'acide.
- Un papier filtre est installé sur un entonnoir et on fixe cet entonnoir sur le support à entonnoirs avec une fiole jaugée de 50 ml ou 100 mL identifiée en dessous. Le papier filtre se plie en 4 et il est ensuite mouillé légèrement à l'aide du flacon laveur d'eau DI. Le contenu du bécher est ensuite filtré par gravité dans la fiole jaugée de 50 ml (ou 100 mL).
- On veille à bien recueillir tout l'acide du bécher et sur le verre de montre à l'aide du flacon laveur. Une fois l'acide filtré et complètement refroidit, on rince le papier filtre avec le flacon laveur et on complète le volume de la fiole jaugée au trait (N'oubliez pas que la densité et le volume changent avec la température).
- Si la solution est turbide, il peut s'avérer nécessaire de filtrer la solution avec des membranes 0.45 μm placée sur un support de plastique approprié.
- On transfère une quantité suffisante d'acide dans des contenants de plastiques de type Nalgene bien fermés et identifiés. Les solutions sont suffisamment concentrées en acide qu'elles n'ont pas besoin d'être conservées au frigo. On ne laisse pas les digestions dans les ballons jaugés, on dispose de l'acide en surplus et on les lave pour usage ultérieur.
- L'échantillon est maintenant prêt à être soumis à une analyse par spectroscopie d'absorption atomique ou si les concentrations sont plus basses par spectrométrie d'émission atomique par plasma (ICP), ou une autre méthode de détection appropriée.
- Pour une analyse par ICP, pipeter 10 mL de l'échantillon dans une fiole 50 mL et si l'échantillon est trop concentré, compléter au volume avec l'eau et agiter (la solution finale devrait être au maximum 5% HNO_3 pour l'ICP-AES, ou bien 2% ou même 0.2% pour l'ICP-MS).
- Pour chaque série de 12 échantillons, inclure un blanc d'acide (donc une bombe traitée de façon identique à tous les échantillons mais dans lequel il n'y a que l'acide) et un échantillon de contrôle de qualité d'une matrice similaire mais pour laquelle vous avez des valeurs de concentrations certifiées.
- Les digestions acides des sols doivent être faites en duplicata ou en triplicata selon le niveau de variabilité attendue (et la disponibilité de l'échantillon). Donc pour chaque sol, on pèse deux ou trois aliquots et on effectue la digestion acide sur chacun de ces aliquots.
- Pour éviter les effets de matrice sur la stabilité des échantillons dilués, les analyses doivent être faites le plus tôt possible après la fin de la préparation des échantillons. Les solutions de digestion d'acides concentrés devraient cependant se conserver assez longtemps.

7. Calculs

Formule générale:

$$mg \cdot kg^{-1} M = \frac{mg \cdot L^{-1} M \cdot V}{m}$$

où :

M = métal

mg.L⁻¹ = valeur lue par AAS /ICP- AES

V = volume flacon jaugé (mL)

m = la masse du sol pesé (g)

8. Exemple :

1.0733 g de sol sec sont digérés avec 10 mL de HNO₃ conc. et complété à 50 mL avec de l'eau déionisée et la concentration de cuivre est ensuite mesurée absorption atomique ou autre.

La concentration de la solution en mg/L (ppm) doit être corrigée pour le blanc (digestion de l'acide seul).

Par exemple, une concentration en solution dans l'échantillon de 0.3685 mg/L et une concentration dans le blanc de 0.0021 mg/L va donc donner 0.3664 mg/L de cuivre dans l'acide de la digestion de l'échantillon.

Or on veut trouver la concentration en Cu dans le sol (en mg/kg de sol sec).

On trouve la quantité de cuivre dans la solution 50.0 mL est de :

$$0.3664 \frac{mg}{l} \cdot 50.0 \text{ ml} \text{ est équivalent à } 0.3664 \frac{mg}{l} \cdot 0.0500 \text{ l} \text{ ou encore}$$

0.0183 mg de cuivre dans l'échantillon.

$$\text{Comme on avait au départ 1.0733g de sol sec, on a donc : } \frac{0.0183 \text{ mg de Cu}}{1.0733 \text{ g de sol sec}}$$

En assumant une digestion complète, on a alors une concentration de :

$$\frac{0.0183 \text{ mg de Cu}}{1.0733 \text{ g de sol sec}} \cdot \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} = 17.05 \text{ mg Cu/kg sol sec}$$

9. Lavage

On lave d'abord les flacons à l'aide d'une brosse, à l'eau chaude et au savon. On rince abondamment à l'eau distillée.

On utilise ensuite la même méthode que pour la digestion (mêmes acides, mêmes volumes, mêmes températures, et mêmes temps). Mais sans échantillons, il faut utiliser la puissance du four au maximum. On rince ensuite au moins fois fois avec de l'eau déionisée.

2.3. Extraction d'une solution de sol pour détermination des métaux dissous

Par: Sébastien Sauvé

Dernière révision: 28 avril 2003

Source initiale: Sauvé S. 2002. Speciation of metals in soils. IN Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes and Plants. H. E. Allen. (ED). Society for Environmental Toxicology and Chemistry Pensacola, FL, USA. pp. 7-58.

1. *But*

Obtenir une solution représentative d'un pseudo équilibre entre la phase solide et la phase liquide d'un échantillon de sol.

2. *Matériel*

- Tubes de centrifugeuses de 50 ml (capacité maximale ~40 ml).
- Support de tubes de centrifugeuse
- Centrifugeuse modèle
- Support de filtre membrane de 2.5 cm
- Membrane cellulosique de 0.45 µm
- Seringues
- Agitateur/rotateur

3. *Manipulations*

Sachant connaissant le % humidité, on prend l'équivalent de 10 g de sol sec pour environ 20 mL de KNO₃ 0.01 M mis dans un tube de centrifugation.

Exemple : avec 20% d'humidité pour un sol donné, il faudra prendre approximativement :

$$10 \text{ g (sec)} / (100\% - 20\%) = 10 \text{ g} / 0.80 = 12 \text{ grammes}$$

Ce 12 g (10 g ≈ 10 mL de sol, 2 mL d'eau) sera mélangé avec 18 mL de KNO₃ 0.01 M.

Pour les sols et médium organiques (>20-30% C), on utilisera un ratio solide:liquide de 1:10 au lieu de 1:2, donc 2 g de solides pour 20 mL de solution.

Procédures expérimentales—Laboratoire de chimie analytique environnementale (Sauvé)

Les tubes de centrifugation sont disposés horizontalement sur un agitateur mécanique. On fait l'agitation pendant au moins 12 h (overnight).

Les tubes sont ensuite centrifugés à 11000 RPM (10000 *g*) pendant 15 min, 30 min, si l'échantillon est organique. Les surnageants sont transférés dans des béchers, on jette les dépôts solides décantés.

Les pH des surnageants sont mesurés au pH-mètre.

Les surnageants sont transférés dans une seringue de 30 mL en plastique. Une membrane filtre 0.45 μm est fixée sur le support approprié et utilisée pour filtrer le surnageant.

Le filtrat peut ensuite être utilisé pour le pH, la détermination du pCu^{2+} , pour l'analyse par polarographie, pour la conductivité ou pour les métaux totaux dissous.

2.4. Broyage de sol en poudre

Par: Luc Lavoie et Sébastien Sauvé

Dernière révision: 9 Février 2004

Source initiale: n/a

1. But

Obtenir un échantillon de sol broyé pour analyse ultérieure.

2. Matériel

- Un mortier et un pilon inerte (en diamonite (de couleur rose) ou en agate), environ 50 ml de capacité, et environ 10 cm de long (La céramique est à proscrire, elle contaminera l'échantillon).
- Un contenant ou un sac approprié pour conserver l'échantillon broyé.
- Papier de pesée.

3. Manipulations

Le mortier et pilon sont nettoyés à la brosse et à l'eau chaude, trempés quelques secondes dans l'acide nitrique 10%, rincés abondamment à l'eau déionisée (DI), puis asséchés avec des mouchoirs, ou avec un peu d'acétone, si on doit aller rapidement.

La coupelle contenant l'échantillon de sol sec est vidée au complet dans le mortier, et le sol est broyé en poudre par l'action du pilon (utiliser des gants en latex non-poudrés afin d'éviter une contamination provenant des mains).

Le sol broyé est alors transféré dans un nouveau contenant. On peut, si nécessaire, on peut déposer l'échantillon broyé sur un papier de pesée pour faciliter le transfert dans le contenant ou le sac de l'échantillon.

Le mortier et le pilon sont ensuite nettoyés à nouveau et on recommence avec l'échantillon suivant (voir étape 3.1).

2.5. Ajustement du taux d'humidité d'un sol

Par: Sébastien Sauvé

Dernière révision: 28 avril 2003

Source initiale: n/a

1. But

Obtenir un échantillon de sol à un taux d'humidité prédéterminé.

2. Procédures

Déterminer la teneur en eau initiale du sol.

Calculer la masse équivalente en sol sec de l'échantillon.

Calculer la masse d'eau totale requise dans l'échantillon selon la masse sèche équivalente.

Soustraire la masse d'eau déjà présente de la masse d'eau à ajouter.

Ajouter l'eau nécessaire à l'échantillon.

Le taux d'humidité d'un sol exposé à l'air varie en fonction de l'humidité relative et va se dessécher ou s'humidifier au gré des variations ambiantes.

3. Calculs

Prenons 130 g d'un échantillon de sol avec une teneur initiale en eau de 12% (12 g H₂O pour 100 g de sol sec-voir méthode).

La quantité de sol sec est la différence du poids total moins la teneur en eau. L'algèbre est un peu amusante, c'est probablement plus simple de faire les calculs par essais-erreurs dans un chiffrier Excel.

Cet échantillon contiendrait donc 13.9 g d'eau et 116.1 g de sol sec. (Et **NON** pas $130 \times 0.12 \approx 15.6$ g d'H₂O parce que 15.6 g d'eau sur $(130 - 15.6)$ g = 13.6%).

Exemple :

% humidité 11.9724376 '=13.9/116.1

Masse sol humide	130 g
Masse H ₂ O	13.9 g
Masse sol sec	116.1 g

2.6. Mesures du pH d'un sol

Par: Sébastien Sauvé

Dernière révision: 28 avril 2003

Source initiale: Hendershot et al. ??

1. But

2.7. Fractionnement des extraits organiques en composants aliphatiques et aromatiques

Par: Pedro Segura et Mireille Gaudreault

Dernière révision: 8 avril 2004

Source initiale: Rhodes, I. "The Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group (TPHCWG) Analytical Method: Characterization of C6 to C35 Petroleum Hydrocarbons in Environmental Samples" dans Risk-Based Methodologies for Evaluating Petroleum Hydrocarbon Impacts at Oil and Natural Gas E&P Sites, s.l., s.d., [[http://api-ep.api.org/filelibrary/tphcwg.pdf](http://api.ep.api.org/filelibrary/tphcwg.pdf)], (8 Avril 2004). 379K.

1. But

Séparer les hydrocarbures aliphatiques des aromatiques dans un extrait organique.

2. Matériel

- Micro-colonne de 1cm de diamètre avec fritté et robinet en téflon
- Gel de silice 200-425 Mesh
- Na₂SO₄ préalablement laissé dans l'étuve
- Ballons jaugé de 10mL

3. Manipulations

1. Peser environ 2g de gel de silice et le mélanger avec 10ml d'acétone-dichlorométhane 1:1 (AC-DCM). Transvider le tout dans la micro-colonne. Laisser le robinet ouvert et pousser avec de l'air. Rendre la silice plus compacte en frappant légèrement la colonne à petits coups répétés. Ajouter des portions de 5ml de DCM, si nécessaire, pour nettoyer les parois de la colonne qui pourraient avoir de la silice collée. Évacuer le solvant jusqu'à ce que son niveau atteigne la surface de la silice qui doit toujours être humectée.
2. Ajouter 0.5cm de Na₂SO₄ sur le dessus de la silice. Rincer la colonne avec 10mL de DCM puis 10mL de hexanes. Laisser couler le solvant jusqu'à la surface de la silice. La colonne est prête pour fractionner l'échantillon.
3. **N'évacuez pas les solvants trop vite! Si non la colonne contiendra des impuretés.**
4. Ajouter 1mL de l'extrait sur la colonne. L'introduire dans la silice en poussant avec de l'air à un flux constant de ~ 1 goutte par second. Recueillir le solvant qui sort de la colonne avec un ballon jaugé de 10mL. Ajouter 1mL d'hexanes et

pousser avec de l'air. Recueillez. Procédez de la même façon en ajoutant des portions de 2mL jusqu'à un volume total de 7mL d'hexanes. Compléter le volume du ballon avec l'hexane jusqu'au trait de jauge. Cette portion est la fraction des aliphatiques.

5. Changez de ballon. Procédez de la même façon qu'en 3.3 mais en utilisant un mélange acétone-dichlorométhane 1:1 (AC-DCM) comme éluant. Le volume de solvant utilisé doit totaliser 8mL. Appliquez le AC-DCM sur la colonne en 4 portions de 2mL. Compléter le volume du ballon avec l'hexane jusqu'au trait de jauge. Cette portion est la fraction des aromatiques.
6. Pour réutiliser la colonne, il faut la nettoyer en utilisant 10mL AC-DCM, 10mL de DCM et 10 mL d'hexanes. La colonne pourra être ainsi utilisée un maximum de quatre fois. Après avoir fractionné quatre échantillons changer la colonne.

3. Procédures et équipements analytiques

3.1. Détermination de la teneur en eau d'un échantillon solide

Par: Luc Lavoie

Dernière révision: 28 avril 2003

Source initiale: n/a

1. But

Déterminer le % d'humidité d'un sol ou d'une autre matrice solide.

2. Matériel

- Spatule de plastique
- Contenant d'aluminium
- Étuve

3. Manipulations

A l'aide d'une spatule en plastique bien propre, on prélève et pèse exactement environ 5.0000 à 6.0000 grammes de terre dans une coupelle d'aluminium identifiée et tarée.

Donc, on note la masse de la coupelle d'aluminium seule, et la masse de la coupelle + l'échantillon de terre humide.

On répète cette opération pour chaque échantillon de sol que l'on désire analyser.

Ces échantillons de sols sont ensuite séchés à l'étuve à 75°C jusqu'à ce qu'ils atteignent une masse constante (environ 12 à 24 heures requises)

On obtient alors pour chaque échantillon de sol sec une masse finale (masse de la coupelle + échantillon de terre sec).

4. Calculs

Le % d'humidité du sol est alors déterminé par la formule suivante :

(masse de terre humide - masse de terre sèche)

$$\% \text{ d'humidité} = \frac{\text{-----}}{\text{masse de terre sèche}} \times 100\%$$

Exemple :

Masse de la coupelle = 1.324 g

Masse de la coupelle + sol humide = 6.556g

Masse de la coupelle + sol sec = 5.432g

$$\% \text{ d'humidité} = \frac{(6.556 - 1.324) - (5.432 - 1.324)}{(5.432 - 1.324)} \times 100 \%$$

$$\% \text{ d'humidité} = \frac{5.232 - 4.108}{4.108} \times 100 = \mathbf{27.36 \%}$$

*** Les % typiques vont de 1% (sols poudreux sec) à 30% (sols granuleux).**

3.2. Détermination du cuivre libre par électrode à ion spécifique

Par: Sébastien Sauvé et Julien Rachou

Dernière révision: Février 2004

Source initiale: Sauvé, S. (1999). Chemical speciation, solubility and bioavailability of lead, copper and cadmium in contaminated soils. Ph.D. Dissertation, Department of Soil, Crop, and Atmospheric Sciences, Cornell University. Ithaca, NY, USA, 174p.

1. *But et application*

Préparation des étalons et des échantillons pour la détermination de la quantité totale de cuivre libre divalent dans une solution de sol.

2. *Matériel*

- Électrode à ion sélectif de cuivre
- pH-mètre (ionomètre)

3. *Réactifs*

On prépare 5 solutions mères : - Solution de tampon IDA (iminodiacetic acid disodium) à 0.05 M.

- Solution de $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ (potassium acid phthalate) à 0.125 M.

- Solution de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à $5.0 \cdot 10^{-3}$ M

- Solution de NaOH à 0.3 M.

- Solution de KNO_3 (ou CaCl_2) à 0.5 M.

4. *Calibration*

On procède à la calibration de l'électrode de cuivre en prélevant 10 mL de chaque solution mère et diluant à 500 mL avec H_2O MQ. On divise en 10 solutions d'environ 50 mL chacune et on acidifie avec différentes quantités (quelques gouttes) de HNO_3 à 5% et 10%.

On laisse équilibrer ces solutions étalons overnight.

On mesure le potentiel E (mV) de chaque solution ainsi que leur pH. Le potentiel est considéré stable quand sa variation est inférieure à 0.3 mV en 3 mn. Le temps requis est variable (plusieurs heures pour les concentrations les plus faibles!). Pour une meilleure rapidité et stabilité, toujours procédé par ordre décroissant de pCu^{2+} (du moins concentré au plus concentré).

Les pCu^{2+} de ces dix solutions sont alors déduits (si on a utilisé $CaCl_2$) à l'aide de l'équation (1) :

$$pCu^{2+} = 0.587 \text{ pH} + 0.0799 \text{ pH}^2 - 0.00263 (\text{pH})^3 + 2.85 \quad (1)$$

ou de l'équation (2) (si on a utilisé KNO_3) :

$$pCu^{2+} = 4.8413 \cdot \text{pH} - 2.00631 \cdot \text{pH}^2 + 0.47175 \cdot \text{pH}^3 - 0.050602 \cdot \text{pH}^4 \\ + 0.00198 \cdot \text{pH}^5 - 0.22205 \quad (2)$$

Connaissant alors les pCu^{2+} des dix solutions étalons et leurs potentiels E (mV), et on peut déterminer les paramètres a et b de l'équation de la droite :

$$pCu^{2+} = a E \text{ (mV)} + b \quad (3)$$

où;

E : les potentiels des solutions mesurées (mV)

a : la pente (mV^{-1})

b : l'ordonnée à l'origine

Les potentiels des solutions inconnues sont alors mesurés, et les pCu^{2+} sont déduits de l'équation (3). Des triplicatas doivent être effectués. Si possible, toujours procéder par ordre décroissant de pCu^{2+} . Entre chaque mesure, l'électrode doit être abondamment rincée et essuyé légèrement avec des mouchoirs de laboratoire (Kimwipes). En fin de journée, l'électrode est polie avec un bout de feuille d'oxyde d'aluminium 3 μm pendant 30 s, puis successivement trempé dans H_2SO_4 0.025M et Na_4EDTA 0.1 M pendant 5 mn.

3.3. Détermination des Cu et Cd totaux dans les échantillons de sols contaminés via l'absorption atomique (AAS)

Par: Luc Lavoie

Dernière révision: 24 avril 2003

Source initiale: n/a

1. But et application

On vise à mesurer les métaux totaux dans des solutions d'extraction acide de sols. Une flamme acétylène-air atomise la matrice et les analytes (ici, les métaux): ces métaux absorberont la radiation d'une lampe à cathode creuse à une longueur d'onde caractéristique pour cet analyte. L'absorbance de la radiation permet (via l'établissement d'une courbe d'étalonnage) de mesurer la quantité totale d'analyte en solution (en mol/L), et donc d'en calculer la concentration dans les sols (en mg / kg de sol).

2. Matériel

- Spectrophotomètre d'absorption atomique
- 10 fioles jaugées de 100 ml
- 4 pipettes 20 ml
- 4 pipettes 50 ml
- 1 pipette 1 ml
- 2 béchers 10 ml
- Flacon laveur d'eau DI
- Pipettes 200 µl et 500 µl, avec embouts jetables
- Cylindre gradué 500 mL
- Cylindre gradué 100 mL
- Erlenmeyer 500 mL

3. Réactifs

- Solution étalon de cuivre 1000 ppm dans HNO₃ 5%
- Solution étalon de cadmium 1000 ppm dans HNO₃ 5%
- Acide nitrique concentré de grade Trace Métal (75 mL pour chaque étalon de métaux à préparer).

Procédures expérimentales—Laboratoire de chimie analytique environnementale (Sauvé)

On prépare environ 5 solutions standards de chaque élément à doser (par exemple, Cu et Cd).

La verrerie est conditionnée à l'acide nitrique 10% (voir méthode).

Préparation de la solution HNO_3 20%: à préparer pour chaque étalon de métal.

Dans le cylindre gradué 500 mL, on mesure environ 300 mL d'eau déionisée. Ce volume d'eau est transféré dans l'erlenmeyer 500 mL.

Dans le cylindre gradué de 75 mL, on mesure environ 75 mL de HNO_3 concentré, et on transfère lentement cet acide dans l'erlenmeyer. On agite l'erlenmeyer pour homogénéiser le mélange.

Attention: il y aura production d'un exotherme lors de l'addition de l'acide. Toujours ajouter le volume d'acide dans l'eau ET NON LE VOLUME D'EAU DANS L'ACIDE !

3.4. Préparation de gels diffusifs et gels de résine (DGT)

Par: Julien Rachou et Luc Lavoie

Dernière révision: 2003

**Source initiale: Communication personnelle Richard Goulet
(Laboratoire d'André Tessier, INRS-ETE, Québec)**

1. But et application

Préparation d'un gel de Fye 15% T, 5% C et gel avec résine

2. Matériel

- Montage (plaques) en plexiglass
- Micropipettes 100µL et 1 mL
- 2 Entonnoirs à col large
- Spatule en plastique stérile (low metal)
- Verre de montre
- 2 cylindres gradués : 50 mL et 100 mL
- 2 fioles jaugées 100 mL
- 2 béchers: 10 mL et 100 mL
- Erlenmeyer à vide 100 mL
- Bac en plastique
- Barreau aimanté
- Plaque agitatrice

3. Réactifs :

- Persulfate d'ammonium
- Acrylamide
- Bis-acrylamide
- TEMED
- Eau déionisée
- Résine Chelex 100 Na-form 100-200 mesh

4. Mode opératoire

Le matériel est conditionné à l'acide nitrique 10% (voir procédure).

5. Solution stock de monomères acrylamide / bis-acrylamide

On sort du frigo les bouteilles de bis-acrylamide et d'acrylamide, laisse revenir à la température ambiante, et on pèse exactement environ 2.0000g de bis-acrylamide sur un verre de montre. Le bis-acrylamide est transféré dans une fiole jaugée de 100 mL à l'aide d'un entonnoir. On dissout au maximum en ajoutant de l'eau milliQ (environ 60 mL). Il est nécessaire d'agiter sur une plaque agitatrice avec un barreau aimantée (30 minutes) sinon cela peut prendre quelques heures. On complète au trait de jauge avec de l'eau milliQ. *On obtient une solution de bis-acrylamide 2% (w/v).*

Dans un bécher de 100 mL, on pèse exactement environ 23.8000 g d'acrylamide, on les transfère dans une fiole jaugée 100 mL avec un entonnoir, et on ajoute au cylindre gradué 63 mL de solution homogène de bis-acrylamide 2%. On agite à la main pour dissoudre (dissolution facile). On complète au trait avec de l'eau milliQ. On obtient une solution stock 25.1% T et 5% C (C'est la solution de monomères).

6. Solution d'APS 10% (w/v) - initiateur

On pèse dans un bécher 10 mL exactement environ 0.1000g de persulfate d'ammonium, puis on dissout le tout dans 1 mL d'eau milliQ à partir de la micropipette 1000 μ L (dissolution facile). Cette solution doit être vieille d'au plus 1 jour.

7. Préparation de 75 mL de gel 15% T, 5% C - gel sans résine

Montage du moule: On installe les plaques de plexiglass parallèlement entre elles, séparées par le tube en caoutchouc, et fixées solidement en bas et des côtés gauche et droit par les clips en plastique.

Dégazage de la solution stock: On verse dans un erlenmeyer à vide 100 mL, 45 mL de solution stock de monomères et 29.25 mL d'eau milliQ (avec un cylindre gradué). Cette solution est dégazée sous vide via une trompe à eau pendant 25 minutes afin d'en enlever l'oxygène.

Amorce de la polymérisation et moulage: On ajoute à cette solution dans l'erlenmeyer 0.525 mL de la solution d'initiateur APS 10% (via la micropipette 1 mL). On verse quelques gouttes de TEMED (tetraméthyl diaminoéthyl) sous la hotte et on en ajoute 150 μ L (via la micropipette 200 μ L) dans l'erlenmeyer. On agite quelques secondes à la main sans faire de bulles, et on coule la solution (gel en formation) entre les plaques du montage. A faire en moins de 5 minutes. Faire attention à d'éventuelles fuites entre les plaques. Dès que l'on constate un épaissement du gel, le montage est laissé presque à l'horizontal pendant 40 minutes.

Démoulage du gel et dialyse: Après 40 minutes, le montage est démonté pour en dégager le gel. A l'aide d'une spatule en plastique, on le transfère dans un bain d'eau milliQ (grand bac en plastique), y met une pincée de résine Chelex 100 Na-form 100-200 mesh. L'eau est renouvelée entre 5 à 10 fois, avec au moins 15 minutes entre chaque changement, de manière à abaisser le pH de 10.5 à 7. (Ici, on y fait sortir le TEMED du gel par dialyse). En pratique il peut être difficile d'abaisser le pH en bas de 8.

Le gel obtenu (sans résine) est prêt pour la DGT.

8. Préparation de 75 mL de gel avec résine Chelex 100 Na-form 100-200 mesh

Les étapes sont pour la plupart les mêmes que pour la préparation du gel sans résine.

Montage du moule: On nettoie, reconditionne le montage, et installe les plaques de plexiglass parallèlement entre elles, séparées par le tube en caoutchouc, et fixées solidement en bas et des côtés gauche et droit par les clips en plastique.

Dégazage de la solution stock: On verse dans un erlenmeyer à vide 100 mL, 45 mL de solution stock de monomères et 29.25 mL d'eau déionisée (avec un cylindre gradué). Cette solution est dégazée sous vide via une trompe à eau pendant 25 minutes afin d'en enlever l'oxygène. *Étape identique à 8.2*

Amorce de la polymérisation, ajout de la résine et moulage: On ajoute à cette solution dans l'erlenmeyer 0.400 mL de la solution d'initiateur APS 10% (via la micropipette 1 mL). On verse quelques gouttes de TEMED (tetraméthyl diaminoéthyl) sous la hotte et on en ajoute 150 μ L (via la micropipette 200 μ L) dans l'erlenmeyer. On ajoute 2 grammes de résine Chelex 100 Na-form 100-200 mesh pour 10 mL de gel, soit 15 g de résine pour 75 mL de résine. On agite quelques secondes à la main sans faire de bulles, et on coule la solution (gel en formation) entre les plaques du montage. Faire attention à d'éventuelles fuites entre les plaques. Cette fois, le durcissement du gel prendra entre 30 minutes 2 heures. Le montage est placé presque à l'horizontal après quelques minutes afin d'éviter de perturber l'homogénéité de la distribution de la résine due à la gravité.

Démoulage du gel et dialyse: Une fois le gel solidifié, le montage est démonté pour en dégager le gel. A l'aide d'une spatule en plastique, on le transfère dans un bain d'eau déionisée (grand bac en plastique), y met une pincée de résine Chelex 100 Na-form 100-200 mesh. L'eau est renouvelée entre 5 à 10 fois, avec au moins 15 minutes entre chaque changement, de manière à abaisser le pH de 10.5 à 7. (Ici, on y fait sortir le TEMED du gel par dialyse). En pratique il peut être difficile d'abaisser le pH en bas de 8.

Le gel obtenu (avec résine) est prêt pour la DGT.

3.5. Utilisation de l'appareil TOC pour les échantillons solides (Carbone total dans les sols)

Par: Raphaël Lambert

Dernière révision: 14 août 2003

Source initiale: n/a

1. But

Déterminer la quantité de carbone totale dans un sol par combustion. Les échantillons sont mis dans un four à haute température, le carbone organique et inorganique est transformé en CO₂, ce dernier est ensuite détecté par un détecteur infra-rouge.

2. Matériel

- Analyseur de carbone Tekmar Dohrmann Apollo 9000, ainsi que le module à échantillon solide Rosemount Model 183 Dohrmann TOC Boat Sampler
- Balance analytique
- Seringue de 100µL
- Solution standard de carbone 1000ppm
- Acide phosphorique

3. Manipulations

Mass d'échantillon: 2-100mg (Les sols doivent absolument être broyés)

Masse en carbone: 0-160µg

A) Ouvrir le programme

- Ouvrez d'abord le programme « TOC talk ». Le nom d'utilisateur est « Administrator » (la première lettre doit être en majuscule). Le mot de passe est: folio1 (tout en minuscule).
- Dans Systeme, cliquez sur "Instrument". Dans la fenêtre qui apparaît, dans la case « Systeme », mettez l'appareil en mode "Ready". Dans la case Préférence, mettez "Without autosampler" à Sample Introduction. Le temps maximum d'intégration est le temps maximum que le programme peut attendre

avant que le signal retourne à la ligne de base après un pic. Si ce temps est atteint, le programme fera l'intégration automatiquement, même si le signal n'est pas revenu à la ligne de base. Cela fausse inévitablement les données. La valeur par défaut est de 4 min. Il est conseillé d'augmenter un peu cette valeur. Le temps maximum pour la stabilisation de la ligne de base est fixé à 60 sec par défaut. Le reste ne nécessite pas d'ajustement pour ce type d'expérience. Cliquez sur OK.

B) Préparer l'appareil

- La fiole de barbotage (en position centrale) à l'avant du module à échantillon solide doit être remplie d'eau millipore à la moitié de la distance entre le fond de la fiole et le bouchon horizontal gris. On doit aussi y ajouter deux ou trois gouttes d'acide phosphorique H_3PO_4 jusqu'à pH 2.
- Assurez-vous que tout le système de tubulure est bien clos: Sous le plateau de où glisse l'aimant, il y a deux tubes, un en haut et un en bas. Vérifiez que le tube du haut entre bien dans le tube en verre à droite. Celui du bas sera ultérieurement relié à l'analyseur de carbone. Le tube sortant du four à gauche du module doit se rendre à l'orifice du haut de la fiole à barbotage à l'avant de l'appareil. Un petit tube doit relier le trou restant de la fiole à barbotage à l'orifice du haut de la fiole à condensation (cette dernière se trouve à gauche, sous l'interrupteur "Boat gas on"). Le tube sortant de cette fiole à condensation doit entrer dans le module à solide. Il reste généralement un petit tube qui sort de l'avant de l'appareil. Ce n'est pas nécessaire qu'il soit branché quelque part.
- À L'AIDE DE PINCETTE (NE TOUCHEZ JAMAIS LA CUPULE AVEC VOS DOIGTS), sortez la cupule de platine de la boîte à introduction d'échantillons. SOYEZ DÉLICATS, CAR LES COMPOSANTES DE L'APPAREIL SONT TRÈS FRAGILES. Prenez l'habitude de laisser la porte ouverte le moins longtemps possible. Il est conseillé de mettre un peu de laine de silice (Silice wool) dans le fond du bateau (cupule). Cela permet une meilleure aération des échantillons, et ainsi une meilleure combustion. Cette laine se trouve dans un petit sachet dans une boîte en carton dans un tiroir dans le meuble sous l'analyseur de carbone. Ne confondez pas avec "Pyrex wool". Suite à cela, remettez le bateau dans son socle et refermez la porte.
- Le tube en verre horizontal du module à solide est muni d'un petit trou vertical à côté de la boîte d'introduction des échantillons. Ce trou doit être bouché par un petit bouchon en caoutchouc orange. La porte de la boîte d'introduction des échantillons doit être bien fermée. Assurez-vous qu'il y a un peu de graisse "High Vacuum Silicone" sur le tour du clapet de la boîte d'introduction d'échantillon. La graisse se trouve dans une boîte en carton dans un tiroir dans le meuble sous l'analyseur de carbone.
- Ouvrir l'arrivée de gaz sur le tube à l'arrière du module pour échantillons solides.
- Ouvrir la bombonne de gaz qui alimente le module solide. NE MODIFIEZ PAS LE DÉBIT.

- Mettez l'interrupteur "Boat gas on" en position *haut* afin de faire circuler le gaz. L'autre interrupteur doit être en position *bas*.
- Vérifiez que le gaz circule bien en mettant le bout du tube du bas qui se trouve sous le plateau de l'appareil à solide dans un peu d'eau. On doit voir des bulles. Une fois cela fait, enlevez le tube vert à l'avant de l'analyseur de carbone de sa position (du côté gauche du U en verre (là où il y a le cuivre)). Remplacer ce tube par celui sortant du module solide (le tube du bas sous le plateau où il y a l'aimant qui n'avait pas été utilisé tout à l'heure).
- Laissez circuler le gaz au moins une heure avant d'allumer le module solide. Cela permet de purger l'appareil et d'obtenir une ligne de base stable.

C) Préparer une courbe d'étalonnage

- Pendant que l'appareil se purge, vous pouvez préparer votre courbe de calibration.
- Allez dans: Système/Calibration/Standards. Une fenêtre apparaît. Dans "File", cliquez sur New, et entrez le nom de votre analyse. Entrez ensuite carbone ou azote dans la fenêtre qui apparaît.
- Sur la première ligne, c'est la concentration zéro. Indiquez le nom du produit (ex: eau MQ). Inscrivez la concentration de la solution (ex: 0). Dans Méthode ID, mettre à "Boat sampler". À ce moment, le nombre de μg apparaît dans la case $\mu\text{g C/N}$ (ex: 0). Cette quantité représente le nombre de carbone total escompté dans le volume de solution standards ajouté (l'appareil fait toujours les calculs à partir d'un volume de $40\mu\text{L}$). Pour ajouter une ligne à votre courbe de calibration, vous n'avez qu'à appuyer sur la flèche par en bas sur le clavier. Entrez encore le nom (ex: standard $25\mu\text{g}$). Entrez la concentration de la solution (exemple 600ppm). À Méthode ID, mettez toujours à "Boat sampler". À ce moment, le nombre de microgramme total de carbone du deuxième étalon apparaît. Cette quantité tient toujours compte du fait qu'une quantité de $40\mu\text{L}$ est ajoutée (cette valeur est inscrite dans le programme, on ne peut la changer). Si vous ne voulez pas préparer de solution standards, vous pouvez indiquer une fausse concentration de manière à avoir le masse de carbone désirée (ex: si vous voulez $25\mu\text{g}$ de carbone, vous n'avez qu'à indiquer une concentration de $625\text{ppm} \times 40\mu\text{L} = 25\mu\text{g}$ de carbone; alors qu'en vérité, vous ajouterez $25\mu\text{L}$ de la solution de 1000ppm). **N'OUBLIEZ PAS QUE L'APPAREIL MESURE DES QUANTITÉS TOTALES, ET NON DES CONCENTRATIONS.**
- Une fois les données de votre courbe de calibration entrées, cliquez sur Ok. Immédiatement, Système/Calibration/Set active apparaît. Cliquez sur set active et "TOC curve", même si ce n'est pas votre type de courbe (pour une raison inconnue, il semble que ce soit la seule façon d'enregistrer la courbe). Une fenêtre apparaît: Le mode (ex:TC mode)- Active calibration curve. À range 5, sélectionnez le nom de votre courbe. Tous les autres "range" doivent être à "défaut". Cliquer sur ok. Immédiatement après, cliquez sur Système/Calibration/set active, et choisissez le véritable type de courbe que

vous voulez utiliser. La même fenêtre que précédemment apparaît: Le mode (ex:TC mode)- Active calibration curve. À « range » 5, sélectionnez encore le nom de votre courbe. Tous les autres « ranges » doivent être à « défaut ». Cliquer sur ok.

- Cliquez ensuite sur “Run”. Trois fenêtres apparaissent: “Strip Chart”, “Analysis results” et “Sample analysis”. Dans “Sample analysis”, cliquez sur “Sample setup”. Dans la fenêtre qui apparaît, entrez le nom du standard (ex: eau MQ, 25ug, etc). À Sample type, mettez le type de standard: TOC standard, TC standard, etc que vous aviez déjà choisi. Une fenêtre apparaît: “Choose range”. Choisissez 5, puis ok. Une autre fenêtre apparaît: « Select calibrator ». Choisissez la ligne qui correspond au standard que vous voulez faire (ex: pour le zéro, cliquez sur la première ligne qui se met alors en bleu). Cliquer sur Exit. Vous revenez à la fenêtre “Without autosampler analysis”. Number of repeats indique le nombre d’essais que vous désirez faire pour cet étalon. Il est fortement conseillé de faire au moins trois répliqués. À méthode ID, sélectionnez Boat sampler. À « Calibration curve », le nom de votre courbe devrait être inscrit. Le mode est régi par l’appareil, vous n’avez rien à y faire. Cliquez finalement sur Save/Use.

D) Se préparer à faire la courbe de calibration

- Après environ 45 minutes de purge, vous pouvez mettre le module solide en marche. Vous n’avez qu’à pousser le bouton noir à l’avant de l’appareil. La température du four est généralement réglée à 800°C. Lorsque la température est stable, un témoin lumineux vert à l’avant de l’appareil apparaît.
- Lorsque le signal de base est constant (en ayant pesé sur “Run”, le détecteur se met immédiatement en marche et vous pouvez alors voir le signal dans la fenêtre “Strip Chart”) et que la lumière verte est allumée, introduisez le bateau dans le four en déplaçant l’aimant rouge. IL FAUT Y ALLER DOUCEMENT ET LENTEMENT, LA TIGE EST TRÈS FRAGILE. Il est normal que l’aimant n’aille pas jusqu’au bout. Vous devriez normalement voir le signal dans la fenêtre « Strip chart » augmenter. Laissez le bateau dans le four jusqu’à ce que le signal revienne à la ligne de base. Cette étape vise à éliminer le carbone qu’il pourrait y avoir sur le bateau. Vous pouvez sortir le bateau du four et le réintroduire quelques fois jusqu’à ce que le signal de base ne varie plus.

E) Faire une courbe de calibration

- Pesez sur « Start ». Une fenêtre apparaît indiquant : Load boat now, then clic OK. Introduisez votre standard liquide dans cupule ou la cupule dans le porte échantillon, puis cliquez sur ok. Cette étape doit se faire le plus vite possible afin de ne pas laisser entrer trop d’air.
- Une fois que vous avez cliqué sur ok, le programme prévoit un temps d’attente qui permet au signal de base de se stabiliser. L’ouverture de la porte a fait entrer de l’air et par conséquent du CO₂ qui fera augmenter le signal. Il faut donc attendre que ce signal soit redescendu à son niveau de base. C’est ici

que l'ajustement fait au début sur le temps maximum d'attente de stabilisation du signal de base peut faire une différence. Un temps court peut réduire le temps d'analyse, mais si le signal n'est pas revenu à son point de base avant de commencer l'analyse, les résultats seront faussés. En effet, après avoir atteint le temps maximum, une autre fenêtre apparaît vous demandant d'introduire l'échantillon (Push boat in now). Même si le signal de base n'est pas revenu à son niveau de base, cette fenêtre apparaîtra. Il est fortement conseillé de vérifier visuellement sur le graphique que le signal est bien redescendu à son niveau de base avant d'introduire l'échantillon. On peut vérifier de plus près le signal en diminuant l'échelle des minivolts. Pour ce faire, cliquez deux fois sur la règle (sur l'axe lui-même) des minivolts et diminuez l'échelle. Donc, une fois la fenêtre "Push boat in now" apparu et le signal de base stable, cliquez sur ok, puis déplacez l'échantillon dans le four. ALLEZ-Y DOUCEMENT. La combustion est présentement en cours et vous n'avez plus qu'à attendre.

- Une fois que l'analyse d'un échantillon est terminée, le résultat apparaît dans la fenêtre: "Analysis results". À ce moment, vous pouvez retirer la cupule du four en glissant doucement l'aimant.
- De façon automatique, le programme vous demande de remettre un l'échantillon dans la cupule (Load boat now, then clic OK). Vous devez attendre que le porte échantillon soit refroidi avant de remettre un deuxième échantillon. Répétez les étapes précédentes afin de compléter vos essais. Une fois le nombre d'essai complété, le programme compile les résultats et indique la moyenne dans la fenêtre "Analysis results". Lorsque la moyenne est apparue dans la fenêtre "Analysis results", deux autres fenêtres apparaissent: "Calibration Curve" avec votre courbe de calibration et une autre fenêtre affichant les résultats. Cliquez sur "Exit" pour fermer ces deux fenêtres, vous n'en avez pas besoin pour le moment. Si vous n'êtes pas satisfait des résultats que vous avez obtenus (par ce que la déviation standard est trop grande par exemple), cliquez sur "Start" de nouveau dans la fenêtre "Sample analysis". Si au lieu de "Start", vous avez "Stop", ne vous inquiéter pas, attendez un peu que l'appareil finisse ses mesures. Donc, en cliquant sur "Start", vous reprendrez vos trois essais sans pour autant effacer ceux que vous aviez déjà.
- Une fois le premier standard terminé, cliquez sur "Sample setup" dans la fenêtre « Sample analysis ». Si l'appareil n'a pas fini ses mesures, attendez un peu que le bouton "Start" réapparaisse. Dans la fenêtre qui apparaît, changez le nom de l'échantillon (ex: 25ug votre deuxième standard). Resélectionnez "Sample type", range 5, ainsi que la deuxième ligne du tableau de votre courbe de calibration (ex: 25ug), puis cliquez sur "Exit". Appuyez sur "Start » afin de faire votre deuxième standard.
- Recommencez les étapes précédentes jusqu'à ce que votre courbe d'étalonnage soit terminée.
- Une fois que tous les échantillons de la courbe d'étalonnage ont été passés et que les résultats vous satisfont, restez dans la fenêtre "Calibration curve". Si vous l'avez déjà fermée, vous pouvez y accéder en allant dans

“Results/Calibration”. À ce moment, vous pouvez maximiser votre courbe en sélectionnant les points de la courbe que vous voulez garder. Dans la colonne “Use”, cliquez sur les points que vous voulez conserver, puis cliquez sur “Recalc”. Dans la fenêtre comportant le graphique, un chiffre apparaît (ex.: $r\text{-sqr} = 94765$). Plus ce chiffre est élevé, plus votre courbe est linéaire. Faites donc quelques essais avec quelques combinaisons de point de manière à ce que ce chiffre soit le plus élevé possible. À chaque nouvelle combinaison, vous devez cliquer sur “Recalc”. Quand la valeur vous convient, cliquez sur “Save as new version”, puis “Exit”. Vous êtes maintenant prêts à commencer vos analyses.

F) Faire les analyses

- Cliquez sur “Sample setup” dans la fenêtre “Sample analysis”, puis à “Sample type”, cliquez sur “Sample”. Faites “Save/use”.
- Allez peser votre échantillon. Pour ce faire, sortez la cupule de platine de l'appareil à l'aide des pincettes. Déposez-la dans une petite assiette d'aluminium avec un verre de montre dessus. N'oubliez pas de refermer la porte de l'appareil. Rendez-vous à la balance et pesez votre échantillon. Essayez de disposer l'échantillon le plus uniformément possible dans la cupule.
- Pour faire l'analyse, cliquez sur “Start” afin de valider vos nouveaux paramètres. Le programme vous demande d'entrer la masse ou le volume de votre échantillon. Faites-le en utilisant la lettre “u” pour le signe “ μ ”. Ne mettez pas d'espace entre le chiffre et les unités de mesure. Le programme demande de mettre l'échantillon dans le bateau (Load boat now, then clic OK). Introduisez la cupule dans le porte échantillon avec le petit trou du bateau vers l'aimant. Refermez immédiatement la porte et attendez d'autres instructions. La fenêtre “Push boat in now” apparaît (après environ une minute). Cliquez sur ok, puis introduisez l'échantillon dans le four. (assurez-vous que la ligne de base est bien redescendue à son niveau le plus bas). Attendez que l'analyse se fasse. Quand le résultat apparaît dans la fenêtre “Analysis results”, sortez la cupule du four et attendez un moment avant de la sortir de l'appareil. Une fois le premier essai fait pour le premier échantillon, vous n'avez pas à cliquer sur “Start” de nouveau pour faire le deuxième essai, le programme s'en charge. Recommencez les étapes précédentes pour tous vos essais du même échantillon.
- Si vous voulez faire un deuxième échantillon, vous n'avez qu'à changer le nom dans « Sample set up ». Sinon, il y aura de la confusion. Cliquez ensuite sur “Start”.
- Si vous voulez voir les détails de vos résultats, allez dans : “Results/sample”. Sélectionnez un résultat et double-cliquez dessus afin d'obtenir les détails.

G) Fermer l'appareil

- Une fois toutes vos analyses terminées, sortez le tube de l'appareil à solide de l'analyseur de carbone, puis remettez le tube vert de l'analyseur de carbone à

sa place. Mettez le module solide à « off » afin de fermer le four. Laissez circuler le gaz un moment avant de fermer la bonbonne. Débranchez le tube du haut de la fiole à barbotage. Fermez le programme.

3.6. Utilisation de ICP-AES IRIS

Par: Marie-Claude Turmel

Dernière révision: 2003

Source initiale: n/a

1. Utilisation

L'utilisation du ICP par un nouvel utilisateur doit se faire au minimum sous la supervision du responsable du laboratoire ou d'un membre de l'équipe qui a l'expérience de l'appareil. Comme il s'agit d'un appareil en grande demande, il est essentiel de respecter certaines règles de base afin d'éviter certains inconvénients:

- 1) Réserver le temps de travail sur le calendrier prévu à cet effet;
- 2) Compléter le log book pour chaque période d'utilisation;
- 3) Avertir le responsable du laboratoire de tous bris ou défectuosité du système ou encore des besoins en consommables (argon, azote, tubes...);
- 4) Garder l'espace de travail propre et libre pour les prochains utilisateurs;

Avant l'utilisation du ICP-AES, la lecture de ces pages synthèses s'avère essentielle. Il s'agit uniquement d'un aide-mémoire qui permet de suivre les grandes étapes pour obtenir des résultats de qualité sans problèmes.

Il est fortement recommandé d'approfondir les connaissances sur l'appareil et le logiciel qui le contrôle en lisant les cartables fournis par la compagnie. Ces informations ne sont malheureusement pas complètes, mais elles peuvent aider à la compréhension du logiciel qui lui n'est pas toujours simple d'utilisation.

2. Procédure d'allumage de l'ICP-AES

Selon que l'appareil est déjà allumé ou non, des étapes importantes sont à suivre pour éviter certains problèmes. Si le ICP est éteint, il faut suivre la procédure collée devant l'appareil; sans quoi des **dommages permanents** de la caméra peuvent survenir. Une fois cette procédure complétée, suivre les étapes suivantes pour l'allumage de la torche.

Vérifier le temps de purge requis pour l'azote, certaines informations reçues indiquent qu'il faut une purge d'au moins 6 heures !

Dans le cas où l'appareil est déjà allumé, suivre les étapes suivantes:

1) Vérifier que le niveau d'azote est suffisant pour travailler. En temps normal une bouteille d'azote a une durée de vie d'environ deux semaines. L'azote sert au refroidissement de certains éléments du ICP; son contrôle est donc crucial.

NOTE: Pour les analyses d'anions dans les basses longueurs d'onde (<220 nm), une purge à plus fort débit est nécessaire. Se référer à la procédure d'analyse des anions pour plus de détails.

2) Vérifier que le niveau d'argon est suffisant pour le travail à effectuer. Si la bouteille n'est pas ouverte, l'ouvrir et vérifier les différentes pressions (sur la bouteille, sur le manomètre à la sortie de la bouteille 60 psi et sur l'appareil XXXX psi). En moyenne, une bouteille a une durée de vie de 8 heures.

NOTE: Éviter que la torche ne s'éteigne par manque d'argon.

Pour ce qui est de l'argon liquide, la bouteille durera de 10 à 12 jours pour une utilisation quotidienne continue. L'achat d'argon liquide n'est recommandé que pour des périodes intenses d'analyse, étant donné les fuites d'argon lorsque le système est éteint.

3) Vérifier le niveau de liquide dans le contenant de rejet. Il ne faut pas oublier que celui-ci contient des acides dilués qui peuvent endommager le plancher et les objets environnants. Si le niveau est élevé, vider le contenu dans l'évier: l'Université est dotée d'un bon bassin de dilution pour ce genre de rejet.

4) Entrer dans le dossier TJA et ouvrir la filière "Diagnostic" afin de vérifier les températures du "CID" (-45) et du "FPA" (30). Si le CID n'a pas une température de -45, vérifier le niveau d'azote et la purge de celui-ci.

5) Effectuer un "reset" du CID (toujours dans le logiciel Thermo-Spec).

HARD RESET: À faire en début de journée et ne jamais faire cette manoeuvre lorsque la torche est allumée. Attendre le message qui indique que le "reset" a été complété avec succès avant de poursuivre.

SOFT RESET: À faire en début de journée ou lorsque des problèmes de communication entre l'ordinateur et l'appareil surviennent en cours d'analyse. Cela peut aider à rétablir la communication. Attendre le message qui indique que le "reset" a été complété avec succès avant de poursuivre.

6) Repositionner l'aiguille dans la station de rinçage en respectant la marque noire sur l'aiguille. Pour ce faire, dévisser la vis qui retient l'aiguille sur le bras de l'échantillonneur. Il est important que l'aiguille soit dans le liquide lors de l'allumage car celui-ci ne fonctionnera pas. S'assurer que la bouteille de la station de rinçage contient suffisamment d'acide nitrique 2% (Trace Metal Grade).

NOTE: Normalement l'aiguille ne doit jamais demeurer dans le liquide de la station de rinçage lorsque le ICP n'est pas en opération. Si l'aiguille y demeure longtemps, le liquide va monter dans la chambre de nébulisation par capillarité et il faudra bien assécher le tout avant le prochain allumage de la torche.

7) Mettre les tubes de la pompe péristaltique sous tension. S'assurer qu'ils ne soient pas trop usés (dépôts noirs, tubes trop souples...), qu'ils soient bien tendus sur les rouleaux et chacun dans sa position. La tension appliquée sur les tubes peut varier dans le temps. L'étape 9 explique comment ajuster cette tension.

Tous les tubes doivent idéalement être changés en même temps afin d'éviter des fluctuations de débit. Il faut aussi respecter les couleurs présentes (jaune-jaune et rouge-rouge). Ces codes-couleurs correspondent à des débits bien précis et si les couleurs sont changées, il faudra changer les codes-couleurs sélectionnées dans les méthodes.

NOTE: La sortie de la chambre de nébulisation doit avoir un débit plus rapide que l'entrée afin d'éviter toute accumulation de liquide dans la chambre de nébulisation.

8) Fermer la fenêtre "Diagnostic" et ouvrir "Spec-CID". Sélectionner la méthode à utiliser. Si la méthode n'existe pas encore, passer à la section pour y développer votre méthode. Ne pas allumer la torche si votre méthode n'est pas encore développée.

Allumer la torche en sélectionnant le symbole de la torche du logiciel (Ignit Plasma). Vérifier les paramètres y figurant :

Ignit power	1150 W
Auxiliary flow	0.5
Nebulizer flow	25
Pump	110 ou 130 rpm

Purge time 90 sec.

Idéalement la vitesse de la pompe doit être à 130 rpm pour l'allumage et les analyses afin d'obtenir une meilleure sensibilité des lectures. Pour des raisons obscures, la vitesse revient souvent à 110 rpm même pour des méthodes où la vitesse sélectionnée est de 130 rpm (???)

Il se peut que plusieurs tentatives d'allumage soient nécessaires. Si la première tentative échoue on peut changer, uniquement pour l'allumage, la puissance d'allumage (1350 ou 1550 W) et le "auxiliary flow" (1 au lieu de 0.5). Une fois l'allumage complété, il faut revenir aux conditions initiales (voir ci-haut) en utilisant l'option "change settings".

9) Ajuster la tension appliquée sur les tubes de la pompe. Il est important de bien ajuster cette tension afin d'avoir une bonne nébulisation et une meilleure sensibilité des lectures possibles.

Arrêter la pompe en utilisant l'option "change settings". Enlever la tension sur les tubes. Relever l'aiguille de la station de rinçage afin de laisser une bulle d'air monter dans le capillaire. Remettre la tension sur le tube de sorte que la bulle soit immobilisée et ajouter deux crans à cette tension. Ajuster tous les tubes à cette même tension.

10) Laisser au minimum le système se réchauffer 30 minutes avant d'y effectuer une optimisation. S'assurer que la température de 90 C est respectée (chiffre vert près de la chambre de nébulisation).

NOTE: Il est important que cette température y demeure le plus constant possible et le plus près possible de 90°C. Une variation de quelques dixièmes de degrés influencera directement les lectures. Durant la période hivernale, il est possible d'ouvrir une fenêtre ou la fenêtre d'aération du climatiseur. Pour l'été, l'utilisation d'un climatiseur peut réduire la surchauffe de la pièce et de l'appareil.

3. Procédure d'arrêt de L'ICP-AES

Tout comme à l'allumage, deux procédures existent. Une première procédure consiste à éteindre la torche à la fin d'une journée de travail et une deuxième consiste à éteindre le ICP-AES. Cette procédure est nécessaire si l'on sait que l'appareil ne sera pas en fonction pour plusieurs jours (une semaine et plus) ou si l'on doit changer le cylindre d'azote.

- 1) Lorsque les analyses sont complétées, laisser le système se rincer dans la station de rinçage (HNO₃ 2%) pour au moins 15 minutes. Cela permet d'éliminer tous les dépôts qui pourraient précipiter et causer des problèmes lors des prochaines analyses. Si les matrices sont très chargées, augmenter sans gêne ce temps de rinçage.
- 2) Retourner au symbole de la torche "Ignit plasma" et sélectionner "Shutdown". Après quelques secondes la torche s'éteindra.
- 3) Retirer l'aiguille de la station de rinçage. En dévissant la vis, il est possible de remonter l'aiguille et la fixer à un niveau plus élevé.
- 4) Libérer les tubes de leur tension. Des tubes qui demeurent sous tension auront une durée de vie beaucoup moins longue.
- 5) Enlever tous les échantillons ou standards de l'échantillonneur.
- 6) Fermer les fenêtres ou la trappe d'aération du climatiseur.
- 7) Fermer le cylindre d'argon.
- 8) Une fois la torche éteinte, il faut savoir si le ICP doit demeurer allumé ou non. Si le ICP doit demeurer ouvert, il faut figurer la quantité d'azote nécessaire pour la période d'inactivité. Si l'azote n'est pas suffisant il faut prévoir un changement de bouteille. Cette procédure est indiquée sur le devant de l'appareil et peut prendre jusqu'à une heure (temps d'installation et de purge adéquate).

Cette même procédure est aussi bonne pour le cas où l'on voudrait éteindre le ICP-AES pour une longue période.

4. Optimisation de l'appareil (mapping)

(doit être complétée !)

Comment développer une méthode

Il est possible d'utiliser une méthode existante. Avant de procéder de la sorte, s'assurer auprès des personnes concernées si cela est possible.

L'idéal est de concevoir sa propre méthode, car les données y seront conservées pendant un certain temps et si des re-calibrations sont nécessaires après examen des résultats, en tout temps il sera possible d'y retourner et d'y refaire les calculs.

Selon le niveau de compréhension du logiciel et le support technique, deux façons de bâtir des méthodes se posent:

- ou bien on passe à travers les différents menus du logiciel et on tente de créer sa propre méthode;
- ou bien on se base sur les informations contenues dans les cartables sur la procédure à suivre pour monter sa méthode.

Voici ici quelques **points de repères** ou aide-mémoire:

- Paramètres de base couramment utilisés mais qui peuvent varier selon le type d'analyse:

- Rinçage de 60 secondes entre chaque échantillon;
- Trois lectures par échantillon ce qui nécessite environ 10 ml ou moins de solution;
- Vitesse de la pompe à 130 rpm;
- "Flush time" ou temps de pré-exposition 60 secondes;
- Exposition à basse longueur d'onde de 30 secondes (LWL);
- Exposition à haute longueur d'onde de 15 secondes (HWL).

- **Il faut sélectionner les éléments à analyser (tableau périodique), les raies d'intérêt (en respectant les interférences analytiques connues du logiciel ou de l'analyste). Il est possible d'ajouter des raies qui ne figurent pas dans les choix (voir cartables).**

- **Créer des tables de standards avec les éléments analysés et les concentrations. Attention, s'assurer que les unités utilisées pour les standards correspondent aux unités sélectionnées par la méthode.**

- **Dans le menu Setup/Automated output il faut y choisir le format de fichier dans lequel les données seront exportées. Voici un exemple d'informations qu'on y retrouve et pour lesquelles il faut faire des choix.**

	Store	Print*	Virtual	Export
Unk	Yes	yes	no	yes
QC	no	no	no	no
Blk	no	no	no	no
STD	yes	yes	no	yes
Reco no	no	no	no	no

- Une fois que les analyses vont bon train, il est possible d'enlever la fonction d'impression afin de réduire la quantité de papier utilisée. La création de fichier texte va permettre de récupérer les données à la fin des analyses.

- Il faut changer le nom du fichier à chaque jour d'analyse. Pour ce faire utiliser les initiales de l'analyste ainsi que la date d'analyse. Il est important de travailler en mode "append" et non "overwrite". Le mode "overwrite" enregistre uniquement la dernière analyse effectuée, alors que le mode "append" enregistre l'ensemble des analyses de la journée.

Exemple: Filename: MC030316.txt

- Dans le fichier nommé MC030316.txt on y retrouvera uniquement les moyennes des réplica. Il existe un fichier du même nom, mais précédé d'un 0 (0MC030316.txt) qui lui contient chacune des lectures. Cela permet de vérifier s'il n'y a pas eu des variations entre les lectures.

- Il faut aussi sélectionner certaines informations comme "include rep" et surtout "include imagedata". Cette dernière option permet de voir les résultats graphiques des analyses (intégration des pics).

- Ne pas oublier de sélectionner la fonction "autoprint std report". Cela nous permet de vérifier si la standardisation s'est bien effectuée avant de poursuivre les analyses de la journée. On retrouvera les pentes les lectures en concentration et le graphique de la calibration. L'ensemble des équations de régression et les R^2 s'y retrouveront également.

5. Analyse en mode automatique

Il existe des méthodes qui nous permettent de travailler en mode manuel ou automatique. Le mode automatique est souvent favorisé afin d'accélérer le travail. Voici un résumé des étapes à suivre.

1) Développer une méthode analytique (voir section précédente);

2) Faire la liste des échantillons en y incluant les informations sur les échantillons, dans le "sample file". Sauvegarder le fichier par date. On peut imprimer cette table de sorte qu'on peut suivre la séquence d'analyse et y noter les changements de position des échantillons. Une fois que les analyses sont démarrées il est impossible de changer l'information sur les échantillons.

3) Se rendre dans le menu et y retrouver "automated analysis" et de là, sélectionner le protocole d'analyse. Normalement le protocole STD-SAMP est utilisé. Ce protocole effectue une calibration en début de journée et poursuit avec les échantillons.

4) Sélectionner le "sample file" créée à l'étape deux ci-haut. Vérifier que le nombre d'échantillon apparaissant correspond bien au nombre d'échantillon enregistré.

5) Pour les standards, le fichier standard sélectionné dans la méthode sera celui utilisé. Vérifier si l'information du fichier correspond bel et bien avec les standards à utiliser.

6) Lorsque tout semble prêt, standards et échantillons en bonne position, sélectionner la fonction "Run" et de là faire une dernière vérification en sélectionnant Set Up. Cela nous permet de voir si les standards sont au même nombre et s'ils sont bien positionnés dans l'échantillonneur (support en forme de L avec les tubes de 30 ml de Nalgene) et de même pour les échantillons (support avec petit tube de 12 ml). S'assurer qu'il s'agit bien du bon format de support.

NOTE: Si les analyses sont nombreuses (plus de 10 échantillons), il est recommandé de faire une calibration en début de journée, poursuivre les analyses avec les échantillons en incluant les standards avec les échantillons à tous les 10 échantillons. Si une dérive de plus de 10% survient au cours de l'analyse, il sera possible à la fin de la journée de recalibrer et refaire les calculs avec les nouveaux paramètres pour les échantillons. Pour ce faire se référer au cartable qui nous indiqueront les différentes étapes à suivre pour les recalculs.

6. *Entretien de l'instrument*

Un minimum d'entretien est requis pour conserver des conditions optimales d'analyse. Le responsable du laboratoire ou le log book pourra nous indiquer les derniers entretiens effectués et les détails de celui-ci.

Normalement suite à des analyses effectuées sur des échantillons ayant une matrice chargée, un nettoyage de la torche sera nécessaire. Ne vous lancer pas dans cette manœuvre si vous n'avez pas l'expérience requise. Le responsable du laboratoire vous donnera un coup de main.

Idéalement des tests de performance doivent être effectués afin de s'assurer que le signal est meilleur ou aussi bon que ce que vous aviez avant le nettoyage. Si le signal est moins bon, des petits ajustements seront peut être nécessaire.

Pour effectuer un test de performance, deux options se posent. Ou bien on analyse un standard couramment utilisé et on compare les lectures obtenues en intensité avant et après l'entretien du système. Ou encore on utilise la méthode TJA-test qui mesure la sensibilité d'une série d'éléments. Cette méthode est développée selon un article de J.M. Mermet (voir cartable près de l'ordinateur).

7. Nouvelle matrice?

Le développement pour l'analyse d'un nouveau type de matrice requiert des étapes importantes. JAMAIS des analyses à l'aveugle doivent être effectuées que la matrice soit complexe (ex BaCl₂ 0.01M, pyrophosphate de Na 0.01 M, oxalate 0.01M) ou simple (H₂O).

Voici quelques points de repères qui vous aideront à planifier votre travail:

- Type d'échantillon: eaux de surface, extraits de sol?**
- Échantillon filtré? Sinon il faut s'assurer de ne pas bloquer le nébuliseur (\$\$\$\$). Certains nébuliseurs à plus grande ouverture existent pour éviter un tel problème.**
- Les standards doivent avoir la même concentration que l'extractant utilisé pour les échantillons. Si ces derniers sont dilués, il faudra prévoir diluer la matrice des standards.**
- Utilisation de contrôle externe dans la mesure du possible. Cela permet de valider la calibration et de voir si l'ensemble des éléments analysés ne présente d'interférence analytique ou chimique.**
- Utilisation de contrôle interne dans le cas où les contrôles externes n'existent pas. Il s'agit d'ajouter aux standards et aux échantillons, en concentration uniforme, un élément quasi inexistant des échantillons et de voir si l'intensité de celui-ci demeure constante entre les standards (conditions pures et matrice simple) et les échantillons (matrice complexe).**
- Utilisation d'échantillons enrichis. Cette étape permet d'évaluer si les éléments mesurés ne sont pas interférés par la matrice. Il s'agit d'ajouter à un échantillon une concentration équivalente à 20% de la concentration connue. Par la suite un calcul de recouvrement signalera si la matrice interfère avec l'élément mesuré.**

- Mesure de la limite de détection. Les LD obtenues pour des eaux de surface acidifiées seront beaucoup plus basses que pour des extraits de sol effectués avec un sel. Ainsi pour chaque type de matrice, un calcul de LD doit être effectué. Il existe plusieurs façons d'obtenir cette mesure. Normalement on peut exposer le plus faible standard de 3 à 10 fois (plus on l'expose de fois, meilleure sera la LD mais elle sera moins réaliste) et multiplié l'écart type de ces lectures par 3 et ainsi obtenir la LD. On peut ensuite vérifier cette information en comparant avec des échantillons s'approchant de cette limite. Si l'allure du pic et son intégration sont raisonnables, on peut conserver cette LD, si non on peut reprendre ce test avec un standard plus élevé.

3.7. Détermination de l'activité de la déshydrogénase dans les sols

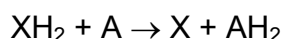
Par: Benoit Cloutier-Hurteau

Dernière révision: 29 juin 2004

Source initiale: Tabatabai MA. 1994. Soil enzymes. In: Mickelson SH (ed.) Methods of Soil Analysis: Part 2 – Microbiological and biochemical properties, number 5, Soil Science Society of America, Madison, pp.775-833.

1. Application

L'enzyme déshydrogénase est une enzyme présente chez tous les organismes vivants. Elle permet d'oxyder les composés organiques par le processus de déshydrogénation :



XH_2 est le composé organique exprimé dans cet exemple comme un donneur d'hydrogène tandis que A est une molécule acceptant cet hydrogène. Cette réaction chimique est produite chez les organismes vivants par l'enzyme déshydrogénase. Cette enzyme se retrouve à l'intérieur des organismes vivants et se dégrade facilement à l'extérieur de l'organisme (Tabatabai 1994). De ce fait, il s'agit d'un indicateur pertinent pour l'étude de l'activité des microorganismes actifs dans les sols (Alef 1995, Tabatabai 1994).

La mesure de l'activité en déshydrogénase se fait par l'analyse de colorimétrie du TPF. Cette substance provient de la réduction du TTC par les microorganismes grâce à la déshydrogénase. En effet, le TTC, substance chimique artificielle, possède un potentiel redox élevé (-0,08V). De ce fait, le TTC agit comme un accepteur d'électron et se transforme en TPF. Il est important de noter que cette technique n'est pas fonctionnelle en présence de grandes concentrations de cuivre puisque celui-ci interfère avec le TPF et réduit la lecture d'absorbance (Chander et Brookes 1991). Cette méthode fut développée par Lenhard (1956) qui est inspirée de Mattson *et al.* (1947), mais le protocole actualisé de Tabatabai (1994) sera plutôt utilisé.

2. Matériel

- Éprouvettes de verre (16 mm par 150 mm) ou équivalent en plastique (volume de 50 ml)
- Spectrophotomètre analysant à 485 nm
- Bouchons pour sceller les éprouvettes (résistant au méthanol)

- Filtres Fisherbrand Q8 ou l'équivalent
- Balance (3 décimales)
- Papier à peser
- papier d'aluminium (si nécessaire)
- Mélangeur de type « vortex »
- Ballons jaugés de 100 mL
- Incubateur pouvant contrôler la température à 37°C
- Le sol à tester doit être bien homogénéisé

3. Réactifs:

- Carbonate de calcium (CaCO_3)
- 2,3,5-Triphényltetrazolium chloride (TTC)
- Méthanol
- Triphényl formazan (TPF)
- Eau ultrapure (UP)

Les réactifs sont sensibles à la lumière, le contact avec la lumière doit être limité¹.

- 1) Préparer une solution de 2,3,5- Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) de 0.0896 M (30 g/L) (3%) : Dissoudre 3 g de TTC (334.81 g/mol) dans de l'eau UP, faire le volume jusqu'à 100 ml dans un ballon jaugé.
- 2) Préparer une solution mère de Triphenyl formazan (TPF) de 8.32×10^{-4} M (1 mg/L): Dissoudre 250 mg de TPF (300.36 g/mol) dans du méthanol, faire le volume avec du méthanol jusqu'à 250 ml dans un ballon jaugé.

4. Mode opératoire

- Faire chauffer l'incubateur avant de débiter les manipulations pour qu'il ait le temps d'atteindre la température requise (37°C).

Préparation des échantillons

- (1) Peser 1 g de sol humide. Faire sécher à 105°C durant 24 heures. Peser le sol sec.
- (2) Incorporer au sol humide du carbonate de calcium (CaCO_3) selon un ratio 1 :100 (CaCO_3 : sol). Pour un échantillon, on mélange 0.06 g de CaCO_3 dans 5.94 g (équivalent sol sec) de sol humide et on l'insère dans une éprouvette. Préparer au moins trois réplifications.

¹ L'effet de la lumière sur les réactifs se fait sentir par l'apparition d'une couleur jaune foncée.

(3) Ajouter, dans l'éprouvette, 1ml de la solution de TTC à 3% ainsi que 2.5ml d'eau UP (pour un test de toxicité de lixiviat, remplacer le 2.5 ml d'eau avec 10 ml du lixiviat à tester). Mélanger le tout avec une tige de verre et sceller l'éprouvette avec un bouchon. Il est important d'ajouter des blancs contenant uniquement de l'eau UP ainsi qu'un contrôle ayant une concentration d'exactly environ 50 $\mu\text{g/ml}$ de TPF.

(4) Pour un contrôle négatif, on utilise un sol préalablement contaminé avec du Ag_2SO_4 à 500 mg/kg sol sec. On prépare une certaine quantité à l'avance. Ensuite répéter les mêmes manipulations que pour le point 2) mais avec le sol contaminé à l'argent.

(5) Pour le contrôle positif on utilise le sol traité avec 10 mL d'eau déionisée au lieu du lixiviat et on fait suivre la même procédure utilisée pour les échantillons.

(6) Incuber les éprouvettes à 37°C pendant 24 heures à la noirceur.

Extraction du TPF

(7) Après l'incubation, ajouter 30ml de méthanol et agiter à la main, avec une tige de verre, pendant une minute. Il faut bien rincer la tige de verre entre les échantillons.

(8) Filtrer le tout avec des filtres Fisherbrand Q8 dans des volumes adéquats. Il est important de déposer le sol de l'éprouvette dans le papier filtre. Si le sol est encore rouge (signe qu'il reste du TPF), ajouter, à coup de 10ml, du méthanol dans l'entonnoir jusqu'à ce que la couleur rouge disparaisse du papier filtre.

Analyse du contenu en TPF

(9) Préparer trois standards de 5, 10 et 15 μg de TPF ml^{-1} à l'aide de la solution mère de 1000 $\mu\text{g/ml}$. Bien mélanger ces solutions.

(10) Mesurer l'absorbance, sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 485nm, des standards (mesurés au début, au milieu et à la fin de l'expérience) et des solutions filtrées. Cet appareil permettra de mesurer l'intensité de la couleur rouge des échantillons. Il est important de brasser les échantillons avant d'analyser sur le spectrophotomètre.

(11) Faire une courbe de calibration grâce aux mesures d'absorbances des standards. La valeur lue sur le spectrophotomètre, pour un échantillon, sera insérée sur la courbe de calibration afin de déduire la concentration de TPF.

(12) Pour connaître l'activité de la déshydrogénase, on doit convertir la concentration en solution de TPF ($\mu\text{g ml}^{-1}$) vers une activité dans le sol (en μg de TPF g^{-1} de sol sec—formule 2).

5. Conversion de la concentration liquide de TPF en activité de déshydrogénase

$$\text{Activité de déshydrogénase} = \frac{[\text{TPF}] * \text{Volume de solution}}{\text{masse de sol sec}}$$

où :

L'activité en déshydrogénase est en μg de TPF g^{-1} de sol sec / 24 h

[TPF] est la concentration de TPF en $\mu\text{g/mL}$

Le volume de solution ajoutée au sol est en mL

La masse de sol sec est en g.

6. Références

- Alef K. 1995. Dehydrogenase activity. In: Alef K et Nannipieri P. (eds.). Methods in applied soil microbiology and biochemistry, Academic Press, London, pp.397-404.
- Chander K, Brookes PC. 1991. Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils? Soil Biology and Biochemistry 23:909-915.
- Lenhard G. 1956. Die Dehydrogenaseaktivität des Bodens als Mass für die Mikroorganismen-tätigkeit im Boden, Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenkd. 73:1-11.
- Mattson AM, Jensen CO, Dutcher RA. 1947. Triphenyltetrazolium chloride as a dye for vital tissues, Science, (September) 26:294-295.
- Tabatabai MA. 1994. Soil enzymes. In: Mickelson SH. (ed.). Methods of Soil Analysis : Part 2 – Microbiological and biochemical properties, number 5, Soil Science Society of America, Madison, pp. 775-833.

3.8. Détermination de l'activité de l'uréase dans les sols

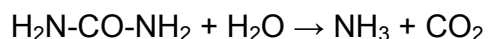
Par: Carmen Donisa et Sébastien Sauvé

Dernière révision: 29 juin 2004

Source initiale: Alef K. 1995. Urease activity. In: Alef K et Nannipieri P. (eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*, Academic Press, London, pp. 316-320.

1. Application

L'enzyme uréase catalyse l'hydrolyse de l'urée en CO₂ et NH₃ par un mécanisme de réaction basé sur la formation de carbamate comme intermédiaire :



Cet enzyme est largement répandu dans l'environnement, présent dans les cellules des microorganismes, des plantes et des animaux. L'uréase catalyse l'hydrolyse de l'hydroxyurée, la dihydroxyurée et les semicarbazides. L'uréase contient du nickel et son poids moléculaire varie de 151,000 to 480,000 Da (Blakeley et Zerner, 1984).

L'uréase dans les sols est fortement retenu à la matière organique et aux minéraux et les valeurs Km correspondantes variant entre 1.3 et 213 mM (Lai et Tabatabai 1992).

Principe

La détermination de l'activité de l'uréase est basée sur la quantification par colorimétrie de l'ammoniaque produite lors de l'incubation de sol en présence d'une solution d'urée pendant deux heures à 37°C. La quantification repose sur la réaction du salicylate de sodium avec NH₃ en présence de dichloroisocyanurate de sodium qui forme un complexe vert sous conditions alcalines. Le nitriprusside de sodium est utilisé comme catalyseur pour augmenter la sensibilité de la méthode par un ordre de grandeur.

2. Matériel

- Incubateur ajustable à 37°C
- Agitateur
- Papier filtres Fisherbrand Q8 ou l'équivalent
- Spectrophotomètre analysant à 690 nm
- Ballons jaugés (100, 500, 1000 mL)

- Erlenmeyers (50, 100 mL)
- Balance (3 décimales)
- Papier à peser
- Eau déionisée
- Le sol à tester doit être bien homogénéisé

3. Réactifs:

- Solution d'urée (79.9 mM $\text{H}_2\text{N-CO-NH}_2$)—dissoudre 2.4 g urée et faire le volume à 500 mL avec de l'eau déionisée (préparer une solution fraîche quotidiennement).
- Chlorure de potassium (2.0 M KCl)—dissoudre 74.6 g de KCl dans de l'eau déionisée, ajouter 10 ml de HCl 1M et faire le volume à 1000mL avec de l'eau déionisée.
- Hydroxyde de sodium (0.3 M NaOH)—dissoudre 12.0 g de NaOH dans de l'eau déionisée et faire le volume à 1000mL avec de l'eau déionisée.
- Salicylate de sodium (1.06 M)—dissoudre 17.0 g de salicylate de sodium et 120 mg de nitroprusside de sodium dans de l'eau déionisée et faire le volume à 100 mL.
- Salicylate de sodium/NaOH—Mélanger des volumes égaux de NaOH, de Na-salicylate solutions et d'eau déionisée ($\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{3}$), préparer une solution fraîche quotidiennement.
- Dichloroisocyanure de sodium (0,1 %)—dissoudre 0.1 g de dichloroisocyanure de sodium dans 100 mL d'eau déionisée (préparer la solution juste avant de l'utiliser).

Standard d'ammonium :

- Solution I: Dissoudre 3.82 g de NH_4Cl dans de l'eau déionisée et faire le volume à 1000 mL ($1000 \mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}$).
- Solution II: Pipeter 0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 de la solution I dans des ballons jaugés de 100 mL et faire le volume à avec la solution de KCl.

4. Mode opératoire

- Faire chauffer l'incubateur avant de débuter les manipulations pour qu'il ait le temps d'atteindre la température requise (37°C).

Préparation des échantillons

- (1) Peser 1 g de sol humide. Faire sécher à 105°C durant 24 heures. Peser le sol sec.

- (2) Déposer 5 g de sol humide dans un erlenmeyer de 100 mL et ajouter 2.5 mL de solution d'urée. Pour les tests de lixiviats, ajouter 2.5 ml du lixiviat à tester. Fermer les erlenmeyers et incuber à 37 °C pendant 2 heures sans agitation.
- (3) Après l'incubation, ajouter 50 ml de solution KCl et brasser les erlenmeyers sur un agitateur rotatif pendant 30 min.
- (4) Filtrer ensuite les suspensions sur papier filtre.
- (5) Les filtrats sont ensuite analysés pour doser l'ammonium. Réaliser des blancs selon la même procédure, sans le sol et en utilisant 2.5 mL d'eau déionisée au lieu du lixiviat. Trois réplicats sont minimalement recommandés.
- (6) Pour un contrôle négatif, on utilise un sol préalablement contaminé avec du Ag_2SO_4 à 500 mg/kg de sol sec. On prépare une certaine quantité à l'avance.
- (7) Pour le contrôle positif, on utilise le sol traité avec 2.5 mL d'eau déionisée au lieu du lixiviat en ajoutant la solution d'urée à la fin de l'incubation et immédiatement avant l'ajout de KCl.

Dosage de l'ammonium

- Pipeter 1 mL de filtrat dans un erlenmeyer de 50 mL et ajouter 9 ml d'eau déionisée, 5 mL de solution de salicylate de sodium/NaOH solution et 2 ml de dichloroisocyanure de sodium et laisser reposer à la température de la pièce pour 30 min avant de mesurer la densité optique à 690 nm.

Calibration

- Pipeter 1 mL de solution d'ammonium dans les tubes de verre, diluer avec 9 mL d'eau déionisée et déterminer ensuite les concentrations d'ammonium (0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 $\mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}$).

5. Calcul activité de l'uréase

Corriger les données pour les blancs et calculer:

$$\text{Activité de l'uréase} = \frac{[\mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}] * V * 10 * m}{M_{\text{sec}}}$$

Où l'activité de l'uréase est en ($\mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}$), la concentration d'azote ammoniacal est multipliée à V, le volume total de solution, 10 est le facteur de dilution, m est le poids de sol humide utilisé pour l'essai et M_{sec} est la masse sèche de 1 g de sol humide.

6. Références

- Alef, K. 1995. Ureas activity. In: Alef K et Nannipieri P. (eds.) Methods in applied soil microbiology and biochemistry, Academic Press, London, 316-320.
- Blakeley RL, Zerner B. 1984. Jack bean urease: the first nickel enzyme. J. Mol. Catal. 23:263-292.
- Lai CM, Tabatabai MA. 1992. Kinetic parameters of immobilised urease. Soil Biol. Biochem. 24:225-228.

3.9. Mesure du potentiel de nitrification dans les sols

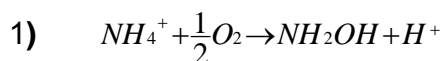
Par : Sophie Chaperon

Date : 26 mai 2004

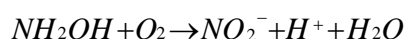
Source initiale: Sauvé S. et al., Nitrification potential in field-collected soils contaminated with Pb or Cu, Applied Soil Ecology 1999, 12, 29-39.

1. But

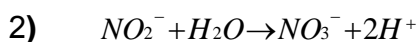
La nitrification est un processus microbien dans lequel NH_4^+ est converti en NO_3^- en deux étapes :



Catalyseur : Enzyme Ammonia Monooxygénase



Catalyseur : Enzyme Hydroxylamine oxidoréductase



Catalyseur : Enzyme nitrite oxidoréductase

Bactéries

Nitrosomas europae

Bactéries

Nitrobacter

La spécificité des bactéries invoquées fait en sorte que le potentiel de nitrification est un indicateur sensible à la contamination métallique d'un sol. Par contre, bien que dans la majorité des cas la nitrification soit effectuée par des bactéries, d'autres microorganismes hétérotrophes sont aussi capables d'effectuer la nitrification.

Pour quantifier le processus de nitrification, un essai microbien simple a été développé dans lequel des mesures de nitrites sont effectuées par colorimétrie. Par contre, il est très important de bien réaliser que les mesures de nitrification sont très sensibles aux variations de pH et de matière organique dans les sols (comme plusieurs processus microbiens, mais possiblement encore plus). Pour l'application écotoxicologique de ce test, voir Sauvé et al. (1999) ainsi que Smolders et al. (2003).

2. Matériel

- Incubateur à 28° C
- Erlenmeyers de 125 mL
- Tubes de centrifugation
- Seringues à filtration

- Filtres 0.45µM en cellulose
- Spectrophotomètre UV-VIS à 520nm

3. Réactifs et solutions

40 mM de NH_4^+ sous forme de sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
30 mM azoture de sodium (NaN_3)
2 mM de NH_4^+ sous forme de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2 mM de NH_4^+ sous forme de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 3 mM de NaN_3
Solution mère 1000 ppm NO_2^- -N de nitrite de sodium (NaNO_2)
Solution intermédiaire 10 ppm NO_2^- -N de nitrite de sodium (NaNO_2)
Courbe de calibration avec 0, 0.1, 0.2, 0.5 et 1.0 ppm NO_2^- -N
Réactif colorant : 10g/L Sulfanilamide
Réactif colorant : 1g/L N-(1-Naphtyl)ethylenediamide dihydrochloride
Acide phosphorique à 85 %

4. Manipulations

Information préliminaire : Les échantillons doivent être effectués en quadruple. La séquence des échantillons doit inclure un contrôle (+), un contrôle (-) et les échantillons désirés. Le contrôle (+) est un échantillon de sol non contaminé qui suit le même traitement que les autres échantillons. Le contrôle (-) utilise l'azoture d'ammonium, un biocide.

Étape préliminaire : Décontaminer toute la vaisselle dans du HCl 10 % et non dans du HNO_3 .

Nitrification

Dans des erlenmeyers de 125 mL, peser 10 g de sol humide (équivalent de sol sec). Ajouter 10 mL d'eau déionisée pour tous les contrôles et échantillons puis placer à l'incubateur à 28 °C avec une agitation rotative de 110 rpm pour 16h. Ensuite, pour 4 échantillons ajouter 10 mL de la solution 4 (fait à partir des solutions 1 et 2), ceci constitue le contrôle (-). Pour tous les autres échantillons, incluant le contrôle (+), ajouter 10 mL de la solution 3 (fait à partir de la solution 1). Le rapport final sol:solution doit être environ 1:2. Toutefois, si les sols contiennent beaucoup de matières organiques une quantité plus importante de solution sera nécessaire. Incuber les sols pendant 4h à 28 °C avec une agitation rotative de 110 rpm. Transférer les échantillons dans des tubes de centrifugation, centrifuger à 10 000g pendant 15 min et filtrer les échantillons avec les seringues et les filtres de 0.45µM en cellulose dans des fioles jetables.

Mesure des nitrites par colorimétrie

Préparation du réactif colorant : Dans un ballon jaugé de 100 mL, peser 1 g de sulfanilamide et dissoudre dans environ 50 mL d'eau et 10 mL H_3PO_4 . Ajouter 0.1 g de

N-(1-Naphtyl)ethylenediamide dihydrochloride et compléter au trait de jauge. Cette solution est stable un mois au réfrigérateur dans un contenant en verre ambré.

Calibration : Prendre 1, 2, 5 et 10 mL de la solution intermédiaire de NaNO_2 et diluer avec de l'eau déionisée dans des ballons jaugés de 100 mL. Mettre 1 mL de chacune des solutions dans des tubes en verre, ajouter 4 mL d'eau déionisée et 0.2 mL du réactif colorant (vous avez maintenant une dilution d'un facteur 5). Effectuer un blanc avec 5 mL d'eau et 0.2 mL du réactif colorant. Refaire les mélanges avec le réactif colorant 2 fois pour obtenir chaque point de calibration en triple. Attendre 15 minutes avant de prendre les lectures d'absorbance.

Échantillons : Selon la quantité de NO_2^- présente dans les échantillons les dilutions seront différentes. Par exemple, pour le sol valbo 2, 4 mL de chacun des filtrats ont été mélangés avec 1 mL d'eau et 0.2 mL du réactif colorant. Ensuite, mesurer l'absorbance d'un standard avant de débiter la mesure des échantillons, puis mesurer l'absorbance du même standard à tous les 8 échantillons et à la fin de l'analyse.

5. *Calculs*

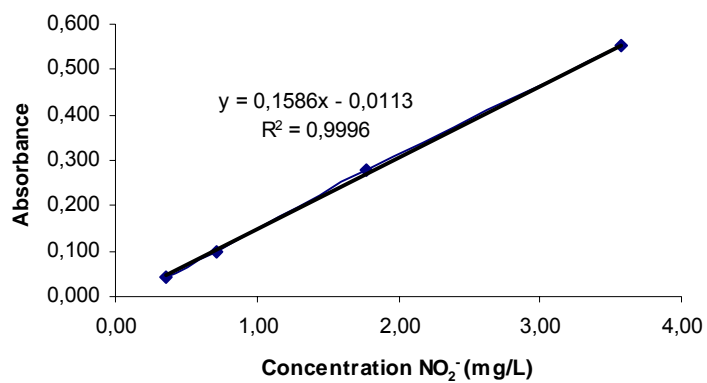
Faire une courbe de calibration de l'absorbance en fonction des concentrations standards de NO_2^- , déterminer l'équation de la droite et à partir des lectures d'absorbances des inconnus trouver la concentration de NO_2^- . Attention aux facteurs de dilution.

6. *Exemple*

Courbe de calibration

	[NaNO_2] g/L	[NaNO_2] mol/L	[$\text{NaNO}_2\text{-N}$] mg/L	[NO_2^-] mg/L
Solution mère de NaNO_2	5,352	7,757E-02	1086	3569
Solution intermédiaire de NaNO_2	0,0535	7,76E-04	10,9	35,7
Calibration avec : 0, 1, 2, 5 et 10 ml de la solution intermédiaire				

# Standard	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (μmol/L)	Dilution	Absorbance à 520 nm
0	Blanc			0
1	0,357	7,76	5X	0,041 0,047 0,040
	moyenne			0,043
2	0,714	15,5	5X	0,098 0,094 0,107
	moyenne			0,100
3	1,78	38,8	5X	0,264 0,282 0,288
	moyenne			0,278
4	3,57	77,6	5X	0,556 0,556 0,544
	moyenne			0,552



Mesure des échantillons

# échantillon	Description	Dilution	Abs/ 520 nm	[NO ₂ ⁻] mg/L	Correction dilution [NO ₂ ⁻] mg/L	[NO ₂ ⁻] mol/L	[NO ₂ ⁻] mol/Kg	[NO ₂ ⁻] µmol/Kg	[NO ₂ ⁻] µmol/Kg*d
STD 2		5x	0,098	0,689		1,50E-05			
1	Contrôle (+) avec NH4	1,25 x	0,126	0,866	0,216	4,70E-06	8,96E-06	9	54
2	Contrôle (+) avec NH4	1,25 x	0,102	0,714	0,179	3,88E-06	7,47E-06	7	45
3	Contrôle (+) avec NH4	1,25 x	0,101	0,708	0,177	3,85E-06	7,38E-06	7	44
4	Contrôle (+) avec NH4	1,25 x	0,087	0,620	0,155	3,37E-06	6,42E-06	6	39
Moyenne								8	45
Écart-type								1	6
5	Contrôle (-) avec NH4 + NaN3	1,25 x	-0,009	0,0145	0,004	7,88E-08	1,54E-07	0	1
6	Contrôle (-) avec NH4 + NaN3	1,25 x	0,007	0,115	0,029	6,27E-07	1,21E-06	1	7
7	Contrôle (-) avec NH4 + NaN3	1,25 x	-0,011	0,00189	0,000	1,03E-08	1,97E-08	0	0
8	Contrôle (-) avec NH4 + NaN3	1,25 x	-0,013	-0,0107	-0,003	-5,82E-08	-1,12E-07	0	-1
Moyenne								0	2
Écart-type								1	4
STD 2		5x	0,098	0,689		1,50E-05			
9	Échantillon x	1,25 x	x	x	x	x	x	x	x
10	Échantillon x	1,25 x	x	x	x	x	x	x	x
11	Échantillon x	1,25 x	x	x	x	x	x	x	x
12	Échantillon x	1,25 x	x	x	x	x	x	x	x
Moyenne								x	x
Écart-type								x	x
STD 2		5x	0,098	0,689		1,50E-05			

*À noter que la correction pour la dilution est effectuée en fonction de la courbe de calibration pour laquelle les standards ont une absorbance diluée 5x.

7. Références

- Sauvé S, Dumestre A, McBride M, Gillett J, Berthelin J, and Hendershot W. 1999. Nitrification potential in field-collected soils contaminated with Pb and Cu. *Applied Soil Ecology* 12:29-39.
- APHA, AWWA, WEF, 4500-NO₂- Nitrogen (Nitrite) dans : *Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater*, 20th ed, APHA, Washington DC, 1998, 4-112   4-114
- Smolders E, McGrath SP, Lombi E, Karman CK, Bernhard R, Cools D, Van den Brande K, Van Os B, Walrave N. 2003. Comparison of zinc toxicity for soil microbial processes between laboratory-contaminated and polluted field soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2592-2598.
- Prosser JI. 1986., *Nitrification*, The Society for General Microbiology, Oxford, Washington DC, USA.
- Beelen P. van, Doelman P. 1997. Significance and Application of Microbial Toxicity Tests in Assessing Ecotoxicological Risks of Contaminants in Soil and Sediment, *Chemosphere* 34: 455-499
- Shen Q.R, Ran W., Cao Z.H. 2003. Mechanisms of nitrite accumulation occurring in soil nitrification, *Chemosphere* 50: 747-753

3.10. La respiration induite

Par : Carmen Donisa

Dernier révision : 29 juin 2004

Source initiale : Test de minéralisation en microcosmes, protocole standard d'opération A10, École Polytechnique, Université de Montréal

1. But

Les cellules vivantes ont besoin d'un apport constant en énergie qui, pour la microflore hétérotrophique, provient de la transformation des matières organiques comme la cellulose, les protéines, les nucléotides et les composés humifiés. Les réactions qui se passent dans les cellules vivantes sont des réactions d'oxydoréduction basées sur le transfert des électrons d'un donneur à un accepteur. Lors de la respiration, soit l'oxydation de la matière organique par les microorganismes aérobiques, les groupes fonctionnels oxygénés sont les groupements finaux accepteurs des électrons. Les produits finaux de ce processus sont le CO₂ et H₂O. L'activité métabolique des microorganismes du sol peut être quantifiée en mesurant la production du CO₂ ou la consommation d'oxygène (Nannipieri et al., 1990).

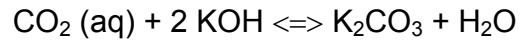
La respiration des sols est une des premières méthodes pour quantifier l'activité microbienne des sols et elle demeure encore très utilisée. La **respiration basale** est définie comme étant la respiration déterminée sans l'ajout de substrats organiques alors que la **respiration induite** est la respiration mesurée en présence de substrats ajoutés comme le glucose, les acides aminés, les feuilles, etc.

Brève description

Pour déterminer la biodégradabilité du glucose dans les sols, on ajoute du glucose radioactif dans un microcosme contenant la matrice d'intérêt et on vérifie s'il y a minéralisation de la part des micro-organismes présents (Samson et al., 1991; Millette et al., 1995, Otte et al., 1994). La biodégradation ultime du glucose est appelée la **minéralisation** et implique que le glucose est complètement transformé en CO₂.

Un poids de 20 g de sol est déposé dans une bouteille sérologique de 120 ml. La solution de glucose marqué au carbone-14 est utilisée pour obtenir dans les microcosmes une activité totale de 100 000 dpm (désintégrations/minute). Chacun des microcosmes est muni d'une trappe à CO₂ constituée de 1 ml de KOH 1 N déposé dans un tube de verre de 5 ml à l'intérieur de la bouteille. Le microcosme est scellé et incubé sans agitation à 22°C dans la matrice au moment de l'échantillonnage. Après 24 h, le KOH contenant le [¹⁴C]CO₂ est échantillonné et déposé dans un vial pour le comptage de la radioactivité dans un compteur à scintillation. La minéralisation du glucose

radiomarqué est ainsi mesurée par la production de $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ qui a réagi avec la solution de KOH selon la réaction chimique suivante:



La radioactivité enregistrée représente donc le CO_2 qui a été minéralisé par les micro-organismes.

Par ailleurs, afin de tenir compte des pertes abiotiques des composés radioactifs, des témoins empoisonnés contenant 0.02% (p/p) d'azoture de sodium doivent être préparés.

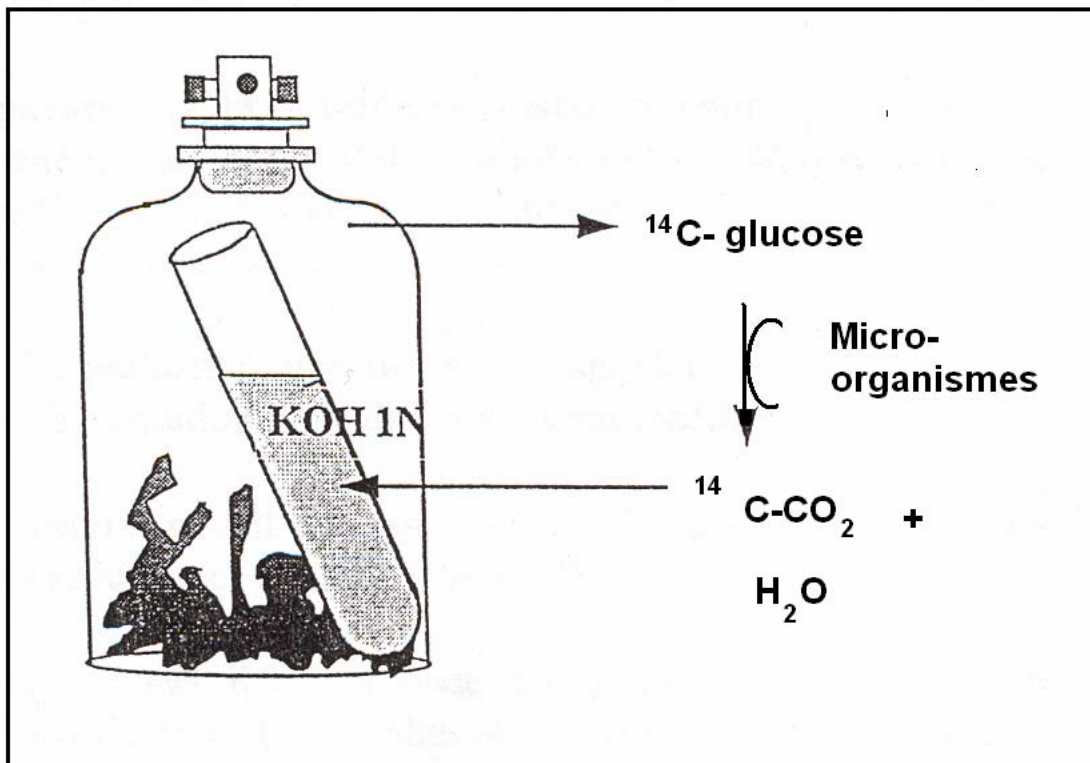


Figure 1: Principe de minéralisation en microcosme.

2. Matériel

Appareils

- Compteur à scintillation Wallac 1409 avec unité de disquette 3.5 et imprimante Epson LX300 (Fisher Scientific);
- Cocktail à scintillation OptiPhase Hisafe 3 (Fisher Scientific);
- Support pour vials à scintillation (Fisher Scientific);
- Balance analytique (précision de ± 0.002 g);

Verrerie

- -Bouteilles sérologiques 120 ml (Fisher Scientific);
- Valves mininert avec septums (pour les composés volatils) (Supelco); ou
- Septums étanches avec anneaux métalliques (Fisher Scientific);
- Tubes en verre de 5 ml (diamètre 10 ou 12 mm) (Fisher Scientific);
- Vials à scintillation en verre de 20 ml avec bouchons (Fisher Scientific);
- Papier absorbant;
- Resserreur de bouchon « crimper »;
- Seringues en verre Gastight de 1, 10, 50, 100, 250 et 1000 μ l;
- Seringues en plastique de 30 ml et 5 ml;
- Aiguille en acier inoxydable de 6 ”;
- Vial ambré de 1.8 ml avec bouchon contenant un septum.

3. Réactifs

- Glucose radioactif [$U^{14}C$] (Sigma);
- KOH (Anachemia);
- Azoture de sodium (NaN_3) (Anachemia);

4. Manipulations

Préparation de la solution radioactive

Avant même de débuter le test de minéralisation en microcosmes, il faut préparer la solution radioactive qui servira de substrat aux micro-organismes.

Étapes préliminaires

- Prévoir le nombre d'échantillons de l'expérience et le nombre de fois que l'on vérifiera la solution radioactive avec des **contrôles** (avant l'expérience et

pendant l'ajout dans les microcosmes afin de vérifier la stabilité de la solution et la reproductibilité des manipulations, environ à tous les 6 microcosmes);

- Effectuer une estimation de la quantité de dpm requise pour l'expérience. En général, une injection spontanée de 100 000 dpm / microcosme est choisie (ex.: pour 10 microcosmes, il faut une solution mère ayant au moins 1 000 000 de dpm);
- Calculer le volume de solution mère requis pour effectuer la solution de travail.

** Il est courant d'utiliser une injection instantanée de 10 μ L de solution radioactive contenant 100 000 dpm par microcosme. Le 10 μ L est issu d'un choix personnel basé sur la facilité de manipulation et la reproductibilité de l'injection. Une quantité entre 5 et 100 μ L peut quand même être utilisée.*

Préparation de la solution radioactive de travail

Tous les produits radiomarqués sont entreposés dans la boîte en plexiglas dans le réfrigérateur à 4 °C.

1. Réserver la hotte radioactive pour la période de travail;
2. Installer un papier absorbant dans la hotte utilisée pour les manipulations radioactives (hotte A) et fixer le papier à l'aide de ruban gommé;
3. Aller chercher le produit radioactif à 4°C et déposer la boîte qui le contient sur le papier absorbant dans la hotte, baisser la vitre de la hotte;
4. Préparer un vial en verre de 20 ml avec le solvant propre avec lequel on veut diluer un certain volume de la solution mère. Prévoir un second vial dans lequel sera déposé le solvant-déchet (solvant utilisé pour le rinçage des seringues);
5. Déposer la quantité de solvant, préalablement calculée dans un vial ambré en verre de 1.8 ml à l'aide d'une seringue en verre *Gastight* préalablement rincée trois fois au solvant propre et mettre le bouchon en téflon;
6. Prendre la quantité nécessaire de produit radioactif à l'aide d'une seringue en verre (se trouvant dans la hotte A) rincée trois fois au solvant propre et déposer dans le même vial ambré de 1.8 ml. Boucher le vial de 1.8 ml avec un bouchon à couverture de téflon et bien agiter;
7. Vérifier le nombre de dpm / μ L de cette solution de travail en injectant 1 μ L (quantité minimale) dans un vial à scintillation contenant 10 mL de cocktail à scintillation puis en mesurant au compteur à l'aide du protocole EASY COUNT (00) pour une lecture de 1 min par vial;
8. Identifier la bouteille en indiquant combien de dpm / μ L qu'elle contient et indiquer la quantité de produit radioactif utilisée dans la feuille d'inventaire.

4.3. Préparation des microcosmes

- Peser 20 g de sol ou 20 mL d'eau selon le cas dans des bouteilles sérologiques bien identifiées (120 ml). Effectuer l'ajout de glucose marqué;

- Ajouter l'azoture de sodium (NaN_3) 0.2% (p/p) soit 0.04 g, dans les microcosmes témoins à la toute fin. Ceux-ci constitueront les témoins abiotiques;
- Placer le tube de verre de 5 ml contenant 1 ml de KOH 1N à l'intérieur du microcosme;
- Installer les microcosmes sur un chariot recouvert de papier absorbant près de la hotte de travail;
- Injecter la quantité de solution radioactive de travail requise (généralement 10 μL) dans le microcosme à l'aide d'une seringue en verre *Gastight* préalablement rincée trois fois au solvant propre.
- Effectuer des contrôles (environ un à chaque 6 microcosmes) en injectant 10 μL de la solution radioactive de travail dans un vial à scintillation contenant 10 ml de cocktail.
- Sceller le microcosme avec la valve mininert contenant un septum (produit radioactif volatil) ou bien avec un septum recouvert de téflon et son anneau métallique à l'aide du resserreur de bouchon et passer au microcosme suivant;
- Entreposer les microcosmes à 22°C, à la noirceur si nécessaire (cabinet gris d'entreposage des microcosmes radioactifs).
- Placer tous les vials contenant les contrôles dans le support à vials et ajouter une languette identifiée PROTOCOLE 1 sur le côté du support marqué d'un point rouge;
- Faire compter dans le compteur à scintillation liquide en plaçant le support point rouge vers la droite;

Échantillonnage des microcosmes

L'échantillonnage des microcosmes s'effectue de façon périodique pouvant aller d'un échantillonnage aux heures à un échantillonnage hebdomadaire dépendamment du polluant en question de même que de la matrice.

1. Préparer une solution de KOH 1N (56.11 g/l d'eau distillée);
2. Porter en tout temps sarrau et deux paires de gants + lunettes;
3. Réserver la hotte radioactive pour la période de travail;
4. Installer un papier absorbant dans la hotte utilisée pour les manipulations radioactives (hotte A) et fixer le papier à l'aide de ruban gommé;
5. Installer dans la hotte les deux béciers identifiées EAU DE RINÇAGE et EAU REJETÉE. Remplir le premier avec de l'eau distillée (utiliser l'évier réservé pour la radioactivité);
6. Retirer les microcosmes du lieu d'entreposage et installer les microcosmes sur un chariot recouvert de papier absorbant près de la hotte de travail;
7. Numéroter tous les bouchons avec le numéro de microcosme, vos initiales, le numéro d'échantillonnage et la date;

8. Placer les vials à scintillation dans le support noir en commençant par le côté opposé au point rouge sur le support;
9. Amener le support contenant les vials de même que les bouchons dans la hotte;
10. Remplir la seringue en plastique de 30 cc avec la solution de KOH 1N et la déposer dans la hotte après avoir retiré l'aiguille;
11. Effectuer un blanc en déposant 10 ml du cocktail à scintillation (à l'aide du distributeur) dans le premier vial de 20 ml et en y ajoutant 2 ml de KOH 1N à l'aide de la seringue en plastique;
12. Effectuer l'échantillonnage du premier microcosme: prélever la solution de KOH en introduisant une aiguille en acier inoxydable de 6" connectée à une seringue de 5 ml dans le tube se trouvant à l'intérieur du microcosme;
13. Vider la trappe à l'aide de la seringue;
14. Retirer la seringue en laissant l'aiguille dans le microcosme;
15. Mettre le contenu de la seringue dans un vial à scintillation. Moucher la dernière goutte sur le côté du vial;
16. Rincer la trappe avec 1 ml de KOH frais en utilisant toujours l'aiguille insérée et additionner ce volume au même vial;
17. Ajouter 1 ml de KOH frais dans la trappe et enlever la seringue (ce KOH sera prélevé au prochain échantillonnage);
18. Laisser équilibrer les pressions intérieures et extérieures avec l'aiguille puis reconnecter la seringue à l'aiguille et déposer celles-ci dans le bécher contenant l'eau de rinçage;
19. Ajouter 10 ml de cocktail à scintillation au vial à scintillation et mettre le bouchon;
20. Agiter bien le vial à scintillation (contenant le $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$);
21. Recommencer les étapes 12 à 21 pour tous les autres microcosmes en prenant soin de rincer la seringue de 5 ml à l'eau distillée trois fois entre chaque microcosme et à la toute fin.
22. Placer tous les vials dans le support à vials et ajouter une languette identifiée PROTOCOLE 1 sur le côté du support marqué d'un point rouge;
23. Faire compter dans le compteur à scintillation liquide en plaçant le support point rouge vers la droite;
24. Bien indiquer les échantillons sur la feuille d'inventaire du compteur en notant aussi le numéro de fichier.
25. Entreposer à nouveau les microcosmes à la température voulue, à la noirceur si nécessaire (cabinet gris d'entreposage des microcosmes radioactifs) jusqu'au prochain échantillonnage;

5. Calculs

Pour calculer la **concentration de glucose marqué minéralisé/consommé**, on utilise les relations suivantes:

- a. $1\mu\text{Ci} = 2,2 \cdot 10^6 \text{ dpm}$
- b. $33.9 \mu\text{Ci} / \text{mg D-glucose} [\text{U}^{14}\text{C}]$

Pour calculer le pourcentage de minéralisation:

$\% \text{ de minéralisation} = \frac{\text{nb de dpm au temps X} \cdot 100}{\text{nb de dpm moyen dans les contrôles de départ}} + \% \text{ min. au temps X-1}$

Références

- Millette, D., Baker, J., Comeau, Y. Butler, B. Frind, E. O. Clément, B. et Samson, R. (1995) Substrate interaction during aerobic biodegradation of creosote-related compounds : a factorial experiment Environ. Sci : Technol. 29: 1744-1952.
- Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B. (1990) Ecological significance of the biological activity in soil. In Soil Biochemistry, vol.6, Bollag J-M, Stotzky G. (eds.), Marcel Dekker, New York, Basel, pp.293-355.
- Otte, M - P. Gagnon, J. Comeau, Y. Matte, N. Greer, C. W. et Samson, R. (1994) Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol / creosote contaminated soil. Applied Microbiology and biotechnology, 40: 926-932.
- Samson, R. Cseh, T. Hawari, J. Demeter, A. Al-Bashir et B. Leduc. (1991) Effect of redox conditions, soil / contaminant interaction and chemical structure on the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in flooded soil World Environment, Acta Press, Calgary.