



Caractérisation du résidu particulaire et étude des mécanismes limitant la biodégradation des boues d'épuration

Sophie Ceriani Decremps

► To cite this version:

Sophie Ceriani Decremps. Caractérisation du résidu particulaire et étude des mécanismes limitant la biodégradation des boues d'épuration. Génie des procédés. INSA de Toulouse, 2014. Français. NNT : 2014ISAT0020 . tel-01510824

HAL Id: tel-01510824

<https://theses.hal.science/tel-01510824>

Submitted on 20 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National des Sciences Appliquées

Présentée et soutenue par :
Sophie DECREMPS

Le 18 avril 2014

Titre :
Caractérisation du résidu réfractaire et étude des mécanismes limitant la biodégradation des boues d'épuration

École doctorale et discipline ou spécialité :
ED MEGeP : Génie des Procédés et de l'Environnement

Unité de recherche :
LISBP, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés

Directeurs de Thèse :
Etienne PAUL Professeur, INSA, LISBP, Toulouse
Xavier LEFEBVRE Ingénieur de Recherche, INSA, LISBP, Toulouse

Rapporteurs :
Jean-Philippe DELGENES Directeur de Recherche, INRA, LBE, Narbonne
Gilles GUIBAUD Professeur, UNILIM, GRESE, Limoges

Autres membres du jury :
Christophe DAGOT Professeur, UNILIM, ENSIL, Limoges
Élisabeth GIRBAL-NEUHAUSER Professeur, IUT, LBAE, Auch
Fabien VEDRENNE Chercheur, VERI, Maisons-Laffitte

Résumé

La matière des eaux usées urbaines (ERU) subit des transformations au sein des filières « eau » et « boue » des stations d'épuration (STEP). Une fraction de la matière organique est systématiquement retrouvée en fin de traitement biologique sous forme particulaire et est, à ce titre, identifiée comme non biodégradable et notée X_U . L'origine « exogène » i.e. provenant de l'ERU brute, ou « endogène », i.e. résidus générés par les processus microbiens, et la contribution quantitative des composés accumulés dans cette fraction X_U ne sont pas identifiables simplement. Par ailleurs, si une faible bioaccessibilité et/ou une inadéquation entre leur nature chimique et le pool enzymatique présent peuvent être suspectées, les raisons de leur caractère réfractaire sont mal connues et constituent un frein pour optimiser la valorisation de la boue par digestion anaérobie. S'intéressant spécifiquement à la fraction organique réfractaire d'une boue d'épuration, ce travail de thèse s'est donc attaché à définir son origine, à quantifier sa proportion selon différentes conditions opératoires de STEP et à caractériser ses composés d'un point de vue physique et chimique.

Une approche filière a tout d'abord été menée pour analyser la relation entre l'origine et la biodégradabilité d'une boue. La démarche scientifique s'est ainsi basée sur (1) l'utilisation de boues de compositions contrastées (car produites sur ERU brute ou décantée, sur boue primaire ou effluent synthétique, à des âges de boue aérobies compris entre 2 et 70 jours), et sur (2) l'analyse relative des propriétés physiques, biologiques et chimiques des matrices réfractaires issues de leur digestion ultime anaérobie. En confrontant données expérimentales et prédites par le modèle ASM1, les fractions DCO des matrices réfractaires ont été déterminées. 85 % de la matière organique réfractaire en anaérobiose demeurant agrégée, deux approches de caractérisation chimique ont été mises en œuvre : (i) Analyse directe de l'empreinte chimique globale par spectrophotométrie infrarouge (IR) en réflexion totale atténuée (ATR) ; (ii) Analyses moléculaires (fluorescence 2D et 3D, UV 210 et 280 nm, dosages biochimiques) de fractions solubilisées après déconstruction thermo-chimique de l'agrégat réfractaire.

Associée à des traitements statistiques (Classification Ascendante Hiérarchique, CAH, et Analyse en Composantes Principales, ACP), l'utilisation de l'empreinte IR s'est révélée pertinente pour différencier chimiquement les matrices réfractaires des boues et suivre l'évolution des empreintes au fil des unités de traitement traversées. Ainsi, l'influence significative de la chimie des composés réfractaires exogènes ($X_{U,inf}$) et de leur fractionnement au niveau d'un décanteur primaire sur la chimie de la fraction réfractaire X_U ont pu être mis en évidence. Par ailleurs, l'utilisation combinée de techniques analytiques complémentaires a permis une caractérisation plus précise des familles de molécules impliquées. Par exemple, une contribution significative de composés de natures protéiques et humiques à la chimie de l'agrégat réfractaire et une nette implication des composés d'origine bactérienne à la fraction protéique-like réfractaire ont pu être constatées.

Enfin, l'empreinte IR a permis de caractériser l'effet d'un traitement thermique (60 à 95°C) ou chimique (hydrolyse acide et alcaline) sur la chimie de la fraction X_U . D'un point de vue application, cette approche pourrait être élargie à d'autres traitements (ex. température élevée, ozonation, hydrolyse enzymatique) pour évaluer leurs effets et définir leur point de fonctionnement pour une dégradation optimale des composés réfractaires. Par ailleurs, la possibilité de discriminer la chimie de différents résidus réfractaires pourrait aussi être mise à profit. L'acquisition de banques de données spectrales pourrait ainsi permettre de mieux définir les champs d'application des traitements couplés à la digestion anaérobie des boues d'épuration.

Mots clefs : résidu réfractaire anaérobie, spectroscopie infrarouge, solubilisation d'agrégats biologiques, caractérisation physico-chimique, digestion anaérobie, traitements des eaux usées.

Abstract

Organic matter of urban wastewaters (WW) is modified all along the treatment units of a wastewater treatment plant (WWTP). A fraction of the organic matter systematically remains at the end of biological treatment, mainly aggregated in particulate form. It is thus classified as refractory organics, noticed X_U . The “exogenous” origin (e.g. originated from the urban WW) or “endogenous” one (e.g. residues produced by the microbial processes) and the quantitative contribution of compounds accumulated into the X_U fraction are difficult to identify. Limited bioaccessibility and/or inappropriate chemical characteristics can be suspected. However, the reasons of their non-biodegradability are not clearly identified that limits an optimal valorization of sewage sludge by anaerobic digestion (AD). Focusing specifically on the refractory COD fraction of sewage sludge, this research work attempts to define its origin, to quantify its proportion depending on the applied operating conditions in the WWTP and to characterize the physical and chemical properties of its different compounds.

A first approach is carried out to analyze the relationship between the WWTP operating conditions and the biodegradability of various sludges. The scientific approach is based on (1) the use of sludges of contrasted composition (fed with raw wastewater, or pre-settled WW, diluted primary sludge or synthetic influent, and produced with a solid retention time in the range of 2 and 70 days), and, on (2) the comparative analysis of physical, biological and chemical characteristics for refractory matrices resulting from their ultimate anaerobic digestion. Refractory COD fractionations are estimated comparing experimental and ASM1 predicted data. While 85% of anaerobic refractory organic matter remain aggregated, two characterization approaches were applied: (i) direct analysis (on unmodified particulate matter) of the global chemical fingerprint by infrared spectroscopy (IR) on attenuated total reflexion (ATR); (ii) molecular analysis (fluorescence 2D and 3D, UV 210 and 280 nm, biochemical assays) of solubilized fractions obtained by thermo-chemical solubilisation of the refractory aggregate. Combined with statistical tools (Hierarchical Ascendant Classification, HAC and Principal Component Analysis, PCA), infrared fingerprints appear relevant to chemically discriminate refractory residues of the selected sludges and hence to follow the evolution of the chemistry of matrices along the treatments chains. Main factors involved in the chemical fingerprint of X_U are highlighted. For example the major effect of the chemistry of exogenic refractory compounds ($X_{U,inf}$) on the X_U chemical fingerprint is shown. In addition, our work underlines the interest of using complementary analytical techniques to get a more accurate chemical characterization of the molecules involved in the ultimate refractory matrices. For example, a significant contribution of proteins and humics on the chemistry of refractory aggregate could be observed with a clear contribution of bacterial compounds to protein refractory fraction.

Finally, the infrared fingerprint was used to characterize the effect of heat treatments (60-95°C) or chemical treatments (acid and alkaline hydrolysis) on the chemistry of X_U . In perspective, this approach could be extended to other treatments (e.g. high temperature, ozonation, enzymatic hydrolysis) to assess their effects and to define their optimal operating point for degradation of refractory compounds. Furthermore, the possibility to discriminate chemical fingerprints of different refractory residues could also be exploited. Acquiring spectral data banks could better define the scope of application of treatment units combined with the anaerobic digestion of sewage sludge.

Key words: refractory anaerobic residue, infrared spectroscopy, solubilisation of biological particulate matter, physico-chemical characterization, anaerobic digestion, wastewater treatment.

Remerciements

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ma thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directeurs de thèse, Etienne Paul et Xavier Lefebvre, qui ont formé un duo de choc grâce auquel j'ai énormément appris, aussi bien scientifiquement que humainement. Je vous remercie d'avoir cru en moi du début à la fin, et d'avoir vu en moi ce que je ne voyais pas.

Je souhaite aussi remercier Jesus Cacho et Fabien Vedrenne pour avoir suivi et soutenu ce projet de recherche au sein de Véolia Environnement Recherche et Innovation.

Je remercie Jean-Philippe Delgenès et Gilles Guibaud pour leur lecture attentive et rigoureuse de mon travail, et Christophe Dagot pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury. J'ai vraiment apprécié l'échange que nous avons eu après ma soutenance. Je vous remercie sincèrement pour vos compliments et vos encouragements.

Je tiens aussi à remercier Elisabeth Neuhauser et Dominique Lefebvre pour toute l'aide et le soutien qu'elles m'ont apporté. Leur gentillesse, leur disponibilité, leurs conseils avisés et leurs compétences m'ont incontestablement été d'une aide très précieuse.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe Symbiose pour son accueil pendant près de 4 ans. Vous avez tous, à votre manière, contribué à faire la personne et la scientifique que je suis devenue et c'est pourquoi je tiens à tous vous remercier.

Toutefois, j'ai à cœur de remercier tout particulièrement mes plus proches compagnons de route : Yoan et Matthieu évidemment, pour leur écoute, leur soutien et leur amitié depuis le début de cette aventure, Laetitia et Mathieu, pour leurs délires souvent salvateurs, Evrard, pour son ingéniosité et sa sincérité, Hélène, pour sa lucidité et son extrême gentillesse, Sébastien, pour sa bonne humeur et sa simplicité, Michel, pour son bon cœur et ses attentions sucrées, et Clarisse, pour ses perpétuels encouragements.

Enfin, j'adresse à mon père, à mes beaux-parents et à mes amis (tout particulièrement Manue et Elvire), un grand merci pour leur écoute, leur soutien dans les moments difficiles et leurs encouragements.

Un immense merci à toi, Ju ! Merci de toujours m'avoir soutenue, merci de m'avoir écoutée et d'avoir toujours cru en moi... et surtout, merci d'être toujours là pour moi. Évidemment, je n'oublie pas mes deux trésors, Hugo et Eléna, pour qui ça n'a pas toujours été simple. Merci de m'avoir attendue.

Mon passage au sein du LISBP touche donc à sa fin. Une page se tourne et je n'en garde que le meilleur. Je suis fière aujourd'hui du travail accompli par nous tous et espère sincèrement qu'il bénéficiera à d'autres.

Maintenant en route vers de nouvelles aventures, je vous remercie tous, une dernière fois, pour m'avoir permis d'en arriver là !

Table des matières

Résumé	III
Abstract	IV
Remerciements.....	V
Table des matières	VII
Tables des illustrations.....	X
Liste des symboles	XV
Introduction générale.....	- 1 -
Chapitre 1. Revue bibliographique.....	- 7 -
I.1 Boues et procédés : Origine et évolution de la fraction organique réfractaire.....	- 9 -
I.1.1 La fraction réfractaire exogène : $X_{U,inf}$	- 9 -
I.1.2 La fraction réfractaire endogène : $X_{U,E_{AE}}$	- 15 -
I.1.3 Détermination de la DCO réfractaire d'une boue	- 22 -
I.2 Caractéristiques de la matière organique réfractaire d'une boue.....	- 25 -
I.2.1 Préambule.....	- 25 -
I.2.2 Caractéristiques physiques des composés organiques réfractaires dans les boues d'épuration	- 26 -
I.2.3 Nature chimique des composés organiques réfractaires.....	- 31 -
I.3 Conclusion générale	- 40 -
I.4 Approche globale du travail de recherche	- 42 -
Chapitre 2. Matériels et méthodes	- 45 -
II.1 Matrices d'étude	- 47 -
II.1.1 Matrices avant digestion anaérobie long terme	- 47 -
II.1.2 Récupération de la fraction réfractaire anaérobie d'une matrice.....	- 52 -
II.2 Quantification de la fraction organique réfractaire d'une boue.....	- 53 -
II.2.1 Détermination de la $DCO_{U,AN}$ via le test BMP	- 53 -
II.2.2 Détermination de la $DCO_{U,AE}$ via une DBO_U (Sapromat ®)	- 57 -
II.3 Techniques de caractérisation de la matière	- 59 -
II.3.1 Paramètres chimiques globaux.....	- 59 -
II.3.2 Caractéristiques physiques de la matière.....	- 60 -
II.3.3 Nature biochimique des molécules	- 64 -
II.3.4 Empreinte chimique par spectrophotométrie en moyen infrarouge (MIR)	- 68 -
II.4 Déconstruction de la fraction particulaire d'un résidu réfractaire	- 75 -
II.4.1 Procédure générale	- 75 -
II.4.2 Calcul du rendement de solubilisation, ou potentiel de solubilisation	- 78 -
Chapitre 3. Le caractère réfractaire.....	- 79 -
III.1 Introduction	- 81 -
III.2 Relation entre la filière et la teneur en matière organique réfractaire d'une boue.....	- 82 -
III.2.1 Préambule : Estimation expérimentale de la fraction réfractaire anaérobie d'une boue	- 82 -
III.2.2 Facteurs impactant majeurs	- 84 -

III.3 Le floc réfractaire, une matrice biologiquement inerte ?.....	- 89 -
III.4 La matière réfractaire, une matière agrégée ?.....	- 92 -
III.4.1 Caractéristiques physiques de la matière réfractaire	- 92 -
III.4.2 Stabilité de la structure floculée réfractaire.....	- 95 -
III.5 Construction de la structure floculée réfractaire.....	- 97 -
III.6 Nature biochimique de la matière réfractaire, un substrat inapproprié ?.....	- 99 -
III.7 Conclusion générale	- 103 -
Chapitre 4. Production de matrices organiques réfractaires contrastées	- 105 -
IV.1 Introduction	- 107 -
IV.2 Origine des matrices contrastées	- 109 -
IV.3 Nomenclature des composés organiques au fil de l'eau	- 112 -
IV.4 Fractionnement des alimentations	- 114 -
IV.4.1 Fractionnement de la boue primaire PS-A*	- 114 -
IV.4.2 Fractionnement DCO des alimentations des boues activées B et E	- 118 -
IV.4.3 Fractionnement des ERU traitées par les procédés biologiques des STEP A et H ..	- 118 -
IV.5 Fractionnement DCO des boues biologiques	- 120 -
IV.5.1 Hypothèses et paramètres de simulation	- 120 -
IV.5.2 Sensibilité du fractionnement DCO d'une boue au paramétrage de l'hydrolyse	- 123 -
IV.5.3 Démarche de validation du fractionnement DCO d'une boue biologique	- 126 -
IV.5.4 Fractionnement DCO des boues biologiques avant digestion anaérobie	- 128 -
IV.6 Fractionnement DCO des résidus réfractaires anaérobies	- 133 -
IV.6.1 Estimation du fractionnement DCO d'un résidu réfractaire.....	- 134 -
IV.6.2 Fractionnement DCO des résidus réfractaires produits.....	- 134 -
IV.7 Conclusion générale	- 135 -
Chapitre 5. Spécificités de la nature chimique des composés réfractaires contenus dans les boues d'épuration	- 137 -
V.1 Introduction	- 139 -
V.2 Évaluation de l'utilisation de l'ATR-FT-MIR pour caractériser la nature chimique de matrices complexes type boues et réfractaires.....	- 140 -
V.2.1 Caractéristiques accessibles par analyse directe d'échantillons complexes de composition inconnue	- 141 -
V.2.2 Variabilité d'un spectre ATR-FT-MIR de boues et de réfractaires.....	- 147 -
V.2.3 Démarche d'interprétation des caractéristiques chimiques	- 151 -
V.3 Identification des spécificités chimiques des matrices avant et après digestion anaérobie long terme	- 153 -
V.3.1 Caractérisation des boues.....	- 153 -
V.3.2 Caractérisation des résidus réfractaires	- 159 -
V.3.3 Conclusion.....	- 169 -
V.4 Conclusion générale	- 170 -

Chapitre 6. Déconstruction de l'agrégat réfractaire	- 173 -
VI.1 Introduction	- 175 -
VI.2 Quelles méthodes de déconstruction choisir ?.....	- 177 -
VI.2.1 Contexte scientifique.....	- 177 -
VI.2.2 Le choix d'une attaque thermo-chimique.....	- 178 -
VI.3 Déconstruction d'un agrégat réfractaire modèle.....	- 179 -
VI.3.1 Efficacité de solubilisation d'une hydrolyse thermo-chimique sur une matrice particulaire réfractaire modèle	- 179 -
VI.3.2 Caractérisation physico-chimique des composés réfractaires solubilisés	- 184 -
VI.3.3 Conclusion.....	- 198 -
VI.4 Dénaturation des molécules solubilisées après 2h à 95°C avec NaOH 0,1M.....	- 199 -
VI.4.1 Conservation des paramètres chimiques globaux ?.....	- 200 -
VI.4.2 Conservation des propriétés chimiques et physiques ?	- 201 -
VI.4.3 Conclusion.....	- 205 -
VI.5 Déconstruction de la fraction particulaire réfractaire de boues d'épuration contrastées	- 206 -
VI.5.1 Objets d'étude	- 206 -
VI.5.2 Caractéristiques des molécules solubilisées et non solubilisées.....	- 207 -
VI.5.3 Propriétés physico-chimiques des molécules réfractaires solubilisées.....	- 211 -
VI.6 Conclusion générale	- 217 -
Conclusions générales et perspectives	- 221 -
Références bibliographiques.....	- 231 -
Annexes	- 239 -
IX.1 Annexe 1 : Écriture des bilans matière en régime permanent	- 239 -
IX.2 Annexe 2 : Spectre ATR-FT-MIR de la boue primaire PS-A*	- 240 -
IX.3 Annexe 3 : Résultats ACP et CAH avant/après pour chaque matrice biologique	- 242 -
IX.4 Annexe 4 : Comparaison des intensités d'absorption à 2851 et 2922 cm ⁻¹	- 245 -
IX.5 Annexe 5 : Spectres particuliers en moyen infrarouge	- 245 -
IX.5.1 Bandes caractéristiques de la liaison C=O des carbonates.....	- 245 -
IX.5.2 Bandes d'absorption à 1030 cm ⁻¹	- 247 -
IX.5.3 Acides humiques extraits de boues	- 248 -
IX.5.4 Interférence de l'eau.....	- 248 -
IX.6 Annexe 6 : Caractéristiques d'une cellule bactérienne.....	- 248 -
IX.7 Annexe 7 : Acides aminés et caractéristiques.....	- 251 -
IX.8 Annexe 8 : Facteurs de conversion des protéines en DCO.....	- 252 -
IX.9 Annexe 9 : Poids moléculaire de différents composés protéiques.....	- 252 -
IX.10 Annexe 10 : L'énergie d'activation : Rappels.....	- 253 -
IX.11 Annexe 11 : L'interféromètre de Michelson	- 253 -

Tables des illustrations

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1. Variabilité des limites de classes de taille de particules.....	12 -
Tableau I.2. Répartition physique de la DCO d'ERUs brutes et décantées	13 -
Tableau I.3. Composition typique d'une ERU brute, décantée, coagulée-décantée.....	14 -
Tableau I.4. Estimation des rendements d'élimination et du fractionnement des boues primaires....	14 -
Tableau I.5. Modèles de dégradation de la biomasse cellulaire	19 -
Tableau I.6. Composition chimique et biochimique d'une cellule bactérienne	35 -
Tableau II.1. Caractéristiques des boues prélevées en STEP	48 -
Tableau II.2. Conditions générales de fonctionnement des pilotes à boues activées	51 -
Tableau II.3. Récapitulatif des techniques analytiques chimiques utilisées	59 -
Tableau II.4. Caractéristiques des colonnes Superdex 200 et Superdex 75	61 -
Tableau II.5. Protéines étalons utilisées pour la calibration des colonnes Superdex 200 et Superdex 75 ..	62 -
Tableau II.6. Protocole de dosage des protéines et des substances humiques selon la méthode de Folin-Lowry modifiée.	65 -
Tableau III.1. Validation de la procédure de récupération de la matière organique réfractaire par test BMP réalisés sans inoculum.....	84 -
Tableau III.2. Caractéristiques de divers types de boues et de leurs fractions réfractaires anaérobies associées	86 -
Tableau III.3. Caractéristiques et résultats des tests d'activité réalisés sur les matrices réfractaires AS-A _{U,AN} et AS-E _{U,AN}	90 -
Tableau III.4. Analyses granulométriques de boues primaires, obtenues par simple décantation (PS) ou combinées à l'ajout d'agents floculants (CS), de boues biologiques (AS) et de résidus réfractaires de boues d'épuration (PS _{U,AN} , CS _{U,AN} , AS _{U,AN}).....	93 -
Tableau III.5. Stabilité de la structure apparente de matrices réfractaires anaérobies de boues biologiques	96 -
Tableau III.6. Stabilité de la structure apparente de matrices réfractaires aérobies et anaérobies	98 -
Tableau IV.1. Origine contrastée des composés réfractaires des matrices avant digestion considérées dans l'étude.....	109 -
Tableau IV.2. Conditions de production contrastées des matrices avant digestion anaérobie	111 -
Tableau IV.3. Mesures de la DCO réfractaire en aérobie et en anaérobie de PS-A*.....	116 -
Tableau IV.4. Fractionnement DCO de la boue primaire PS-A*	118 -
Tableau IV.5. Fractionnement DCO des alimentations traitées par les boues activées B et E.....	118 -
Tableau IV.6. Fractionnements théoriques de la DCO traitée par les procédés biologiques des STEP A et H	119 -
Tableau IV.7. Valeurs des paramètres biologiques utilisés pour l'estimation par modélisation du fractionnement des boues biologiques produites.....	122 -
Tableau IV.8. Conditions d'alimentation et de fonctionnement des boues biologiques	123 -
Tableau IV.9. Mesures de la DCO réfractaire en aérobie et en anaérobie de la matrice OHO	127 -
Tableau IV.10. Confrontation de la DCO _{U,AN_exp} et de la DCO _{U,AN_th} des boues biologiques OHO, AS-A (1), AS-A (2), AS-B, AS-E, AS-H avant digestion anaérobie	130 -
Tableau IV.11. Fractionnement DCO des résidus réfractaires anaérobies	135 -
Tableau V.1. Table d'attribution des bandes d'absorption aux groupes fonctionnels.....	142 -
Tableau V.2. Spectres ATR-FT-MIR de différentes familles de molécules	145 -

Tableau V.3. Caractéristiques globales des boues.....	- 154 -
Tableau V.4. Origine et proportion des différents composés organiques des résidus réfractaires considérés	- 159 -
Tableau V.5. Tableau récapitulatif de l'analyse du cercle de corrélation entre les variables d'origine (nombre d'onde) et la composante principale Dim1	- 168 -
Tableau VI.1. Récapitulatif des différentes conditions thermo-chimique appliquées à AS-A _{XU,AN}	- 182 -
Tableau VI.2. Récapitulatif de l'effet quantitatif et qualitatif d'une hydrolyse thermo-chimique... ..	- 198 -
Tableau VI.3. Origine et contribution quantitative des différents composés réfractaires constitutifs des 4 résidus réfractaires anaérobies avant déconstruction (extrait du Tableau IV.11).....	- 207 -
Tableau VI.4. Caractéristiques des différentes particules réfractaires traitées 2h à 95°C avec NaOH 0,1M	- 208 -
Tableau IX.1. Tableau récapitulatif des résultats de classification ascendante hiérarchique (colonne de droite) et d'analyse en composantes principales (colonne de gauche) de particules avant et après digestion long terme anaérobie et parfois aérobie	- 242 -
Tableau IX.2. Tableau récapitulatif de l'analyse du cercle de corrélation entre les variables d'origine (nombre d'onde) et la composante principale Dim1 différenciant l'empreinte chimique de particules avant et après digestion long terme	- 244 -
Tableau IX.3. Facteurs de conversion des équivalent-protéines en DCO	- 252 -
Tableau IX.4. : Poids moléculaire de différentes protéines.....	- 252 -

LISTE DES FIGURES

Figure 0.1. La biodégradation d'un composé organique, un processus multicritère	- 4 -
Figure I.1. Fractionnement de la DCO totale d'une ERU	- 9 -
Figure I.2. Trois méthodes de détermination du fractionnement de la DCO d'une ERU	- 10 -
Figure I.3. Valeurs de la fraction réfractaire particulaire ($f_{XU,inf}$)	- 11 -
Figure I.4. Comparaison des analyses granulométriques d'une ERU brute (●) avec ses particules décantées (■) et non décantées (X), obtenues après 2h de décantation dans un cône Imhoff gradué de 1L (Guellil et al., 2001).....	- 12 -
Figure I.5. Évolution de la matière organique aux bornes d'un procédé de traitement biologique d'une eau usée	- 15 -
Figure I.6. Croissance de la biomasse hétérotrophe	- 16 -
Figure I.7. Représentation schématique de la théorie unifiée de Lapidou et Rittman (2002).....	- 20 -
Figure I.8. Estimation du fractionnement DCO d'une boue biologique.....	- 21 -
Figure I.9. Potentiel méthane ultime déterminé par test BMP	- 22 -
Figure I.10. Pourcentage de MVS éliminées par digestion anaérobie en fonction de la teneur en fraction active dans une boue biologique (Araujo et al., 1998).....	- 23 -
Figure I.11. Confrontation des données expérimentales et simulées des volumes de biogaz et de méthane produit lors de la digestion anaérobie de boues activées (Jones et al., 2007).....	- 25 -
Figure I.12. Approche globale des caractéristiques d'une boue biologique.....	- 26 -
Figure I.13. Floc biologique observé au microscope optique (Guan et al., 1998).....	- 27 -
Figure I.14. Représentations schématiques de boues activées : A- Jorand et al., 1995 ; B – Eriksson et al., 1992; C – Sheng et al., 2006; D - Keiding et Nielsen, 1997	- 28 -
Figure I.15. Représentation schématique de pontage par cations divalents (Nguyen et al., 2007) ...	- 29 -
Figure I.16. Représentation schématique de la formation d'un gel d'alginate (Sobeck et al., 2002) .-	- 29 -
Figure I.17. Approche microbiologique de la composition d'un floc	- 31 -

Figure I.18. Nature de composés organiques classiquement contenus dans une ERU en fonction de la taille des particules et techniques de séparation physique.....	33 -
Figure I.19. Chimie de composés organiques exogènes retrouvés dans les boues biologiques	34 -
Figure I.20. Comparaison de la nature des lipides membranaires de bactéries et d'archae	36 -
Figure I.21. Eléments de composition de la paroi des archae	37 -
Figure I.22. Photographie en microscopie électronique d'une spore de <i>Bacillus cereus</i> (Gaillard, 2003).-	39 -
Figure I.23. Formule chimique du dipicolinate de calcium.....	39 -
Figure I.24. Démarche globale du travail de recherche.....	43 -
Figure I.25. Approche filière de la caractérisation d'un résidu réfractaire de boue d'épuration.....	44 -
Figure II.1. Flux cumulés de DCO totale entrant et de DCO soluble sortant, sur deux périodes de fonctionnement des boues activées productrices de la matrice biologique OHO	49 -
Figure II.2. Flux de DCO entrant sur le procédé à boues activées B	50 -
Figure II.3. Schéma des boues activées productrices des matrices OHO, AS-B et AS-E	50 -
Figure II.4. Dispositif de fonctionnement du pilote laboratoire	51 -
Figure II.5. Potentiel méthane déterminé par test BMP	55 -
Figure II.6. Mesure du potentiel méthanogène biologique pour une boue totale et les fractions particulaire et soluble. (Perez, 2009).....	56 -
Figure II.7. Dispositif de la mesure d'une DBO ultime	57 -
Figure II.8. Fiole de DBO ultime	58 -
Figure II.9. Spectres de fluorescence 3D d'une protéine et d'un acide humique commerciaux	62 -
Figure II.10. Droites de calibration des colonnes Superdex 200 et Superdex 75.....	63 -
Figure II.11. Spectre de fluorescence 3D du tryptophane	67 -
Figure II.12. Cartographie d'un spectre de fluorescence 3D.....	67 -
Figure II.13. Valeurs respectives des contributions électroniques vibrationnelles et rotationnelles d'une molécule (Dalibart et al., 2000).....	68 -
Figure II.14. Domaines spectraux de rayonnements électromagnétiques	69 -
Figure II.15.Principe de la spectrométrie par réflexion totale atténuée (ATR) (Pons et al., 2004) ...-	69 -
Figure II.16.Dispositif de positionnement de l'échantillon solide pour une analyse ATR-FT-MIR.-	70 -
Figure II.17. Prétraitement de centration-réduction des données brutes de spectres ATR-FT-MIR.-	73 -
Figure II.18. Spectre ATR-FT-MIR moyen de glucose lyophilisé.....	74 -
Figure II.19. Schéma d'une clusterisation.....	74 -
Figure II.20. Procédure de solubilisation de la fraction réfractaire particulaire d'une boue d'épuration digérée en BMP de plus de 120 jours.....	76 -
Figure II.21. Reproductibilité de l'échantillonnage d'une matrice particulaire avant hydrolyse	77 -
Figure III.1. Représentation schématisée des processus de production de méthane.....	83 -
Figure III.2. Évolution des composés organiques au sein de la filière eau	85 -
Figure III.3. Représentation de la teneur en réfractaire en fonction de l'âge des boues.....	88 -
Figure III.4. Tests d'activités réalisées sur les matrices réfractaires AS-A _{U,AN} et AS-E _{U,AN}	91 -
Figure III.5. Fractionnement physique de la DCO réfractaire anaérobie de boues PS et AS (n=35)-	92 -
Figure III.6. Observations au microscope optique de la boue primaire PS-A*.....	93 -
Figure III.7. Sensibilité différenciée de la DCO biodégradable et réfractaire d'une boue biologique lors d'une procédure de solubilisation de 150h à 65°C.....	97 -
Figure III.8. Tests de stabilité : Démarche et nomenclature.....	98 -
Figure III.9. Empreintes biochimiques de la fraction particulaire des matrices réfractaires anaérobies des boues ⁽¹⁾ PS-A, AS-A, AS-B, AS-E, AS-H et OHO.....	100 -
Figure III.10. Observation au microscope optique du résidu réfractaire de PS-A*	101 -
Figure IV.1. Approche globale de caractérisation quantitative du fractionnement DCO d'un résidu réfractaire anaérobie d'une boue d'épuration.....	109 -

Figure IV.2. Origine des 6 matrices réfractaires étudiées	112 -
Figure IV.3. Nomenclature utilisée pour caractériser les fractions organiques constitutives des boues d'épuration et matrices réfractaires correspondantes :	113 -
Figure IV.4. Estimation du fractionnement de la boue primaire PS-A*	115 -
Figure IV.5. Cumul de DCO sortant en fonction du cumul de DCO entrant au niveau des boues activées B et E	117 -
Figure IV.6. Unités de traitement biologique simulées sous Biowin 4.0 ®	120 -
Figure IV.7. Fractionnement DCO des boues biologiques estimés pour différents jeux de paramètres biologiques d'hydrolyse (k_{hyd} ; K_X)	124 -
Figure IV.8. Comparaison de la proportion estimée des différentes fractions réfractaires accumulées dans les boues selon le paramétrage de l'hydrolyse.	125 -
Figure IV.9. Transformation de la matière organique d'une boue biologique en digestion anaérobie long terme en anaérobie (BMP)	126 -
Figure IV.10. Confrontation de la $DCO_{U,AN_{th}}$ et de la $DCO_{U,AN_{exp}}$ des boues analysées.....	129 -
Figure IV.11. Potentiel méthane de la boue AS-H.....	132 -
Figure IV.12. Fractionnements DCO estimés pour les matrices OHO, AS-A, AS-B, AS-E et AS-H .	133 -
Figure IV.13. Fractionnements DCO des résidus réfractaires anaérobies produits.....	134 -
Figure V.1. Découpage d'un spectre ATR-FT-MIR en zones d'attribution.....	147 -
Figure V.2. Analyse de la qualité de représentation de la nature chimique de matrices complexes par ATR-FT-MIR	149 -
Figure V.3. Intervalles de confiance à 95% sur les intensités moyennes de l'empreinte spectrale de particules avant (A) et après (B) digestion anaérobie long terme (durée BMP>120jours)	150 -
Figure V.4. Méthodologie d'analyse relative des caractéristiques chimiques définies par ATR-FT-MIR d'échantillons complexes de composition inconnue	153 -
Figure V.5. Spectres ATR-FT-MIR d'une boue primaire et de différentes boues biologiques	154 -
Figure V.6. Résultats de la CAH des différents spectres ATR-FT-MIR des boues avant digestion anaérobie long terme (BMP>120 jours)	156 -
Figure V.7. Résultats de l'ACP réalisée sur l'ensemble des spectres ATR-FT-MIR des boues d'épuration avant digestion anaérobie long terme.....	158 -
Figure V.8. Effet de la biodégradation anaérobie sur la chimie du substrat particulaire des boues PS-A*, OHO, AS-B, AS-E, AS-A, AS-H	161 -
Figure V.9. Evolution de l'intensité d'absorption du pic à 2922 cm^{-1} pour des boues et leurs résidus réfractaires	162 -
Figure V.10. Dendrogramme des différents spectres ATR-FT-MIR de boues avant et après digestion long terme (BMP>120 jours)	163 -
Figure V.11. Spectres ATR-FT-MIR des particules réfractaires à la digestion anaérobie long terme (BMP>120 jours) de différentes matrices biologiques (PS-A*, AS-B, AS-E, AS-A, AS-H, OHO)	164 -
Figure V.12. Résultats de la CAH des différents spectres ATR-FT-MIR des particules réfractaires à la digestion anaérobie long terme (BMP>120 jours)	165 -
Figure V.13. Résultats de l'ACP réalisée sur l'ensemble des spectres ATR-FT-MIR de particules réfractaires anaérobies.....	168 -
Figure VI.1. Déconstruction de l'agrégat réfractaire couplée à la caractérisation moléculaire.....	176 -
Figure VI.2. Effet du temps de réaction, de la température et de la concentration en NaOH sur le potentiel de solubilisation de la fraction particulaire de AS-A _{XU,AN}	180 -
Figure VI.3. Potentiel de solubilisation de composés organiques réfractaires agrégés soumis à différentes conditions d'hydrolyse thermo-chimique.....	182 -
Figure VI.4. Amélioration du potentiel de solubilisation de la soude utilisée à 95°C plutôt qu'à 60°C -	183 -

Figure VI.5. Fractionnements biochimiques déterminés par dosages colorimétriques, avant et après traitement, de la matrice AS-A _{XU,AN}	185 -
Figure VI.6. A-Modification de la chimie d'une matrice particulaire réfractaire après 2h à 60 ou 95°C ; B-Comparaison de la chimie des composés réfractaires particuliers solubilisés aux composés réfractaires solubles en fin de BMP à 35°C.....	187 -
Figure VI.7. A-Modification de la chimie d'une matrice particulaire réfractaire après différentes hydrolyses thermo-acides ; B-Comparaison de la chimie des composés réfractaires particuliers solubilisés par rapport aux résidus réfractaires solubles en fin de BMP	188 -
Figure VI.8. Spectre ATR-FT-MIR de l'urée et de la fraction solubilisée de AS-A _{XU,AN} à 2,4gHCl.gDCO ⁻¹ , 2h à 95°C.....	189 -
Figure VI.9. A-Modification de la chimie d'une matrice particulaire réfractaire après différentes hydrolyses thermo-alkalines ; B-Comparaison de la chimie des composés réfractaires particuliers solubilisés par rapport aux résidus réfractaires solubles en fin de BMP	190 -
Figure VI.10. Effet contrasté d'une hydrolyse acide et alcaline sur un agrégat réfractaire.....	192 -
Figure VI.11. Sensibilité contrastée à une hydrolyse acide ou alcaline des principales bandes d'absorption identifiées comme discriminante de la nature chimique de résidus réfractaires.	193 -
Figure VI.12. Chromatogrammes de filtration sur gel des fractions solubilisées de la matrice AS-A _{XU,AN}	196 -
Figure VI.13. Comparaison de paramètres chimiques globaux (DCO, COT, CI, N) mesurés sur des molécules modèles, avec ou sans traitement 2h avec NaOH 0,1M à 95°C et des ratios DCO/COT et N/DCO	200 -
Figure VI.14. Cartographie qualitative d'un spectre de fluorescence 3D	201 -
Figure VI.15. Comparaison du spectre de fluorescence 3D des molécules modèles avec ou sans traitement 2h à 95°C avec NaOH 0,1M.....	202 -
Figure VI.16. Chromatogrammes en UV 280nm de la BSA, de AH et de L, avec ou sans traitement..	204 -
Figure VI.17. Chromatogrammes en UV 210 et 280nm de NaOH 0,1M seule, chauffée 2h à 95°C ...	204 -
Figure VI.18. Relation entre la teneur en composés d'origine endogène et la teneur en composés protéiques-like et humiques-like.....	212 -
Figure VI.19. Chromatogrammes en UV 210 (A), UV280 (B) et FluoSH (C) des fractions solubilisées avec NaOH 0,1M, 2h à 95°C des matrices PS-A* _{XU,AN} , AS-E _{XU,AN} , AS-A _{XU,AN} et OHO _{XU,AN} ...	215 -
Figure IX.1. Analyse de la composition d'une boue primaire par comparaison de son spectre ATR-FT-MIR à ceux de molécules organiques isolées et de boues biologiques alimentées par cette boue primaire	240 -
Figure IX.2. Ratios d'intensité d'absorption, I ₂₉₂₂ /I ₂₈₅₁ , pour l'ensemble des matrices avant et après digestion anaérobie long terme.....	245 -
Figure IX.3. Spectres ATR-FT-MIR des fractions solubilisées et non solubilisées de AS-A _{XU,AN} après traitement thermo-alkalin	246 -
Figure IX.4. Spectres ATR-FT-MIR des matières minérales en suspension (MMS) des résidus réfractaires de OHO _{XU,AN} , AS-E _{XU,AN} et de la boue PS-A*	247 -
Figure IX.5. Spectre FTIR de phosphate de calcium de 400 à 1300 cm ⁻¹ (Mahamid et al., 2008) .-	247 -
Figure IX.6. Spectres FTIR d'acides humiques extraits de boues à différents stade de compostage (T0 à T9 mois) (Amir et al., 2004).....	248 -
Figure IX.7. Effet de la présence d'eau sur le spectre ATR-FT-MIR d'un échantillon.....	248 -
Figure IX.8. Représentation schématique de la paroi des bactéries Gram – et Gram + ...	249 -
Figure IX.9. Unités constitutives du peptidoglycan	250 -
Figure IX.10. Effet d'une enzyme sur l'énergie d'activation d'une réaction.....	253 -
Figure IX.11. Schéma du dispositif optique de l'interféromètre de Michelson	253 -

Liste des symboles

Symboles	Définitions	Unités
<i>Abréviations</i>		
STEP	Station de traitements des eaux usées	
ERU	Eau résiduaire urbaine	
PS	Boue primaire issue d'une décantation simple	
CS	Boue primaire issue d'une décantation combinée à l'ajout d'agents chimique de coagulation-floculation	
AS	Boue biologique produite par la filière eau (ex. boues activées, boues de bioréacteur à membrane aérobie)	
EPS	Substances exo-polymériques	
BSA	Albumine de serum bovin commercial	
AH	Acide humique commercial	
Glc	Glucose	
L	Lignine alkali commercial	
nd	Nature biochimique de la matière organique d'un échantillon non déterminée par dosages biochimiques	
BMP	Biochemical Methane Potential	
ATR-FT-MIR	Spectrométrie infrarouge à Transformée de Fourier, en Réflexion Totale Atténuée, sur le domaine du Moyen InfraRouge	
SNV	Traitement mathématique de centration-réduction (Standard Normal Variate)	
IC	Intervalle de confiance	
CAH	Classification ascendante hiérarchique	
ACP	Analyse en composantes principales	
ASM	Activated sludge Model	
ADM	Anaerobic digestion model	
<i>Indices de caractéristiques globales de la matière organique</i>		
S	DCO soluble fractionnée par centrifugation (surnageant)	
X	DCO particulaire fractionnée par centrifugation (culot)	
U	DCO réfractaire	
B	DCO biodégradable	
inf	Origine exogène au système d'épuration considéré	
E	Origine endogène (résidus du métabolisme de la biomasse active au niveau d'un traitement biologique)	
<i>Paramètres analytiques</i>		
DBO	Demande biologique en oxygène	$\text{gO}_2\cdot\text{L}^{-1}$
DCO	Demande chimique en oxygène	$\text{gDCO}\cdot\text{L}^{-1}$
DCO_{CH_4}	Quantité de méthane produit convertie en DCO	$\text{gDCO}\cdot\text{mLCH}_4^{-1}$
MV	Matières volatiles à 500°C	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
MVS	Matières volatiles en suspension	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
MES	Matières en suspension (organique et minérale)	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

<i>NTK</i>	Azote Kjeldahl	g.L^{-1}
<i>NT</i>	Azote total	g.L^{-1}
<i>CT</i>	Carbone total	g.L^{-1}
<i>CI</i>	Carbone inorganique	g.L^{-1}
<i>COT</i>	Carbone organique total	g.L^{-1}
<i>PN</i>	Protéines-like	$\text{g}(\text{eq-BSA}).\text{L}^{-1}$
<i>HS</i>	Substances humiques-like	$\text{g}(\text{eq-AH}).\text{L}^{-1}$
<i>PS</i>	Polysaccharides-like	$\text{g}(\text{eq-Glc}).\text{L}^{-1}$

Nomenclature de fractionnement

$S_{B,inf}$	DCO facilement biodégradable exogène contenue dans une eau usée	gDCO.L^{-1}
$X_{B,inf}$	DCO lentement biodégradable exogène contenue dans une eau usée	gDCO.L^{-1}
$S_{U,inf}$	DCO soluble réfractaire exogène contenue dans une eau usée	gDCO.L^{-1}
$X_{U,inf}$	DCO particulaire réfractaire exogène contenue dans une eau usée	gDCO.L^{-1}
S_B	DCO facilement biodégradable	$\text{gDCO}_{SB} \cdot \text{L}^{-1}$
X_B	DCO exogène lentement biodégradable dans une boue	$\text{gDCO}_{XB,inf} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
X_{OHO}	DCO équivalente aux microorganismes hétérotrophes	$\text{gDCO}_{X_{OHO}} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
X_{AD}	DCO équivalente aux microorganismes actifs en anaérobie (consortium total)	$\text{gDCO}_{X_{AD}} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
X_{U,E_AE}	Teneur en composés organiques réfractaires produits par le métabolisme des microorganismes actifs au niveau d'un traitement biologique de la filière eau	$\text{gDCO}_{X_{U,E_AE}} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
X_{U,E_AN}	Teneur en composés organiques réfractaires produits par le métabolisme des microorganismes actifs au niveau d'un traitement biologique en anaérobie	$\text{gDCO}_{X_{U,E_BMP}} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
X_{U,E_BMP}	Teneur en composés organiques réfractaires produits par le métabolisme des microorganismes actifs lors d'un test BMP (batch anaérobie)	$\text{gDCO}_{X_{U,E_BMP}} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
X_{U,inf_AD}	DCO particulaire réfractaire exogène à la digestion anaérobie (teneur de l'intrant)	gDCO.L^{-1}
$X_{U,inf_AE/AD}$	DCO particulaire réfractaire exogène (i.e. contenue dans l'eau usée) et qui a traversé un traitement biologique aérobie et un traitement biologique anaérobie	gDCO.L^{-1}
$X_{U,AN}$	DCO particulaire réfractaire en anaérobie totale contenue dans une boue	$\text{gDCO}_{X_U} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
X_{U,AN_exp}	DCO particulaire réfractaire en anaérobie totale contenue dans une boue déduit d'une démarche calculatoire basée sur des données expérimentales	$\text{gDCO}_{X_U} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
X_{U,AN_th}	DCO particulaire réfractaire en anaérobie totale contenue dans une boue déduit d'une démarche calculatoire basée sur des données estimées par modélisation des processus biologiques aérobies et anaérobies	$\text{gDCO}_{X_U} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
$S_{U,AN}$	DCO soluble réfractaire en anaérobie totale contenue dans une boue	$\text{gDCO}_{S_U} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
PX_{tot}	Quantité totale de boue produite par un procédé biologique	gDCO.j^{-1}
PX_{OHO}	Quantité de biomasse hétérotrophe produite	gDCO.j^{-1}
PX_{U,E_AE}	Quantité de résidus organiques réfractaires endogènes	gDCO.j^{-1}
$PX_{U,inf}$	Quantité de composés organiques réfractaires exogènes	gDCO.j^{-1}
$DCO_{tot,inf}$	DCO totale exogène entrant sur un procédé biologique	gDCO.L^{-1}
$DCO_{U,inf}$	DCO réfractaire exogène totale entrant sur un procédé biologique	gDCO.L^{-1}
$DCO_{B,inf}$	DCO biodégradable exogène totale entrant sur un procédé biologique	gDCO.L^{-1}

$DCO_{U,AN}$	Teneur en DCO réfractaire en anaérobie totale	$gDCO_U \cdot gDCO^{-1}$
$DCO_{B,AN}$	Teneur en DCO biodégradable en anaérobie totale	$gDCO_B \cdot gDCO^{-1}$
$DCO_{U,AE}$	Teneur en DCO réfractaire en aérobie totale	$gDCO_U \cdot gDCO^{-1}$
$DCO_{B,AE}$	Teneur en DCO biodégradable en aérobie totale	$gDCO_B \cdot gDCO^{-1}$
$DCO_{CH4,th}$	Teneur maximale en DCO méthanisable dans un échantillon (potentiel méthane), déduite du fractionnement DCO de la matrice à digérer et de la modélisation des processus biologiques en anaérobie	$gDCO_{CH4} \cdot gDCO^{-1}$
$DCO_{CH4,exp}$	Teneur maximale en DCO méthanisable dans un échantillon (potentiel méthane), mesurée expérimentalement par test BMP	$gDCO_{CH4} \cdot gDCO^{-1}$
$DCO_{Xoho,CH4}$	Quantité de méthane attribuable à la digestion de la fraction biodégradable de la fraction X_{OHO} contenue dans une boue biologique digérée en anaérobie	$gDCO_{CH4} \cdot gDCO_{Xoho}^{-1}$
$DCO_{Xb,CH4}$	Quantité de méthane attribuable à la digestion anaérobie de la fraction biodégradable de la fraction X_B contenue dans une boue d'épuration	$gDCO_{CH4} \cdot gDCO_{Xb}^{-1}$
f_S	Fraction soluble	$gDCO_S \cdot gDCO_{tot}^{-1}$
f_X	Fraction particulaire	$gDCO_X \cdot gDCO_{tot}^{-1}$
f_U	Fraction réfractaire	$gDCO_U \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$
f_{SU}	Fraction réfractaire soluble	$gDCO_{SU} \cdot gDCO_{tot}^{-1}$
f_{XU}	Fraction réfractaire particulaire	$gDCO_{XU} \cdot gDCO_{tot}^{-1}$
f_B	Fraction biodégradable	$gDCO_B \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$
f_{SB}	Fraction rapidement biodégradable	$gDCO_{SB} \cdot gDCO_{tot}^{-1}$
f_{XB}	Fraction lentement biodégradable	$gDCO_{XB} \cdot gDCO_{tot}^{-1}$
$(1-f_{US}-f_{UX})$	Fraction biodégradé au niveau d'un traitement biologique d'une eau usée	$gDCO_b \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$
$f_{S,inf}$	Fraction soluble contenue dans une eau usée	$gDCO_{S,inf} \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$
$f_{C,inf}$	Fraction colloïdale contenue dans une eau usée	$gDCO_{C,inf} \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$
$f_{X,inf}$	Fraction particulaire contenue dans une eau usée	$gDCO_{X,inf} \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$
$f_{SU,inf}$	Fraction réfractaire soluble contenue dans une eau usée	$gDCO_{SU,inf} \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$
$f_{CU,inf}$	Fraction réfractaire colloïdale contenue dans une eau usée	$gDCO_{CU,inf} \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$
$f_{XU,inf}$	Fraction réfractaire particulaire contenue dans une eau usée	$gDCO_{XU,inf} \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$
$f_{SB,inf}$	Fraction rapidement biodégradable contenue dans une eau usée	$gDCO_{SB,inf} \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$
$f_{CB,inf}$	Fraction biodégradable colloïdale contenue dans une eau usée	$gDCO_{CB,inf} \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$
$f_{XB,inf}$	Fraction lentement biodégradable contenue dans une eau usée	$gDCO_{XB,inf} \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$

Paramètres biologiques

μ_{OHO}	Taux de croissance spécifique maximal des hétérotrophes	$gDCO \cdot gDCO^{-1} \cdot j^{-1}$
μ_{AD}	Taux de croissance spécifique maximal de la biomasse anaérobie (consortium méthanogène)	$gDCO \cdot gDCO^{-1} \cdot j^{-1}$
Y_H	Rendement de conversion de la DCO biodégradable en biomasse cellulaire hétérotrophe	$gDCO \cdot gDCO^{-1}$
Y_{XAD}	Rendement de conversion de la DCO biodégradable en biomasse cellulaire anaérobie	$gDCO \cdot gDCO^{-1}$
r_{XH}	Taux de croissance de la biomasse hétérotrophe	$gDCO \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$
K_S	Constante de demi-saturation	$gDCO \cdot L^{-1}$
k_{hyd}	Constante de vitesse d'hydrolyse	$gDCO \cdot gDCO^{-1} \cdot j^{-1}$
K_X	Constante de demi-saturation spécifique	$gDCO \cdot L^{-1}$
b_H	Constante de vitesse de décès des hétérotrophes (concept respiration)	$gDCO \cdot gDCO^{-1} \cdot j^{-1}$

	endogène)	
b'_H	Constante de vitesse de décès des hétérotrophes (concept mort-régénération)	$\text{gDCO} \cdot (\text{gDCO} \cdot \text{j})^{-1}$
b_E	Constante de vitesse de décès appliquée aux résidus réfractaires endogènes	$\text{gDCO} \cdot (\text{gDCO} \cdot \text{j})^{-1}$
b_{AD}	Constante de vitesse de décès de la biomasse anaérobie	$\text{gDCO} \cdot (\text{gDCO} \cdot \text{j})^{-1}$
f_{AE}	Fraction réfractaire produite lors du décès de la biomasse cellulaire (concept respiration endogène)	$\text{gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
f'_{AE}	Fraction réfractaire produite lors du décès de la biomasse cellulaire (concept mort-régénération)	$\text{gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
f_{AD}	Fraction réfractaire produite lors du décès de la biomasse cellulaire anaérobie	$\text{gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$
k_{BMP}	Constante de vitesse globale de la digestion anaérobie déduite d'un test BMP	$\text{gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$
$\theta_{b_{AE}}$	Âges de boues au niveau d'un traitement biologique réalisé au niveau de la filière eau	jours

Introduction générale

Les boues d'épuration constituent le principal sous-produit de l'épuration des eaux. Ces boues résultent de la transformation et de l'accumulation de molécules solubles, colloïdales et particulières initialement contenues dans les effluents dits urbains. On entend par effluent urbain, les eaux résiduaires urbaines (ERU) composées des eaux domestiques et des eaux pluviales dans le cas d'un réseau partiellement séparatif. Par ailleurs, des eaux d'origine industrielle peuvent aussi être raccordées au réseau d'assainissement sous certaines conditions. La qualité des boues est directement liée à la composition de ces eaux usées mais aussi aux conditions de fonctionnement des procédés mis en jeu dans la filière de traitement. Une station d'épuration est composée d'un ensemble d'ouvrages qui constituent une filière de traitement. Ces ouvrages produisent des boues qui sont ensuite qualifiées en lien avec le traitement dont elles sont issues : les boues primaires sont les matières séparées au niveau du décanteur primaire, les boues physicochimiques sont celles obtenues au niveau de ce même décanteur mais avec injection de coagulant / floculant et enfin les boues biologiques sont quant à elles le fruit d'une transformation biologique et d'une séparation au niveau du clarificateur. Par conséquent, le réseau d'assainissement, les flux de matière organique contenue dans les ERU et les conditions de fonctionnement des unités de traitements de la filière eau sont autant de facteurs qui vont conditionner la quantité et la composition des boues produites.

Avec des frais de traitement de l'ordre de 50 % des coûts de fonctionnement des stations d'épuration (Appels et al., 2010), la gestion des flux de boues constituent un réel défi pour l'exploitant. Malgré la multitude de filières de traitement qui peuvent être envisagées, de nombreux schémas sont limités pour des raisons économiques, réglementaires, géographiques (débouchés locaux) et sociales. La réduction de la production de boue et l'amélioration de leur traitement font l'objet de nombreux travaux (Mahmood et Elliott, 2006, Carrère, 2010). En plus des normes environnementales, une exigence de valorisation sous forme d'énergie ou de matière s'est ajoutée à la problématique de gestion des boues. Dans ce contexte, la digestion anaérobie qui allie de bonnes performances de traitement et de valorisation de la matière carbonée (30 à 60 % des MVS des boues convertis en biogaz), a connu un regain d'intérêt. Chercheurs et industriels se sont alors mobilisés pour optimiser ce procédé biologique autour de quatre thématiques de recherche : la caractérisation des intrants, le digesteur, la qualité de la boue digérée, et enfin le biogaz et sa valorisation (Buffière et al., 2009).

Néanmoins, la boue contient une fraction significative de composés organiques qui ne sont pas convertis en méthane dans des conditions conventionnelles de digestion anaérobie. Elle constitue alors un gisement de matière organique perdu au sens de la valorisation énergétique. Cette fraction organique non biodégradée est variable et comprise entre 25 et 65 % de la DCO des boues d'épuration (Mottet et al., 2010, Astals et al., 2013). Il faut savoir que la production biologique de méthane est soumise à une succession de réactions mettant en jeu un consortium bactérien complexe, gouvernée par le processus d'hydrolyse des polymères organiques (Vavilin et al., 2008).

D'une manière générale, trois facteurs majeurs conditionnent la biodégradation d'une molécule organique (Figure 0.1) :

- **Le milieu réactionnel**, qui rassemble les conditions de fonctionnement d'un procédé biologique (température, pH, temps de séjour hydraulique, temps de séjour des boues...) et les propriétés du milieu (salinité, éléments traces, cations métalliques...). L'ensemble de ces paramètres définit l'environnement des enzymes et conditionne directement la cinétique réactionnelle.
- **Le pool biologique**, qui correspond à l'ensemble des populations de microorganismes qui se sont implantés du fait de la pression de sélection imposée par leur environnement et leur aptitude à dégrader les substrats disponibles. Ils conditionnent majoritairement le potentiel enzymatique présent dans une unité biologique donnée pour métaboliser les substrats.
- **Le substrat**, qui est par définition la matière organique présente. Son caractère biodégradable ou réfractaire est relatif au fait d'être dégradé ou non. Or cette caractéristique peut être liée à (i) ses propriétés physiques qui conditionnent son accessibilité et à (ii) ses propriétés (bio)chimiques qui conditionnent son adéquation avec le pool enzymatique présent.

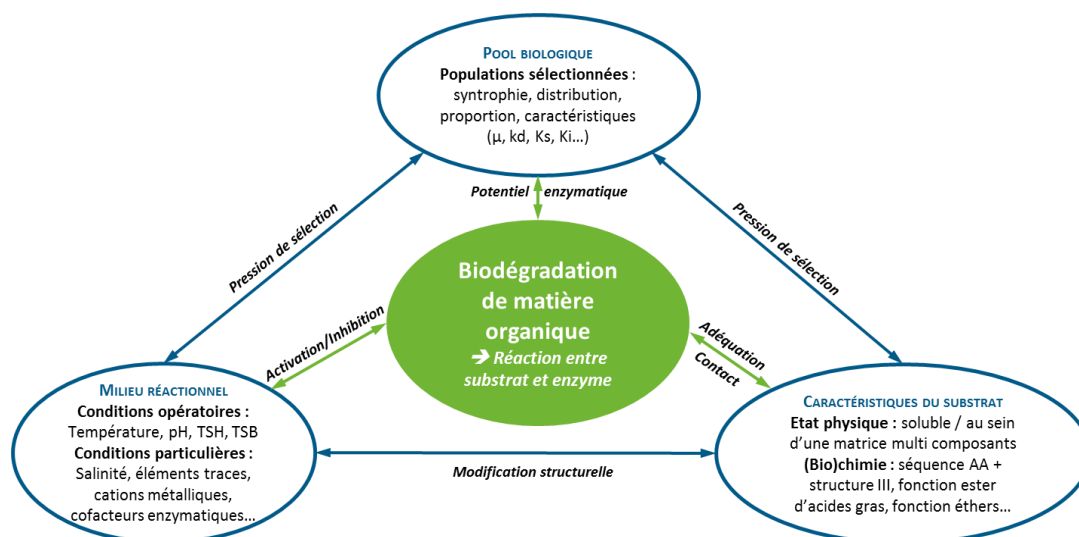


Figure 0.1. La biodégradation d'un composé organique, un processus multicritère

Compte tenu de l'agrégation de la matière organique sous forme de floes, de nombreux travaux ont donc cherché en priorité à améliorer la bioaccessibilité des composés des boues en développant des traitements de solubilisation des boues (Camacho et al., 2005, Bougrier et al., 2006, Carrère et al. 2010, Salhi, 2003). Globalement, les approches se révèlent souvent de type boîte noire, étudiant l'effet d'un traitement sur la biodégradabilité globale et sur des temps d'observation proches des temps de séjour sur une unité anaérobie industrielle. Ainsi, malgré de nombreux travaux de recherche visant à optimiser la biodégradabilité des boues, rares sont ceux dédiés à la caractérisation de la matière organique réfractaire contenue dans les boues et à la compréhension des mécanismes qui limitent sa biodégradation (Ramdani et al., 2011, Ramdani et al., 2010).

Notre objectif de recherche est de contribuer à mieux caractériser la physicochimie de la matière organique réfractaire d'une boue dans un contexte de filière eau usée pour générer des connaissances nouvelles et identifier les verrous à l'origine de la récalcitrance. Cette approche est motivée par des enjeux industriels forts : (1) aider à une gestion optimale des flux de matière organique et favoriser leur orientation vers la méthanisation, (2) proposer des stratégies d'amélioration de la biodégradabilité des boues.

La rédaction du travail réalisé a été organisée autour de 6 chapitres.

- Tout d'abord, une revue bibliographique focalisée (1) sur les méthodes de quantification et de caractérisation des différents composés organiques constituant la fraction réfractaire d'une boue, (2) sur un recensement des données et connaissances en termes de propriétés physiques et chimiques de ces composés accumulés. En conclusion de cette partie, les limites majeures à la caractérisation et à la compréhension des mécanismes responsables de la récalcitrance sont récapitulées et la démarche globale suivie est décrite.
- Un chapitre « Matériels et Méthodes » qui présente les matrices d'étude, les techniques de caractérisation quantitative et qualitative utilisées.
- Une étude expérimentale sur la relation entre le contenu réfractaire des boues et la filière eau usée, et ce, pour un large spectre de boue. La dépendance de la qualité d'une boue aux paramètres de fonctionnement et aux performances des ouvrages a été analysée. Des matrices réfractaires d'origines contrastées ont été aussi produites et ont servi d'objets d'étude tout au long de ce travail.
- Une première qualification théorique de ces matrices réfractaires selon le fractionnement défini par la modélisation ASM1, à savoir la fraction exogène (qui rassemble les molécules réfractaires de l'eau usée) et les fractions endogènes aérobie et anaérobie (qui rassemblent les molécules produites par le métabolisme bactérien). Ce fractionnement a été utilisé pour aider à l'interprétation de l'effet filière et des caractérisations chimiques des matrices réfractaires.
- Le développement d'une méthode basée sur les spectres mesurés en moyen infrarouge permettant de comparer (discriminer ou regrouper) les différentes matrices réfractaires selon leurs empreintes chimiques globales.
- Le développement d'une procédure de déconstruction de l'agrégat réfractaire compatible avec l'utilisation de techniques moléculaires sur les solubilisats.

Le tout se termine par une conclusion générale qui synthétise (1) l'ensemble des apports en termes de données, connaissances, outils méthodologiques, (2) les perspectives et (3) les retombées industrielles envisageables.

I .

Revue bibliographique

I.1 BOUES ET PROCEDES : ORIGINE ET EVOLUTION DE LA FRACTION ORGANIQUE REFRACTAIRE

Les composés qui s'accumulent au sein de la fraction organique réfractaire d'une boue correspondent à des molécules véhiculées par l'ERU et à des débris cellulaires de microorganismes actifs au niveau des unités de traitements biologiques traversées. On parle respectivement de fractions réfractaires exogènes et endogènes. La contribution quantitative de chacune est indispensable pour mieux évaluer leur implication dans les propriétés physiques, chimiques et biochimiques de la matrice réfractaire ultime d'une boue. Cette partie va donc présenter les outils permettant d'évaluer quantitativement ces deux fractions.

I.1.1 La fraction réfractaire exogène : $X_{U,inf}$

Les ERUs véhiculent des composés organiques de nature très diverse. Elles sont généralement caractérisées à l'aide de paramètres globaux tels que la DCO, quantifiant l'oxygène nécessaire à l'oxydation de la majeure partie des composés organiques, la DBO, correspondant à la quantité d'oxygène consommée lors de la dégradation biologique de la DCO biodégradable ou encore les MES, la concentration de matières en suspension. En lien avec la modélisation des processus biologiques, l'approche communément utilisée est de fractionner la DCO totale d'une ERU selon des critères biologiques (biodégradable, B, ou réfractaire, U) et physiques (soluble, S, ou particulaire, X), comme le montre la Figure I.1. L'origine exogène des composés contenus dans une ERU est indiquée par l'indice « inf » par opposition à la matière d'origine endogène, produite par les microorganismes actifs au niveau des traitements biologiques, indiquée « E ».

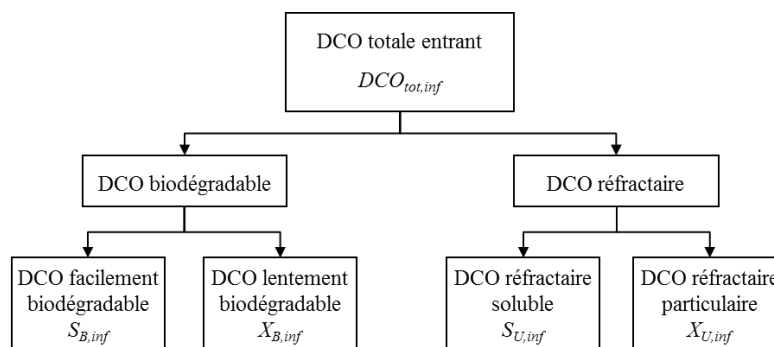


Figure I.1. Fractionnement de la DCO totale d'une ERU

I.1.1.1 Détermination de la teneur en composés réfractaires dans une ERU

Le fractionnement de la DCO d'une eau usée est une étape clé de la prédiction des performances de séparation et de traitement, des besoins en oxygène des unités biologiques, de la production de boues... De nombreux travaux ont donc été menés pour développer des procédures expérimentales permettant de déterminer le fractionnement DCO d'une ERU. La combinaison d'analyses physiques et

biologiques est apparue comme l'approche expérimentale la plus appropriée. Néanmoins, la diversité des techniques de caractérisations physiques (i.e. filtration, ultrafiltration, décantation, centrifugation...) et biologiques (i.e. réacteur batch ou continu, court ou long terme...) a donné lieu à l'utilisation de nombreuses méthodologies de fractionnement. Trois méthodes majeures peuvent toutefois être citées (Figure I.2) : une méthode A basée sur un test de DBO ultime (Roeleveld et Van Loodsrecht, 2002, Gillot et Choubert, 2010) ; une méthode B basée sur des respirométries initiées avec des ratios S_0/X_0 différents et l'identification mathématique de paramètres cinétiques de modèles ASM (Spérandio et Paul, 2000) ; une méthode C basée sur un bilan matière réalisé à partir de la biodégradation en batch de différentes matrices (ERU brute, ERU décantée et DCO soluble synthétique), permettant de mesurer la production de composés réfractaires bactériens (Orhon et al. 1994).

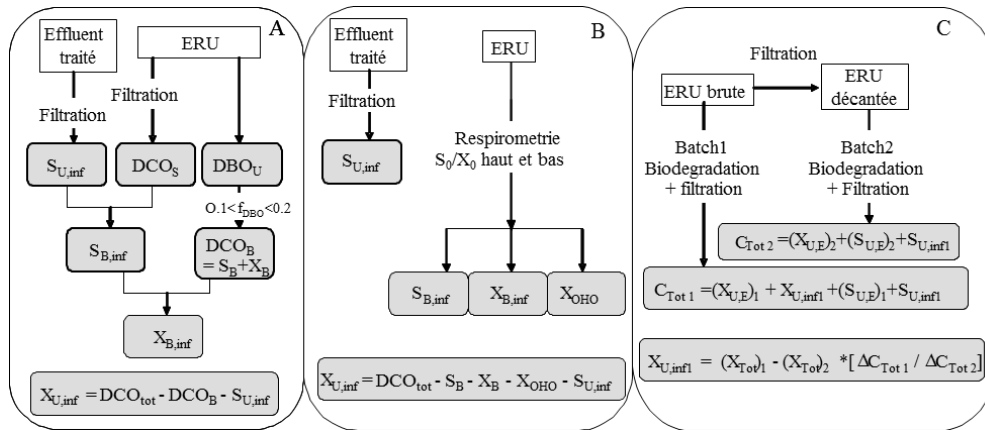


Figure I.2. Trois méthodes de détermination du fractionnement de la DCO d'une ERU

Quelle que soit la démarche expérimentale utilisée, la fraction organique réfractaire contenue dans une ERU est toujours estimée par différence entre la DCO totale et la DCO biodégradable (mesurée expérimentalement). La DCO réfractaire soluble est ensuite soit mesurée par filtration soit assimilée à la DCO soluble non biodégradée en sortie de procédé.

Ainsi, quelle que soit la méthodologie mise en œuvre, l'estimation de la DCO réfractaire particulière ($X_{U,inf}$) est entachée de l'ensemble des erreurs attribuables à la détermination des autres fractions.

Représentée par le paramètre $f_{XU,inf}$ exprimé en $gDCO_{XU,inf} \cdot gDCO_{tot,inf}^{-1}$, la Figure I.3 indique la valeur de ce paramètre estimée dans différents travaux de la littérature, récapitulés par Paul et Liu (2012). Un ordre de grandeur similaire peut être souligné pour les données moyennes obtenues par Ginestet et al. (2002), Spérandio et al. (2001) et Roeleveld et Van Loodsrecht (2002). Toutefois, une variabilité de l'ordre de 25 à 30 % est à noter. Par ailleurs, les données de Ekama et al. (1986) et Orhon et al. (2003) apparaissent nettement inférieures. Même si ces auteurs n'ont caractérisé qu'une seule ERU, ce résultat est potentiellement lié à leur procédure de détermination du fractionnement qui quantifie

directement la production de composés réfractaires d'origine bactérienne au niveau des batchs respirométriques au lieu de l'estimer.

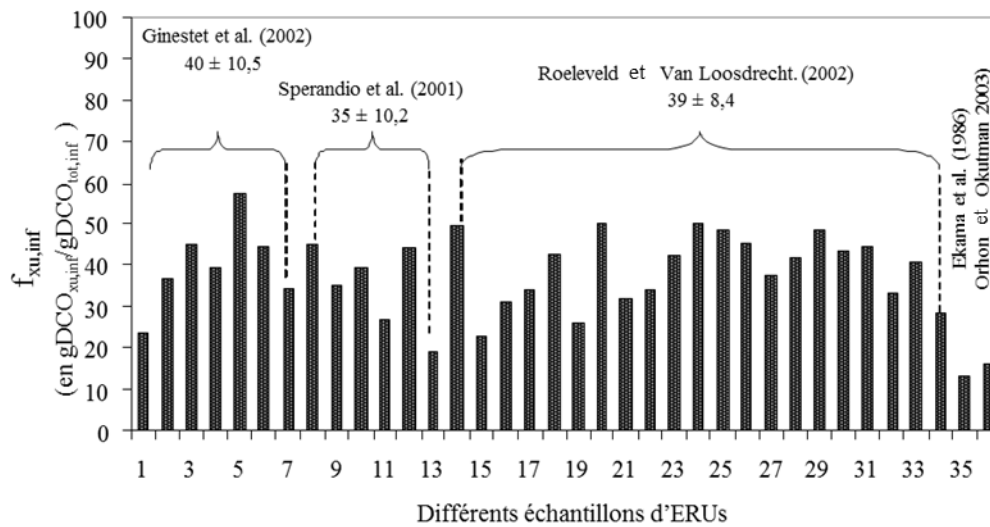


Figure I.3. Valeurs de la fraction réfractaire particulaire ($f_{xu,inf}$)

I.1.1.2 Fractionnement du flux de matière au niveau d'un décanteur primaire

Les boues primaires sont des matrices particulières purgées au niveau d'un traitement de séparation physique basé sur une décantation par simple gravité. La quantité de boue primaire produite dépend alors essentiellement de la quantité en matière organique décantable présente dans les eaux usées et du dimensionnement du traitement primaire. Dans des conditions optimales de fonctionnement, l'efficacité d'élimination est généralement comprise entre 50 et 70 % des solides en suspension (Metcalf et Eddy, 2003). Des agents chimiques coagulants sont parfois utilisés pour améliorer les rendements d'élimination en provoquant la décantation de composés non décantables (notamment les colloïdes).

Quatre classes de taille de particules sont au plus considérées dans la littérature pour définir la physico-chimie des polluants organiques contenus dans une ERU : soluble, colloïdale, supra-colloïdale et particulaire. Comme l'indique le Tableau I.1 (adapté de Sophonsiri et Morgenroth, 2004), les seuils entre ces domaines varient suivant les auteurs, entre autre à cause de la définition de l'état colloïdale et de l'état supra-colloïdale qui ne fait pas consensus.

Tableau I.1. Variabilité des limites de classes de taille de particules

Références	Type de particules			
	Solubles	Colloïdales	Supra-colloïdales	Décantables
Rickert et Hunter, 1967	< 0,1µm	1 – 100 µm		> 100µm
Hauekelekian et Balmat, 1959	< 0,1µm	0,1 – 1 µm	1 – 100 µm	> 100µm
Levine et al., 1985	< 0,08 µm	0,08 – 100 µm		> 100µm
Klop et Koppe, 1990	< 0,07 µm	0,07 – 2 µm		> 2µm
Hu et al., 2002	< 10 000 Da*	10 000 Da – 1µm		> 1µm
Sophonsiri et Morgenroth, 2004	< 100 000 Da	100 000 Da – 1,2 µm	1,2 µm – 63 µm	> 63 µm

* Da : unité standard pour indiquer la taille à l'échelle atomique ou moléculaire.

Les résultats de Guellil et al. (2001), qui ont développé une méthode pour simuler les conditions normales de fonctionnement d'un décanteur primaire à l'échelle laboratoire, indiquent que les particules décantables d'une ERU brute ont majoritairement un diamètre moyen supérieur à 100µm. La Figure I.4 indique toutefois que les particules dont le diamètre est compris entre 10 et 100µm sont aussi partiellement séparées. Les résultats ne permettent pas de déterminer ce qui confère le caractère décantable, ou non, aux particules de cette gamme de taille (équivalente à des colloïdes et/ou supra-colloïdes). Pourtant, il est possible que la fluctuation des performances de séparation au niveau de la décantation simple implique la variabilité des propriétés de cette classe de particules.

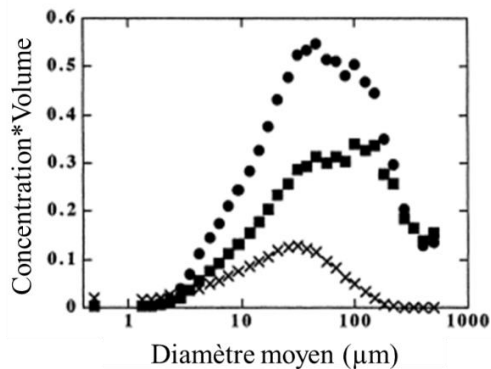


Figure I.4. Comparaison des analyses granulométriques d'une ERU brute (●) avec ses particules décantées (■) et non décantées (X), obtenues après 2h de décantation dans un cône Imhoff gradué de 1L (Guellil et al., 2001)

Le Tableau I.2 indique la répartition de la DCO contenue dans différentes ERUs, brutes et décantées, considérées par Sophonsiri et Morgenroth (2004). Leurs résultats soulignent que (1) le fractionnement physique de la matière organique est très variable selon les ERUs et que (2) la répartition selon la taille est relativement similaire avant et après décantation.

Tableau I.2. Répartition physique de la DCO d'ERUs brutes et décantées

Taille de particules	ERU brute (n=5)	ERU décantée (n=3)
Soluble ($<0,8\mu\text{m}$)	42 ± 17 (40%)	45 ± 7 (15%)
Colloïdale ($0,08-1\mu\text{m}$)	12 ± 4 (33%)	10 ± 2 (20%)
Supra-colloïdale ($1-100\mu\text{m}$)	25 ± 9 (36%)	34 ± 16 (47%)
Décantable ($>100\mu\text{m}$)	26 ± 11 (42%)	17 ± 13 (76%)

Pourcentages entre parenthèses : erreur relative (soit l'écart-type divisé par la moyenne)

La répartition de la DCO des ERUs de 7 STEP Françaises a été estimée selon la procédure de Ginestet et al. (2002), basée sur un critère de décantabilité en cône Imhoff et de coagulation par un agent floculant (FeCl_3). Avec des proportions comprises entre 2 et 47%, pour les fractions solubles (non-décantables et non coagulables), 0 et 70 % pour les fractions colloïdales (non-décantables mais coagulables) et 15 et 20 % pour les fractions particulières (décantables), les auteurs constatent la même variabilité des propriétés physico-chimiques de la matière organique véhiculée par une ERU.

L'ensemble de ces résultats indiquent que la répartition de la matière organique au niveau d'un décanteur primaire est variable. De plus, les données ne permettent pas de préciser avec certitude de quelle manière se répartissent les composés organiques réfractaires entre la boue primaire et l'ERU décantée. Les compositions moyennes d'une ERU brute, d'une ERU décantée et d'une ERU coagulée-décantée, typiquement utilisées lors de la modélisation du fonctionnement d'une STEP, sont présentées dans le Tableau I.3. L'objectif est de déterminer de quelle manière la répartition de la matière réfractaire $X_{U,\text{inf}}$ est considérée dans la littérature. Les rendements d'élimination globale de la fraction particulaire et spécifique à la fraction $X_{U,\text{inf}}$ ont été calculés sur la base de ces données et sont présentés dans le Tableau I.4. L'estimation du fractionnement des boues primaires, avec ou sans ajout d'agents chimiques, purgées y est aussi indiquée.

Tableau I.3. Composition typique d'une ERU brute, décantée, coagulée-décantée (adapté de Dold et al.,2007 (1) et Ekama et al.,2009(2))

	ERU brute		ERU décantée		ERU coagulée-décantée
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)
Concentrations					
DCO _{totale,inf}	800	750	530	450	260
S _{U,inf}	40	53	40	53	40
S _{B,inf}	160	146	160	146	160
X _{B,inf}	480	439	264	233	48
X _{U,inf}	120	112	66	18	12
X _B (sans colloïdes)	360		144		36
X _U (sans colloïdes)	90		36		9
Fractions					
f _{US,inf}	0,05	0,07	0,08	0,12	0,15
f _{BS,inf}	0,20	0,19	0,30	0,32	0,62
f _{S,inf} = f _{US,inf} + f _{BS,inf}	0,25	0,26	0,38	0,44	0,77
f _{BX,inf}	0,60	0,59	0,50	0,52	0,18
f _{UX,inf}	0,15	0,15	0,12	0,04	0,05
f _{X,inf} = f _{BX,inf} + f _{UX,inf}	0,75	0,74	0,62	0,56	0,23
f _{BC,inf} *	0,15(0,25)	/	0,23(0,45)	/	0,05(0,25)
f _{UC,inf} *	0,04(0,25)	/	0,06(0,45)	/	0,01(0,25)
f _{C,inf} = f _{BC,inf} + f _{UC,inf} *	0,19(0,25)		0,29(0,45)		0,06(0,25)

Les valeurs entre parenthèses correspondent à la part de composés colloïdaux par rapport à la quantité de composés particulaires (X).

Tableau I.4. Estimation des rendements d'élimination et du fractionnement des boues primaires

	Décantation primaire		Coagulation-Décantation
	(1)	(2)	(1)
Rendement élimination par décantation			
η _{PS}	34%	40%	68%
η _{XB}	45%	47%	90%
η _{XU}	45%	84%	90%
Fractions des boues décantées			
f _{BX}	0,80	0,69	0,8
f _{UX}	0,20	0,31	0,2

(1) Dold et al., 2007

(2) Ekama et al., 2009

La comparaison des concentrations proposées par Dold et al. (2007) et de Ekama et al. (2009), entre une ERU brute et une ERU décantée, révèle alors que ces auteurs attribuent des rendements similaires pour l'élimination de la DCO biodégradable contenue dans l'ERU brute (η_{XB} de 45 et 47% de la DCO particulaire biodégradable de l'ERU, X_B) mais nettement différents pour la DCO réfractaire (η_{XU} de 45 et 84 % de la DCO particulaire réfractaire de l'ERU). En attribuant un rendement d'élimination par décantation de 45% identique pour les composés biodégradables et réfractaires, Dold et al. (2007) supposent que le fractionnement biodégradable reste inchangé lors du fractionnement physique par décantation. Le fractionnement de la fraction particulaire, f_X, est alors conservé entre l'ERU brute, l'effluent primaire et la boue primaire. A l'inverse, en attribuant des rendements d'élimination différents à la DCO particulaire biodégradable et réfractaire, Ekama et al. (2009) considèrent que la

décantation modifie significativement son fractionnement. Ainsi, la DCO réfractaire particulière de l'effluent primaire et de la boue primaire compte alors pour 7% et 31%, contre 20% dans l'ERU brute avant décantation (% exprimés en $\text{gDCO}_{\text{XU}}.\text{gDCO}_{\text{X}}^{-1}$).

En conclusion, les résultats mettent en évidence que la répartition de la matière organique réfractaire au niveau du traitement primaire ne fait pas consensus. Cette caractéristique joue pourtant un rôle majeur sur l'estimation de la teneur en matière réfractaire contenue dans les boues primaires et les boues biologiques, et potentiellement sur la nature chimique de ses composés. Les données actuellement disponibles dans la littérature ne permettent pas de préciser l'impact quantitatif et qualitatif d'un décanteur sur la fraction réfractaire d'une boue.

I.1.2 La fraction réfractaire endogène : $X_{\text{U,E,AE}}$

I.1.2.1 Fractionnement DCO d'une boue biologique

La composition d'une boue purgée d'un traitement biologique est directement liée aux caractéristiques de l'eau usée à traiter et aux paramètres stœchiométriques et cinétiques des processus biologiques en jeu. La modélisation constitue alors un outil qui permet de décrire l'évolution de la matière organique aux bornes d'une unité de traitement biologique. La Figure I.5 représente ainsi les principaux processus considérés lors de la biodégradation de la DCO biodégradable contenue dans une eau usée : l'hydrolyse, la croissance et la lyse cellulaire.

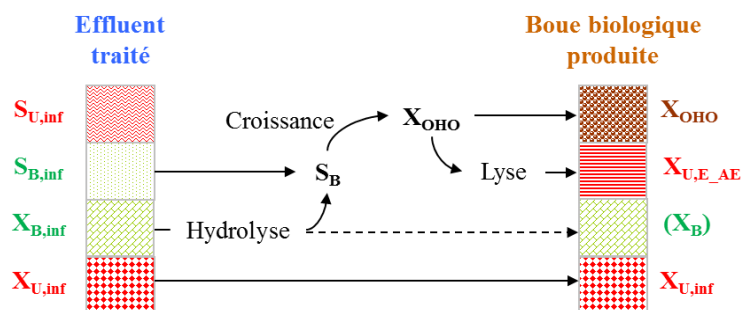


Figure I.5. Évolution de la matière organique aux bornes d'un procédé de traitement biologique d'une eau usée

Une boue biologique est purgée par séparation solide-liquide et est donc majoritairement particulaire. En accord avec les mécanismes de dégradation, la DCO totale d'une boue peut être fractionnée au plus en quatre fractions :

- X_{OHO} , qui correspond à la biomasse cellulaire responsable des processus de dégradation de la matière organique biodégradable. En aérobie, elle est majoritairement composée de microorganismes hétérotrophes, notés OHO (*ordinary heterotrophic organisms*). Dans une moindre proportion et selon certaines conditions de fonctionnement, d'autres microorganismes peuvent contribuer à la fraction active. Les autotrophes nitrifiants responsables de l'oxydation

de l'azote ammoniacal, notés AOB (*ammonium oxidizing bacteria*) et NOB (*nitrite-oxidizing bacteria*), peuvent être cités à titre d'exemple.

- X_{U,E_AE} , qui correspond à des composés réfractaires (U) produits par le métabolisme des microorganismes actifs au niveau de l'unité biologique. Produits par le système de traitement, et non amenés par l'alimentation, ces composés sont dits endogènes (E). (L'indice « _AE » est précisé pour différencier ces composés de ceux produits lors de la digestion anaérobie en aval).
- $X_{U,inf}$, qui correspond à la fraction réfractaire particulaire véhiculé par l'eau usée traitée par l'unité biologique.
- X_B , qui correspond à une fraction de composés lentement biodégradables contenus dans l'eau usée d'entrée ($X_{B,inf}$) et dont la dégradation a pu être limitée par le processus hydrolytique.

La fraction réfractaire contenue dans une boue biologique correspond donc à la somme des composés réfractaires exogènes de l'eau usée qui alimente le traitement biologique, $X_{U,inf}$, et des composés réfractaires endogènes, X_{U,E_AE} . L'estimation de la contribution quantitative de ces deux types de composés est directement liée à la détermination du fractionnement de l'eau usée et aux paramètres cinétiques et stœchiométriques des processus biologiques en jeu qui vont directement conditionner la teneur en X_{U,E_AE} produite lors du traitement de l'eau usée. La question de la détermination du $X_{U,inf}$ a été discutée précédemment. Les paragraphes suivants s'attachent donc à décrire les mécanismes de dégradation de la matière organique indiqués sur la Figure I.5 qui vont être à l'origine de l'accumulation de la fraction organique réfractaire dite endogène, X_{U,E_AE} .

1.1.2.2 Processus biologiques en jeu en aérobie

a. Croissance de la biomasse

La Figure I.6 permet de représenter les flux de DCO et les paramètres cinétiques et stœchiométriques caractéristiques de ce processus biologique.

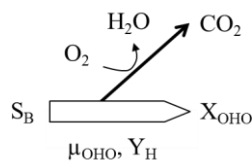


Figure I.6. Croissance de la biomasse hétérotrophe

La croissance de la biomasse hétérotrophe est décrite par une cinétique de Monod d'ordre un par rapport à X_{OHO} (Dold et al., 1980; Metcalf & Eddy, 2003). Conditionnée par des réactions enzymatiques, elle est considérée limitée par la disponibilité du substrat rapidement biodégradable S_B tel que le décrit l'équation ci-dessous.

$$r_{XH} = \frac{dX_{OHO}}{dt} = \mu_{OHO,max} * \frac{S_B}{K_S + S_B} * X_{OHO}$$

où :

r_{XH} : Taux de croissance de la biomasse hétérotrophe (gDCO.L⁻¹.j⁻¹)

$\mu_{OHO,max}$: Taux de croissance spécifique maximal des hétérotrophes (gDCO.gDCO⁻¹.j⁻¹)

S_B : Substrat rapidement biodégradable (gDCO.L⁻¹)

K_S : Constante de demi-saturation (gDCO L⁻¹)

X_{OHO} : Biomasse hétérotrophe (gDCO L⁻¹)

Les valeurs les plus fréquemment utilisées pour le taux de croissance spécifique, μ_{OHO} , et le rendement de conversion, Y_H , des hétérotrophes sont 6 j⁻¹ et 0,666 gDCO_{X_{OHO}}.gDCO_B⁻¹ (sur eaux usées) (Henze et al., 1987).

b. Hydrolyse de la fraction lentement biodégradable X_B

Les bactéries ont la faculté de dégrader la matière organique soluble ayant un faible poids moléculaire. La matière organique contenue dans une eau usée urbaine est majoritairement particulaire. Des enzymes extracellulaires sont alors secrétées par les bactéries pour réduire la taille des particules en molécules biodisponibles, capables de traverser les membranes cellulaires. Le processus mis en jeu est l'hydrolyse. C'est un processus multi-étapes mal connu. Morgenroth et al., 2002 récapitulent différentes expressions de la cinétique d'hydrolyse utilisées dans la littérature. Les auteurs indiquent que des modèles tenant compte de la limitation de l'hydrolyse par la surface réactionnelle avec le terme X_B/X_{OHO} permettent de couvrir une plus large gamme de cas d'application. L'expression cinétique basée sur les travaux de Levenspiel, 1972, qui considère la limitation par la surface réactionnelle, est proposée par le groupe de l'IWAQ. Son expression est la suivante :

$$\frac{dX_B}{dt} = -k_{hyd} * \frac{X_B / X_{OHO}}{K_X + X_B / X_{OHO}} * X_{OHO}$$

où :

k_{hyd} : Taux d'hydrolyse (gDCO.gDCO⁻¹.j⁻¹)

K_X : Constante de demi-saturation spécifique (gDCO.gDCO⁻¹)

X_B : Substrat lentement biodégradable (gDCO.L⁻¹)

X_{OHO} : Biomasse active hétérotrophe (gDCO.L⁻¹)

Dans les procédés à boues activées, les micro-organismes sont en excès par rapport au substrat. Cette expression peut alors se simplifier. La cinétique d'hydrolyse peut alors être représentée par un modèle d'ordre un, indépendant de la concentration en biomasse :

$$\frac{dX_B}{dt} = -K_H * X_B \quad \frac{dX_B}{dt} = -K_H * X_B \quad \text{où} \quad K_H = \frac{k_{hyd}}{K_X} \quad K_H = \frac{k_{hyd}}{K_X} \quad \text{car } X_{OHO} \gg X_B \text{ et } X_B/X_{OHO} \ll 1$$

De manière générale au niveau de la modélisation du fonctionnement d'un procédé, les valeurs attribuées à la cinétique d'hydrolyse sont fixées en lien avec le fractionnement DCO de l'ERU à traiter. Les données proposées par les modèles permettent de prédire relativement bien la consommation d'oxygène associée à la biodégradation (et donc la production de boue) malgré la fluctuation de la qualité des constituants d'une ERU. Ces valeurs englobent différents processus et dépendent de la structure du modèle. Ainsi, pour une même écriture du processus d'hydrolyse, le modèle ASM3 qui prend en compte le processus de stockage n'a pas les mêmes valeurs pour k_{hyd} et K_X que le modèle ASM1 qui n'en tient pas compte dans sa structure. De plus, les valeurs obtenues expérimentalement sur des ERUs brutes ou décantées présentent une importante variabilité (Ginestet et al. 2002).

Or, le processus d'hydrolyse gouverne directement la part de DCO totale entrante qui sera biodégradée pendant le temps de séjour des solides et donc les teneurs produites en biomasse active et en résidus réfractaires endogènes. Dans une démarche visant à quantifier le fractionnement de la matière réfractaire contenue dans une boue biologique, la sensibilité du paramétrage de l'hydrolyse devra être abordée.

c. Dégradation de la biomasse cellulaire : Production de composés réfractaires endogènes

Le métabolisme endogène, la lyse cellulaire, la croissance cryptique et la prédation sont regroupés sous le processus de dégradation de la biomasse cellulaire (Van Loosdrecht et Henze, 1999). Deux modèles permettent de décrire la production d'une fraction organique particulière réfractaire endogène, X_{U,E_AE} :

- Le modèle de mort-régénération utilisé dans le modèle ASM1 fait intervenir la notion de croissance cryptique de la biomasse sur les sous-produits biodégradables issus de la lyse cellulaire (Dold et al., 1980, Henze et al., 1987). Celle-ci produit une fraction inerte f_{AE} et une fraction de composés organiques ($1-f_{AE}$) assimilée à des composés de type X_B , lentement biodégradable. Après hydrolyse en S_B , la DCO organique biodégradable générée par la lyse cellulaire est oxydée et régénérée en biomasse hétérotrophe X_{OHO} .
- Le modèle de respiration endogène utilisé dans le modèle ASM3 décrit aussi la production d'une fraction de résidu réfractaire endogène lors de la lyse cellulaire, f_{AE} . Néanmoins, il diffère du modèle mort-régénération car la fraction ($1-f_{AE}$) est directement oxydée.

Les schémas des flux de DCO et les équations qui décrivent les processus pris en compte pour chaque modèle sont présentées dans le Tableau I.5 avec le formalisme qui leur est associé.

Tableau I.5. Modèles de dégradation de la biomasse cellulaire

Respiration endogène (utilisé dans ASM3) (McKinney, 1960)	Mort-Régénération (utilisé dans ASM1) (Dold et al, 1980)
Dégradation de la biomasse active	
$\frac{dX_{OHO}}{dt} = -b_H * X_{OHO}$	$\frac{dX_{OHO}}{dt} = -b'_H * X_{OHO}$
Génération du résidu endogène X_{U,E_AE}	
$\frac{dX_{U,E_AE}}{dt} = -f_{AE} * \frac{dX_{OHO}}{dt} = f_{AE} * b_H * X_{OHO}$	$\frac{dX_{U,E_AE}}{dt} = -f'_{AE} * \frac{dX_{OHO}}{dt} = f'_{AE} * b'_H * X_{OHO}$
Génération d'une fraction lentement biodégradable X_B	
$\frac{dX_B}{dt} = (1 - f'_{AE}) * b'_H * X_{OHO}$	
Hydrolyse du X_B en S_B	
$\frac{dS_B}{dt} = k_{hyd} * \frac{X_B / X_{OHO}}{K_X + X_B / X_{OHO}} * X_{OHO}$	
Utilisation de l'oxygène pour la lyse cellulaire	
$-\frac{dO_2}{dt} = (1 - f_{AE}) * b_H * X_{OHO}$	$-\frac{dO_2}{dt} = (1 - f'_{AE}) * (1 - Y_H) * b'_H * X_{OHO}$
où :	
X_{OHO} : biomasse active hétérotrophe, en $gDCO.L^{-1}$	
X_{U,E_AE} : Résidu réfractaire particulaire endogène accumulé pendant le traitement aérobie , en $gDCO.L^{-1}$	
b_H ou b'_H : taux de respiration endogène, en $gDCO.(gDCO.j)^{-1}$	
f_{AE} ou f'_{AE} : fraction réfractaire produite lors de la lyse de la biomasse cellulaire et qui s'accumule en tant que résidu réfractaire endogène, en $gDCO.gDCO^{-1}$	
X_B : substrat lentement biodégradable, en $gDCO.L^{-1}$	
S_B : substrat rapidement biodégradable, en $gDCO.L^{-1}$	
Y_H : rendement de conversion maximal des hétérotrophes, en $gDCO.gDCO^{-1}$	

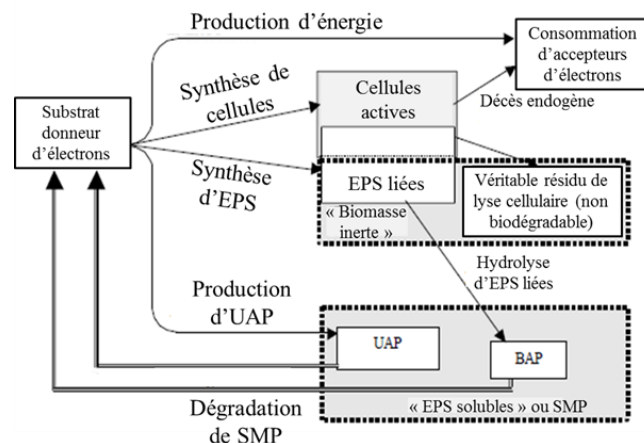
Quel que soit le modèle de dégradation de la biomasse cellulaire choisi, les deux approches aboutissent aux mêmes résultats. Les relations mathématiques qui décrivent le passage d'un couple de paramètres à un autre sont déduites en posant l'égalité des équations décrivant la génération de la fraction $X_{U,E_{AE}}$ et de l'utilisation de l'oxygène :

$$\left\{ \begin{array}{l} b_H * f_{AE} = b'_H * f'_{AE} \\ (1-f_{AE}) * b_H = (1-f'_{AE}) * (1-Y_H) * b'_H \end{array} \right. \rightarrow \left\{ \begin{array}{l} f'_{AE} = \frac{(1-Y_H)}{(1-Y_H * f_{AE})} * f_{AE} \\ b'_H = \frac{(1-Y_H * f_{AE})}{(1-Y_H)} * b_H \end{array} \right.$$

Les valeurs recommandées pour les paramètres b_H et f_{AE} par Dold et al., 2007 sont respectivement de $0,24 \text{ j}^{-1}$ (à 20°C) et $0,20$. Les valeurs de b'_H et f'_{AE} équivalentes pour le concept de la mort régénération sont de $0,62 \text{ j}^{-1}$ (à 20°C) et $0,08$ en considérant une valeur de $0,666 \text{gDCO/gDCO}$ pour Y_{OHO} .

Par ailleurs, il a été montré que le taux de respiration endogène b_H est indépendant de l'âge de boue mais qu'il varie avec la température selon l'équation suivante basée sur le principe de *Van't Hoff-Arrhenius* : $b_H(T) = 0,24 * \theta^{(T-20)}$, où θ vaut $1,029$ (Dold et al., 2007). Ramdani et al. (2010) confirment d'ailleurs ce résultat.

Concernant les composés organiques assimilés à cette fraction $X_{U,E_{AE}}$, Laspidou et Rittman (2002) ont réalisé une analyse des différents concepts utilisés dans la littérature pour décrire les relations existant entre les différents composés organiques liés au métabolisme bactérien : EPS, produits microbiens solubles, biomasse active et composés réfractaires. (Figure I.7)



UAP : produit de l'utilisation du substrat; BAP : produits associés à la biomasse ; SMP : produits microbiens solubles

Figure I.7. Représentation schématique de la théorie unifiée de Laspidou et Rittman (2002)

Les auteurs proposent de différencier deux types de composés organiques non biodégradables produits par la biomasse cellulaire : des produits de la lyse bactérienne et des EPS générées par la biomasse lors de sa croissance et dont la cinétique d'hydrolyse est plus lente que le décès cellulaire. En ce sens, ils

considèrent que les composés réellement réfractaires sont issus du décès. Même si leur modèle permet de décrire correctement des données expérimentales de la littérature, aucune méthodologie n'est proposée pour déterminer la distribution de ces différentes fractions. Cette distinction entre ces différents composés organiques réfractaires endogènes ne sera donc pas prise en compte dans les démarches de quantification utilisées dans le cadre de ce travail de thèse. Toutefois, dans un contexte d'identification de l'origine des composés réfractaires accumulés dans un résidu de boue, ces travaux méritaient d'être soulignés.

1.1.2.3 Estimation de la fraction $X_{U,E_{AE}}$ produite

Sur la base des processus biologiques présentés précédemment, la production de boue purgée au niveau d'un procédé biologique, PX_{tot} , peut s'écrire de la manière suivante :

$$PX_{tot} = PX_{OHO} + PX_{U,E_{AE}} + PX_{U,inf}$$

avec

PX_{OHO} : quantité de biomasse hétérotrophe produite (gDCO.j⁻¹)

$PX_{U,E_{AE}}$: quantité de résidus organiques réfractaires endogènes (gDCO.j⁻¹)

$PX_{U,inf}$: quantité de composés organiques réfractaires exogènes (gDCO.j⁻¹)

En régime permanent, l'écriture des bilans matières présentée en Annexe 1 aboutit aux expressions mathématiques rappelées sur la Figure I.8.

Boue biologique produite



$$X_{OHO} \quad PX_{OHO} = Y_{H,obs} * (1 - f_{US} - f_{UX}) * Q_{inf} * DCO_{tot,inf}$$

$$X_{U,E_{AE}} \quad PX_{U,E_{AE}} = b_H * f_{AE} * \theta_{b-AE} * Y_{H,obs} * (1 - f_{US} - f_{UX}) * Q_{inf} * DCO_{tot,inf}$$

$$X_{U,inf} \quad PX_{U,inf} = f_{UX} * Q_{inf} * DCO_{tot,inf}$$

$$\Rightarrow PX_{tot} = \left[(1 - f_{US} - f_{UX}) * \left[\frac{Y_H}{1 + b_H * \theta_{b-AE}} * (1 + b_H * f_{AE} * \theta_{b-AE}) \right] + f_{UX} \right] * Q_{inf} * DCO_{tot,inf}$$

f_{US}, f_{UX} : fractions soluble et particulaire de la DCO réfractaire contenues dans l'eau usée

Figure I.8. Estimation du fractionnement DCO d'une boue biologique

Les expressions montrent que le fractionnement d'une boue biologique, et en particulier la fraction $X_{U,E_{AE}}$, est fortement impactée par :

- le fractionnement de l'effluent à traiter : f_{US}, f_{UX} ,
- le choix de l'âge de boue : θ_{b-AE} ,
- les paramètres biologiques de la biomasse cellulaire active : Y_H, b_H, f_{AE} .

De plus, le terme $(1-f_{US}-f_{UX})$ revient à considérer que la totalité de la DCO biodégradable a été biodégradée pendant le temps de séjour des solides imposé au procédé biologique. Ceci suppose que toute la fraction biodégradable lentement biodégradable $X_{B,inf}$ a été dégradée. Or, cette hypothèse peut

conduire à une surestimation de la quantité de composés réfractaires endogènes réellement accumulés dans la boue biologique produite.

L'incertitude sur la fraction $X_{U,inf}$ contenue dans l'eau usée à traiter, les conditions opératoires variables d'une unité de traitement biologique et la valeur des paramètres utilisés pour la modélisation des processus biologiques impactent significativement (1) l'estimation de la teneur en DCO réfractaire d'une boue, et (2) l'estimation de la proportion relative entre les différents composés réfractaires.

I.1.3 Détermination de la DCO réfractaire d'une boue

I.1.3.1 Approche expérimentale

Comme pour la détermination de la DCO réfractaire contenue dans une ERU, il n'existe pas de technique analytique permettant de quantifier directement la DCO réfractaire contenue dans une boue. Cette fraction organique est obtenue différence entre la quantité de DCO totale contenue dans un échantillon donné et la quantité de DCO biodégradable mesurée expérimentalement (Mottet et al., 2009) :

$$DCO_{U,AN} = DCO_{tot} - DCO_{B,AN}$$

En anaérobie, la procédure la plus communément utilisée pour déterminer la DCO biodégradable est le test BMP (*Biochemical Methane Potential*) (Lesteur et al., 2010). Elle consiste à mesurer la quantité maximale de méthane produite par une quantité connue de DCO digérée en batch anaérobie sur une durée indéfinie (Angelidaki and Sanders, 2004). La Figure I.9 représente le volume cumulé de méthane produit, normalisé par gramme de DCO échantillon. Le potentiel méthane correspond à la valeur maximale produite. Sachant qu'un gramme de DCO biodégradable équivaut à 350 NmL de CH_4 , il est possible de calculer la proportion de DCO biodégradable.

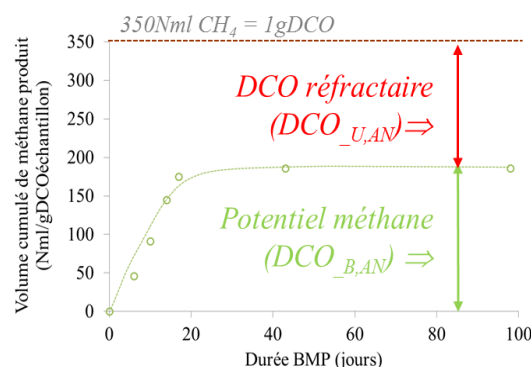


Figure I.9. Potentiel méthane ultime déterminé par test BMP

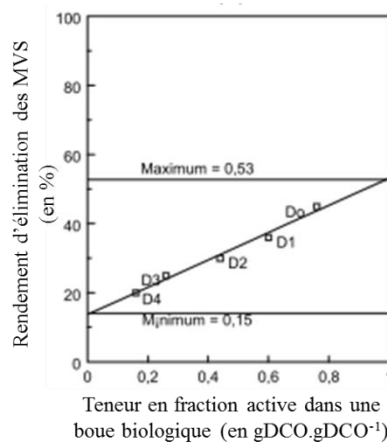
La durée du test BMP n'est pas fixe et peut varier selon les études de 15 à 60 jours. Comme le soulignent Lesteur et al. (2010), le test BMP est sensible à de nombreux paramètres : température, pH, ratios substrat/inoculum... Face aux questions que posent cette technique et aux conséquences industrielles d'une mauvaise estimation de la biodégradabilité d'un intrant de digestion anaérobie, des

méthodes alternatives d'estimation de la biodégradabilité ont fait l'objet de nombreux travaux. Dans sa revue bibliographique, Lesteur et al. (2010) en rappellent un certain nombre qui *a priori* permettent d'estimer correctement la biodégradabilité d'un substrat. Néanmoins, les différentes méthodes évoquées ne correspondent pas à une mesure expérimentale directe de la DCO biodégradable, et la plupart sont couplées à un modèle mathématique de prédiction nécessitant une démarche analytique dédiée.

Ainsi, le test BMP demeure la technique de quantification expérimentale de la DCO biodégradable d'une boue la plus accessible et la plus facile à mettre en œuvre.

I.1.3.2 Le caractère réfractaire des fractions $X_{U,inf}$ et $X_{U,E_{AE}}$

Araujo et al. (1998) sont les premiers à avoir émis l'hypothèse de la possible dégradabilité en anaérobie de la fraction réfractaire d'une boue biologique. Ils ont mesuré le rendement d'élimination en matières volatiles en suspension (MVS) atteint lors de la digestion anaérobie, pendant 20 jours à 25°C, de cinq boues aérobies d'âges croissants (de 2 à 43 jours) et alimentées par une même ERU brute. Après avoir estimé la fraction active contenue dans les différentes boues, les auteurs ont mis en évidence l'existence d'une corrélation entre le rendement d'élimination exprimé en MVS et la teneur en fraction active contenue dans les boues (Figure I.10).



D0, D1, D2, D3, D4, D5 : boues biologiques d'âges de boues respectifs 2, 5, 10, 23, 43 jours avant digestion anaérobie de 20 jours à 25°C.

Figure I.10. Pourcentage de MVS éliminées par digestion anaérobie en fonction de la teneur en fraction active dans une boue biologique (Araujo et al., 1998)

Par extrapolation, les auteurs concluent à une possible biodégradabilité partielle de la fraction réfractaire accumulée après un traitement biologique aérobie puisque leur relation suggère un rendement minimum de 15% des MVS pour une boue biologique présentant une fraction active nulle (soit exclusivement composée de $X_{U,E_{AE}}$ et $X_{U,inf}$).

En vue de prédire la quantité de boue produite par le système d'épuration considéré dans sa globalité (filière eau + filière boue), la conservation du caractère réfractaire des composés organiques qui contribuent à la fraction réfractaire contenue dans les boues est une question clé. Ekama et al. (2007) ont alors utilisé les données d'Araujo et al. (1998), les données de leur propre étude (boues activées âgées de 15 à 150 jours digérées en anaérobie pendant 60 jours à 37°C), et la modélisation pour déterminer les fractions biodégradables en digestion anaérobie (ASM1 et ADM de Dold et al. (1980) et Sötemann et al. (2006)). Les auteurs concluent à la conservation du caractère réfractaire en aérobie et en anaérobie.

Par l'analyse de travaux publiés sur les 30 dernières années, Spérandio et al. (2013) ont évalué la qualité de prédiction du rendement observé Y_{obs} de bioréacteurs à membranes alimentés par des effluents solubles synthétiques ou par des effluents urbains, avec ou sans purge de boues. Leurs résultats indiquent que l'introduction d'une cinétique de biodégradation de $0,007 \text{ j}^{-1}$ pour les deux fractions dites réfractaires $X_{U,E_{AE}}$ et $X_{U,inf}$ dans la structure du modèle ASM3 permet d'améliorer significativement la prédiction des rendements mesurés sur une gamme d'âges de boues allant de 1 à 400 jours. Néanmoins, les auteurs précisent que pour des âges de boues inférieurs à 25 jours, les données prédites sont identiques avec ou sans la considération d'un processus de biodégradation des fractions réfractaires. Leurs résultats indiquent que la conservation du caractère réfractaire pourrait dépendre de l'âge de boue opéré au niveau du traitement biologique.

Par ailleurs, Jones et al. (2007) ont étudié la biodégradabilité en batchs anaérobies de 123 jours de boues primaires et secondaires en se basant sur la confrontation entre un suivi expérimental et une modélisation mathématique avec le modèle ASDM de Biowin 2.2 (Activated Sludge – Digestion Model). Les premières simulations ont été basées sur l'hypothèse de la conservation du caractère réfractaire des fractions $X_{U,E_{AE}}$ et $X_{U,inf}$. Les concentrations en MVS, en DCO et la production de méthane ont été mesurées. La digestion anaérobie des boues primaires a été bien simulée sur l'ensemble de la période. La prédiction de la digestion anaérobie des boues activées a seulement été correcte sur les 40 premiers jours. Au-delà, les mesures de biogaz et de méthane produit sont significativement supérieures aux données estimées (Figure I.11-A). L'ajout d'un processus de dégradation sur la fraction endogène réfractaire $X_{U,E_{AE}}$ avec une cinétique b_E de $0,0075 \text{ j}^{-1}$ a alors permis de simuler correctement la production de biogaz et de méthane comme le montre la Figure I.11-B. En accord avec la différence constatée entre la digestion anaérobie d'une boue primaire et d'une boue biologique, Jones et al. (2007) concluent que la biodégradation de la fraction réfractaire d'une boue est plutôt attribuable à la fraction réfractaire endogène correspondant à des composés d'origine bactérienne.

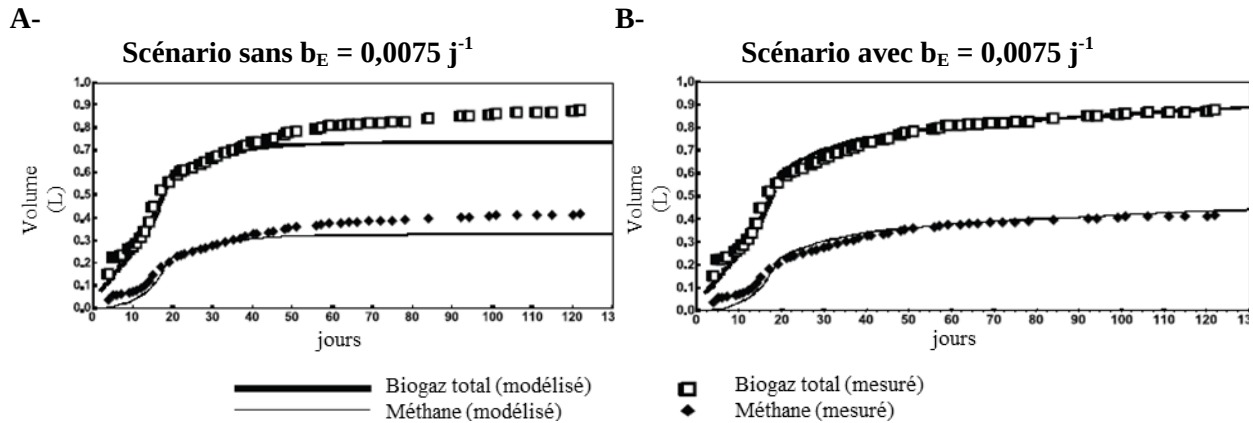


Figure I.11. Confrontation des données expérimentales et simulées des volumes de biogaz et de méthane produit lors de la digestion anaérobie de boues activées (Jones et al., 2007)

Les travaux de Ramdani et al. (2010) viennent aussi confirmer la biodégradabilité attribuable à la fraction X_{U,E_AE} . Les auteurs l'ont spécifiquement étudié après avoir produit une matrice biologique exclusivement composée de biomasse hétérotrophe, X_{OHO} , et de résidus réfractaires endogènes, X_{U,E_AE} (bioréacteur à membrane opéré à un âge de boue, θ_{b_AE} , de 5,2 jours et alimenté par de l'acétate comme unique source de DCO). Des batchs de 90 jours à 35°C en conditions anaérobies et en conditions alternées aérobie-anaérobie ont été utilisés pour mesurer la biodégradabilité de la fraction réfractaire produite par des microorganismes. La modélisation a permis de (1) confirmer la biodégradabilité lente de la fraction réfractaire d'origine bactérienne, et de (2) déterminer les cinétiques de sa dégradation en anaérobie stricte et en conditions alternées, respectivement de 0,005 et 0,012 j^{-1} .

La conservation du caractère réfractaire des fractions $X_{U,inf}$ et X_{U,E_AE} ne fait pas consensus. Or cette caractéristique impacte directement le fractionnement de la fraction réfractaire d'une boue. Cette question devra donc être abordée.

I.2 CARACTERISTIQUES DE LA MATIERE ORGANIQUE REFRACTAIRE D'UNE BOUE

I.2.1 Préambule

La biodégradation d'un composé organique est un processus complexe qui dépend de nombreux facteurs (Figure 0.1). Toutefois, deux éléments majeurs conditionnent la réalisation des réactions enzymatiques : (1) l'adéquation entre le pool enzymatique présent et la nature des substrats disponibles, et (2) le contact entre les entités « enzyme » et « substrat ». La recherche bibliographique relative à la matière réfractaire contenue dans une boue d'épuration s'est donc naturellement focalisée sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques qui gouvernent la bioaccessibilité, la biodisponibilité et la biodégradabilité des composés contenus dans les boues.

De manière globale, les composés constitutifs d'une boue d'épuration peuvent être définis de différentes manières :

- Description microbiologique : cellules + substances exo-polymériques (EPS)
- Caractéristiques physico-chimiques
- Caractéristiques de biodégradabilité : DCO biodégradable (paramètres cinétiques et stœchiométries) et DCO réfractaire
- Origine des composés : composés exogènes i.e. véhiculés par l'ERU brute, ou endogènes i.e. produits par le métabolisme des microorganismes actifs au niveau d'une unité de traitement biologique (cellules, résidus de lyse...)

La Figure I.12 permet ainsi d'illustrer la diversité et la complexité des caractéristiques qui peuvent définir un floc biologique.

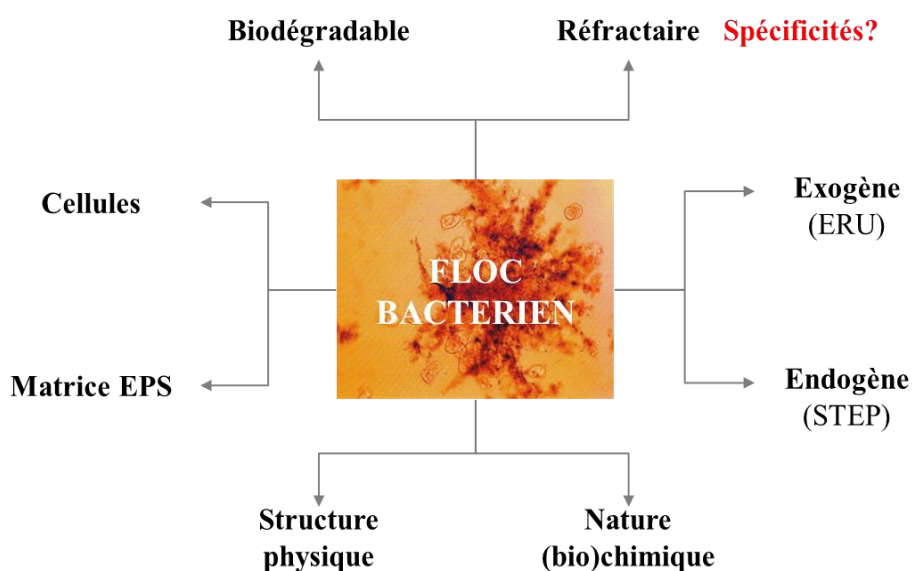


Figure I.12. Approche globale des caractéristiques d'une boue biologique

Ce paragraphe s'attache donc à présenter les données physiques et (bio)chimiques des composés réfractaires contenus dans une boue d'épuration déduites directement ou indirectement de travaux de la littérature. L'état des connaissances ici présenté va d'ailleurs contribuer à définir la démarche analytique à mettre en œuvre afin de mieux caractériser la fraction réfractaire d'une boue.

I.2.2 Caractéristiques physiques des composés organiques réfractaires dans les boues d'épuration

Les mécanismes identifiés dans la littérature comme étant à l'origine de la biofloculation et/ou participant au maintien de la structure d'un floc sont abordés dans un premier temps. Les caractéristiques relatives spécifiquement à la fraction réfractaire d'une boue seront abordées dans un second temps.

1.2.2.1 Biofloculation et mécanismes d'agrégation au sein d'un floc biologique

a. Structure d'un floc biologique

La particularité structurelle d'un floc est qu'il correspond à une entité particulière plus ou moins diffuse avec des contours irréguliers. La Figure I.13 permet d'illustrer la complexité de cette entité réactionnelle.

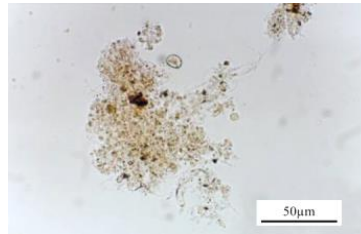


Figure I.13. Floc biologique observé au microscope optique (Guan et al., 1998)

La morphologie du floc, est généralement caractérisée par sa taille, l'abondance et le type de filaments, sa densité, sa forme (Sheng et al., 2006). La taille des floccs bactériens est communément caractérisée par des analyses granulométriques qui renseignent sur la distribution du diamètre moyen des particules assimilées à des sphères. Eriksson et al. (1992), Liss et al. (1996), Swain et al. (2004) soulignent que sa morphologie peut être fortement impactée par les conditions de fonctionnement du procédé biologique notamment l'âge de boues, la charge et la composition de l'alimentation.

Différents modèles de la structure du floc ont alors été proposés dans la littérature (Figure I.14) :

- Jorand et al. (1995) proposent un modèle structural après analyse de l'effet de l'ultrasonication sur des floccs de 600µm. Les auteurs suggèrent que la structure d'un floc s'organise en premier par l'agrégation de particules de 2,5µm en micro-colonies de 13µm. Celles-ci s'assemblent dans un second temps pour former des floccs de 51 à 125µm. Leurs résultats sont d'ailleurs en accord avec le modèle proposé par Eriksson et al. (1992).
- Keiding, et Nielsen (1997) soulignent que la présence de bactéries filamenteuses et de fibres organiques participent à la mise en place de l'agrégat. Ces auteurs avancent alors un possible rôle de squelette rigide assuré par ces composés.
- Sheng et al. (2006) proposent un modèle de structure de floc basé sur une sensibilité différente des composés à une contrainte hydrodynamique prolongée et à une contrainte chimique plus sévère (ajout de NaOH, pour atteindre un pH de 11). Un floc biologique correspond alors à une fraction extérieure diffuse composée d'EPS plus facilement extractibles et à une fraction plus dense, difficilement dispersable, contenant 80% de la masse du floc. Avec le même type de tests, Wilén et al. (2003) suggèrent en plus d'un mécanisme d'érosion, une fragmentation de la structure en grosses particules.

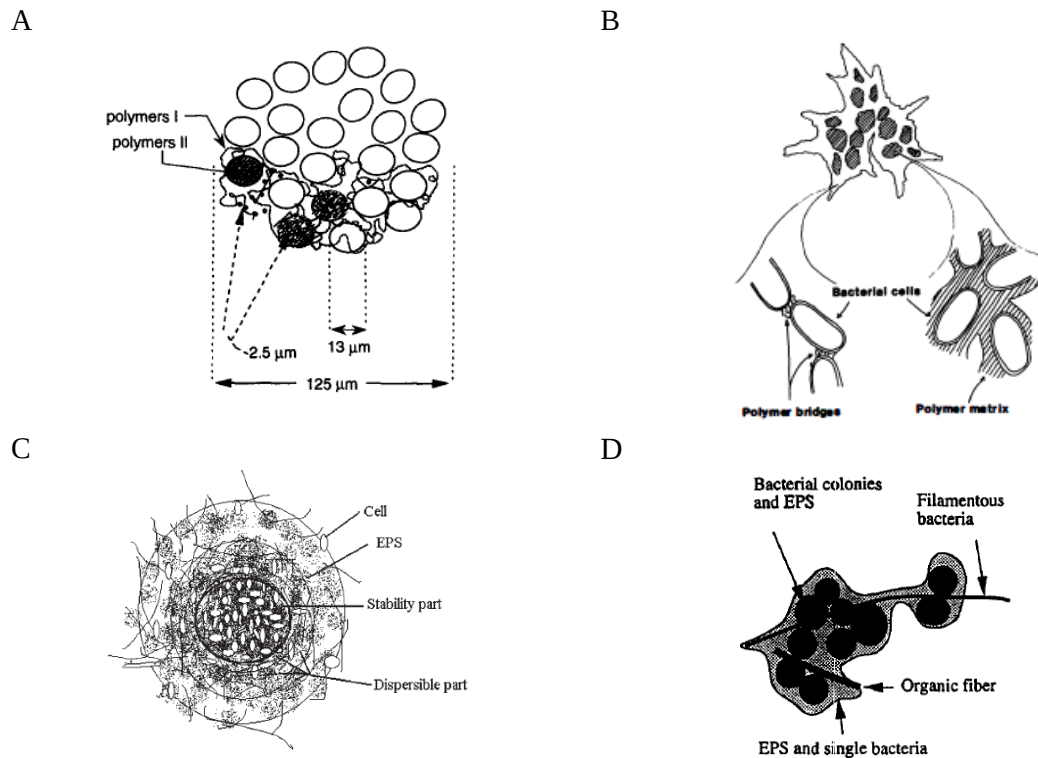


Figure I.14. Représentations schématiques de boues activées : A- Jorand et al., 1995 ; B – Eriksson et al., 1992; C – Sheng et al., 2006; D - Keiding et Nielsen, 1997

Malgré une description relativement différente, tous ces modèles se rejoignent néanmoins sur le fait que la matrice polymérique joue un rôle majeur dans la stabilité de la structure qui immobilise les cellules actives dans l'agrégat. Toutefois, le caractère réfractaire ou biodégradable des EPS n'a jamais été spécifiquement considéré.

b. Mécanismes d'agrégation

L'agrégation des particules ou des cellules n'étant pas un phénomène spontané, d'autres travaux se sont focalisés sur les mécanismes d'agrégation et les molécules impliquées dans le processus de biofloculation. Les résultats mettent en évidence l'implication de la concentration et de la nature des cations (Higgins and Novak, 1997; Nguyen et al., 2007; Park et al., 2006, Sobeck et Higgins, 2002) et le rôle de polymères particuliers sécrétés par les microorganismes immobilisés dans le floc (Wilén et al., 2008, Higgins et al., 1997, Wilén et al., 2003 ; Li et Yang, 2007; Xie et Lu, 2010).

Les principaux mécanismes d'agrégation des composés au sein d'un floc biologique, proposés dans la littérature, sont brièvement rappelés ici :

1. la théorie DLVO (Derjauguin, Landau, Verway, Overbeek) décrit l'énergie d'interaction nette entre les particules comme la résultante de la somme d'un terme répulsif (attraction électrostatique) et d'un terme attractif (force de Van Der Waals). L'augmentation de la concentration en ions au voisinage d'une particule chargée peut diminuer l'épaisseur de sa double couche de contre-ions

(responsable de la répulsion entre particules de même charge). Cette théorie est empruntée à la chimie des colloïdes. Si elle contribue à l'agrégation des composés, Sobeck et Higgins (2002) soulignent toutefois qu'elle ne constitue certainement pas le processus majeur.

2. le pontage cationique est basé sur des interactions ioniques entre des cations divalents et les fonctions chimiques chargées négativement des EPS constitutifs de la matrice qui entoure les bactéries (Figure I.15). Les travaux de Higgins et Novak,(1997), Sobeck et Higgins (2002), viennent supporter cette théorie en mettant par ailleurs en évidence que l'ajout de cations monovalents type Na^+ et K^+ détériore la biofloculation.

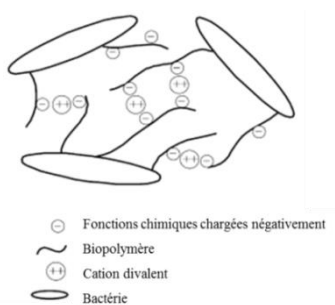


Figure I.15. Représentation schématique de pontage par cations divalents (Nguyen et al., 2007)

3. le rôle du fer dans la stabilité des floccs a été mis en évidence par Nielsen, 1996. Le mécanisme n'est pas clairement établi mais les travaux de Park (2006) soulignent une sélectivité envers certaines protéines solubilisées par l'utilisation d'une méthode d'extraction basé sur la réduction du FeIII en FeII .

4. la sécrétion de composés organiques particuliers d'origine bactérienne :

- a. *Les alginates* : polysaccharides linéaires non ramifiés composés de répétition d'acides uroniques. En présence de Ca^{2+} ou de Cu^{2+} , les groupes carboxylates s'organisent en réseau et forment une structure gélatineuse (Ramdani et al., 2012) (Figure I.16).

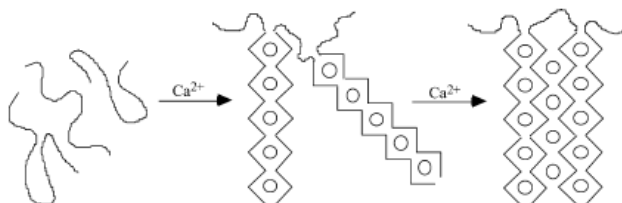


Figure I.16. Représentation schématique de la formation d'un gel d'alginates (Sobeck et al., 2002)

- b. *Les lectines* : protéines non-enzymatiques qui s'associent à des polysaccharides et jouent des rôles clés dans une multitude de processus de reconnaissance moléculaire et de signalisation cellulaire. Higgins et Novak, 1997 et Park et al., 2006 ont montré que les boues activées présentaient une activité lectine.

- c. *La capsule* : couche de polysaccharides plus ou moins compacte, visqueuse, qui entoure la paroi bactérienne. On parle de couche mucoïde si elle est peu organisée et facile à extraire, et de glycocalyx si la couche recouvre les cellules productrices et les cellules voisines. L'élaboration de la capsule dépend des conditions du milieu. Toutes les bactéries n'en produisent pas. Subramanian et al. (2010) ont isolé 25 souches de bactéries présentes dans une eau usée urbaine et ont mis en évidence que 15 avaient la capacité de produire des EPS capsulaires.
- d. *Les fimbriae, ou pili*, : structures protéiques généralement trouvées à la surface de bactéries Gram négatif (Metcalf et Eddy, 2003).

Selon le type de microorganismes présents et la qualité des effluents, ces processus d'agrégation seront probablement plus ou moins impliqués dans la biofloculation et le maintien des interactions entre les différents constituants d'un floc biologique. Mikkelsen et Keiding (2001) soulignent par ailleurs que l'enchevêtrement des EPS peut aussi contribuer à la stabilité de la structure.

Concernant l'origine des composés impliqués dans les mécanismes de structuration d'un floc, les études relatives aux adhésines montrent que des polymères d'origine bactérienne peuvent être impliqués dans le maintien de la structure. Même si Keiding, et Nielsen (1997) soulignent que des composés exogènes d'origine non bactérienne tels que les fibres peuvent jouer un rôle dans la rigidité de la structure, rares sont les études de l'implication spécifique de ce type de molécules dans le maintien de la structure floculée.

1.2.2.2 Stabilité de l'état agrégé de la fraction réfractaire

L'état agrégé des molécules réfractaires d'une boue a été mis en évidence par Sergio (2009). En effet, la déstabilisation des interactions moléculaires induite par la rupture de liaisons faibles (sensibles à une température de 65°C) permet de solubiliser majoritairement la fraction organique biodégradable alors que les composés réfractaires demeurent dans la fraction particulaire. Les auteurs suggèrent que les différents composés organiques réfractaires accumulés dans le floc biologique pourraient jouer le rôle d'un squelette sur lequel les composés biodégradables seraient faiblement liés (facilement mobilisables).

Néanmoins, les résultats de cette étude sont donnés en termes de répartition de la DCO. Ils ne permettent donc pas de définir (1) les caractéristiques structurelles de la fraction non solubilisable à 65°C essentiellement composée de DCO réfractaire et (2) les mécanismes ou les molécules impliquées dans la cohésion de la structure qui demeure agrégée.

Il est intéressant de signaler que les travaux de Jimenez (2013) tendent à confirmer la stabilité de la fraction réfractaire même soumise à une attaque chimique. En effet, en vue de mettre au point un modèle robuste de prédiction de la bioaccessibilité de la matière biodégradable en anaérobie, Jimenez (2013) a utilisé un protocole d'extraction à sévérité graduelle et croissante (dont le degré maximum est l'utilisation de NaOH 0,1M à température ambiante). En fin de procédure d'extraction, la quasi-totalité de la matière biodégradable a été solubilisée alors qu'une fraction significative de matière organique demeure non solubilisée. Ce résultat laisse penser une nouvelle fois que (1) les interactions moléculaires, existant entre les composés réfractaires d'un floc biologique, confèrent une réelle stabilité à leur état agrégé et que (2) les composés biodégradables contenus dans le floc biologique sont plus facilement solubilisables.

I.2.3 Nature chimique des composés organiques réfractaires

Sur le plan chimique et microbiologique, les flocs bactériens sont composés de microorganismes (essentiellement des bactéries), de particules inorganiques (silicates, phosphates de calcium, oxydes de fer), de cation multivalents et de composés organiques réfractaires (Figure I.17). La biomasse cellulaire représente entre 9 et 15 % de la matière organique des boues (Foladori et al., 2010 : 14,5±2,8%, 9-14%, Frolund et al., 1996 : 10-15%).

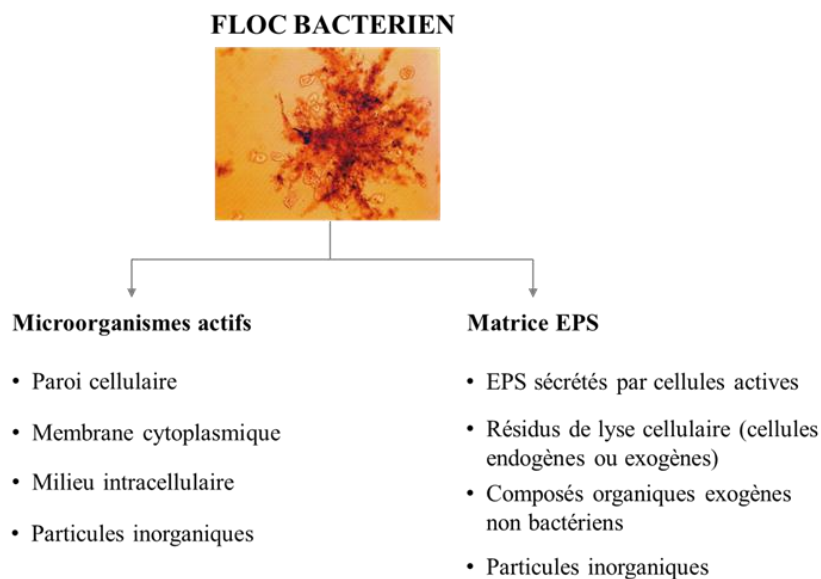


Figure I.17. Approche microbiologique de la composition d'un floc

La caractérisation d'une boue renseigne sur la nature de l'ensemble des composés organiques qui la constitue sans pouvoir faire la distinction entre leur fraction d'origine : cellules actives (X_{OHO}), résidus de lyse cellulaire (X_{U,E_AE}), composés organiques exogènes ($X_{U,inf}$), bactériens ou non. Aucune étude de caractérisation spécifique de résidus réfractaires ultimes de boues d'épuration n'a été trouvée dans la littérature.

Les données qui sont présentées dans cette partie vont donc s'attacher à mieux définir la nature des composés réfractaires exogènes susceptibles de s'accumuler dans les boues d'épuration. Les caractéristiques des composés réfractaires d'origine bactérienne seront présentées par la suite.

1.2.3.1 Composés réfractaires d'origine exogène

a. Composés organiques véhiculés par une ERU

De manière générale, les composés organiques véhiculés dans les eaux usées ont différentes origines possibles :

- Les eaux grises : détergents, graisses, solvants, débris organiques (ex. kératine identifiés par Park et al., 2008)
- Les eaux noires (rejets des toilettes) : papier toilette (fibre cellulosique), selles humaines (150 à 200g par jour par personne, composées de fibres végétales et animales, de bactéries de la flore intestinale, de germes parfois, d'enzymes actives comme la chymotrypsine (protéase digestive), de cellules épithéliales de la paroi intestinale, de pigments biliaires de stercobiline (entre 70 à 300 mg par jour produit par la flore intestinale) et d'urobiline (Miyabara et al., 1994)).
- Le réseau (microorganismes anaérobies, débris lignocellulosiques, hydrocarbures d'eaux de ruissellement...)
- Éventuellement des eaux industrielles (ex. composés phénoliques)

Les eaux usées sont ainsi composées de molécules organiques de poids moléculaires différents et de nature chimique très diverses, allant de composés simples tels que l'acide acétique, à des polymères complexes (Henze et al., 1992). La Figure I.18 illustre l'hétérogénéité des composés organiques présents dans des eaux usées et des eaux de surface (Metcalf et Eddy, 2003, Shon et al., 2006).

La nature des constituants des ERU demeure néanmoins mal connue. Des études de caractérisation (bio)chimique poussées voient le jour comme celle de Huang et al., 2010 sur une ERU en Chine. Néanmoins, cette démarche est expérimentalement très lourde et n'est pas envisageable en routine. Ce type de résultats est par ailleurs probablement spécifique à l'ERU considérée du fait de l'impact évident des caractéristiques du réseau (unitaire ou non, raccordement d'effluents industriels, longueur...), de la localisation géographique, de la saisonnalité, des habitudes sanitaires, alimentaires et environnementales...

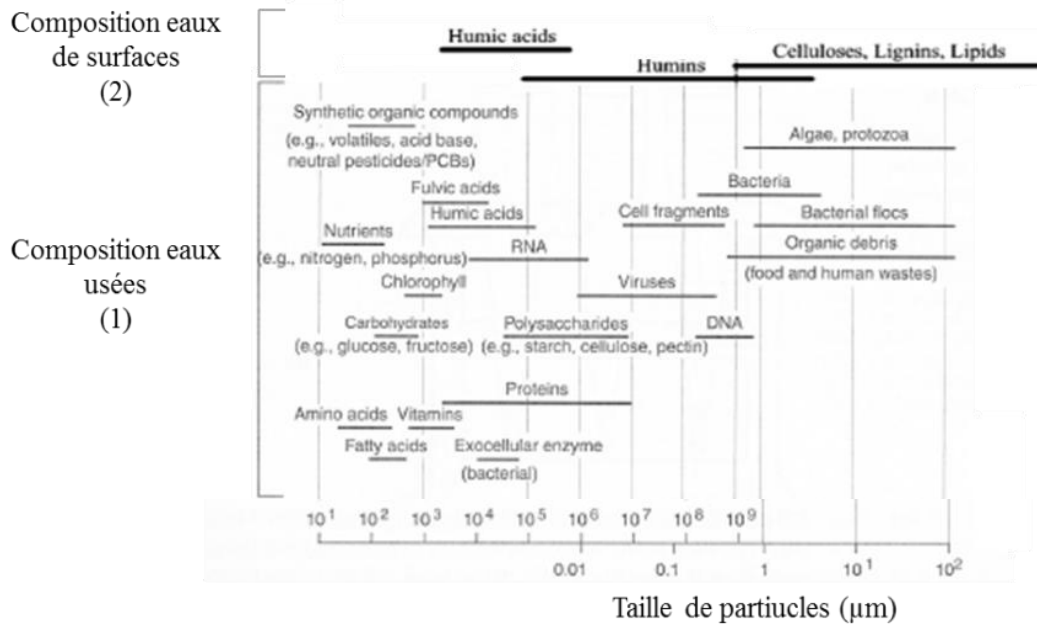


Figure I.18. Nature de composés organiques classiquement contenus dans une ERU en fonction de la taille des particules et techniques de séparation physique ((1) Metcalf et Eddy, 2003 et (2) Shon et al., 2006)

La caractérisation des composés organiques contenus dans les eaux usées est le plus souvent réalisée en familles de molécules : protéines, polysaccharides, lipides, fibres, acides humiques (Metcalf et Eddy, 2003, Dignac et al., 2000, Huang et al., 2010, Sophonsiri et Morgenroth, 2004, Morgenroth et al., 2002). Le principal inconvénient de ce type de données est qu'elles n'illustrent pas la diversité chimique des composés ni leur origine et qu'elles laissent une part significative de composés non identifiés (Dignac et al., 2000).

Les eaux usées urbaines présentent une teneur en biomasse bactérienne de 10 à 20 % de la matière organique totale. Spérandio et al. (2001) ont d'ailleurs estimé la présence d'une fraction active (X_{OHO}) comprise entre 2 et 13% dans des ERUs brutes et entre 12 et 17% dans des effluents primaires (en $\text{gDCO}_{\text{Xoho}} \cdot \text{gDCO}_{\text{tot}}^{-1}$). Ces résultats indiquent que la matière organique réfractaire exogène sera partiellement empreinte de molécules d'origine cellulaire.

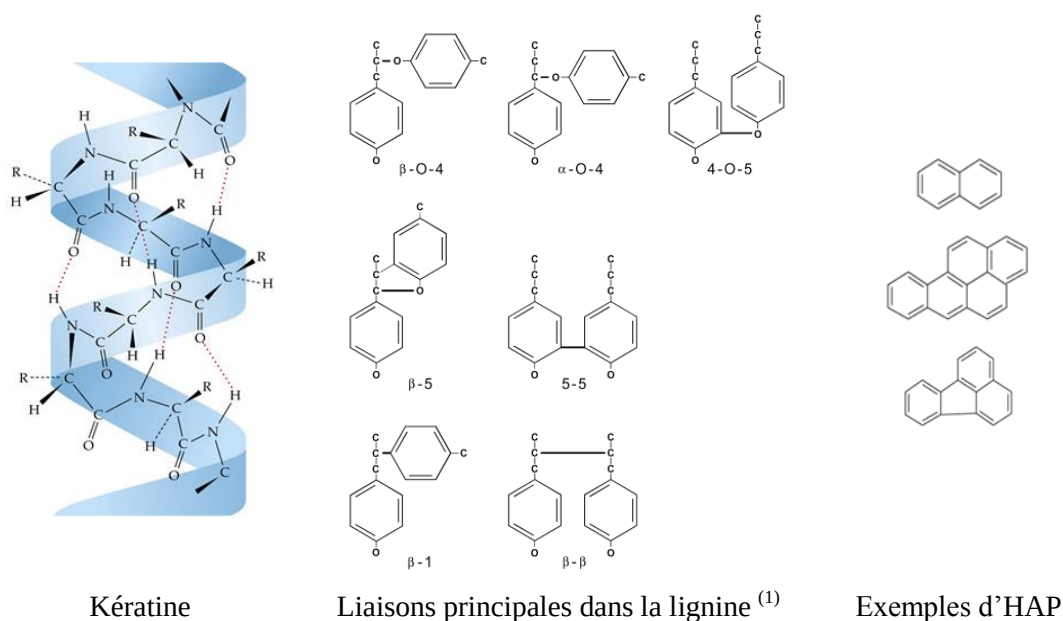
Par ailleurs, la comparaison des teneurs en biomasse active entre des ERUs brutes et décantées obtenues par Spérandio et al. (2001), révèle que la décantation primaire a tendance à concentrer la biomasse cellulaire dans l'effluent primaire. Foladori et al. (2010) confirment ce résultat en mesurant une teneur en biomasse cellulaire de $4,8 \pm 2,4\%$ et $10,7 \pm 3,1\%$ respectivement dans l'ERU brute et de l'effluent primaire d'une STEP. La surface des cellules bactériennes étant chargée négativement, des cellules libres ont tendance à se repousser et sont maintenues en suspension (Li et Yang, 2007). Il est donc possible que l'enrichissement d'une ERU décantée en biomasse cellulaire corresponde essentiellement à des cellules libres. Ces résultats révèlent que si certains auteurs considèrent que quantitativement la décantation n'impacte pas significativement le fractionnement DCO de l'ERU

(Dold et al., 2007), ces résultats soulignent que les composés organiques contenus dans les différentes fractions pourraient être qualitativement différents entre une ERU brute et une ERU décantée.

Parmi les composés réfractaires exogènes, certains sont donc d'origine bactérienne. La nature de ce type de composés est probablement similaire à celle des composés réfractaires bactériens produits au niveau des unités biologiques. Celle-ci sera discutée par la suite avec les données de Ramdani et al. (2011) qui caractérisent spécifiquement ces molécules. Le paragraphe suivant s'attache à indiquer la nature de composés d'origine non bactérienne non biodégradés par le traitement biologique de la filière eau et qui contribuent à la fraction $X_{U,inf}$ d'une boue.

b. Composés exogènes d'origine non bactérienne

Certaines techniques de caractérisation moléculaire appliquées aux boues biologiques ont mis en évidence la présence de composés organiques qui ne sont pas d'origine bactérienne. Des composés d'origine humaine (élastase, kératine, cytokératine) identifiés par Park et al. (2008) grâce à l'analyse en SDS-PAGE d'EPS extraits de boues biologiques, la lignine et des composés polyphénoliques identifiés par Jardé et al. (2003) et Dignac et al. (1998) grâce à la pyrolyse-GC-MS, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Mozo, 2013) peuvent être cités à titre d'exemple. La Figure I.19 permet d'illustrer la complexité chimique de ces composés organiques. Ces composés d'origine non bactérienne sont obligatoirement d'origine exogène (amenés dans le système par l'ERU). Leur présence dans les boues souligne par ailleurs leur faible biodégradabilité. Certains font d'ailleurs l'objet de travaux d'optimisation de leur biodégradabilité (ex. Mozo, 2013 pour les HAP).



(1) Kögel-Knabner, 2002

Figure I.19. Chimie de composés organiques exogènes retrouvés dans les boues biologiques

La biodégradabilité limitée des fibres lignocellulosiques fait aussi l'objet de plusieurs études. Buffière et al. (2006) ont d'ailleurs mis en évidence que la biodégradabilité anaérobie de matrices lignocellulosiques était négativement corrélée à la teneur en cellulose et en lignine. Concernant les boues, même si les fibres lignocellulosiques ne constituent pas des constituants majoritaires du floc, leur contribution à la fraction organique réfractaire est fort probable.

Au final, les méthodes mises en œuvre ne permettent pas de balayer l'ensemble des molécules d'origine non bactérienne. En effet, les méthodes de quantification ou d'identification sont souvent le fruit d'une démarche analytique dédiée et/ou spécifique (ex. extraction couplée à SDS-PAGE- LC-MS/MS pour l'identification de composés protéiques (Park et al., 2008)). D'autres techniques plus exhaustives tel que la pyrolyse-GC-MS permettent de caractériser un large spectre de composés organiques (Dignac et al., 2000, Jardé et, 2003, Parnaudeau et al., 2007). Néanmoins, aucune caractérisation moléculaire de ce genre n'a été trouvée dans la littérature sur un résidu ultime de boue d'épuration (exclusivement composés de composés réfractaires).

1.2.3.2 Composés réfractaires d'origine bactérienne

a. Éléments constitutifs des microorganismes

De manière générale, une cellule est composée de 80% d'eau et de 20% de matière sèche dont 92% de matière organique. La composition typique d'une bactérie est donnée dans le Tableau I.6. Si on considère que les protéines contiennent 16% d'azote, la comparaison des teneurs en protéines et en azote montre que les protéines contribuent à 70% de la teneur en azote dans une cellule. D'autres molécules cellulaires contiennent effectivement de l'azote (acides nucléiques, cofacteurs d'enzymes, lipides membranaires...).

Tableau I.6. Composition chimique et biochimique d'une cellule bactérienne (Metcalf et Eddy, 2003)

Composants majoritaires (exprimés en % du poids sec)		Éléments chimiques du matériel cellulaire (exprimés en% du poids sec)			
Protéines	55	C	50	Na	1
Polysaccharides	5	O	22	Ca	0,5
Lipides	9,1	N	12	Mg	0,5
ADN	3,1	H	9	Cl	0,5
ARN	20,5	P	2	Fe	0,2
Autres (sucres, acides aminés)	6,3	S	1	traces	0,3
Ions inorganiques	1	K	1		

Chaque compartiment cellulaire va contribuer à la composition de la fraction organique libérée lors de la lyse cellulaire. Leurs constituants sont susceptibles d'être immobilisés dans le floc. Les principales spécificités moléculaires du cytoplasme, de la membrane cytoplasmique, de la paroi bactérienne des Gram⁺ et des Gram⁻ (notamment le peptidoglycan) sont alors rappelées en Annexe 6.

La famille des *archae* est un genre particulier auquel appartiennent certains microorganismes actifs en digestion anaérobie (ex. méthanogènes). Ce genre présente des différences de composition chimique qu'il est intéressant de souligner car les résidus de leur lyse contribueront aussi aux composés organiques accumulés dans le résidu réfractaire anaérobie.

La distinction entre les bactéries et les *archae* est essentiellement basée sur l'ARN ribosomal et la nature chimique des lipides membranaires : diacyl D-glycerol diester chez les bactéries contre des diéthers ou tétraéthers L-glycérol isoprenoïde chez les *archae*. La Figure I.20 permet de comparer ces types de lipides et de remarquer que certaines archéobactéries ne présentent pas de double couche de lipides (b. Figure I.20) telle que *Thermoplasma acidophilum*, une archée thermoacidophile, dont le glycophospholipide est constitué d'un noyau hydrophobe de caldarchaeol (C40C40).

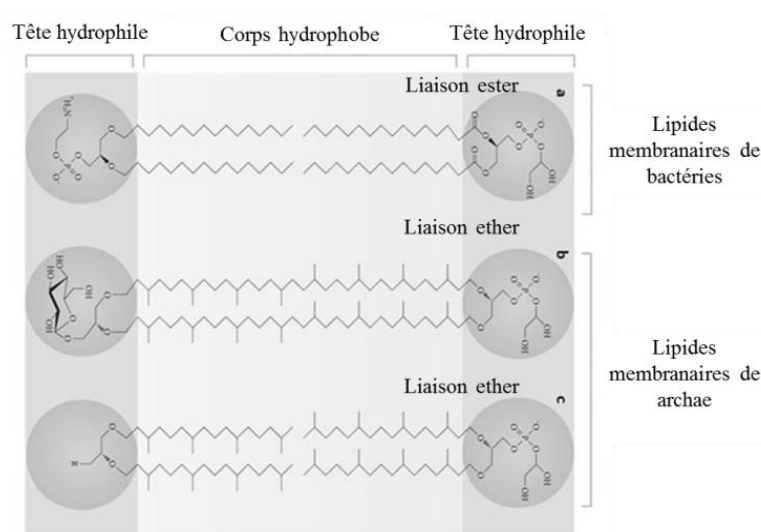


Figure I.20. Comparaison de la nature des lipides membranaires de bactéries et d'archae (Albers et al., 2011)

De plus, aucune archée ne dispose d'un peptidoglycan, (polymère présent chez les gram-positif et les gram-négatif, composé de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) reliées par liaison $\beta(1-4)$ et de différents acides aminés substitués à l'unité NAM qui ne sont pas trouvés dans les protéines). En remplacement du peptidoglycan, des polymères de natures chimiques diverses permettent de rigidifier la paroi cellulaire des *archae* gram-positif. La majorité des *archae* gram-négatif possède une enveloppe protéique ou glycoprotéiques appelés S-layers, ou un renforcement de la membrane cytoplasmique par un élément fibrillaire normalement présent chez tous les eucaryotes (glycolyx). La Figure I.21 permet d'illustrer la diversité de composition de la paroi des cellules *archae*.

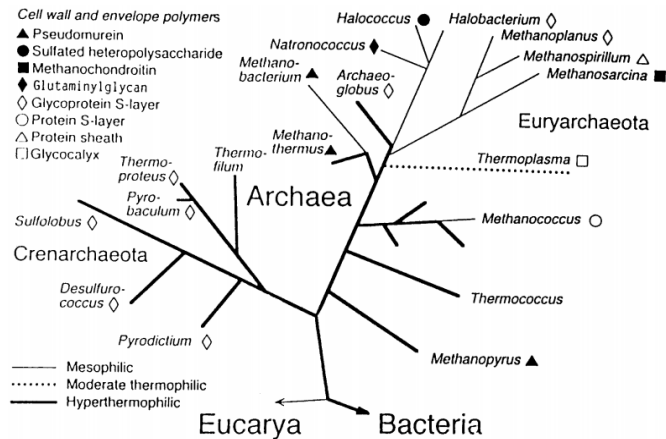


Figure I.21. Eléments de composition de la paroi des archae (Kandlera et al.,1998)

L'ensemble de ces données permet de souligner l'hétérogénéité des composés organiques liés à la fraction « active » d'un floc qui s'ajoute à la diversité des communautés bactériennes et à la dynamique de leur environnement qui conditionnent leur état métabolique en permanence. De plus, ces données mettent en évidence au sein des familles biochimiques majoritaires (protéines, sucres et lipides) une large diversité moléculaire. Par ailleurs, la diversité des éléments externes sécrétés par certains microorganismes actifs tels que les fimbriae (protéiques), la capsule (polysaccharidiques), les alginates (polysaccharidiques), les lectines (glycoprotéiques), cités précédemment pour leurs propriétés adhésives, révèle une variabilité qualitative et quantitative des EPS bactériens qui composent la matrice globale d'EPS du floc.

b. Le compartiment « EPS »

Les EPS, toutes origines confondues, représentent entre 85 et 90 % de la matière organique d'un floc (complémentaire de la biomasse cellulaire). La caractérisation des composés constitutifs de la matrice EPS est directement liée à l'efficacité et à la sélectivité des différentes méthodes utilisées ainsi qu'à l'origine des boues caractérisées (alimentation, conditions opératoires, type de biodégradation). Or les procédures et les mécanismes d'extraction utilisés dans la littérature sont très nombreux (Sheng et al., 2010). Toutefois, aucun protocole n'a été trouvé permettant de séparer exactement les cellules de la matrice d'EPS afin de pouvoir déterminer leurs compositions respectives. L'efficacité du protocole d'extraction multi-méthodes de Ras et al. (2008) doit tout de même être soulignée (trois répétitions d'une séquence de ultrasons (3x2min) / Tween (0,25%-1h) / EDTA (2%-1h)). Les auteurs obtiennent en effet des rendements de solubilisation de 53 et 57 gMVS.gMVS⁻¹, respectivement pour des boues de 8 jours alimentées par une eau synthétique et une ERU, avec des teneurs respectives en protéines de 50 et 65 % en g(protéines).g(MVS_{extraits})⁻¹ (il est à noter que l'absence de lyse cellulaire a été contrôlée par les auteurs).

La teneur et la composition des EPS extraits varient beaucoup dans la littérature (Wingender et al., 1999). Les principales raisons de cette hétérogénéité sont : la composition des eaux usées, l'état métabolique des cellules, les paramètres opératoires du procédé, le type de réacteur, les méthodes d'extraction, les techniques de caractérisation (Nielsen et al., 1999, Comte et al., 2007, Sponza, 2002, Jimenez et al., 2013). Néanmoins, les polysaccharides et les protéines sont généralement identifiés comme les composés organiques majoritaires (Jorand et al., 1995, Wilèn et al., 2003, Sheng et al., 2010). Ce résultat est assez cohérent compte tenu de la nature biochimique des éléments de la paroi d'une cellule, du pool enzymatique exo et extracellulaire sécrété par une cellule active et de la composition d'une ERU, qui constituent les principales sources de polymères accumulés dans le compartiment « EPS ». Les substances humiques, qui constituent les composés organiques réfractaires naturellement les plus abondants dans un environnement terrestre et aquatique (Filip et al., 2007), sont aussi identifiées comme une famille de molécules importante des EPS de boues activées, comprise entre 15 et 30 % (Frolund et al., 1996, Bhatia et al., 2013). En utilisant la microscopie infrarouge sur des EPS extraits de boues et fractionnés par chromatographie exclusion de taille, Garnier et al., 2005 ajoutent la présence d'acides organiques et de lipides aux types de molécules participant à la matrice EPS d'une boue activée.

L'efficacité relative des méthodes développées pose néanmoins la question de la représentativité de toutes ces données par rapport à la matrice globale d'EPS. De plus, les analyses biochimiques, qui sont les plus répandues pour caractériser la composition des EPS ne permettent pas de différencier ni leur spécificité chimique, ni leur origine bactérienne ou non, ni leur caractère réfractaire ou biodégradable.

c. Mécanismes de défense

En conditions défavorables à la survie, les bactéries sont capables de mettre en place des processus de défense (ex. protéines chaperonnes en conditions de stress thermique, modification des protéines en conditions thermophiles, Kumar et al., 2001). La sporulation correspond à l'ultime recours de bactéries sporulantes qui existent chez quatre genres bactériens : *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina* et *Sporolactobacillus* (Baril et al., 2011). La spore ou l'endospore est un organe facultatif qui se forme au sein du cytoplasme de la cellule végétative et diffère par sa forme, sa structure, son équipement enzymatique et par une extraordinaire résistance qui lui permet de survivre dans des conditions très défavorables, pendant plusieurs centaines d'années. Cet organe d'origine bactérienne est donc susceptible de contribuer aux composés organiques constitutifs de la fraction organique réfractaire accumulée au niveau d'un procédé de traitement biologique ou lors d'une dégradation prolongée de la matière organique plaçant les microorganismes en situation de carence nutritive. La spore présente différents compartiments (Figure I.22) : le corps sporal qui contient le matériel nucléaire nécessaire pour la synthèse, la membrane interne qui correspond à la membrane cellulaire de

la future cellule végétative, la paroi sporale qui contient du peptidoglycan normal destiné à la paroi de la future cellule végétative, le cortex qui contient un peptidoglycan inhabituel moins sensible au lysozyme et une forte proportion de dipicolinate de calcium (Figure I.23), les tuniques composées de protéines, de type kératine, riche en liaisons disulfures qui confèrent à la spore son imperméabilité et sa résistance aux agents chimiques, et l'exosporium qui correspond à une membrane lipoprotéinique.

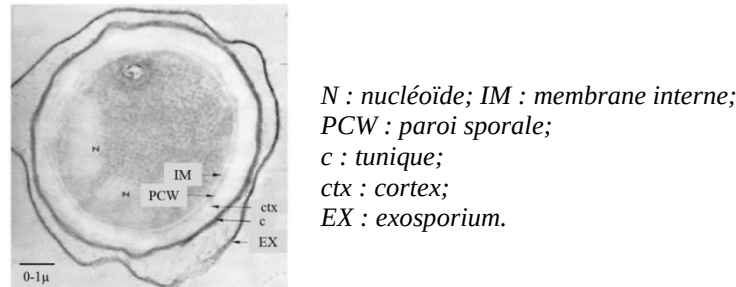


Figure I.22. Photographie en microscopie électronique d'une spore de *Bacillus cereus* (Gaillard, 2003)

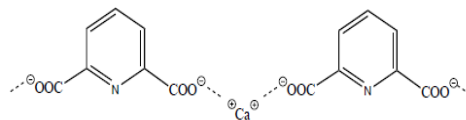


Figure I.23. Formule chimique du dipicolinate de calcium

Il est intéressant de noter que si une spore peut contribuer à la fraction organique réfractaire, elle indique aussi que la fraction organique réfractaire pourrait retrouver une activité métabolique en cas de retour à des conditions favorables (germination, croissance).

d. Caractérisation spécifique de la fraction organique réfractaire associée à la biomasse cellulaire

Seuls les travaux de Ramdani et al. (2011) ont été trouvés dans la littérature pour définir spécifiquement la chimie des composés organiques réfractaires d'origine bactérienne. Les auteurs cherchent à caractériser spécifiquement la fraction $X_{U,E_{AE}}$ après avoir produit le résidu réfractaire aérobie par digestion de 21 jours d'une boue de 5,2 et 10,4 jours exclusivement composée de cellules (X_{OHO}) et de résidus cellulaires ($X_{U,E_{AE}}$). Les auteurs ont alors déterminé les compositions élémentaires de la fraction active et de la fraction organique réfractaire, X_{OHO} et $X_{U,E_{AE}}$, et leur teneur en EPS protéiques et polysaccharidiques. En rapportant leurs analyses des résidus aérobies au fractionnement quantitatif de la boue avant digestion, Ramdani et al. (2011) ont proposé les compositions élémentaires suivantes : $C_5H_{6,442}O_{2,459}N_{0,342}P_{0,016}S_{0,008}$ pour $X_{U,E_{AE}}$ (masse molaire de 111g/mol) et, $C_5H_{6,201}O_{1,874}N_{1,002}P_{0,086}S_{0,035}$ pour X_{OHO} (masse molaire de 114g/mol). Ce résultat très utile pour les bilans matières et la modélisation d'unités successives de traitement biologique (ex. digestion anaérobie alimentée par boue biologique de la filière eau), il ne permet pas de préciser la nature des molécules qui composent la fraction réfractaire endogène. Concernant la teneur en EPS, les

auteurs ont appliqués différents types d'extractions sur la boue âgée de 10,4 jours et sa matrice réfractaire aérobie : 1. Ultrasons à 37W pendant 2 minutes, 5 fois à 5 minutes d'intervalles; 2. Température à 80 °C pendant 2min ; Formaldéhyde 37% (CH₂O) + soude (NaOH) ; Triton X-100 (0,5%). Malheureusement, les rendements d'extraction de 11 à 17% pour X_{U,E_AE} ne permettent pas non plus de préciser de manière représentative la nature des molécules constitutives d'une matrice organique réfractaire d'origine bactérienne. Par ailleurs, ces résultats soulignent une nouvelle fois la stabilité des mécanismes d'agrégation entre des composés réfractaires même exclusivement d'origine bactérienne.

1.2.3.3 La question des composés protéiques

Le potentiel enzymatique actif pour la biodégradation des substrats organiques présents correspond à l'ensemble des enzymes produites par les microorganismes actifs. Ce sont par définition des composés organiques protéiques. La diversité des activités enzymatiques identifiées dans un floc biologique est gouvernée par de nombreux paramètres : la phase de croissance (Wang et al., 2005), taille des substrats (Cadoret et al., 2002), la quantité de biomasse (Goel et al., 1998), la charge et la composition de l'alimentation (Li et al., 2006, Wilén et al., 2003, Yan et al. 2008)... De plus, la mobilité des enzymes est gouvernée par leur caractère exocellulaire ou extracellulaire. Une enzyme exocellulaire est ancrée dans la paroi cellulaire. Son activité enzymatique est donc soit dépendante de la mobilité du substrat soit de la mobilité de la cellule. Une enzyme extracellulaire est sécrétée. Sa mobilité est donc soumise à des mécanismes de transport gouvernés par les propriétés physico-chimiques du floc à l'échelle locale. De nombreux travaux cherchent à identifier la localisation de diverses activités enzymatiques notamment hydrolytiques pour améliorer et/ou comprendre la limitation de la biodégradation (Frolund et al., 1995, Goel et al., 1997, Burgess et al., 2008). La majorité des données indique que les enzymes hydrolytiques sont localisées dans la fraction particulaire d'une boue et donc immobilisées dans le floc bactérien (Goel et al., 1998, Yu et al, 2007, Yu et al, 2008, Wang et al., 2005).

Lors de la quantification de la fraction protéique présente dans une boue biologique, la nature par définition protéique d'une enzyme pose alors la question de la différenciation entre des composés protéiques « actifs », qui correspondent au pool enzymatique, et « inactifs », qui constituent de potentiels substrats hydrolysables dont la bioaccessibilité est limitée.

I.3 CONCLUSION GÉNÉRALE

Mieux comprendre pour mieux appréhender la gestion et la valorisation de la matière organique réfractaire contenue dans les boues d'épuration, tel est l'objectif de ce travail de thèse.

Cette thématique est effectivement abordée dans la littérature mais essentiellement sous l'angle quantitatif d'une part, car la matière organique réfractaire contribue significativement à la production

de boue au niveau de la filière eau, et d'autre part, car elle contribue à la limitation des performances de production de biogaz au niveau de la digestion anaérobie. Nombreux travaux se concentrent sur l'estimation quantitative des fractions réfractaires dites exogène, car contenue dans les eaux usées, et endogène, car issue du métabolisme microbien mis en jeu dans les procédés biologiques. Les approches reposent sur des outils de modélisation pour identifier chaque compartiment. Le fractionnement biologique est donc conditionné par la structure même des modèles utilisés. Ces derniers ont l'intérêt de représenter de manière satisfaisante le fractionnement d'une boue, en particulier ses fractions réfractaires et, plus important, leurs dépendances à la filière (décantation primaire, âge de boue du procédé biologique). En effet, les proportions de matière organique réfractaire dans les boues varient en pratique énormément (25 à 65 %).

Concernant la digestion anaérobie des boues, l'essentiel des travaux de recherche visent à améliorer la biodégradabilité des boues et donc à réduire la fraction organique qui résiste à une transformation en méthane. Cette fraction réfractaire est la plupart du temps considérée dans sa globalité, rarement en lien avec la filière et avec les contributions quantitatives des composés issus de l'eau usée et du métabolisme bactérien aérobie. Les verrous à la biodégradabilité sont abordés à travers la caractérisation de type boîte noire des traitements physico-chimiques souvent drastiques (température, sonication, ozonation...). Celles-ci se limitent aux processus de solubilisation associés et aux processus de transformation en méthane.

Dans tous les cas d'étude, la matière organique réfractaire n'est jamais étudiée isolément. Elle est toujours intimement agrégée à la matière organique biodégradable présente au sein du floc biologique. Cet état de la matière rend difficile l'analyse des mécanismes de résistance à la biodégradation propres aux molécules constituant cette fraction réfractaire. De manière globale, ces molécules réfractaires, quelle que soit leur origine, sont imbriquées et impliquées dans une structure dite floculée. Aucune information n'est disponible sur le mécanisme précis de biofloculation. La seule certitude est la synthèse, par les bactéries floculantes, de substances polymériques exocellulaires (EPS), de nature protéique ou polysaccharidique, qui forment une matrice assimilée à un gel. Il est aussi probable que les molécules exogènes réfractaires ou biodégradables soient incorporées dans cette matrice lors de sa formation par le jeu d'interactions physico-chimiques multiples. Le floc ainsi formé a fait l'objet de multiples modèles structuraux et certains assimilent cet agencement de molécules réfractaires (EPS, fibres ou amas filamenteux) à un squelette rigide conférant à l'agrégat biologique sa stabilité structurelle. Ces molécules ont donc la particularité d'être fortement associées les unes aux autres. Cet état peut limiter leur bioaccessibilité et donc ralentir, voir bloquer, leur biodégradation. Ainsi, des scientifiques ont récemment mis en évidence que certaines molécules composant la fraction endogène dite réfractaire (au sens de la modélisation) présentaient une biodégradabilité long terme en aérobie et en anaérobie.

D'un point de vue chimique, il y a aussi peu d'études dédiées à la caractérisation de la matière organique réfractaire. D'une manière simplifiée, un floc est réduit à deux compartiments : les EPS et les cellules bactériennes. Les EPS rassemblent 85 à 90 % de la matière organique. Ce seraient préférentiellement des protéines, des polysaccharides et des molécules assimilables à des substances humiques. Une fraction de ces molécules serait résistante à toute dégradation. A ces molécules, s'ajouteraient celles contenues dans l'eau usée. Peu de données sont disponibles à leur sujet. Les travaux se concentrent sur des molécules particulières. D'ailleurs, la diversité des molécules et la difficulté analytique à les différencier au sein de la matrice réfractaire globale ont probablement constitué un frein à cette approche frontale. On peut tout de même citer des molécules telles que la lignine, la cellulose cristalline, la kératine... connues pour être chimiquement résistantes à toute attaque enzymatique, préalable nécessaire à leur assimilation microbienne. L'autre compartiment est celui des cellules bactériennes, elles-mêmes immobilisées dans cette matrice exopolymérique. Les molécules constitutives des membranes cellulaires sont connues pour leur résistance. Là encore, la diversité de la communauté bactérienne engendre une diversité biochimique de ces molécules dont l'analyse reste délicate.

Au final, l'analyse bibliographique souligne à la fois le peu de données disponibles sur les propriétés physico-chimiques des molécules constituant le compartiment réfractaire d'une boue et également les difficultés expérimentales et analytiques pour les obtenir. Les composés réfractaires se présentent sous la forme d'une structure agrégée qui nécessite des approches destructives ou intrusives complexes avec des réponses délicates à interpréter (ex : pyrolyse-GC-MS). Les techniques fournissent la plupart du temps des empreintes partielles de la matière (ex. dosages colorimétriques, dosage de l'azote, spectrométrie de masse après extraction et chromatographie séparative...) ou ne permettent pas de rendre compte de la diversité moléculaire (ex. composition élémentaire, dosages biochimiques).

I.4 APPROCHE GLOBALE DU TRAVAIL DE RECHERCHE

La Figure I.24 résume la démarche scientifique adoptée pour évaluer les mécanismes à l'origine de la récalcitrance d'une fraction significative de la matière organique. À la lueur de la synthèse bibliographique, deux verrous sont désignés : la structure agrégée des molécules réfractaires (bioaccessibilité) et la chimie de ces mêmes molécules (biodégradabilité). Cette analyse doit néanmoins se faire en prenant en compte l'effet filière sur la construction de ces flocs et leurs propriétés physiques, chimiques et biologiques. Cette approche repose sur deux volets :

- Produire et isoler des matières organiques réfractaires contrastées (proportion relative en composés endogènes et exogènes) sans en modifier drastiquement les caractéristiques (en fonction des propriétés recherchées : structure/chimie).

- Définir, mettre au point et valider des démarches analytiques permettant (i) d'accéder à une information globale de la nature chimique ou structurale de la matière, (ii) de refléter sa diversité et (iii) de comparer et différencier des matières organiques d'origine contrastée

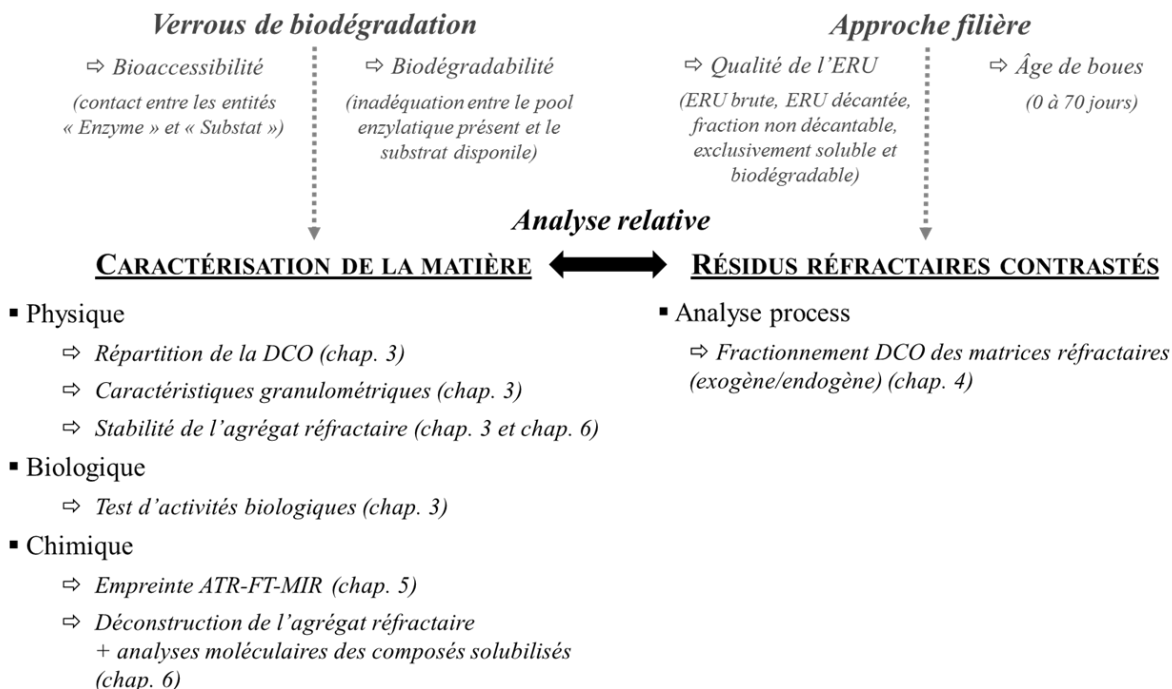


Figure I.24. Démarche globale du travail de recherche

Cette démarche globale s'organise autour de quatre chapitres

Dans un premier temps (chapitre 3), le travail s'est concentré sur la question liant la matière organique réfractaire et la filière eau. Pour cela, des boues primaires et biologiques issues de stations réelles et de pilotes aux conditions de fonctionnement parfaitement contrôlées ont été utilisées (Figure I.25). Les boues biologiques ont été produites sur des eaux usées contrastées (ERU brute, ERU décantée, fraction décantable d'une ERU, mélange de sources carbonées solubles et biodégradables exempt de composés réfractaires exogènes) et pour une gamme d'âge de boue très large (2-70 jours), le tout pour exacerber la contribution quantitative des composés organiques réfractaires exogènes et endogènes. La matière réfractaire a été isolée pour chacune de ces boues et caractérisée en termes de proportion dans la boue initiale, de structure et de biochimie globale. Au final, ces différentes conditions de production ont permis de disposer d'un jeu de résidus réfractaires de boues d'épuration qui seront utilisés tout au long de ce travail.

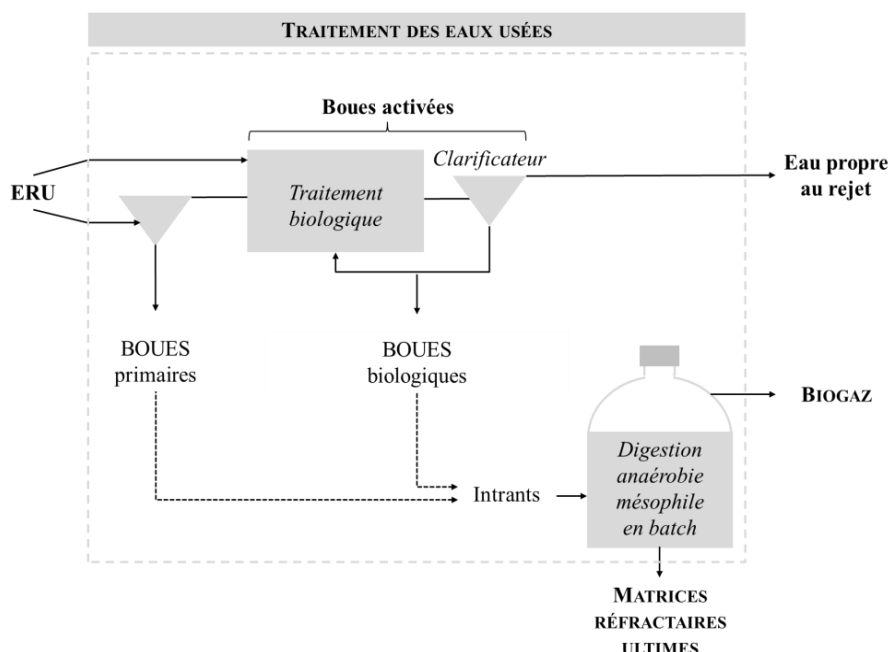


Figure I.25. Approche filière de la caractérisation d'un résidu réfractaire de boue d'épuration

Dans un deuxième temps (chapitre 4), la répartition entre molécules réfractaires endogènes et exogènes dans ces matrices a été déterminée en utilisant un outil de simulation (Biowin) intégrant les processus biologiques aérobie et anaérobie impliqués dans la chaîne de fabrication de ces matières réfractaires. Cette information a été utilisée pour interpréter les éventuelles différences de caractéristiques chimiques ou physiques de la matière réfractaire globale.

Enfin, le verrou associé à la chimie des molécules réfractaires a été abordé dans les chapitres 5 et 6. Deux approches complémentaires de caractérisation ont alors été développées : (i) l'utilisation de la spectrométrie d'absorption en moyen infrarouge par réflexion totale atténuée (ATR-FT-MIR) afin d'obtenir l'empreinte chimique globale de la matière, (ii) l'utilisation d'une approche plus invasive de déconstruction de la fraction particulaire réfractaire couplée à des analyses moléculaires des composés solubilisés (fluorescence 2D et 3D, UV 210 et 280 nm, dosages biochimiques).

De manière globale, la caractérisation de la fraction réfractaire d'une boue d'épuration a été basée sur l'analyse relative de données qualitatives (physique, biologique et chimiques) obtenues sur des résidus réfractaires de boues produites dans des conditions contrastées. Les caractéristiques de la matière ont alors systématiquement été interprétées en lien avec l'origine des résidus réfractaires de manière à mieux définir l'impact de choix opératoires pris au niveau de la filière eau (ex. décantation primaire en amont du traitement biologique, durée de l'âge de boue).

II.

Matériels et Méthodes

L'ensemble du travail expérimental qui a permis d'établir les résultats présentés dans ce travail de thèse est basé sur la caractérisation de matrices prélevées en STEP ou produites au laboratoire, et dont la fraction réfractaire a été isolée et caractérisée. Les conditions de production de ces matrices ainsi que la procédure de récupération de leurs résidus réfractaires sont décrites dans la partie (1). Les procédures expérimentales et les démarches calculatoires de la teneur en DCO réfractaire anaérobie et aérobie d'une boue sont ensuite détaillées dans la partie (2). L'ensemble des techniques analytiques physiques, chimiques et biochimiques de caractérisation de la matière est présenté dans la partie (3). Enfin, ce chapitre s'achève par la description de la démarche globale de déconstruction de la matière réfractaire agrégée dont les conditions thermo-chimiques appliquées et les résultats sont présentés dans le chapitre 6.

II.1 MATRICES D'ETUDE

II.1.1 Matrices avant digestion anaérobie long terme

II.1.1.1 Boues d'épuration prélevées en STEP

Les procédures de prélèvements et de stockage ainsi que les principales caractéristiques des boues prélevées en STEP sont synthétisées dans le Tableau II.1.

La boue primaire PS-A a été prélevée au cours d'un même cycle de fonctionnement de la pompe de circulation de la boue épaissie dans la canalisation où elle a été prélevée. Un volume conséquent de boue PS-A a été prélevé car elle constitue la source de DCO particulaire, notamment réfractaire, des procédés à boues activées suivi au laboratoire et dont le fonctionnement est décrit par la suite. De manière à disposer d'une alimentation relativement constante sur les 6 mois de fonctionnement, la totalité du volume a été prélevé dans des bidons de capacité 2,5L qui ont été directement stockés au congélateur à -20°C après prélèvement sur la STEP A. La boue PS-A et PS-A* correspondent donc au même point de prélèvement sur la STEP A mais à des conditions de stockage différentes.

Tableau II.1. Caractéristiques des boues prélevées en STEP

Type de boue	STEP	Nom	Prélèvement		Conservation		Paramètres opératoires		
			Mode de prélèvement	Volumes prélevés	Type de conservation	Durée de conservation	Effluent à traiter	Procédé	Âge de boues
Boue primaire	A	PS-A	Prélèvement au niveau d'un robinet placé sur circuit de purge de l'épaississeur 1.	10 L	Chambre froide (4°C)	< 24h	ERU brute	/	/
		PS-A*	Prélèvement quand circuit en charge (cycle de 30').	140 L aliquotés en volume de 2,2 à 2,4L au moment du prélèvement	Congélateur (-20°C)	< 6h avant congélation		/	/
Boue biologique	A	AS-A	Prélèvement au niveau d'un robinet de purge de l'aéroflottateur permettant d'épaissir les boues biologiques.	10 L	Chambre froide (4°C)	< 24h	ERU décantée	BA	2-3 jours
	H	AS-H	Prélèvement manuel directement dans le bassin biologique.	10 L	Chambre froide (4°C)	< 24h	ERU brute	BRM	70-130 jours

ERU : eaux résiduaires urbaines

BA : boues activées

BRM : bioréacteur à membranes

II.1.1.2 Production de boues activées à l'échelle laboratoire

Des procédés à boues activées ont été mis en place et suivis à l'échelle laboratoire pour produire des boues biologiques en apport contrôlé en composés organiques réfractaires exogènes (présent dans l'alimentation à traiter). Deux alimentations contrastées ont été traitées par deux unités de traitement biologiques aérobies fonctionnant en parallèle :

1. **L'alimentation de la ligne 1 est notée $X_{U,inf}^-$** car elle est exempte de composés réfractaires. En effet, elle est exclusivement composée d'un mélange de matière organique carbonée soluble et biodégradable (acétate de sodium/citrate de sodium/éthanol en proportion 2/1/1 en DCO), complété en éléments nutritionnels nécessaires à la croissance bactérienne. La fraction réfractaire de la boue biologique OHO ainsi produite sera uniquement composée de molécules produites par la lyse bactérienne et donc issues du métabolisme.

La Figure II.1 représente les flux cumulés de DCO totale entrant et de DCO solubles sortant du procédé à boues activées produisant la matrice OHO. Les deux périodes présentées correspondent à des périodes où la matrice OHO a été prélevée pour être caractérisée et pour en récupérer ses composés réfractaires par digestion long terme (selon les conditions décrites dans le paragraphe II.1.2).

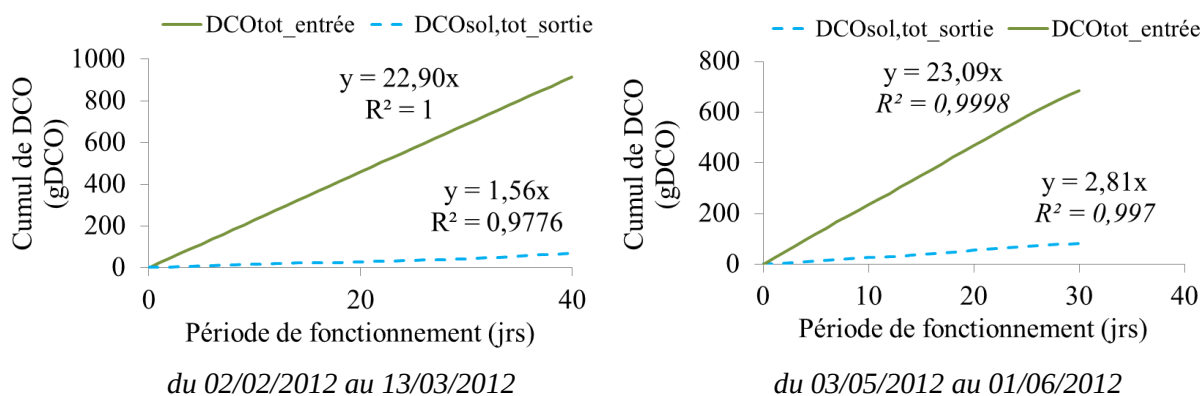


Figure II.1. Flux cumulés de DCO totale entrant et de DCO soluble sortant, sur deux périodes de fonctionnement des boues activées productrices de la matrice biologique OHO

2. **L'alimentation de la ligne 2 est notée $X_{U,inf}^+$** car elle contient des composés particuliers réfractaires. Deux boues biologiques ont été produites par cette ligne du pilote : AS-B et AS-E (ligne 2 sur la Figure II.3). Ces deux matrices ont été produites avec une alimentation dont la source de DCO réfractaire correspond à celle de la boue primaire PS-A* décrite dans le Tableau II.1. Ses conditions de prélèvement et d'échantillonnage ont d'ailleurs eu pour objectif de limiter la variabilité qualitative des composés réfractaires particuliers qui vont ensuite s'accumuler dans les boues biologiques produites. Il est à noter que l'alimentation de

la boue AS-B a été complétée par un flux de DCO soluble biodégradable correspondant à 8% de la DCO totale entrante sur le procédé B (Figure II.2). La composition de ce complément est identique à l'alimentation de la ligne 1. Par ailleurs, les boues AS-B et AS-E diffèrent en termes d'âge de boue, respectivement de 2 et 5 jours.

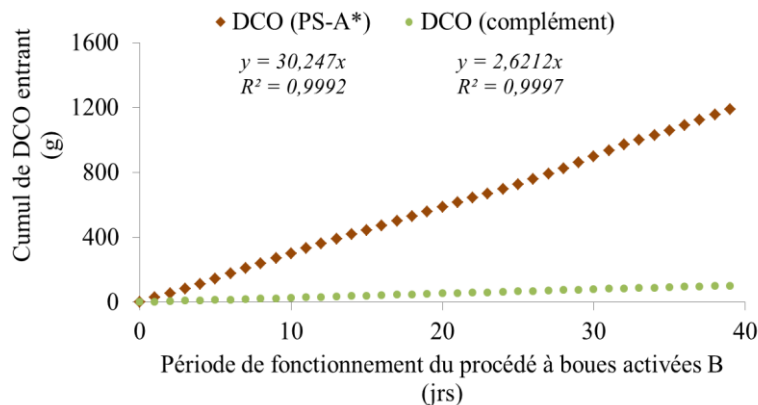


Figure II.2. Flux de DCO entrant sur le procédé à boues activées B

Les schémas de la Figure II.3 permettent d'illustrer globalement le fonctionnement des deux lignes de traitement biologique suivies au laboratoire et les matrices biologiques produites correspondantes.

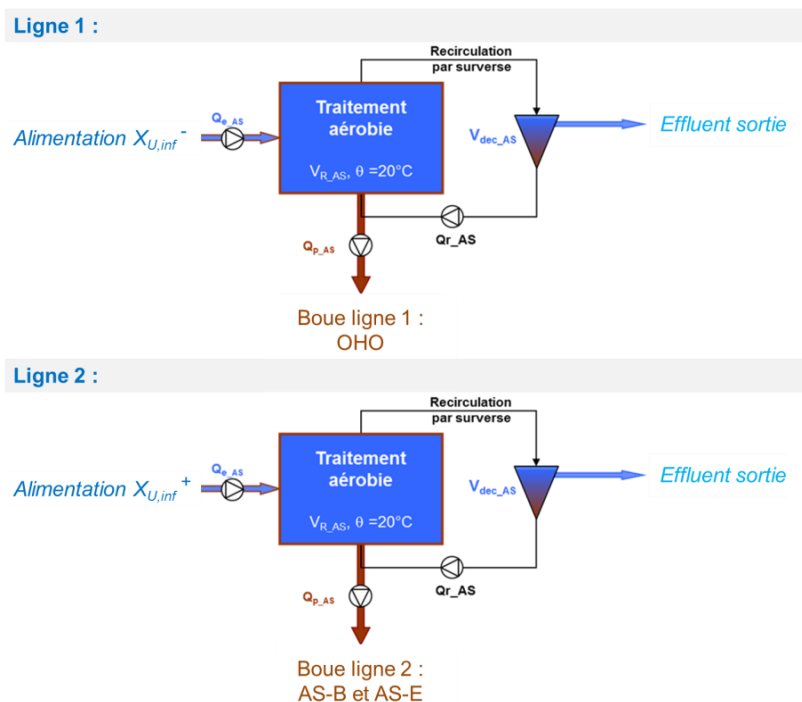


Figure II.3. Schéma des boues activées productrices des matrices biologiques OHO, AS-B et AS-E

L'ensemble des conditions de fonctionnement correspondant aux périodes de prélèvements des différentes matrices biologiques est récapitulé dans le Tableau II.2.

Tableau II.2. Conditions générales de fonctionnement des pilotes à boues activées

Conditions	Nom	Unités	Procédé 1	Procédé B	Procédé E
Alimentation			Acétate de sodium / Ethanol / Citrate de sodium (2/1/1)	PS-A* / DCO _{SB} ⁽¹⁾ (92/8)	PS-A* (100)
Volume de réacteur	V _{R, AS}	L	10		
Volume du décanteur	V _{dec, AS}	L	2,95	2,45	3,75
Débit d'alimentation	Q _{e, AS}	L.jrs ⁻¹	40	40	38
Débit de recirculation	Q _{r, AS}	L.jrs ⁻¹	40	40	40
Débit de purge	Q _{p, AS}	L.jrs ⁻¹	1	1	0,6
Charge volumique	C _V	gDCO. L ⁻¹ .jrs ⁻¹	0,4	2,6	2,8
DCO _X		gDCO _X .L ⁻¹	1,4	4,5	8,5
Température	T	°C	20		
Oxygène dissous	O _{2d}	mgO ₂ .L ⁻¹	>2		
Âge de boues	θ _{b, AE}	jrs	2	2	5

(1) : DCO_{SB} = alimentation du procédé 1

La Figure II.4 représente les différentes unités du pilote pour chaque ligne.

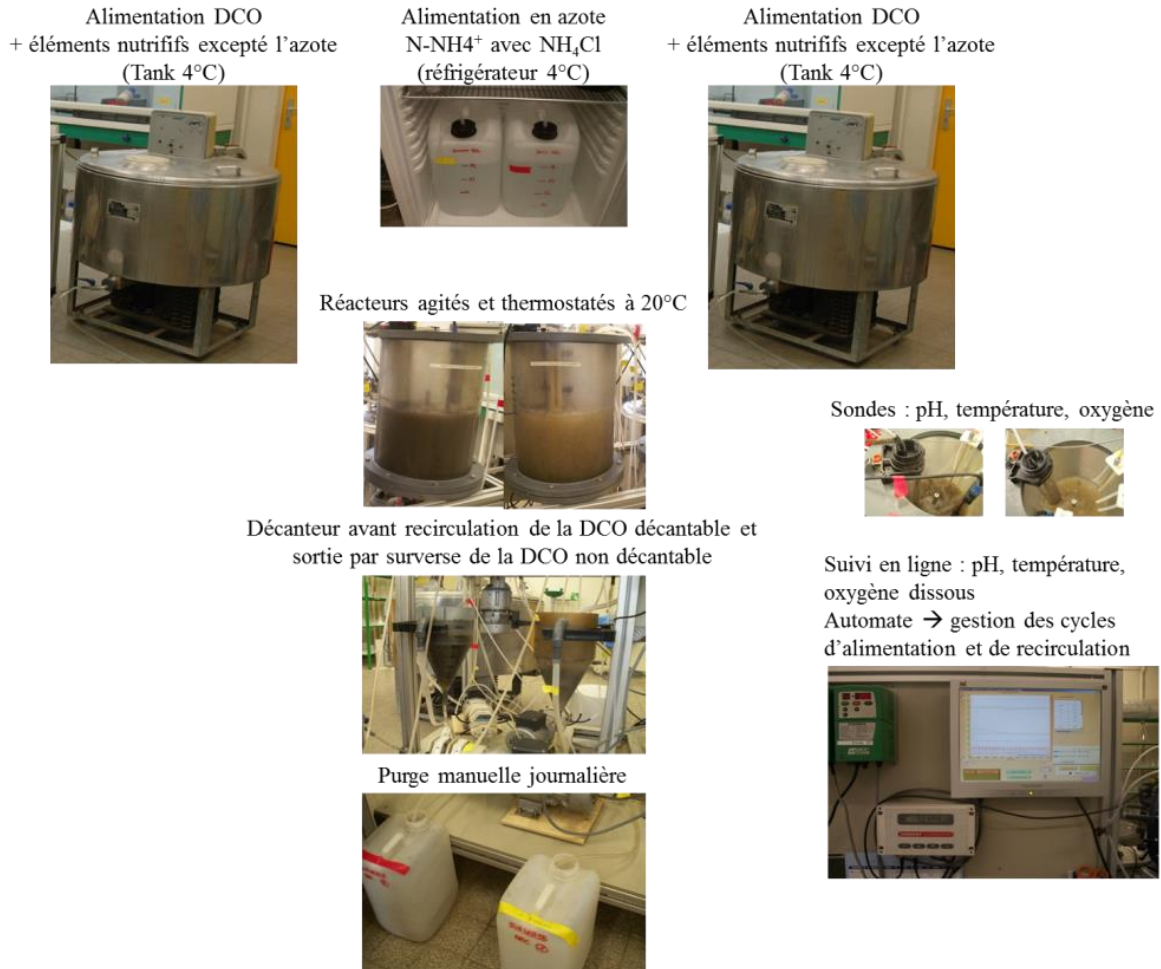


Figure II.4. Dispositif de fonctionnement du pilote laboratoire

II.1.2 Récupération de la fraction réfractaire anaérobie d'une matrice

La caractérisation de la matière organique réfractaire contenue dans une boue d'épuration est un des enjeux de ce travail. Le fractionnement entre les composés organiques biodégradables et réfractaires contenus dans une boue n'est pas réalisable expérimentalement. La biodégradation de la matière organique biodégradable contenue dans une boue a donc été choisie comme moyen de récupération de la matière organique réfractaire. L'élimination de la DCO biodégradable contenue dans un échantillon de boue par biodégradation ultime a alors été envisagée. La « respiration » en batch long terme anaérobie a été préférée à l'aérobie pour deux raisons majeures :

1. Les processus biologiques de croissance anaérobie sont nettement inférieurs en anaérobie par rapport à l'aérobie. En effet, le rendement de conversion maximal de la biomasse active composée essentiellement de microorganismes hétérotrophes, X_{OHO} , est de $0,667 \text{ gX}_{OHO} \cdot \text{gDCO}_B^{-1}$ en aérobie (Henze et al., 1987), contre un rendement de conversion global de l'ordre $0,2 \text{ gX}_{AD} \cdot \text{gDCO}_B^{-1}$ en anaérobie (ADM1 - Batstone et al., 2002). Pour une même quantité de DCO biodégradable dégradée, la quantité de biomasse produite au niveau du batch, et donc la quantité de composés réfractaires endogènes produite, sera au moins trois fois supérieure en aérobie. Ainsi, les composés réfractaires endogènes produits par la digestion anaérobie de la fraction biodégradable d'une boue contribueront moins significativement à la matrice réfractaire ultime obtenue. Celle-ci sera alors majoritairement empreinte de composés organiques présents dans la boue d'épuration avant digestion ultime.
2. La matière réfractaire obtenue en fin de digestion anaérobie ultime a été soumise à des mécanismes de limitation probablement similaire à ceux que la boue aurait subi dans un digesteur anaérobie.

Du point de vue expérimental, la procédure est globalement la même que celle utilisée pour un test BMP classique (décrite dans le paragraphe II.2.1.). La seule différence est qu'aucun inoculum n'est ajouté à la fiole réactionnelle de manière à ne pas récupérer les composés organiques réfractaires amenés par l'inoculum. Néanmoins, de manière à vérifier que la biodégradation de la matrice considérée a été optimale et est représentative malgré l'absence d'un inoculum anaérobie, la digestion en batch est systématiquement réalisée en duplicat, avec et sans inoculum, de manière à contrôler que la quantité de DCO biodégradée est équivalente, avec ou sans inoculum. La matière dite réfractaire va alors correspondre à la matrice qui a été digérée pendant au moins 120 jours en batch anaérobie, sans ajout d'inoculum, maintenus à 35°C en étuve.

II.2 QUANTIFICATION DE LA FRACTION ORGANIQUE REFRACTAIRE D'UNE BOUE

De manière générale, la donnée qui est mesurée expérimentalement correspond à la quantité de DCO biodégradable :

1. en aérobie, la teneur en DCO biodégradable d'un échantillon est déduite de la quantification de la demande biologique en oxygène (accepteur d'électrons de la réaction de biodégradation de la matière organique),
2. en anaérobie, la teneur en DCO biodégradable d'un échantillon est déduite de la quantification du volume de méthane produit (produit ultime de la réaction de biodégradation de la matière organique).

La teneur en DCO réfractaire d'un échantillon correspond au complémentaire de cette quantité, et est donc obtenue par différence entre les quantités de DCO totale et de DCO biodégradable estimées expérimentalement.

Ce paragraphe présente alors les principes, les procédures de mise en œuvre et les démarches calculatoires associés à la détermination de la teneur en DCO réfractaire d'un échantillon de boue dans ces deux conditions.

II.2.1 Détermination de la $DCO_{U,AN}$ via le test BMP

II.2.1.1 Principe du test BMP

Un test BMP (*Biological Methane Potential*) consiste à suivre la production cumulée de méthane produit dans des conditions d'incubation dites optimales. L'échantillon est placé dans une fiole hermétique en présence de tous les éléments nutritifs nécessaires au métabolisme cellulaire et en conditions tamponnées. Les fioles BMP sont placées dans une étuve à 35 °C de manière à mesurer la biodégradabilité anaérobie en conditions mésophiles. La production de biogaz contenant du méthane se traduit alors par une augmentation de pression à l'intérieur de la fiole de réaction. Son suivi est réalisé par mesure journalière de la pression relative grâce à un manomètre (différence de pression entre la pression atmosphérique et le ciel gazeux de la fiole). Cette mesure est réalisée (i) après une légère agitation des fioles de réactions de manière à permettre la libération d'éventuelles bulles de biogaz piégées dans la phase particulaire et (ii) dans l'étuve pour limiter la modification de la température. Dès que la pression relative est supérieure à 200mBars, un volume de gaz est prélevé grâce à une seringue en verre et analysé par chromatographie phase gaz. L'oxygène (O_2), le diazote (N_2), le dioxyde de carbone (CO_2) et le méthane (CH_4) sont les quatre gaz mesurés après étalonnage. Le sulfure d'hydrogène (H_2S) n'est pas mesuré. Il est à noter que l'hydrogène n'a jamais été détecté dans le biogaz au cours des tests réalisés sur les boues. Après chaque prélèvement, la pression est ramenée à la pression atmosphérique par dégazage via une fiole laissant s'échapper le gaz au travers

d'un liquide tout en évitant la contamination du ciel gazeux de la fiole de BMP par l'air atmosphérique.

II.2.1.2 Préparation d'une fiole BMP

Le protocole classique suit les étapes suivantes :

- Ajout d'un volume d'échantillon compris entre 50 et 200 ml prélevé sous agitation douce
- Ajout de 10 à 50 mL de tampon phosphate : Na_2HPO_4 (54 g.L⁻¹), KH_2PO_4 (18 g.L⁻¹)
- Ajout de 10 à 50 mL d'un inoculum (purge d'un digesteur anaérobie)
- Ajustement à 400 mL avec de l'eau du robinet
- Vérification du pH (entre 7 et 8)
- Mesure du volume mort auquel sera rapporté la quantité de méthane produite et suivie par la suite
- Balayage du ciel gazeux à l'azote
- Fermeture hermétique de la fiole
- Incubation à 35°C



Pour la mesure de la DCO biodégradable d'une boue dans ces conditions, le test BMP est réalisé au minimum en duplicat. Une fiole contenant uniquement l'inoculum, appelée « fiole-témoin », est aussi préparée pour mesurer et retrancher la part de méthane produit attribuable à la DCO biodégradable contenu dans l'inoculum et qui a contribué en partie à la quantité de méthane produite dans la « fiole-échantillon ».

II.2.1.3 Calcul de la $\text{DCO}_{U,AN}$ d'une boue

a. Mesure du potentiel méthane

Comme dit précédemment, la pression des fioles est périodiquement relevée, un volume de biogaz prélevé (si la surpression dépasse 0,2 bar) et analysé de manière à suivre la production de méthane au cours du temps. La fin du test correspond à l'absence d'élévation de pression pendant au moins 20 jours. Dans le cadre de cette étude, le temps minimum laissé à la biodégradation est de 120 jours. Suite à l'ouverture de la fiole, le pH et la concentration en acides gras volatils (AGV) sont mesurés pour vérifier que l'arrêt de la production de biogaz correspond bien à un épuisement de la DCO biodégradable et non à une acidification du milieu suite à un déséquilibre entre les populations méthanogènes et acidogènes.

Les profils de production de méthane obtenus s'expriment en $\text{NmL CH}_4.\text{gDCO}_{\text{échantillon}}^{-1}$ au cours du temps. Le volume de biogaz produit (V_p) est calculé à partir de la mesure de la pression relative (ΔP) et du volume mort de la fiole (V_M). Cette relation est vérifiée car la variation de la pression

atmosphérique est relativement faible et peut être négligée en comparaison avec l'élévation de la pression dans la fiole.

La production cumulée au cours du temps peut s'écrire de la manière suivante :

$$V_{CH_4\ total}^i = \left[(V_M \cdot \%CH_4^i) + \sum_0^i Vp^j \cdot \%CH_4^j \right]$$

avec

$V_{CH_4\ total}^i$: volume de méthane cumulé à l'instant i (mL.gDCO⁻¹)

V_M : volume mort de la fiole de l'expérience (mL)

%CH₄ : fraction volumique de méthane mesurée par chromatographie gazeuse

Vp : volume de biogaz mesuré et dégazé (mL)

Le potentiel méthane correspond à la quantité maximale de méthane mobilisable lors de la digestion anaérobie de l'échantillon considéré (Figure II.5). Puisque 350 Nml de CH₄ équivalent à 1 gramme de DCO (Buffière et al., 2008), le ratio du volume de méthane produit sur 350 permet de calculer la teneur en DCO biodégradable dans l'échantillon digéré dans la fiole BMP. L'expression utilisée pour obtenir la teneur en DCO biodégradable contenue dans un échantillon donné est la suivante :

$$DCO_{B,AN} = \frac{V_{CH_4\ total}^{\infty \text{ ou } >120j}}{350} \quad \text{avec} \quad V_{CH_4\ total}^{\infty} : \text{volume de méthane cumulé en fin de test (NmL.gDCO}_{\text{échantillon}}^{-1})$$

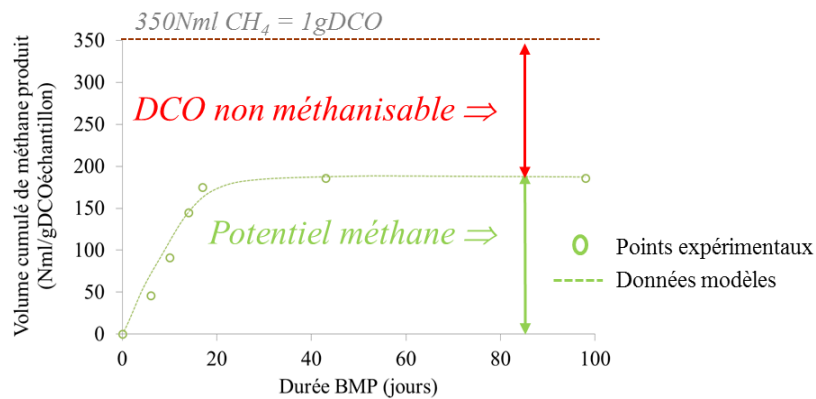


Figure II.5. Potentiel méthane déterminé par test BMP

Rq : La constante cinétique globale de la biodégradation anaérobie en batch peut être déterminée en confrontant les données expérimentales et les données estimées par un modèle cinétique du 1^{er} ordre défini par l'expression suivante : $V_{CH_4}(t) = V_{CH_4,max} * (1 - e^{-k_{BMP} * t})$. La valeur de k_{BMP} correspond à la valeur estimée permettant d'avoir une somme des écarts aux carrés minimale entre les données expérimentales et les données modèles (Figure II.5).

b. Calcul de la teneur en DCO_{U,AN}

La teneur en DCO réfractaire d'un échantillon est calculée par différence entre la quantité d'échantillon placé dans la fiole BMP et la quantité de DCO totale méthanisée à la fin du test. Le calcul peut s'écrire de la manière suivante :

$$DCO_{U,AN} = 1 - DCO_{B,AN}$$

avec

$DCO_{U,AN}$: teneur en DCO réfractaire, en $gDCO.gDCO_{\text{échantillon}}^{-1}$

$DCO_{B,AN}$: teneur en DCO méthanisable, en $gDCO.gDCO_{\text{échantillon}}^{-1}$

c. Précision de la mesure

▪ **Calcul de l'erreur expérimentale associée**

À chaque volume, l'erreur expérimentale ou l'incertitude absolue est calculée. Elle prend en compte les erreurs liées à la mesure manométrique, à l'estimation du volume mort et également à la mesure chromatographique de la teneur en méthane. Elle est en général inférieure à 4 %.

▪ **Représentativité du test BMP pour l'évaluation de la biodégradabilité d'une boue**

Le bilan DCO a été vérifié sur un certain nombre d'essais. Ce dernier boucle à moins de 4 %. Cette valeur est de l'ordre de grandeur de l'erreur sur la mesure de la production totale de méthane. Par conséquent, il est possible d'assimiler la DCO biodégradable, $DCO_{B,AN}$ à la DCO_{CH_4} mesurée expérimentalement.

▪ **Fractionnement de la DCO biodégradable**

Le test BMP a aussi été utilisé pour déterminer la répartition de la matière organique biodégradable entre les fractions solubles et particulaires d'une boue. La Figure II.6 indique que la somme des productions de méthane mesurées pour les deux fractions solubles et particulaires d'une boue boucle à 10% près à la mesure enregistrée lors du test BMP réalisé avec la boue totale. Ces résultats soulignent la possibilité de réaliser des bilans matières relativement précis à partir de ces essais.

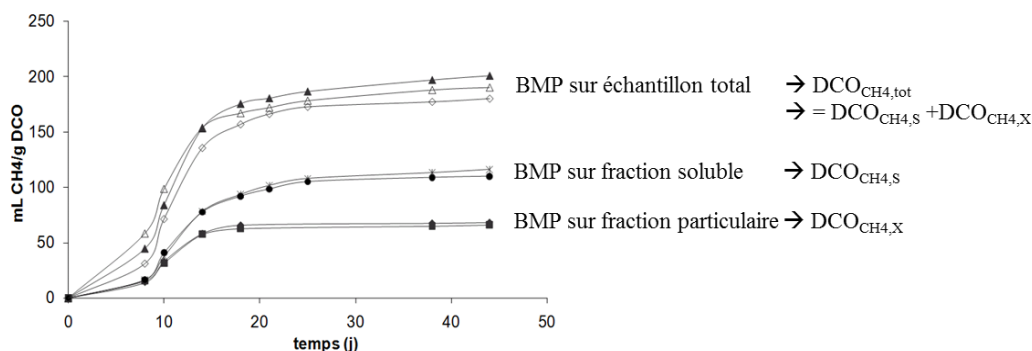


Figure II.6. Mesure du potentiel méthanogène biologique pour une boue totale et les fractions particulaire et soluble. (Perez, 2009)

▪ Échantillonnage d'une boue primaire

La question de la reproductibilité de l'échantillonnage s'est posée dans le cas d'un test BMP appliqué à une boue primaire qui est une matrice particulièrement hétérogène. La préparation de 4 fioles BMP a donc été effectuée. La DCO ainsi répartie a été évaluée en triplicat après prélèvements sous agitation douce dans chacune des fioles. La DCO moyenne mesurée sur ces 12 prélèvements est de $10084 \pm 463 \text{ mg.L}^{-1}$ soit une erreur relative de 5%. Ce résultat nous a permis d'établir qu'une variabilité de potentiel méthane pour une boue primaire supérieure à 5% ne serait pas attribuable à un problème d'échantillonnage.

II.2.2 Détermination de la $\text{DCO}_{\text{U,AE}}$ via une DBO_U (Sapromat ®)

II.2.2.1 Principe d'une DBO_U

Une DBO_U correspond à la demande biologique en oxygène ultime mesurée lors de la biodégradation en batch aérobie d'un échantillon organique donné. Cette technique consiste à mesurer la consommation cumulée d'oxygène associée à la dégradation de la DCO d'un échantillon. Cette mesure est réalisée dans des fioles closes contenant 250 ml de milieu réactionnel. L'oxygène est fourni par un générateur électrolytique au fur et à mesure de la disparition de l'air présent au-dessus du liquide du fait de son utilisation par les microorganismes. La réaction d'oxydation biologique de la matière organique s'accompagne d'une consommation d'oxygène et d'une production de dioxyde de carbone qui est transféré partiellement dans la phase gazeuse. Une cartouche de pastilles de chaux sodée fixe ce dioxyde de carbone sous la forme de carbonate, provoquant ainsi une dépression au sein du dispositif. Cette dépression est détectée par la cellule manométrique grâce à deux électrodes qui enclenche un cycle de production d'oxygène jusqu'au rétablissement de la pression.

Les composantes de l'appareillage utilisé sont présentées sur la Figure II.7. La fiole de réaction thermostatée à 20°C (3) est reliée au générateur d'oxygène (4) et au détecteur manométrique (5) qui régule l'apport en oxygène.

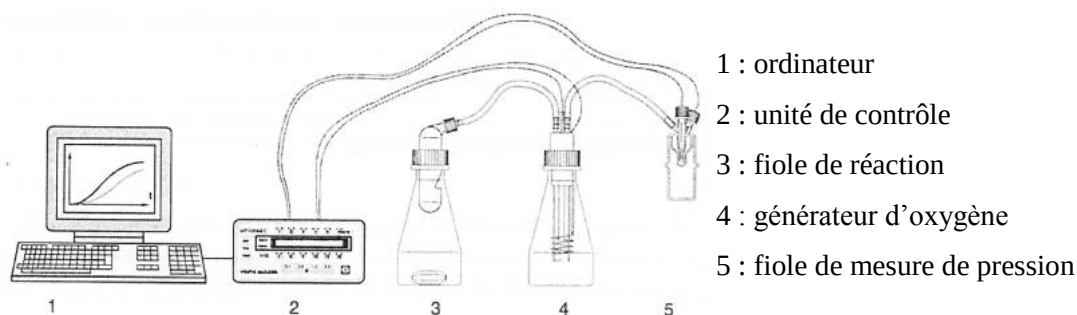
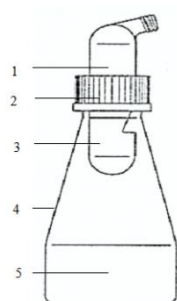


Figure II.7. Dispositif de la mesure d'une DBO ultime

II.2.2.2 Préparation d'une fiole de réaction

La fiole est représentée dans la Figure II.8. Le protocole classique suit les étapes suivantes :

- Ajout d'une quantité connue de matière organique calculée à partir de la mesure de la concentration en DCO de l'échantillon et du volume mesuré précisément.
- Ajout de tampon phosphate : Na_2HPO_4 (54 g.L⁻¹), KH_2PO_4 (18 g.L⁻¹)
- Ajout de chlorure d'ammonium (NH_4Cl)
- Ajout d'un inhibiteur de nitrification, l'ATU (allylthiourée) pour que seul l'oxygène soit utilisé comme accepteur d'électrons pour la biodégradation aérobie des substrats organiques et éviter le développement de microorganismes autotrophes.
- Compléter à 250ml le volume de liquide.



- 1 : embout de connexion à un tube reliant la fiole de réaction au générateur d'oxygène
- 2 : bouchon de la fiole
- 3 : réservoir en verre des pastilles de chaux sodée
- 4 : fiole de réaction
- 5 : milieu réactionnel sous agitation douce

Figure II.8. Fiole de DBO ultime

II.2.2.3 Calcul de la $\text{DCO}_{U,AE}$

a. Mesure de la $\text{DCO}_{B,AE}$

La mesure de la DCO biodégradable en aérobie est déduite de la demande biologique en oxygène enregistrée sur une période de plus de 20 jours et corrigée selon la méthode proposée par Roelleveld et al., 2002, qui permet de prendre en compte la quantité de matière qui a été anabolisée. La $\text{DCO}_{B,AE}$ se calcule alors de la manière suivante :

$$\text{DCO}_{B,AE} = \frac{1}{1 - f_{AE} * Y_{OHO}} * \text{DBO}_u$$

avec

DBO_u , la demande biologique en oxygène mesurée en fin de batch aérobie, exprimée en gO₂.L⁻¹

f_{AE} , la fraction réfractaire contenue dans un microorganisme : 0,2 gDCO_{U,E-AE}.gDCO_{Xoho}⁻¹

Y_{OHO} , le rendement de conversion de la biomasse hétérotrophe : 0,67 gDCO_{Xoho}.gDCO_{B,AE}⁻¹

b. Calcul de la $\text{DCO}_{U,AE}$

Tout comme en anaérobie, la DCO réfractaire est calculée par différence avec la $\text{DCO}_{B,AE}$ contenue dans un échantillon et déduite de données expérimentales.

II.3 TECHNIQUES DE CARACTERISATION DE LA MATIERE

II.3.1 Paramètres chimiques globaux

Tableau II.3. Récapitulatif des techniques analytiques chimiques utilisées

Analyses	Méthodes et équipements	Erreur (%)
DCO	Oxydation au dichromate de potassium pendant 2h à 150°C (Norme NFT 90.101) en microméthode. La mesure est faite par dosage retour au sel de Mohr pour la gamme 150-1500mgO ₂ /l et par lecture spectrométrique à 420 nm pour la gamme 0-150mg/l. Spectrophotomètre HP 8452 A	5
DCO liquide	DCO mesurée sur le surnageant d'une centrifugation à 4200g, 15', 4°C	
DCO particulaire	DCO calculée par différence entre la mesure sur l'échantillon total et sur le surnageant de centrifugation à 4200g, 15', 4°C	
MES	Masse de matière pesée après 24 h au four à 100°C – Matière en suspension mesurée sur le culot de centrifugation à 4200g, 15', 4°C d'un échantillon de 50ml.	3
MVS	Masse de matière volatilisée lors d'une combustion de 2h au four à 500°C : MVS = MES – MMS (matière minérale inerte à la combustion)	3
NTK	Minéralisation et distillation. Tecator KJELTEC 1030	4
NT	Combustion à 720°C en présence d'un catalyseur (platine) : transformation des composés azotés en monoxyde d'azote. Oxydation du NO par l'ozone pour un composé radicalaire, le NO ₂ [*] , détecté par chimiluminescence. Confrontation de l'aire du signal obtenu à une courbe de calibration réalisée sur une solution de KNO ₃ . Gammes de mesures disponibles : 0-200mgN/l. Shimadzu TOC-V CSN	5
CT, CI, COT	Mesure infrarouge du CO ₂ gazeux véhiculé par un gaz vecteur (air purifié) - TC : Combustion des composés carbonés organiques et inorganiques à 680°C en présence d'un catalyseur. Confrontation de l'aire du signal obtenu à une courbe de calibration avec solution standard de KHP. Gammes : 0-25, 0-250 et 0-2500 mgC/l. - IC : Acidification par ajout d'acide chlorhydrique 2M. Confrontation de l'aire du signal obtenu à une courbe de calibration avec un mélange de Na ₂ CO ₃ et de NaHCO ₃ . Gammes de mesures disponibles : 0-100 et 0-1000mgC/l. - COT = CT – CI Shimadzu TOC-V CSN	5
Anions, Cations	Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , PO ₄ ⁼ , SO ₄ ⁼ , Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ : gamme : 0-100mg/l (échantillons filtrés sur filtres Nylon de 0,2 µm avant analyse) Chromatographie ionique, DIONEX DX-100	10
N ₂ , O ₂ , CO ₂ , CH ₄	Chromatographie gazeuse : modèle HP 5890 équipé avec un détecteur de conductivité. Séparation sur colonne HAYSEP D avec un tamis moléculaire de 5 Å. Gaz vecteur : Argon avec un débit de 100 mL.min ⁻¹ . Températures de l'injecteur, du four et du détecteur respectivement de 100, 60 et 140°C.	

De manière générale, les mesures de paramètres sur échantillon total sont réalisées sur des échantillons soniqués au préalable 30 secondes dans la glace et maintenus sous agitation douce lors du prélèvement.

II.3.2 Caractéristiques physiques de la matière

II.3.2.1 Fractionnement physique

La séparation des phases particulaires et solubles est faite par centrifugation à 4200 g pendant 15 minutes à 4°C.

Si une filtration sur filtres nylon à 0,45 µm ou à 0,2 µm est réalisée sur les surnageants de centrifugation, les composés présents dans les perméats sont alors dits solubles, et ceux retenus sur les filtres sont assimilés à des composés colloïdaux. Il est à noter que cette séparation a été réalisée pour établir la répartition physique des composés réfractaires en fin de BMP et pour retirer les particules de tailles supérieures à 0,2 ou 045µm inappropriées à certains équipements analytiques (colonnes chromatographiques).

II.3.2.2 Analyses granulométriques

La granulométrie permet d'approcher la distribution des diamètres de particules de quelques dizaines de nanomètres au millimètre. Elle a ici été utilisée d'une part, pour caractériser la taille des particules de boues d'épuration et de résidus réfractaires à la digestion anaérobie long terme et d'autre part, pour évaluer l'effet d'un test de stabilité de structure particulaire à l'application d'une température de 65°C pendant 150h (procédure détaillée dans le paragraphe II.3.2.4).

Cette technique repose sur la propriété des matériaux à diffracter la lumière. Toutes les particules éclairées par un faisceau laser diffractent la lumière dans toutes les directions avec une répartition d'intensité qui dépend de leur taille. Certaines hypothèses et conditions de mise en œuvre sont réalisées pour rendre applicables les lois propres au phénomène de diffraction :

- Les particules sont assimilées à des sphères optiquement homogènes et isotropes
- Les particules ont un mouvement aléatoire
- La suspension est suffisamment diluée de sorte qu'il n'y ait aucune interaction optique entre deux particules.
- La phase liquide est transparente, l'absorption de la lumière du laser est négligeable.

En pratique, un échantillon de boue diluée est mis sous agitation douce limitant les phénomènes de décantation et de stress hydrodynamiques qui pourraient impacter significativement la structure des particules. L'échantillon est aspiré dans la cellule de mesure éclairée par un faisceau laser grâce à une pompe péristaltique située en aval de la cellule. Les boues ne sont donc pas soumises à un cisaillement dû au pompage avant la mesure. La lumière diffractée par l'échantillon est collectée par une lentille et focalisée sur un détecteur placé dans le plan focal de cette lentille. Dans cette étude, l'indice de réfraction du dispersant est considéré égal à 1,330 et correspond à l'indice de réfraction de l'eau. L'indice de réfraction classiquement utilisé pour les floccs biologiques, principalement constitués de

matière organique, est de 1,596 (Lambert et al., 2000). Pour tous les résultats fournis, 3 analyses minimum sur le même échantillon sont effectuées. Le logiciel intégré à l'appareil (Mastersizer 2000) donne alors la distribution granulométrie en volume et en nombre.

II.3.2.3 Analyse de la physico-chimie de molécules solubles par filtration sur gel

La séparation de composés par chromatographie à exclusion de taille est basée sur la migration différentielle des molécules dans une matrice de gel ou de particules présentant des pores de diamètres contrôlés. La séparation se fait par tamisage moléculaire dans la matrice poreuse et reflète l'encombrement stérique des molécules qui dépend de leur forme, de leur taille et de leur degré de dénaturation qui conditionnent leur volume hydrodynamique. Les molécules injectées sont entraînées dans la colonne par la phase mobile et vont être séparées selon leur capacité à pénétrer dans les pores de la matrice poreuse (superdex). Les molécules de tailles supérieures aux diamètres des pores seront exclues et éluées en premier. Les molécules de tailles compatibles seront éluées plus ou moins rapidement en fonction de leur taille. Le Tableau II.4 récapitule les conditions d'utilisation de cette technique analytique dans le cadre de cette étude.

Tableau II.4. Caractéristiques des colonnes Superdex 200 et Superdex 75

Type de colonne	Superdex 200 GL	Superdex 75 GL
Référence fournisseur	GE Healthcare	GE Healthcare
Gamme de travail	10 000 à 600 000 Da	1000 à 150 000 Da
Eluant	PBS*	PBS*
Préparation échantillon	Filtration préalable à 0,2µm	Filtration préalable à 0,2µm
Débit d'élution	0,75 ml/min	0,4 ml/min
Volume d'injection	100 µl ou 250 µl	100 µl ou 250 µl
Type de détecteur	▪ UV 210 nm → détection de tout composé organique ▪ UV 280 nm → détection de noyaux aromatiques ▪ Fluorescence à 2 couples d'excitation-émission (Ex/Em): ○ 221/350 (nm/nm) → protéines-like ○ 345/443 (nm/nm) → acides humiques-like	

*PBS = Phosphate Buffered Salin, composé de chlorure de sodium, de phosphate disodique, de phosphate monopotassique et de chlorure de potassium

Selon le détecteur placé en sortie de colonne, des caractéristiques chimiques des molécules peuvent être identifiées. Dans le cadre de cette étude, quatre ont été utilisés : UV 210nm, UV 280nm et deux couples de fluorescence pour essayer de différencier les composés humiques et protéiques (Tableau II.4). Les couples Ex/Em ont été choisis en accord avec la littérature (Bathia et al., 2013). Les spectres en fluorescence en 3D réalisés sur une protéine et un acide humique commerciaux confirment la pertinence du choix de ces couples qui correspondent effectivement aux massifs les plus importants de ce type de molécules (Figure II.9).

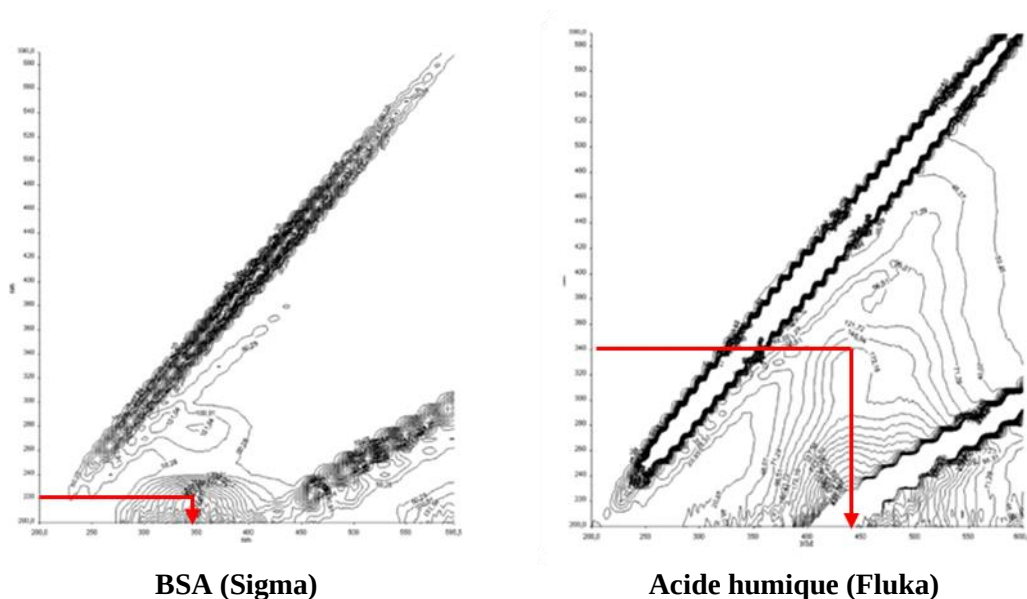


Figure II.9. Spectres de fluorescence 3D d'une protéine et d'un acide humique commerciaux

La taille des molécules contenues dans les échantillons injectés sur les colonnes sont estimées par comparaison de leur temps de rétention (volume d'élution) avec une droite de calibration réalisée pour chaque colonne. Les droites de calibration sont établies en utilisant des protéines étalons de tailles connues, récapitulées pour chaque colonne dans le Tableau II.5.

Tableau II.5. Protéines étalons utilisées pour la calibration des colonnes Superdex 200 et Superdex 75

Type de colonne	Protéines	Poids moléculaire (Da)	Volume d'élution (mL)
Superdex 200 GL	Thyroglobuline	669 000	9,24
	Ferritine	440 000	10,34
	Ovalbumine	44 000	15,3
	Conalbumine	75 000	14,09
	Anhydrase carbonique	29 000	16,47
	Ribonucléase	13 700	18,1
	Aprotinine	6 500	21,37
Superdex 75 GL	Aldolase	158000	8,6
	Conalbumine	75000	9,47
	Ovalbumine	43000	10,35
	Ribonucléase	13 700	13,37
	Aprotinine	6500	15,56
	Vitamin B12	1355	18,9
	Bleu dextran*	2000000	7,9

*Bleu dextran utilisé pour mesurer le volume d'exclusion

La Figure II.10 présente l'équation des courbes de calibration pour ces deux colonnes.

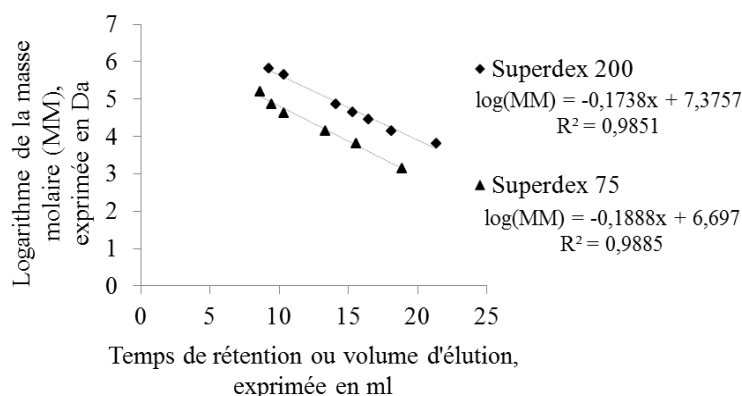


Figure II.10. Droites de calibration des colonnes Superdex 200 et Superdex 75

II.3.2.4 Test de stabilité de la matière particulaire

Ce test est utilisé pour évaluer la stabilité des interactions moléculaires qui assurent le maintien d'un agrégat réfractaire (seul type de matrice sur lequel cette approche a été appliquée dans le cadre de ce travail). Le principe est basé sur l'application d'une température de 65°C pendant une durée de 150 h à une matrice réfractaire récupérée en fin de digestion anaérobie long terme (comme défini dans le paragraphe II.1.2). Les paramètres analysés avant, pendant et en fin de test, sont les suivants :

- ⇒ DCO totale, DCO_{tot} , pour vérifier l'absence de méthanisation,
- ⇒ DCO soluble, DCO_{sol} (surnageant après centrifugation 4200g, 15', 4°C), pour suivre l'évolution de la répartition de la DCO entre la phase particulaire et soluble,
- ⇒ Distribution granulométrique en % du volume (technique décrite dans le paragraphe II.3.2.2.), pour suivre l'évolution des caractéristiques physiques apparentes des particules.

La procédure de suivi est la suivante :

- Prélèvement sous agitation douce de 4 échantillons de 100 ml de la matrice à traiter, répartis dans 4 flacons en verre à vis.
- Fermeture hermétique des flacons.
- Mise en place des flacons dans une étuve réglée à 65°C
- Mesure des caractéristiques de la matrice sans traitement à t_0 (DCO_{tot} , DCO_{sol} , distribution granulométrique).
- Mesure journalière : pression relative au sein de chaque fiole en cours de traitement pour contrôler un éventuel redémarrage de la méthanisation (jamais constaté).
- Arrêt d'une fiole à t_{24h} , t_{48h} , t_{72h} et t_{150h} et mesure des caractéristiques de la matrice après traitement (DCO_{tot} , DCO_{sol} , distribution granulométrique).

En fin de test, les données sont comparées afin d'évaluer l'effet de la température sur les caractéristiques physiques considérées.

II.3.3 Nature biochimique des molécules

II.3.3.1 Dosages biochimiques colorimétriques

Dans le cadre de ce travail, des méthodes de dosages colorimétriques ont été utilisées pour caractériser le contenu protéique-like, humique-like et polysaccharidique-like de résidus réfractaires à la biodégradation. Ces dosages ont été appliqués sur des échantillons totaux et des fractions solubles. Les données quantitatives sont toutes basées sur des équivalents par analogie d'absorbances obtenues sur les échantillons analysés et des étalons externes. Le principe des dosages et les procédures de mises en œuvre sont détaillés dans les paragraphes suivants. Ces dosages ont été réalisés au Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale.

a. Dosage des protéines et des substances humiques par la méthode Folin-Lowry modifiée

▪ Principe du dosage

Le dosage des protéines utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été rendu plus sensible en ajoutant l'élément cuivre. La méthode de Lowry a ensuite été modifiée afin de pallier l'interférence des substances humiques dans la réaction colorimétrique (Frølund et al., 1995). Cette modification repose sur l'absorbance de l'échantillon à analyser, en présence ou non de l'élément cuivre. La réaction se déroule en 2 phases.

1. Complexation des ions Cu^{2+} avec les atomes d'azote des liaisons peptidiques de la protéine dans des conditions de pH alcalin. Le Cu^{2+} est ainsi réduit en Cu^+ .
2. Les ions Cu^+ réduisent le complexe acide phosphotungstique/acide phosphomolybdique (couleur jaune) contenu dans le réactif Folin-Ciocalteu ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{Na}_2\text{WO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$), produisant ainsi une couleur bleue. En absence de cuivre, la coloration est due aux substances humiques (Box et al., 1983). L'absorbance totale, A_{totale} , à 750 nm de l'échantillon analysé selon la méthode de Lowry est donc due à la présence de protéines et d'acides humiques. L'absorbance A_{blanc} correspond à l'absorbance à 750 nm de l'échantillon analysé sans l'élément cuivre.

Les absorbances relatives aux protéines et aux substances humiques pour un échantillon donné sont alors calculées de la manière suivante :

$$A_{\text{protéine}} = 1,25 (A_{\text{totale}} - A_{\text{blanc}}) \quad (\text{avec } A_{\text{blanc}} = A_{\text{échantillon sans Cu}})$$

$$A_{\text{acides humiques}} = A_{\text{blanc}} - 0,2 \times A_{\text{protéine}}$$

▪ Protocole du dosage

Les réactifs utilisés au cours du dosage des protéines par la méthode Lowry modifiée sont :

- une solution de travail (A) avec l'élément cuivre : sulfate de cuivre à 1% (1 mL), tartrate de sodium et potassium à 2% (1 mL), soude à 0,2 mol/L (49 mL) et carbonate de sodium à 4% (49 mL), pour un volume final de 100 mL.
- une solution de travail (B) sans l'élément cuivre : tartrate de sodium et potassium à 2% (1mL), soude à 0,2 mol/L (49 mL), carbonate de sodium à 4% (49 mL) et eau distillée (1 mL), pour un volume final de 100 mL.
- le réactif de Folin-Ciocalteu (VWR).

Deux séries des mêmes échantillons sont donc préparées en parallèle : l'une en présence de la solution de travail A (avec CuSO_4 , coloration bleue), et l'autre en présence de la solution de travail B (sans CuSO_4 , coloration noire) (Tableau II.6). L'absorbance à 750 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur FLUO star OPTIMA. Des solutions d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma) et d'acides humiques commerciaux (Fluka) à des concentrations comprises entre 0 et 750 mg/L sont utilisées pour l'étalonnage respectivement des protéines et des substances humiques.

Tableau II.6. Protocole de dosage des protéines et des substances humiques selon la méthode de Folin-Lowry modifiée.

Série A	Série B
0,250 mL d'échantillon	0,250 mL d'échantillon
+ 1,25 mL de solution de travail A	+ 1,25 mL de solution de travail B
Incubation 10 minutes à température ambiante	
+ 0,125 mL de réactif de Folin-Ciocalteu	+ 0,125 mL de réactif de Folin-Ciocalteu
Incubation 20 minutes à l'obscurité	
Lecture de l'absorbance à 750 nm : A_{totale}	Lecture de l'absorbance à 750 nm : A_{blanc}

b. Dosages des sucres

▪ Principe du dosage

Selon Dreywood, 1946, le dosage à l'anthrone permet de mesurer les sucres totaux qui possèdent des fonctions carbonyles ($\text{C}=\text{O}$). Cette méthode colorimétrique est basée sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide à chaud (H_2SO_4 pur à 98% porté à 100°C). Les dérivés furfuraliques obtenus se condensent avec l'anthrone pour former des produits colorés verts.

▪ **Protocole du dosage**

Le réactif à l'Anthrone (Sigma) est préparé à raison de 2 g/L dans de l'acide sulfurique concentré. 0,5 mL d'échantillon est mis en contact avec 1 mL de réactif Anthrone en tube Eppendorf. Le mélange est agité au vortex et mis au bain à sec à 100°C pendant 15 minutes. Les tubes sont refroidis à température ambiante et l'absorbance est lue à 620 nm (FLUO star OPTIMA). Des solutions de D-glucose (Fisher Scientific) à des concentrations comprises entre 0 et 200 mg/L sont utilisées comme étalons externes.

c. Facteurs de conversion utilisés

Les dosages biochimiques sont tous basés sur des équivalents. Des facteurs de conversion en DCO sont appliqués afin d'estimer la quantité de matière caractériser en gDCO.gDCO^{-1} . Les valeurs suivantes ont été utilisées : $1,3 \pm 0,1 \text{gDCO.g(protéines)}^{-1}$ (moyenne sur 6 protéines de 14 à 250 kDa), $1,1 \text{ gDCO.g(polysaccharides)}^{-1}$ et $1,1 \text{gDCO.g(acide humique)}^{-1}$ (mesuré sur une poudre d'acide humique commercial de chez Fluka). Ces facteurs peuvent varier selon les auteurs. Un tableau de données trouvées dans la littérature est d'ailleurs donné en Annexe 8).

d. Spectrofluorimétrie 3D

Des analyses en spectrofluorimétrie à trois dimensions (3D) ont été réalisées sur des fractions solubles de résidus réfractaires au centre de recherche de Véolia Environnement Recherche et Innovation (Maisons-Lafitte). Le spectromètre de fluorescence utilisé est un Perkin Elmer LS55 Liquid phase fluorescence (LPF) équipé d'une cellule quartz SUPRASIL de chez HELIMA type 101-Q5 (support de l'échantillon liquide).

La source d'excitation lumineuse est une lampe Xénon qui produit une radiation comprise entre 200 et 600nm. La lumière incidente passe par un monochromateur qui sélectionne les longueurs d'onde transmises. Les molécules de l'échantillon irradié peuvent alors absorber une partie de l'énergie lumineuse et émettre une lumière de fluorescence. Celle-ci est ensuite concentrée sur un monochromateur, placé à un angle de 90°C par rapport à la lumière d'excitation. La lumière est ensuite captée par un détecteur.

Dans le cas de spectres 3D, l'incrément entre les longueurs d'onde d'excitation est de 10 nm, la vitesse de scan est de 1200 nm.s^{-1} , et les intensités de fluorescence sont enregistrées tous les 0,5nm. Les signaux détectés sont traités par le logiciel PerkinElmer FL Winlab. La température est régulée à 20°C pendant l'analyse par un thermostat LAUDA. Un spectrogramme de fluorescence 3D représente les longueurs d'onde d'excitation (λ_{ex}) en ordonnées et d'émission (λ_{em}) en abscisses, et les intensités de fluorescence sur l'axe Z. Les massifs de fluorescence sont représentés par des lignes de niveaux.

À titre d'exemple, la Figure II.11 représente le spectre 3D du tryptophane qui illustre bien le maximum de fluorescence au couple $\lambda_{ex}=280$ nm et $\lambda_{em}=330$ nm utilisé par les spectromètres à longueur d'onde fixe.

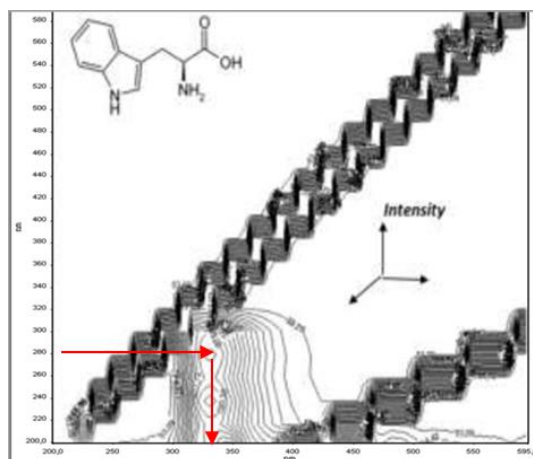


Figure II.11. Spectre de fluorescence 3D du tryptophane

L'interprétation du spectre est généralement réalisée après plusieurs dilutions de l'échantillon analysé. Primordiales dans une démarche de quantification basée sur la relation de proportionnalité entre les intensités de fluorescence et la concentration de l'échantillon analysé, ces différentes dilutions constituent un test de linéarité permettant d'établir la qualité de représentation quantitative d'un spectre 3D d'un échantillon donné. La linéarité impacte moins l'analyse qualitative d'un spectre 3D basée sur la position des principaux massifs (comme c'est le cas de cette thèse). Basé sur les travaux de Chen et al., 2003, et repris dans les travaux de Jimenez, 2013, sur extraits de boues biologiques, le spectre a été quadrillé pour définir des zones caractéristiques de familles de molécules présentes dans ce type d'échantillon (Figure II.12). L'attribution qualitative de ces zones est la suivante :

- I, II, III : protéines-like (I: tyrosine-like (Tyr); II: tryptophane-like (Trp); III: Tyr, Trp, résidus bactériens)
- IV : acides fulviques-like
- V : protéines glycosylées
- VI : mélanoidine-like et lignocellulose-like
- VII : acides humiques-like et lipofuscine-like (pigments résultant du vieillissement cellulaire et de la dégradation de ces organites)

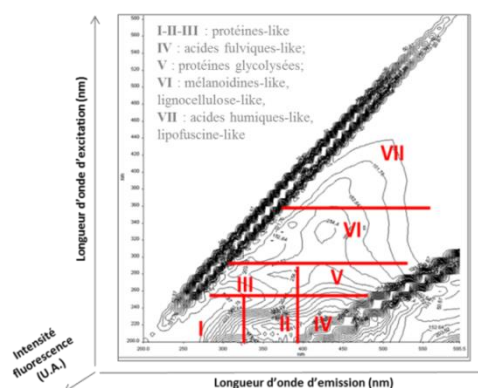


Figure II.12. Cartographie d'un spectre de fluorescence 3D

L'efficacité de fluorescence d'une molécule donnée, dite fluorochrome, est déterminée par son rendement quantique Φ défini par le rapport entre le nombre de photons émis par fluorescence (I_f) et le

nombre de photons absorbés par la molécule (I_A). De manière générale, ce rendement peut être diminué par l'environnement de la molécule. Les principaux éléments impactant l'intensité de fluorescence sont la force ionique, le pH et le phénomène de quenching (réduction de l'efficacité d'émission du fait de la présence d'autres fluorochromes qui absorbent une partie de l'énergie qui est émise).

Dans le cadre de cette étude, la fluorescence 3D est utilisée pour caractériser les familles de molécules présentes et leur éventuelle diversité moléculaire. L'interprétation va donc prendre en compte la position, l'apparition ou la disparition des principaux massifs de fluorescence des échantillons solubles analysés.

II.3.4 Empreinte chimique par spectrophotométrie en moyen infrarouge (MIR)

II.3.4.1 Principe

a. Interaction rayonnement-matière

La spectrophotométrie d'absorption est l'étude de l'absorption d'un rayonnement électromagnétique par des entités chimiques (atomes, ions, molécules). Ces entités se trouvent en général dans leur état fondamental (énergie minimale). L'absorption d'énergie électromagnétique aura lieu si l'interaction onde-matière peut conduire l'entité irradiée de son état fondamental à l'un de ses états excités. Différents niveaux d'énergie de transition peuvent être mis en jeu : rotation de la molécule, vibration des atomes, énergie des électrons (Figure II.13).

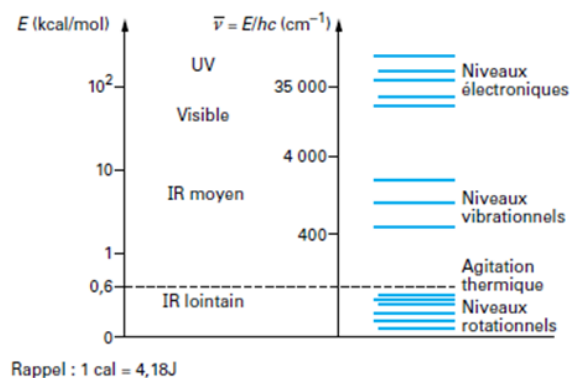


Figure II.13. Valeurs respectives des contributions électroniques vibrationnelles et rotationnelles d'une molécule (Dalibart et al., 2000)

Le changement de niveau d'énergie des molécules induit par l'énergie véhiculée par le rayonnement incident dépend de la fenêtre spectrale utilisée comme l'indique la Figure II.14. **Le moyen infrarouge, compris entre 400 et 4000 cm^{-1} (2,5-25 μm), est le domaine d'application du spectrophotomètre utilisé dans le cadre de ce travail.** Cette fenêtre spectrale correspond au domaine des transitions vibrationnelles et permet de mettre en évidence des groupes fonctionnels présents dans l'échantillon irradié.

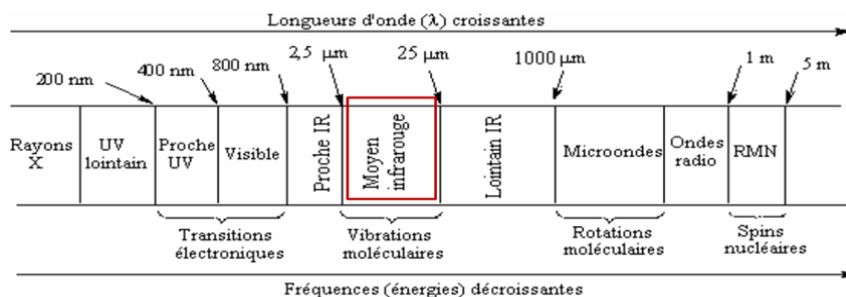


Figure II.14. Domaines spectraux de rayonnements électromagnétiques

De manière générale, la modification de l'énergie incidente peut être mesurée en transmission, en diffusion ou en réflexion. **Les spectres mesurés et analysés dans ce travail ont été enregistrés en réflexion totale atténuée (ATR).** La Figure II.15 indique le principe de cette technique analytique.

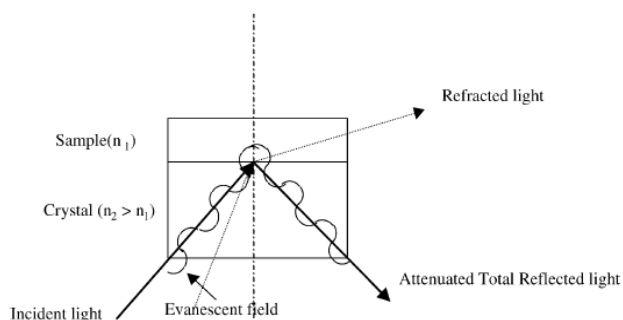


Figure II.15. Principe de la spectrométrie par réflexion totale atténuée (ATR) (Pons et al., 2004)

Le faisceau infrarouge incident pénètre dans l'échantillon (chemin optique de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde), et en ressort, par réflexion dans le cristal dont l'indice de réfraction est supérieur à celui de l'échantillon. L'intensité du faisceau réfléchi est alors atténuée par l'absorption due aux différents modes de vibrations des groupes fonctionnels avec lesquels le faisceau incident a interagi. **Le cristal ici utilisé est le diamant.** La détection de l'onde réfléchie, dite évanescente, donne un spectre d'absorption appelé ATR-FT-MIR. Ce mode de récupération des caractéristiques spectrales de l'échantillon analysé présente l'avantage d'être rapide, non destructive et peu consommatrice d'échantillon (prélèvement de quelques mg).

b. La spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge consiste donc à mesurer les intensités d'absorption par un échantillon placé sur le chemin optique d'une source infrarouge (polychromatique). En notant I_0 et I , les intensités des faisceaux incidents et émis (transmis ou réfléchis), le spectre infrarouge représente les variations d'intensité en transmittance ($T=I/I_0$) ou en absorbance ($A=\log(1/T)$) en fonction de la fréquence incidente exprimée par convention en cm^{-1} (nombres d'ondes qui correspondent à l'inverse de la longueur d'ondes du rayonnement incident). L'absorbance, A , est reliée à la composition de l'échantillon par la loi de Beer-Lambert : $A=\sum(\epsilon_i \cdot l \cdot c_i)$ avec ϵ , le coefficient d'absorption moléculaire ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l , le trajet optique (cm) et c , la concentration de l'espèce i ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

C'est une des techniques spectroscopiques les plus utilisées en chimie organique et inorganique car elle permet de déterminer les groupes fonctionnels chimiques présents dans un échantillon ainsi que leur organisation dans le cas de molécules seules. Le spectre infrarouge constitue l'empreinte chimique spécifique d'un échantillon analysé.

II.3.4.2 Dispositif

Le dispositif de fonctionnement d'un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier est composé des éléments majeurs suivants : la source du rayonnement infrarouge incident, l'interférogramme, le dispositif de positionnement de l'échantillon, le détecteur. Les caractéristiques du spectromètre **Nicolet 6700 ® utilisé dans le cadre de ce travail** pour obtenir des spectres ATR-FT-MIR sont présentées en parallèle de la définition générale de ces différents éléments :

- **la source de la radiation** qui conditionne la fenêtre spectrale de travail. Elle est généralement constituée de solides portés à haute température et qui rayonnent par incandescence sur certains domaines spectraux. Le moyen infrarouge étudié ici, balaye une gamme de nombre d'ondes allant de 400 à 4000 cm^{-1} .
- **l'interféromètre de Michelson** qui correspond au montage optique permettant de discriminer les diverses fréquences du rayonnement incident (Annexe 11). Dans le domaine spectral du moyen infrarouge, la séparatrice est constituée d'une lame support en KBr et d'un film mince en Germanium.
- **le dispositif de positionnement de l'échantillon** sur le chemin du faisceau incident. De nombreuses configurations existent et dépendent du mode de détection des variations de l'intensité incidente (transmission, réflexion, diffusion) et de l'état physique de l'échantillon (solide, liquide, gazeux).

Utilisé en mode ATR, le dispositif de positionnement de l'échantillon correspond au cristal de diamant sur lequel est simplement déposé l'échantillon sec à analyser. Celui-ci est ensuite pressé contre le cristal par une presse manuelle débrayable (Figure II.16).

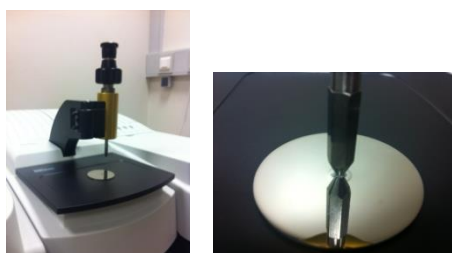


Figure II.16. Dispositif de positionnement de l'échantillon solide pour une analyse ATR-FT-MIR

- **le détecteur** est caractérisé par sa sensibilité (le plus petit signal mesurable), son domaine spectral, et son efficacité quantique (rapport du courant induit sur le flux incident). Il existe deux type de détecteurs :
 1. DTGS (Deuterated TriGlycide Sulfate) : détecteur pyroélectrique à fenêtre de KBr ou de CsI qui transforme la chaleur émise par l'absorption en courant électrique.
 2. MCT (Mercury Cadmium Telluride) : détecteur photoconducteur qui est sensible aux photons émis.

Le détecteur disponible pour l'analyse en moyen infrarouge sur le spectrophotomètre utilisé dans cette étude est de type DTGS.

- **l'enregistreur** permet d'obtenir le spectre infrarouge de l'échantillon analysé. Un spectromètre à transformée de Fourier calcule, à partir de la variation de l'intensité exprimée en fonction du déphasage (interférogramme), un spectre infrarouge exprimé en fonction des nombres d'onde du rayonnement incident. Les calculs de la transformée de Fourier de l'interférogramme de référence (signal sans échantillon) et de l'échantillon (signal après irradiation de l'échantillon) ainsi que le calcul point par point du rapport $\text{Energie}_{\text{échantillon}}/\text{Energie}_{\text{référence}}$ dont résulte le spectre infrarouge de l'échantillon analysé, sont effectués par le logiciel du spectromètre. L'ensemble de la démarche calculatoire est réalisé par le logiciel d'acquisition du spectrophotomètre.

Le logiciel d'acquisition et de traitement des données du spectrophotomètre Nicolet 6700 ® utilisé est OMNIC v9.2. Le traitement du signal par la transformée de Fourier pour convertir l'information en fonction du déphasage (induit par le déplacement du miroir mobile) en nombre d'ondes nécessite de préciser la technique d'apodisation. Pour l'ensemble des spectres étudiés, la fonction d'apodisation de Happ-Genzel a été appliquée.

- **le laser** est utilisé comme moyen de contrôle du mouvement de la partie mobile de l'interférogramme car les deux faisceaux doivent être parfaitement colinéaires.

II.3.4.3 Obtention d'un spectre ATR-FT-MIR

a. Préparation d'échantillon

Plusieurs étapes successives sont requises pour obtenir un échantillon prêt pour l'analyse infrarouge :

1. Récupération de la fraction particulière

Quatre échantillons de 10 ml de matrices boues ou résidus réfractaires sont prélevés sous agitation dans des falcons de 15ml. Tous sont centrifugés dans les mêmes conditions que la mesure d'une DCO particulière : centrifugation à 4200g, 15', 4°C. Après cette première centrifugation, une étape de lavage des molécules de surnageant interstitielles est réalisée. Elle consiste à remettre en suspension le

culot de la première centrifugation par un volume de 10 ml d'eau déminéralisée. Les échantillons sont alors à nouveau centrifugés à 4200g, 15', 4°C. Les culots récupérés correspondent alors aux matrices particulières dont la nature chimique va être analysée en spectroscopie infrarouge.

2. Lyophilisation

Il est impératif que les échantillons analysés en infrarouge soit sec pour limiter l'interférence des liaisons O-H de l'eau. Dans le cadre de ce travail, la procédure choisie pour éliminer efficacement l'eau présente dans les échantillons, sans altérer la chimie des composants, est la lyophilisation sous vide après congélation des échantillons. Ainsi, après 24 h à -20°C, les échantillons sont placés 1h à -80°C de manière à éviter une décongélation partielle entre leur sortie du congélateur et leur positionnement dans le lyophilisateur (car une décongélation, même minime, empêche la lyophilisation optimale). L'eau glacée est alors sublimée (passage direct de l'état solide à gazeux) et capturée par condensation. La Figure IX.7 présentée en annexe permet d'illustrer l'interférence de l'eau (H₂O) sur l'empreinte infrarouge d'un échantillon.

b. Procédure d'utilisation du spectrophotomètre en ATR-FT-MIR

La procédure d'obtention d'un spectre a donc été la suivante :

1. Enregistrement du spectre infrarouge du background (sans échantillon, spectre infrarouge de l'humidité et du carbone atmosphérique du dispositif)
2. Positionnement de l'échantillon sur la cellule de mesure en ATR (diamant). La quantité déposée n'excède pas quelques mg et doit seulement recouvrir la totalité de la cellule de mesure. La masse d'échantillon déposée et irradiée n'est pas un paramètre contrôlable. Dans la mesure du possible (quantité d'échantillon suffisante), 5 à 10 répliquas sont réalisés pour l'analyse d'un échantillon.
3. Pression de l'échantillon contre le cristal de diamant par une presse manuelle débrayable
4. Enregistrement du spectre infrarouge (corrigé automatiquement par le spectre du background enregistré au préalable)

Les paramètres réglés pour l'enregistrement d'un spectre sur l'ensemble de l'étude ont été les suivants :

- Nombre de scans (nombre d'analyse pour que le spectrophotomètre rende son résultat) : 64
- Gain : 4
- Enregistrement de background toutes les 30 minutes maximum.
- Résolution : 2 cm⁻¹
- Apodisation : Happ-Genzel (choix par défaut)

c. Reproductibilité de la mesure infrarouge

La reproductibilité de l'analyse infrarouge a été évaluée en utilisant un échantillon physiquement et chimiquement homogène : le glucose. La reproductibilité est évaluée à l'échelle d'un dépôt (reproductibilité d'une analyse) et pour différents dépôts d'un même échantillon (dispersion de l'analyse).

Les analyses successives d'un même dépôt de matière se superposent parfaitement. Par contre, la Figure II.17 indique que les spectres ATR-FT-MIR de différents dépôts d'un même échantillon peuvent différer en termes d'intensité. La variabilité de l'analyse entre les différents dépôts de glucose est essentiellement due à la variabilité de la masse d'échantillon déposée et irradiée par le rayonnement incident. Un traitement mathématique des données brutes est alors utilisé pour éliminer l'effet du dépôt sur l'empreinte chimique d'un échantillon donné. Ce traitement est noté SNV (*Standard Normal Variate*) (Zeiter et al. 2004 et 2005). Il consiste à réaliser de manière combinée :

- Une centration : retirer de chaque valeur d'intensité mesurée à un nombre d'onde, la moyenne des intensités mesurées à ce nombre d'onde.
- Une réduction : diviser chaque valeur d'intensité mesurée à un nombre d'onde par l'écart-type des intensités mesurées à ce nombre d'onde.

À chaque nombre d'onde j (allant de 400 à 4000 cm^{-1}), chaque valeur brute d'intensité absorbée, I_j , est alors centrée-réduite par rapport à l'ensemble i des répliquas mesurés pour un même échantillon. Le calcul réalisé est le suivant :

$$I_{j,SNV} = \frac{I_j - \bar{I}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (I_j - \bar{I})^2}{(n-1)}}}$$

Après traitement de centration-réduction des données spectrales brutes, la Figure II.17 permet d'illustrer que l'analyse ATR-FT-MIR d'un échantillon est reproductible.

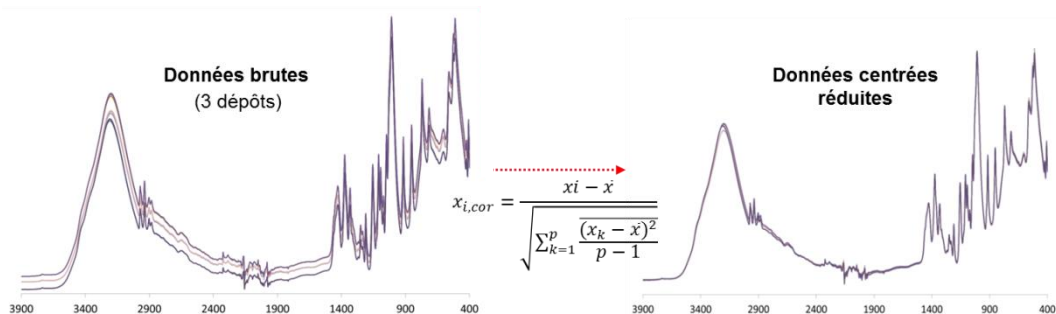


Figure II.17. Prétraitement de centration-réduction des données brutes de spectres ATR-FT-MIR

d. Représentation de l'empreinte spectrale d'un échantillon

- Empreinte moyenne bornée par IC 95%

Après traitement des données par centration-réduction, l'intervalle de confiance à 95% de la valeur moyenne a été calculé à chaque nombre d'onde pour évaluer l'erreur attribuable à la mesure d'intensité d'absorption à chaque nombre d'onde.

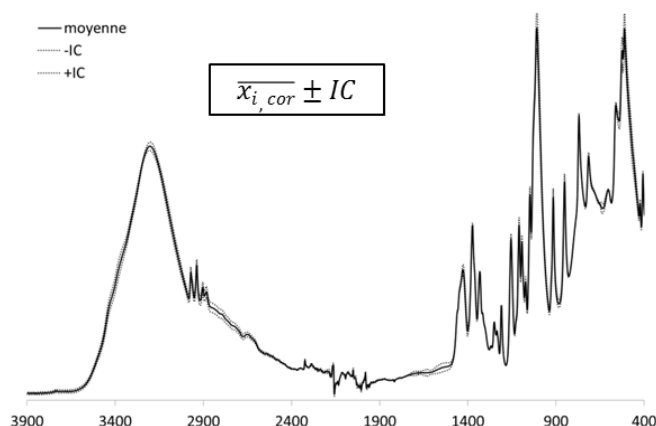


Figure II.18. Spectre ATR-FT-MIR moyen de glucose lyophilisé

- Domaines spectraux retirés de l'analyse relative :
 - zone de correction de l'absorption liée au cristal en diamant et au CO₂ atmosphérique : 1800 à 2750 cm⁻¹
 - zone de 3200 à 4000 cm⁻¹ : sensibilité accrue aux liaisons hydrogènes

II.3.4.4 Outils statistiques d'analyses multi variées

Des outils de classification des empreintes spectrales d'échantillons complexes ont déjà été utilisés dans la littérature (Smidt et al., 2008). Dans le cadre de ce travail, deux outils mathématiques ont été utilisés pour identifier et caractériser des différences entre des spectres ATR-FT-MIR : la classification ascendante hiérarchique et l'analyse en composante principale. Les analyses ont été obtenues grâce à l'utilisation de la version 3.0.0 du logiciel libre R et avec la librairie de fonctionnalités « FactoMineR ». Les données quantitatives comparées ont toujours été centrées réduites avant analyse relative multi-variée.

a. Classification ascendante hiérarchique ou analyse en clusters

L'analyse en clusters permet de découper un jeu de données en sous-groupes homogènes d'individus ou de variables. Parmi les méthodes d'analyse en clusters, la classification hiérarchique ascendante permet de regrouper des individus ou des variables par ordre de proximités croissantes.

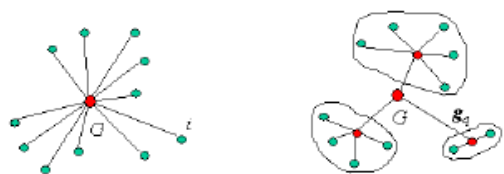


Figure II.19. Schéma d'une clusterisation

Dans le cadre de ce travail, la méthode d'agrégation utilisée est la méthode de Ward qui consiste à réunir les deux clusters dont le regroupement fera le moins baisser l'inertie interclasse.

b. Analyse composante principale

L'analyse en composante principale (ACP) traite des tableaux croisant les individus (échantillons) et les variables numériques qui les caractérisent (intensités d'absorption de leurs spectres ATR-FT-MIR). Cette méthode d'analyse factorielle permet d'effectuer la synthèse d'informations contenues dans un

grand nombre de variables grâce à l'obtention de « composantes principales » : nouvelles variables, indépendantes, combinaisons linéaires des variables initiales possédant une variance maximale. Les composantes principales autorisent la représentation graphique de grands tableaux de données, complexes à décrire par les méthodes graphiques habituelles. Il rend possible l'observation de regroupements, d'oppositions, de tendances directionnelles, impossibles à discerner directement. Globalement cette méthode permet donc de condenser l'information. Néanmoins, la pertinence de ses résultats est liée à la qualité de représentation des individus par les différentes composantes principales.

La qualité de représentation des individus et des variables est identifiable grâce au paramètre $\cos^2(\theta)$ (θ angle de projection du point-individu ou du point-variable sur l'axe de la composante principale considérée). Ce paramètre traduit la part de l'information initialement contenue dans le point-individu représenté par le plan factoriel considéré. Si la somme de ses $\cos^2(\theta)$ est supérieure à 0,8, l'individu est considéré bien représenté. L'analyse de ce critère est un préambule à l'interprétation des résultats d'une ACP car elle conditionne la pertinence des positions relatives des points-individus sur le plan factoriel.

Par ailleurs, chaque variable est représentée par un vecteur (une flèche) dont la direction et ses coordonnées (projections sur Dim1 et Dim2) traduisent sa contribution à la combinaison linéaire qui définit chaque composante principale. La valeur du $\cos^2(\theta)$ du point-variable permet cette fois d'identifier le poids de la variable d'origine dans la construction de la composante principale considérée.

II.4 DECONSTRUCTION DE LA FRACTION PARTICULAIRE D'UN RESIDU REFRACTAIRE

II.4.1 Procédure générale

Ce protocole concerne les matrices obtenues en fin de digestion anaérobie en BMP d'une durée supérieure à 120 jours. La Figure II.20 représente les principales étapes de la procédure appliquée.

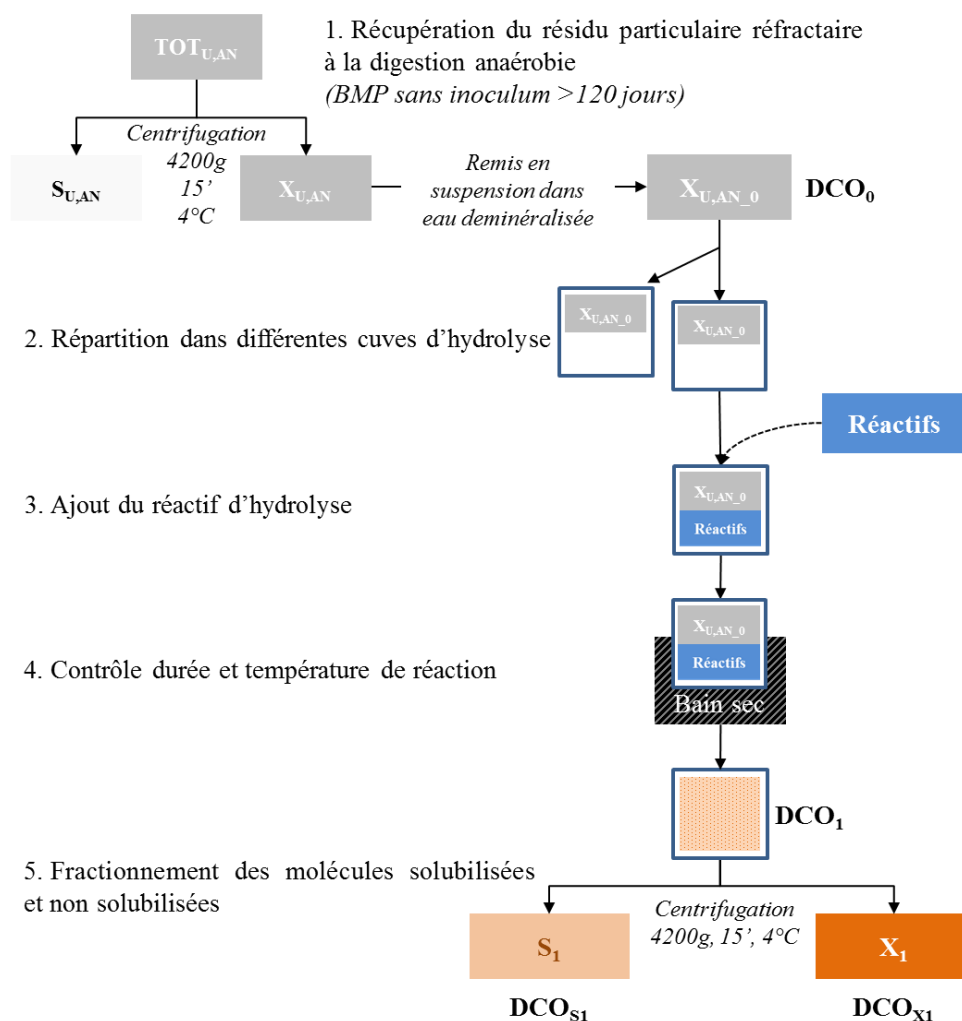


Figure II.20. Procédure de solubilisation de la fraction réfractaire particulaire d'une boue d'épuration digérée en BMP de plus de 120 jours

▪ Récupération de la fraction particulaire réfractaire

La première étape de ce protocole consiste à récupérer, par centrifugation à 4200g pendant 15' à 4°C, la fraction particulaire de la matrice réfractaire totale obtenue en fin de BMP (réalisé en conditions appropriées à la récupération de la fraction réfractaire d'une boue comme décrites précédemment). Le culot est ensuite repris dans un volume d'eau de façon à obtenir une concentration en DCO comprise entre 10 et 20 g.L⁻¹. Cette matrice particulaire est nommée X_{U,AN_0} .

La concentration en DCO de la matrice X_{U,AN_0} , notée DCO_0 , est alors mesurée pour pouvoir vérifier la non-minéralisation de la matière organique au cours de la réaction d'hydrolyse. Cette caractéristique est évaluée en calculant la différence entre la concentration en DCO du milieu réactionnel avant et après réaction. L'écart a toujours été de l'ordre de 1% et donc de l'ordre de grandeur de la mesure en DCO. Dans les conditions testées dans ce travail, la minéralisation de la matière organique est donc négligeable.

▪ Répartition dans différentes cuves d'hydrolyse et ajout du réactif

La matrice particulaire X_{U,AN_0} est pipetée sous agitation (pointe à embouts coupés) et répartie dans des tubes en verre à vis. Un volume de réactif, identique à celui de l'échantillon déjà présent dans les tubes, est ajouté. Les réactifs testés dans le cadre de ce travail sont l'eau, NaOH, HCl et H_2SO_4 .

La reproductibilité de l'échantillonnage de la matrice particulaire a été évaluée par mesure de la DCO_{tot} de 9 aliquots d'un même échantillon préparés comme précédemment décrit. Les résultats indiquent une valeur moyenne de $7653 \pm 193 \text{ mgDCO.L}^{-1}$ (Figure II.21). Cette variabilité étant de l'ordre de grandeur de l'erreur sur la mesure de DCO, la répartition d'une matrice particulaire lors de la réplication de la procédure d'hydrolyse sur un même échantillon est considérée reproductible.

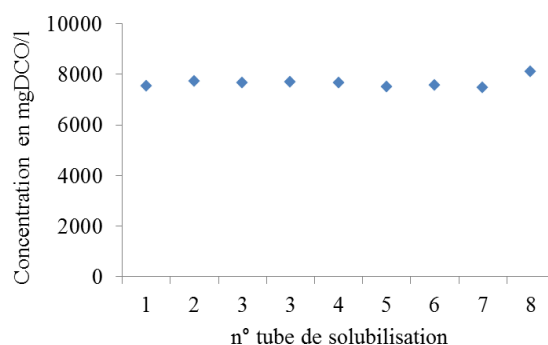


Figure II.21. Reproductibilité de l'échantillonnage d'une matrice particulaire avant test d'hydrolyse

▪ Contrôle de la durée et de la température

Les traitements de solubilisation du particulaire ont été réalisés à deux températures différentes (60° et 95°C), pendant des durées variables (30 min, 2h et 24h). A la fin de la durée d'hydrolyse les échantillons sont refroidis à 4°C.

▪ Fractionnement des molécules

Après refroidissement, les tubes sont agités et centrifugés à 4200g pendant 15' à 4°C de façon à séparer les molécules de la fraction particulaire réfractaire qui ont été solubilisées de celles qui ne l'ont pas été.

II.4.2 Calcul du rendement de solubilisation, ou potentiel de solubilisation

L'écart entre la DCO totale avant et après méthode de déconstruction est toujours contrôlé. Sur l'ensemble des conditions de solubilisation appliquées à la fraction particulaire d'un résidu réfractaire, l'écart est demeuré inférieur à l'erreur faite sur la mesure d'une DCO (5%). Le rendement de solubilisation est donc calculé avec l'expression suivante :

$$\text{Rendement de solubilisation (\%)} = \frac{DCO_{S1}}{DCO_1} * 100$$

avec,

DCO_{S1} : DCO du surnageant de centrifugation à 4200g, 15', 4°C de l'échantillon récupéré en fin de déconstruction, en gDCO.L⁻¹,

DCO_1 : DCO totale de l'échantillon récupéré en fin de déconstruction, en gDCO.L⁻¹.

III .

Le caractère réfractaire anaérobie

III.1 INTRODUCTION

L'objectif de ce chapitre est de mieux cerner le caractère réfractaire de la matière organique d'une boue et d'identifier les mécanismes inhérents à sa récalcitrance. Analyser la physico-chimie des molécules constitutives de la matière réfractaire sans considérer l'historique de la boue serait réducteur, tant les processus physico-chimiques et biologiques sont filière-dépendants. La démarche suivie pour mieux comprendre les mécanismes qui limitent la biodégradation vise au contraire à ouvrir le champ des possibles pour traiter et valoriser au mieux les composants de l'eau usée. À notre connaissance, il n'existe pas d'études spécifiques sur la matière réfractaire d'une boue en relation avec la filière de traitement de l'eau usée.

D'une manière générale, comme mis en évidence et discuté dans le chapitre 1, les travaux sur la caractérisation de la matière organique concernent majoritairement les boues biologiques et les boues partiellement digérées dont le contenu biodégradable reste significatif (de l'ordre de 15 à 20 %) et parasite au final l'identification du compartiment réfractaire de la boue. Le défaut d'informations relatives aux résidus réfractaires de boues d'épuration a motivé l'analyse de données quantitatives et qualitatives de matrices issues d'un large panel de stations d'épuration.

Ce chapitre constitue un préambule à la caractérisation fine et approfondie de cette matière. De cette première analyse, ont été évalués les paramètres déterminants à mesurer et les enjeux méthodologiques et analytiques sur lesquels nous avons construit notre démarche scientifique autour de notre objet d'étude qu'est le floc. Le floc, assemblage complexe de cellules et d'exopolymères (EPS), est le siège des réactions et fixe les conditions environnementales affectant ces mêmes réactions. Les molécules réfractaires constitutives de la matrice organique du floc sont des molécules polymériques de nature chimique variable (acides aminés, sucres, lipides, molécules cycliques aromatiques). Par conséquent, leur dégradation et leur assimilation par des micro-organismes engagent des processus préalables dits d'hydrolyse. Ces processus sont donc assurés par des enzymes exocellulaires attachées ou non à la paroi externe d'une bactérie. À l'échelle du floc, la compréhension du caractère réfractaire passe alors par une série de questions formant le fil rouge de ce chapitre et qui sont autant d'axes d'investigations des limitations réactionnelles :

- **Le rôle de la filière d'épuration dans la « fabrication » du contenu réfractaire d'une boue**
- **Le rôle de l'agrégation des molécules organiques :** l'agencement de ces molécules et leur immobilité limitent ou freinent certainement leur accessibilité à des bactéries ou à des enzymes.
- **La capacité et la diversité hydrolytique du pool enzymatique contenu dans une flore anaérobie développée sur des boues biologiques :** malgré la capacité élevée d'acclimatation d'une flore bactérienne et sa large biodiversité, est-il possible que la chimie de certaines molécules requiert des fonctionnalités enzymatiques non disponibles sous les pressions de sélection imposées par les conditions de la digestion anaérobie mésophile ?

▪ **La chimie des molécules réfractaires** : au-delà de leur agencement défavorable, ces molécules, dont la chimie reste mal connue, pourraient être par nature difficilement hydrolysables. On peut citer les molécules connues comme tel, constitutives des débris cellulaires ou les molécules présentes initialement dans l'eau usée telles que la cellulose cristalline, la lignine, les substances humiques...

III.2 RELATION ENTRE LA FILIERE ET LA TENEUR EN MATIERE ORGANIQUE REFRACTAIRE ANAEROBIE D'UNE BOUE

III.2.1 Préambule : Estimation expérimentale de la fraction réfractaire anaérobie d'une boue

La teneur en matière organique non biodégradable anaérobie d'une boue ($DCO_{U,AN}$) est obtenue par différence. La matière organique biodégradable d'un échantillon est assimilée à la part de DCO transformée en méthane lors d'un test BMP (procédure détaillée dans le chapitre Matériels et Méthodes). La part de matière organique réfractaire à la biodégradation anaérobie est alors déduite de l'équation suivante : $DCO_{U,AN} = DCO_{tot,échantillon} - DCO_{CH4,tot}$

Cette approche expérimentale suppose que la totalité de la biomasse produite ait été convertie en méthane.

De plus, un inoculum acclimaté au type d'échantillon à dégrader peut être utilisé pour éliminer tout risque de limitation de la réaction de biodégradation du fait d'un pool biologique incomplet (en particulier les pools méthanogènes et acétogènes). La production de biogaz associé à l'inoculum est alors retranchée de la production de méthane liée à l'échantillon. Les fractions réfractaires calculées pour les boues du Tableau III.2 ont toutes été réalisées dans ces conditions.

La matière organique biodégradable contribue à des réactions anaboliques (récupération d'énergie cellulaire) et cataboliques (croissance cellulaire). Lors d'une biodégradation anaérobie long terme en batch (test BMP), la DCO biodégradable qui n'est pas convertie en méthane correspond à la conjugaison des processus de croissance et de lyse cellulaire de la biomasse anaérobie. La Figure III.1 schématise les processus biologiques auxquels est associée la production de méthane mesurée lors d'un test BMP. La biomasse anaérobie y est considérée de manière globale et notée X_{AD} .

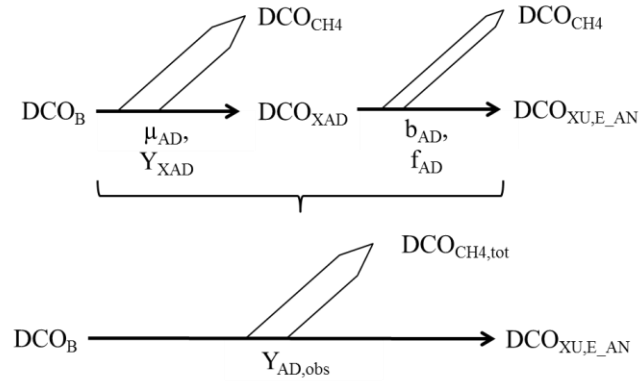


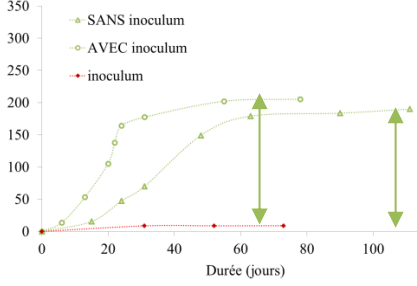
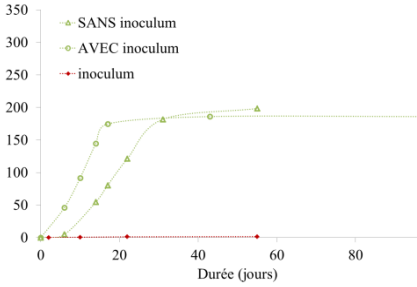
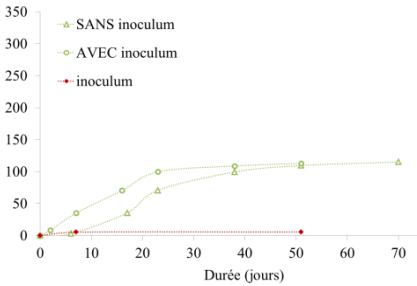
Figure III.1. Représentation schématique des processus de production de méthane

La part de DCO biodégradable non méthanisée peut alors être estimée par le produit du rendement global de conversion en biomasse anaérobie, Y_{XAD} exprimé en $gDCO_{XAD}.gDCO_B^{-1}$, et de la fraction de produits réfractaires endogènes produits lors de la lyse cellulaire, f_{AD} . Des valeurs de références sont données dans ADM1 (Batstone et al., 2002). Les valeurs maximales indiquées pour des rendements de conversion des acidogènes, des acétogènes et des méthanogènes sont respectivement de 0,15, 0,05-0,09 et 0,03-0,08 $gDCO_X.gDCO_B^{-1}$. En accord avec ces données, une valeur globale pour Y_{AD} de 0,2 $gDCO_{XAD}.gDCO_B^{-1}$ est utilisée. Ainsi, considérant que f_{AD} vaut 0,2 $gDCO_{XU,E_AN}.gDCO_{XAD}^{-1}$ (ADM1), la part de DCO_B qui n'est pas transformée en méthane lors d'un test BMP est inférieure à 4%. Cette valeur est comprise dans l'erreur de mesure de la DCO biodégradable par un test BMP (chapitre Matériels et Méthodes). Par conséquent, la DCO transformée en méthane est assimilée à la DCO biodégradable en anaérobie dans les conditions du test BMP.

Pour isoler et caractériser la matière organique réfractaire anaérobie contenue dans une boue donnée, les tests BMP ont été réalisés sans inoculum pour ne pas avoir l'empreinte des composés réfractaires apportés par l'inoculum (chapitre Matériels et Méthodes). Il a été préalablement démontré que l'inoculum n'était pas indispensable pour la biodégradation complète de la matière organique biodégradable lors d'un test BMP (Tableau III.1). Seuls le temps de latence avant le démarrage de la production de méthane et la cinétique de dégradation de la DCO sont modifiés. Les floes possèdent intrinsèquement toute la machinerie enzymatique et cellulaire nécessaire à la digestion anaérobie.

En éliminant ainsi la DCO biodégradable intimement mélangée avec la DCO réfractaire, cette méthode s'apparente donc à un moyen d'« extraire » la matière réfractaire d'un échantillon de boue.

Tableau III.1. Validation de la procédure de récupération de la matière organique réfractaire par test BMP réalisés sans inoculum

Caractéristiques des échantillons à digérer		Digestion anaérobie en batchs (tests BMP) avec ou sans inoculum ⁽¹⁾				DCO _{U,AN_obs} (%)	
Type de boue	Conditions de production ⁽²⁾	Production de méthane NmlCH ₄ .gDCO _{échantillon} ⁻¹	Nombre de fioles			avec	sans
			avec	sans			
Boue primaire (PS)	Décantation primaire → PS-A		5	3		44 ± 4	46 ± 2
	Eau usée traitée : Boue primaire diluée Âge de boue : 2 jrs → AS-B		2	2		44 ± 4	44 ± 1
Boue biologique (AS)	Eau usée traitée : ERU brute Âge de boue : 70 jrs → AS-H		2	2		67 ± 1	70 ± 2

(1) inoculum : purge d'un digesteur anaérobie alimentée par une boue activée, TSH de 20 jours

(2) ensemble des données dans le Tableau III.2

III.2.2 Facteurs impactant majeurs

L'eau résiduaire brute qui entre sur la STEP véhicule des composés organiques réfractaires, dits exogènes, dont la qualité et la quantité dépend du réseau d'assainissement. Les diverses configurations de la filière eau vont alors directement conditionner leur répartition au sein des différentes boues qui sont produites par les unités de traitement en place. Trois types de boues sont ici considérés : boue primaire (PS), boue primaire physico-chimique (CS), et boue biologique (AS). La Figure III.2 montre que les traitements primaires présents en amont du traitement biologique fractionnent le flux de matière organique de l'ERU brute. Les boues PS et CS purgées sont alors composées de molécules réfractaires exclusivement d'origine exogène dont la proportion sera directement liée à leurs propriétés physico-chimiques (décantables par simple gravité associée ou non à l'ajout de coagulants-floculants ciblant les colloïdes). Les boues AS, produites au niveau d'un procédé biologique, auront une composition très variable selon la nature de leurs alimentations (ERU brute, ERU décantée et ERU

décantée-coagulée) et leurs conditions de fonctionnement qui conditionnent le type de microorganismes actifs qui s’y développe et la quantité de composés réfractaires endogènes produits par leur métabolisme (Figure III.2).

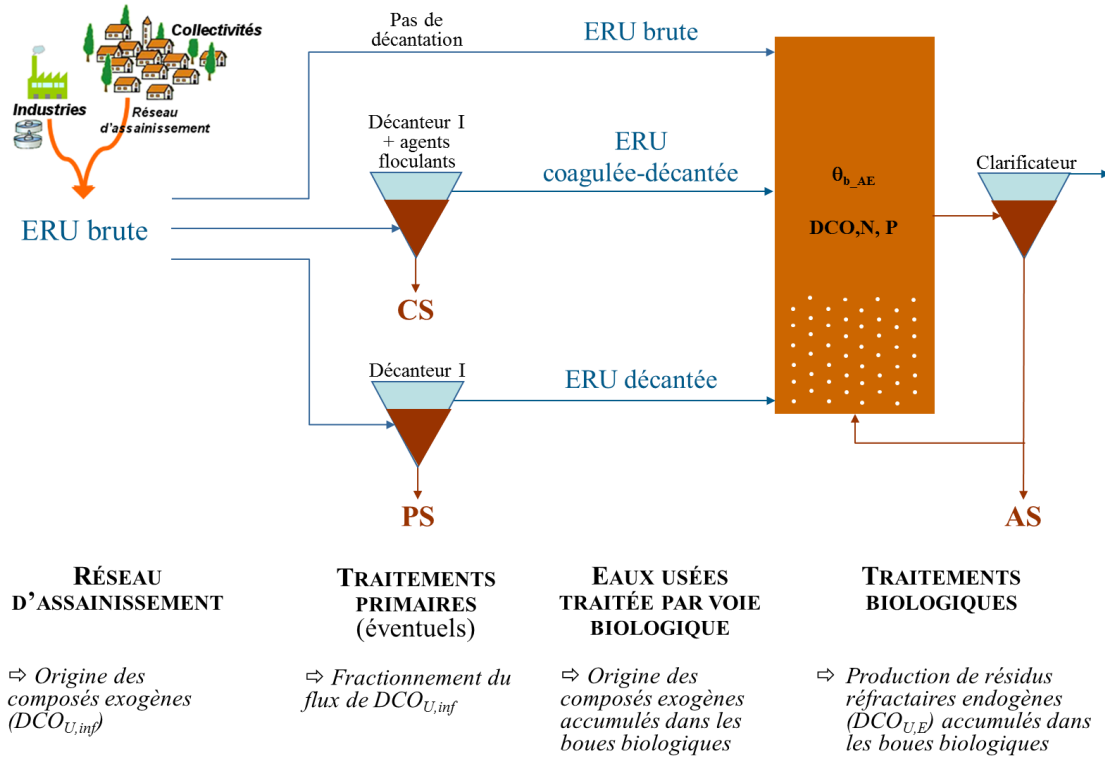


Figure III.2. Évolution des composés organiques au sein de la filière eau

L'enjeu de ce paragraphe est d'identifier dans quelle mesure la configuration d'une filière de traitement d'eaux usées impacte la teneur en matière organique réfractaire d'une boue. L'effet sur les caractéristiques de la matière sera analysé dans les paragraphes suivants. La quantification de la DCO réfractaire anaérobie a donc été réalisée sur un panel de boues prenant en compte les facteurs « filière eau » discutés précédemment : l'origine de l'eau usée et l'âge de boue. L'âge de boue conditionne fortement la production des composés réfractaires endogènes. Une large plage comprise entre 2 et 135 jours a été considérée. L'ensemble des caractéristiques des boues analysées sont consignées dans le Tableau III.2.

Tableau III.2. Caractéristiques de divers types de boues et de leurs fractions réfractaires anaérobies associées

		ORIGINE DES BOUES		CARACTÉRISTIQUES DE LA FILIÈRE EAU			CARACTÉRISTIQUES DES BOUES						CARACTÉRISTIQUES DES RÉFRACTAIRES ANAÉROBIES			
		STEP réelle	Pilote labo	Décantation primaire	Trait. combiné	θ_{b_AE} (jrs)	k_{BMP} (j^{-1})	MVS/ MES (%)	DCO/ MVS (g/g)	DCO _{U,AN}			Origine des composés réfractaires exogènes			MVS/ MES (%)
										Gamme (%)	Moyenne $\pm$ ET (%)	Fréquence de prélèvements	D	C	ND	
TRAITEMENTS PRIMAIRES	PS	A ⁽¹⁾					0,13	85-88	1,6-1,8	22-41	33 $\pm$ 7	4 fois sur 4 mois				61
		F ⁽⁵⁾								31	31		✓			
	CS	A ⁽¹⁾					0,11	70	1,42	16	16	1 fois	✓	✓		51
		J ⁽⁶⁾								20	20					
TRAITEMENTS BIOLOGIQUES	AS	A ⁽¹⁾		Oui	DCO	2-3	0,08	72-84	1,4-1,5	37 - 56	46 $\pm$ 6	4 fois sur 12 mois			✓	66
		B ⁽²⁾		Non	DCO	2-3	0,18	86	1,6		44 $\pm$ 3	1 fois	✓			52
		E ⁽²⁾		Non	DCO	5-7	0,10	86	1,5-1,8	60 - 68	64 $\pm$ 4	2 fois sur 1 mois	✓			55
		C ⁽³⁾		Non	DCO,N	8	0,11	74-84	1,5-1,6	49 - 61	56 $\pm$ 4	8 fois sur 4 mois	✓	✓	✓	
		D ⁽¹⁾		Oui	DCO	10	0,12	72-84	1,5	47 - 64	56 $\pm$ 6	5 fois sur 8 mois			✓	
		F ⁽⁴⁾				15				65	65					
		G ⁽¹⁾		Oui	DCO, N, P	15-20		74-75	1,7	68 - 73	70 $\pm$ 3	2 fois sur 2 mois			✓	
		H ⁽¹⁾		Non	DCO, N, P	70-135	0,09	74	1,56	69	69 $\pm$ 3	1 fois	✓	✓	✓	58
		OHO ⁽⁴⁾			DCO	2	0,09	88-91	1,2-1,6		26 $\pm$ 2	1 fois				

(1) STEP du sud de la France; (2) boues activées alimentées par une boue primaire; (3) boues activées alimentées par un mélange [boue primaire + DCO soluble biodégradable] (Perez, 2009); (4) boues activées alimentés par un mélange de composés carbonés totalement solubles et biodégradables (acétate de sodium/citrate de sodium/éthanol en proportion DCO : 2/1/1) ; (5) Ekama et al., 2009 ;(6) Dold et al., 2007

PS = boue primaire ; CS = boue physico-chimique ; AS = boue biologique; D = décantable ; C = coagulable ; ND = non-décantable ; AE = produit en aérobie ; AN = produit en anaérobie.

La teneur en DCO réfractaire (DCO_{U_AN}) contenue dans la boue primaire PS de la STEP A a été analysée sur une période significative. Une valeur comprise entre 22 et 41 % de la DCO totale souligne que pour un même ouvrage ce type de boue présente une forte variabilité (+/- 21%). Il est à noter que cette plage de données mesurées est de l'ordre de grandeur habituellement considéré (Dold et al., 2007, Ekama et al., 2009).

Cette fluctuation est directement liée à la physico-chimie des constituants de l'ERU qui conditionne leur décantabilité. Comme révélé par Ginestet et al. (2002) à l'échelle de 7 STEP françaises, le fractionnement physique des ERUs est très variable : 2 à 47% pour la fraction soluble (non-décantable et non coagulable), 0 à 70 % pour la fraction colloïdale (non-décantable mais coagulable) et 15 à 20 % pour la fraction particulaire (décantable). De plus, les fractions organiques biodégradables rapidement et lentement biodégradables, sur lesquelles sont basés les modèles de biodégradation, ne correspondent pas nécessairement aux fractions solubles et particulières des eaux usées (Sophonsiri et Morgenroth, 2004). À cela s'ajoute le rendement de séparation du décanteur lui-même fonction de son dimensionnement et des variations du régime hydraulique. Selon les auteurs (Dold et al., 2007; Ekama et al., 2009), les rendements d'élimination de la DCO particulaire réfractaire habituellement considérés sont aussi très différents, respectivement de 45 % et de 84 %. Tous ces paramètres contribuent à la fluctuation de la qualité et de la quantité des composés récupérés par simple décantation gravitaire et justifient le constat d'une telle variabilité de teneur globale en DCO réfractaire contenue dans une boue primaire.

L'addition de coagulants et de flocculants est généralement appliquée pour améliorer l'efficacité de la décantation primaire en favorisant l'agrégation entre autre des colloïdes en particules décantables. On désigne ces boues par le terme « boues physico-chimiques » (notées CS). La boue physico-chimique et la boue primaire décrite dans le Tableau III.2 ont été prélevées dans la même station (STEP A). Les composés organiques qui les constituent sont donc issus de la même ERU. La boue CS présente une teneur en DCO réfractaire de 16%, significativement inférieure à celle de la boue primaire (comprise entre 22 et 41%). La variabilité de cette teneur en DCO réfractaire n'a pas été évaluée expérimentalement. Néanmoins, elle est du même ordre de grandeur que celle proposée par Dold et al. (2007) (20 %, CS-J dans le Tableau III.2). Il est probable que la composition d'une boue physico-chimique soit plus constante du fait d'une meilleure stabilité des performances de séparation de la matière organique au niveau du décanteur. Enfin, la matière colloïdale, coagulable et décantable, semble préférentiellement biodégradable.

Restent les boues biologiques résultant du traitement d'eaux usées différentes (brute, décantée, coagulée-décantée). *A priori*, leur composition doit être très variable compte tenu de la qualité des eaux usées traitées et de l'âge de boue imposé au procédé. De manière globale, leur teneur en DCO réfractaire est comprise entre 46 et 70% de la DCO totale. Cette gamme est supérieure à celle

déterminée pour les boues primaires et physico-chimiques dont les valeurs oscillent entre 16 et 41%. La variabilité inter-station des boues biologiques est en accord avec la gamme trouvée dans la littérature établie entre 45 et 73% (Bougrier et al., 2008, Ekama et al., 2007, Gavala et al., 2003, Mottet et al., 2010, Astals et al., 2013).

Malgré tout, il est possible d'extraire des corrélations entre la teneur en DCO réfractaire d'une boue et les conditions opératoires du procédé. Sur la Figure III.3 est tracée la proportion de DCO réfractaire d'une boue en fonction de l'âge de boue du traitement dont elle a été purgée avant digestion anaérobie. La présence ou non d'une décantation primaire en amont du traitement biologique y est aussi indiquée. D'une manière générale, il apparaît clairement que la boue s'enrichit en DCO réfractaire avec l'augmentation de l'âge de boue moyen de la station. On observe également une réduction de la variabilité de la teneur en DCO réfractaire d'une boue issue d'une même STEP lorsque l'âge de boue augmente. Cette variabilité est alors de l'ordre de grandeur de l'incertitude de la mesure du test BMP (5%). Effectivement avec l'âge de boue, les variations impactant le contenu réfractaire d'une boue (qualité de l'eau, efficacité du décanteur primaire, purges de boues, ...) sont lissées.

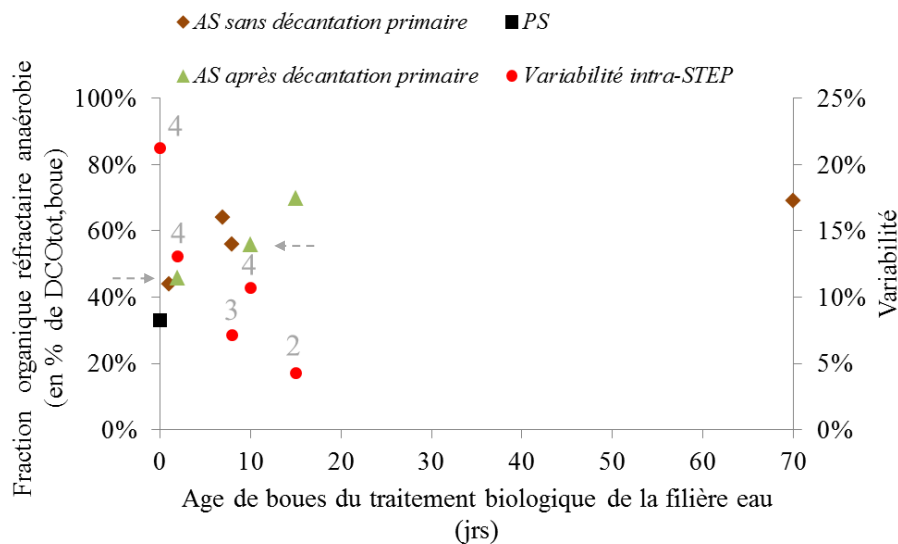


Figure III.3. Représentation de la teneur en réfractaire en fonction de l'âge des boues

Sur la base de nos résultats (qui mériteraient d'être étoffés), à un âge de boue donné, la présence ou non d'une décantation primaire en amont du traitement biologique ne semble pas impacter les teneurs moyennes en DCO réfractaire. En effet, les boues biologiques de la STEP A et du pilote B sont (i) produites à même âge de boue (inférieur à 3 jours) et (ii) respectivement alimentées par l'eau usée sortie du décanteur primaire et la boue primaire issue de ce même décanteur. Ces deux boues présentent une teneur en DCO réfractaire $DCO_{U,AN}$ moyenne équivalente de 46 et 44% respectivement (flèche en tirets à gauche de la Figure III.3). De manière similaire, les boues biologiques des STEP C et D (pour un âge de boue similaire compris entre 8 et 10 j) ont toutes deux une teneur en DCO réfractaire de 56 % (flèche en tirets à droite de la Figure III.3). Ces résultats sont

en faveur d'un fractionnement biologique de la matière conservée entre eaux usées décantées et boue primaire, comme proposé par Dold et al. 2007. En d'autres termes, le fractionnement biologique du particulaire décantable contenu dans l'ERU serait très proche de celui de la boue primaire et de l'effluent primaire.

Néanmoins, contrairement aux boues primaires ou physico-chimiques, la teneur et la composition de la DCO réfractaire sont affectées par les processus bactériens mis en jeu lors de l'épuration des eaux usées. Les cellules et les exopolymères concentrés sous forme de floccs sont effectivement des produits du métabolisme épuratoire. Les produits de la lyse cellulaire de ces microorganismes et les exopolymères récalcitrants constituent une source de matière organique réfractaire. Cette matière dite endogène s'ajoute aux composés réfractaires exogènes véhiculés par les eaux usées traitées (discutés précédemment). Cette fraction a été déterminée expérimentalement à travers la boue OHO (Tableau III.2) produite exclusivement sur un substrat totalement soluble et biodégradable. Cette boue d'âge de boue court (2 jours) est composée de 24 % de DCO réfractaire d'origine bactérienne. Cette valeur est cohérente avec la valeur habituellement considérée pour la fraction réfractaire d'une population bactérienne (Ramdani et al., 2010).

La quantité de matière organique réfractaire à la digestion anaérobie, estimée en DCO, comptabilise donc l'ensemble des composés organiques réfractaires contenu dans une boue d'épuration, sans distinction de leur origine exogène ou endogène. La proportion de ces composés est essentiellement liée à la qualité de l'eau usée traitée par le traitement biologique, aux paramètres cinétiques et stœchiométriques de croissance et de lyse de la biomasse active, et au temps de séjour des boues dans le procédé (θ_{b_AE}) qui borne le déroulement des divers processus.

La contribution quantitative des composés réfractaires endogènes et exogènes à la DCO réfractaire totale fera l'objet du chapitre 4.

III.3 LE FLOC REFRACTAIRE, UNE MATRICE BIOLOGIQUEMENT INERTE ?

Dans le cas d'un pool biologique actif équilibré, l'hydrolyse est considérée comme l'étape limitante de la réaction globale de transformation de la matière organique en méthane. La procédure d'obtention de la matière réfractaire consiste à faire une biodégradation anaérobie en batch au moins égale à 120 jours, durée au-delà de laquelle une production de méthane n'est plus détectable (Chapitre Matériels et Méthodes). Or, même si l'ensemble des populations hydrolytiques, acidogènes, acétogènes et méthanogènes a été actif au cours du test BMP, il n'est pas exclu qu'à terme, les processus de mort cellulaire affectent la capacité hydrolytique vis-à-vis de la matière organique résiduelle. Un test d'activité sur deux matrices réfractaires anaérobies a donc été réalisé. L'activité enzymatique et sa diversité sont directement liées à l'activité métabolique cellulaire. Ces enzymes sont synthétisées par

les cellules de manière permanente (constitutives) ou bien de manière induite (présence d'un substrat). Ces enzymes ont en général une durée de vie limitée et doivent être renouvelées. Par conséquent, le choix du substrat pour le test d'activité est délicat. Deux substrats solubles et biodégradables, le glucose et l'acétate, ont été choisis : le glucose, car c'est un substrat non spécifique de l'activité des bactéries acidogènes qui détiennent aussi la machinerie enzymatique d'hydrolyse ; l'acétate, tout simplement pour s'assurer qu'une activité méthanogène persiste puisque c'est à travers la production du méthane que la présence de DCO biodégradable est détectée et quantifiée. La procédure expérimentale est la même que pour un test BMP classique sauf que l'inoculum correspond à une matrice réfractaire et que le substrat à dégrader est soluble et biodégradable. Le Tableau III.3 donne les conditions de mises en œuvre et les données déduites des tests d'activités inoculés avec les matrices réfractaires AS-A_{U,AN} et AS-E_{U,AN} pour dégrader du glucose, de l'acétate ou un mélange des deux. Le temps de latence, le rendement de production de méthane et le rendement apparent de conversion en biomasse sont déduits des résultats expérimentaux présentés sur la Figure III.4.

Tableau III.3. Caractéristiques et résultats des tests d'activité réalisés sur les matrices réfractaires AS-A_{U,AN} et AS-E_{U,AN}

Caractéristiques des matrices réfractaires			Conditions initiales			Résultats			
Nom ⁽¹⁾	Origine des composés exogènes	θ _{b,AE} (jours)	Substrat biodégradable	Masse de DCO substrat	S/Xu ⁽²⁾ gDCO. gDCO ⁻¹	Temps de latence <i>jrs</i>	Volume cumulé de CH4 produit <i>Nml.gDCO⁻¹</i>	DCO _{CH4} <i>gDCO_{CH4}. gDCO⁻¹</i>	Y _{AD,obs} <i>gDCO_U. gDCO⁻¹</i>
AS-A _{U,AN}	Fraction non décantable de l'ERU de la STEP A	2-3	Acétate	1 g	0,7	7	329	0,94	0,06
			Glucose		1,4	16	250	0,71	0,29
					0,7	13	256	0,73	0,27
			Glucose + Acétate (1 : 1)		0,7	12	306	0,87	0,13
AS-E _{U,AN}	Fraction décantable de l'ERU de la STEP A	5	Acétate	1 g	14	16	341	0,97	0,03
					7	11	329	0,94	0,06
			Glucose		14	18	261	0,75	0,25
					7	14	276	0,79	0,21
			Glucose + Acétate (1 : 1)		7	11	284	0,81	0,19

(1) données des boues avant digestion consignées dans le Tableau III.2

(2) S/Xu correspond au rapport de la quantité de substrat biodégradable apportée (S) sur la quantité de matière réfractaire inoculée (Xu)

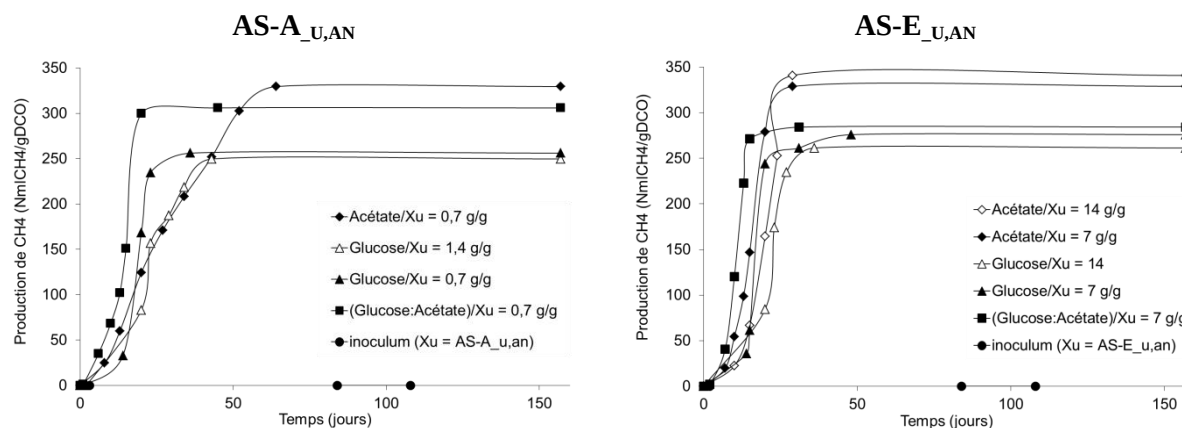


Figure III.4. Tests d'activités réalisées sur les matrices réfractaires anaérobies AS-A_{U,AN} et AS-E_{U,AN}

Le résultat majeur est qu'après 120 jours de batch anaérobie, les activités biologiques acidogènes et méthanogènes demeurent présentes dans les matrices réfractaires. Par conséquent, au sein de la matrice réfractaire particulière d'une boue sont encore immobilisées des bactéries acidogènes qui possèdent certainement la capacité de synthétiser des enzymes hydrolytiques. Il aurait été intéressant de tester successivement d'autres substrats nécessitant une hydrolyse préalable tels que des protéines ou des polymères de sucre. Par ailleurs, les substrats étant parfaitement solubles, la phase de latence en début de tests témoigne de probables mécanismes de réactivation métabolique de ces microorganismes.

Reste en suspens la question de la mise en contact entre l'enzyme et les substrats potentiellement, rendue difficile voire impossible par l'immobilisation respective des deux réactants : l'enzyme associée à la membrane de la cellule et la molécule « substrat » immobilisée dans la matrice constitutive du floc. Il est probable que la résistance de certains composés organiques constitutifs de la matrice réfractaire soit liée à l'inaccessibilité de ces molécules immobilisées par le jeu d'interactions fortes et/ou à la chimie de ces molécules qui seraient alors réfractaires à toute assimilation bactérienne. Des ajouts d'enzymes à large spectre pourraient permettre de répondre à ces questions.

III.4 LA MATIERE REFRACTAIRE, UNE MATIERE AGREGEE ?

III.4.1 Caractéristiques physiques de la matière réfractaire

La matière réfractaire d'une boue d'épuration est obtenue par digestion anaérobie en batchs de plus de 120 jours comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Un fractionnement physique de cette matrice a été établi sur 35 fioles de digestion anaérobie des boues primaires et biologiques (correspondant aux boues A, B, D, E et H du Tableau III.3). Ce fractionnement physique a trois composantes : particulaires (culot de centrifugation sous 4200 g), colloïdales et soluble (surnageant de centrifugation filtré à 0,2 μm). Les résultats sont présentés sur la Figure III.5. Suite au processus de biodégradation, seul $15 \pm 5\%$ de la DCO totale réfractaire se retrouve sous une forme colloïdale et soluble, cette dernière forme étant majoritaire (70 %). Ce résultat est similaire pour les boues primaires et secondaires et est indépendant de la configuration de la filière et de la composition de l'ERU ou encore de la biodégradabilité intrinsèque de la boue.

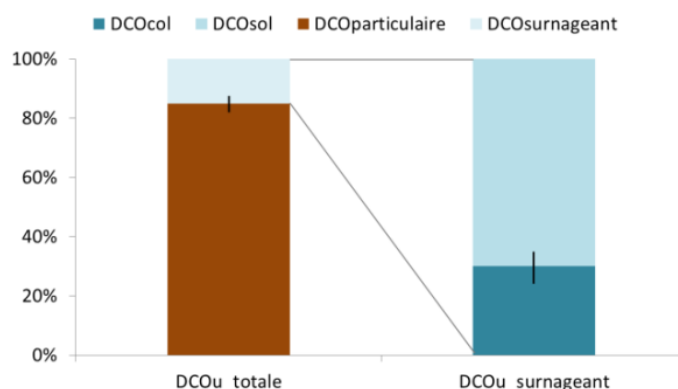
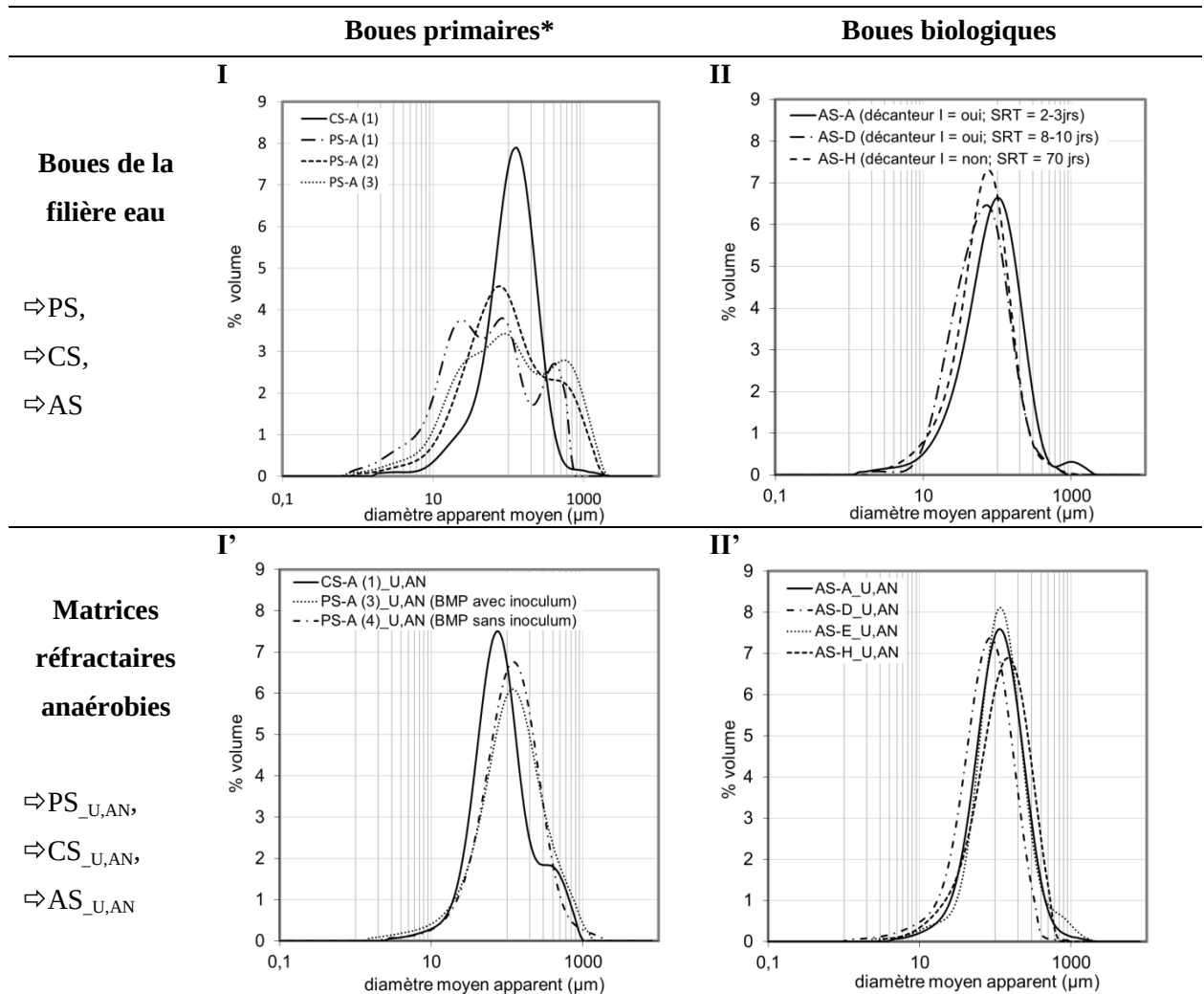


Figure III.5. Fractionnement physique de la DCO réfractaire anaérobie de boues PS et AS (n=35)

Les composés organiques réfractaires contenus dans le floc biologique demeurent donc majoritairement agencés sous la forme de particules et les processus de dégradation avancée n'aboutissent pas une déconstruction complète du floc. Cette question a été approfondie à travers l'analyse granulométrique des flocs qui permet de caractériser la distribution en volume des tailles de particules. Cette distribution de taille a d'ailleurs été comparée entre des flocs avant et après digestion anaérobie, pour évaluer l'impact des processus de biodégradation sur la structure particulaire initiale. Le Tableau III.4 présente ainsi les analyses granulométriques de la boue primaire et physico-chimique de la STEP A et des boues biologiques A, D et H, avant et après leur digestion anaérobie ultime.

Tableau III.4. Analyses granulométriques de boues primaires, obtenues par simple décantation (PS) ou combinées à l'ajout d'agents flocculants (CS), de boues biologiques (AS) et de résidus réfractaires de boues d'épuration (PS_{U,AN}, CS_{U,AN}, AS_{U,AN})



*le numéro entre parenthèse indique différentes dates de prélèvement pour des boues primaires PS, CS,

La granulométrie d'une boue primaire présente une distribution multimodale qui témoigne de l'hétérogénéité de la taille des particules de ce type de matrice, majoritairement fibrillaires et flocculées (figure ci-dessous).

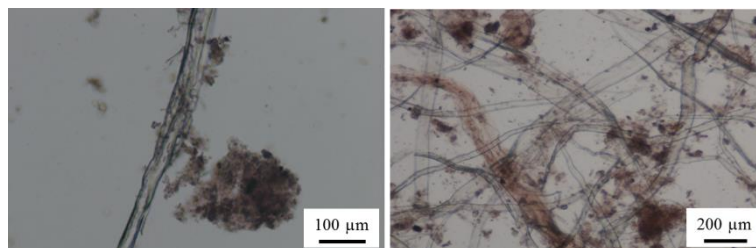


Figure III.6. Observations au microscope optique de la boue primaire PS-A*

Il est intéressant de noter que la granulométrie des particules décantables de l'ERU de la STEP A (PS-A) est comparable à celle mesurée par Guellil et al. (2000). La comparaison de la distribution granulométrique des boues primaires et physico-chimiques de la STEP A, prélevées le même jour

« (1) », met en évidence l'impact d'un agent chimique coagulant sur l'état d'agrégation de la matière. Il y a floculation et formation de floccs dont la distribution de taille est unimodale et centrée autour d'un diamètre moyen de 130 μm . Ce type de floccs présente une distribution apparente de taille proche de celle d'une boue biologique (figure II du Tableau III.4). Il est intéressant de constater que des processus chimiques ou biologiques de floculation aboutissent à un même état d'agrégation. Il est à noter que l'action floculante des processus biologiques en condition anaérobie est aussi mise en évidence par l'état d'agrégation de la matière organique de la boue primaire en fin de test BMP (PS-A_{U,AN} de la figure I' du Tableau III.4). En effet, la distribution de taille des particules est alors unimodale et centrée autour d'un diamètre moyen de 113 μm .

Concernant l'état floculé des boues biologiques, elle présente toujours des distributions unimodales centrées sur un diamètre moyen compris entre 75 et 113 μm , relativement similaires et indépendantes de l'âge de boue (ici compris entre 2 et 70 jours), de la configuration de la filière (traitement combiné, décantation primaire) ou encore de leur teneur en matière organique réfractaire (DCO_{U,AN} de 46 à 70 %). Cette gamme est d'ailleurs en accord avec des données de la littérature (Guan et al., 1998, Guellil et al., 2001, Jorand et al., 1995).

Après biodégradation anaérobie, la matière organique de boues biologiques demeure floculée. La distribution de taille n'est pas significativement modifiée malgré la conversion massive de la matière organique de départ en méthane (30 à 54 %). La digestion des particules chimiquement coagulées aboutit au même résultat. Cette absence d'effet de la biodégradation sur l'état floculé de la matière contraste avec l'impact sur celle de la boue primaire. En effet, la comparaison des profils granulométriques, avant et après digestion anaérobie long terme de la boue primaire présentés dans le Tableau III.4, révèle que parallèlement à la consommation de la matière biodégradable, la matière réfractaire s'agrége. Les composés réfractaires sont alors floculés et présentent des caractéristiques granulométriques similaires à celles des boues biologiques. De plus, il est intéressant de signaler que la biofloculation des composés réfractaires de la boue primaire est constatée en présence ou non d'un inoculum floculé lors du test BMP (figure I') et indépendamment de la variabilité du profil granulométrique de la boue primaire avant digestion (PS-A (1), (2) et (3) sur la figure I par rapport à PS-A_{U,AN} (2) et (3) de la figure I' du Tableau III.4).

En conclusion, malgré leur diversité d'origine et les proportions variables en molécules réfractaires endogènes et exogènes, les matrices réfractaires de boues d'épuration obtenues en conditions anaérobies convergent toutes vers une structure floculée dont la distribution de taille est similaire, centrée autour d'un diamètre moyen compris entre 73 et 113 μm . De plus cette structure floculée est similaire à la structure de floccs biologiques avant digestion. Par conséquent l'état floculé n'est pas un critère discriminant du caractère réfractaire. Néanmoins, sous cette apparence floculée commune, il

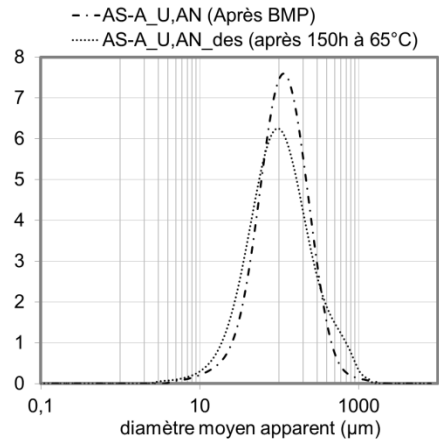
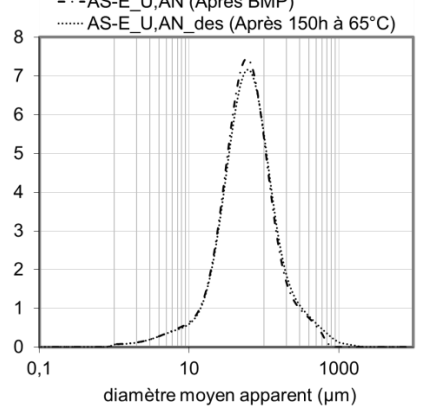
n'est pas exclu que se cachent des mécanismes physico-chimiques structurants différents et des molécules de chimies différentes. Cette analyse fait l'objet des chapitres 5 et 6.

III.4.2 Stabilité de la structure floculée réfractaire

La chimie des composants d'un agrégat conditionne les types de liaisons intermoléculaires qui assurent le maintien de sa structure. Compte tenu de leur diversité chimique, les liaisons mises en jeu sont multiples (Van der Waals, hydrogènes, ioniques, hydrophobes, covalentes). La stabilité élevée de l'ensemble résulte de leur combinaison ou de leur association. L'exemple d'une fibre de cellulose, molécule présente dans la composition des boues primaires, peut être cité. En effet, si la rupture d'une liaison hydrogène requiert théoriquement peu d'énergie, le nombre et l'agencement intra et intermoléculaires de ces liaisons entre les unités anhydroglucoses d'une fibre de cellulose lui confère sa résistance mécanique et sa très faible solubilité. Cette structure est d'ailleurs considérée comme un des facteurs à l'origine de sa récalcitrance (Chang et al., 2000, Hall et al., 2010).

Un test de stabilité de la structure floculée a été appliqué à diverses matrices réfractaires de boues biologiques. Il consiste à appliquer une température de 65°C pendant 150 h. La procédure est décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes. La quantification de la DCO solubilisée et l'analyse granulométrique des matrices ont été réalisées tout au long du test (0, 24, 48, 72 et 150h). Le Tableau III.5 présente les résultats obtenus pour les résidus réfractaires anaérobies des boues biologiques AS-A, AS-E et AS-H respectivement alimentées par une ERU décantée, une boue primaire et une ERU brute (Tableau III.2). Pour plus de lisibilité, seuls les résultats avant traitement et après 150h à 65°C (indiqué par l'indice « _des ») sont présentés car aucune différence significative n'a été décelée aux temps intermédiaires.

Tableau III.5. Stabilité de la structure apparente de matrices réfractaires anaérobies de boues biologiques

Matrices réfractaires anaérobies ⁽¹⁾	Origine composés réfractaires exogènes	$\theta_{b,AE}$ (jours)	Potentiel de solubilisation de 65°C pendant 150h (% DCO traitée)	Caractéristiques granulométriques (% volume)
AS-A _{U,AN}	ERU décantée de la STEP A	2-3	0 %	
AS-E _{U,AN}	Fraction décantable de l'ERU brute de la STEP A (boue primaire PS-A)	5	0 %	

(1) données des boues avant digestion anaérobie consignées dans le Tableau III.2

Un potentiel de solubilisation nul et la conservation de la distribution en volume des tailles des agrégats réfractaires après 150h à 65°C démontrent que les interactions chimiques mises en jeu entre les molécules réfractaires sont fortes et confèrent une stabilité structurelle aux flocs, indépendamment de leurs origines. Une déconstruction de ces agrégats nécessitera donc une énergie importante ou l'action de réactifs particuliers. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans les travaux de solubilisation avancée de la matière organique d'une boue (Camacho et al., 2005, pour la température; Sahli, 2003 et Paul et al., 2006, pour l'ozone). Le potentiel de solubilisation de la température au-delà de 150 °C ou de l'ozone y est clairement démontré.

III.5 CONSTRUCTION DE LA STRUCTURE FLOCULEE REFRACTAIRE

Les travaux de Perez (2009) précédemment menés au laboratoire ont mis en évidence que 80% de la DCO biodégradable contenue dans un floc de boues activées pouvaient être solubilisés sous l'action d'une température modérée (65°C) appliquée pendant une durée de 150 h. La matrice particulière résiduelle, non solubilisée à 65°C, est alors majoritairement réfractaire à la digestion anaérobie comme l'illustre la Figure III.7. adaptée de Perez (2009). Les auteurs présentent cette matrice réfractaire, qui s'est formée au cours du procédé de traitement biologique au niveau de la filière eau, comme l'équivalent d'un squelette tridimensionnel résistant aux attaques enzymatiques, et sur lequel ou dans lequel se fixeraient cellules et molécules biodégradables. Les processus mis en jeu lors de la solubilisation combinent désorption et hydrolyse chimique et enzymatique des molécules biodégradables et des cellules (Dumas et al., 2010).

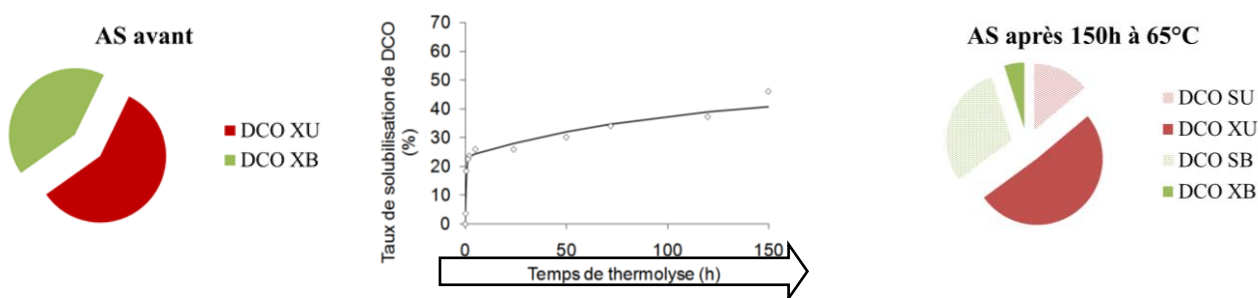


Figure III.7. Sensibilité différenciée de la DCO biodégradable et réfractaire d'une boue biologique lors d'une procédure de solubilisation de 150h à 65°C

Une désorption à 65°C est donc une méthode simple pour séparer la fraction biodégradable de la fraction réfractaire d'une boue : la première passe majoritairement en solution tandis que la seconde demeure sous forme particulaire (Figure III.7 adaptée de Sergio, 2009).

Cette méthode a été utilisée ici (1) pour évaluer le rôle respectif de la DCO biodégradable et de la DCO réfractaire dans la structure floculée d'une boue, et (2) pour identifier des changements dans cette structure en fonction de l'âge de boue (proportion de DCO réfractaire variable, composition en cellules et EPS).

La démarche est alors explicitée dans la Figure III.8. Une même boue biologique, AS, subit d'une part, un test de solubilisation pour extraire du floc l'essentiel de la fraction biodégradable de la DCO et d'autre part, un test BMP pour éliminer cette même fraction par des processus biologiques anaérobies. Les matrices après solubilisation à 65°C et digestion anaérobie sont respectivement notées AS_{des} et AS_{U,AN} comme indiqué sur la Figure III.8.

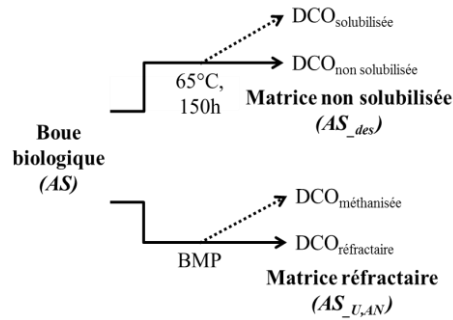


Figure III.8. Tests de stabilité : Démarche et nomenclature

Les distributions granulométriques en volume obtenues après solubilisation à 65°C ou biodégradation de la matière organique des deux boues biologiques, AS-A et AS-H, sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.6. Stabilité de la structure apparente de matrices réfractaires aérobies et anaérobies

Boues biologiques ⁽¹⁾	Origine composés réfractaires exogènes	θ_{b_AE} (jrs)	Potentiel de solubilisation		Caractéristiques granulométriques (% volume)
			65°C ; 150h	BMP	
			% en $gDCO_{solubilisée} \cdot gDCO_{échantillon}^{-1}$	% en $gDCO_{CH_4} \cdot gDCO_{échantillon}^{-1}$	
AS-A	ERU décantée de la STEP A	2-3	51 %	52 %	
AS-H	ERU brute de la STEP H	70	31%	30 %	

(1) Caractéristiques des boues consignées dans le Tableau III.2

Quelle que soit l'expérience, la distribution de taille des floes n'est pas significativement modifiée. Ces résultats démontrent que le rôle des molécules solubilisables et biodégradables n'est pas prépondérant dans la stabilité de la structure floculée. L'état floculé et sa stabilité sont directement liés

à l'agencement de molécules réfractaires exogènes et endogènes qui contribuent à la matrice réfractaire globale. Cet agencement semble être piloté par un processus de bio-floculation. Compte tenu de l'effet de la digestion anaérobie sur la distribution de taille de particules d'une boue primaire discuté précédemment (figure I' présentée dans le Tableau III.4), ce processus de biofloculation est présent aussi bien en anaérobie qu'en aérobie. De plus, le constat de cette structure dès l'utilisation d'âges de boues courts (2-3 jrs pour la boue AS-A) indique que le mécanisme de biofloculation est rapide. Il est probable que certaines bactéries excrètent rapidement parmi les EPSs des molécules résistantes qui, combinées avec la matière organique réfractaire exogène, constitueraient cette structure stable.

Toutefois, l'obtention d'un même squelette en aérobie et en anaérobie (sur la base des analyses granulométriques) ne garantit pas que les liaisons en jeu et la nature des composés soient du même type. Cette question nécessite une étude plus approfondie de la chimie des composés réfractaires endogènes en relation avec l'environnement aérobie ou anaérobie.

III.6 NATURE BIOCHIMIQUE DE LA MATIERE REFRACTAIRE, UN SUBSTRAT INAPPROPRIE ?

La chimie des composés organiques est un rempart possible à leur biodégradation. L'objectif est donc ici de caractériser les constituants de la matière réfractaire.

Le rapport MVS/MES a été mesuré pour les matrices réfractaires anaérobies de différentes boues d'épuration (Tableau III.2). Il est compris entre 51 et 66 % et n'offre aucune information discriminante sur la qualité des différentes fractions réfractaires.

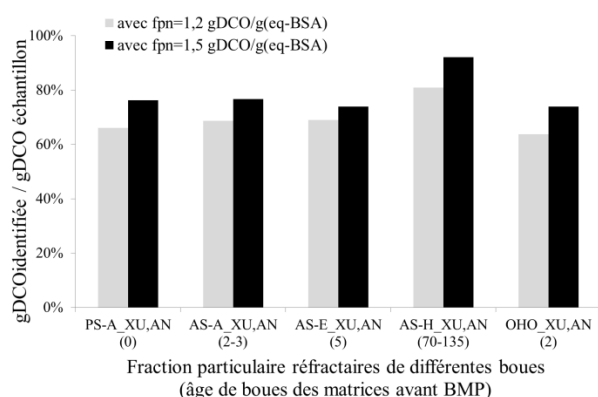
En accord avec Elfsiniotis et Odman (1994), Frolund et al. (1996), Mottet et al. (2010), Huang et al. (2010), Jimenez et al. (2013), les principaux composants des boues (primaires, biologiques aérobies ou anaérobies) sont les protéines, les polysaccharides, les lipides et les substances humiques. Le dosage des protéines-like, polysaccharides-like et substances-humiques-like a donc été réalisé pour caractériser l'empreinte biochimique des matrices organiques réfractaires de certaines boues.

Pour cela, des dosages colorimétriques, largement utilisés dans la littérature pour établir ce type de fractionnement biochimique des fractions soluble et particulaire de boues biologiques, ont été utilisés. Ces dosages colorimétriques font appel à des étalons : la BSA (albumine de serum bovin) pour les protéines, le glucose pour les polysaccharides et un acide humique commercial pour les substances humiques. Ras et al. (2007) ont validé, par comparaison avec d'autres protéines, que la BSA est un étalon externe approprié pour quantifier les protéines rencontrées dans ce type de matrice. Ainsi, les

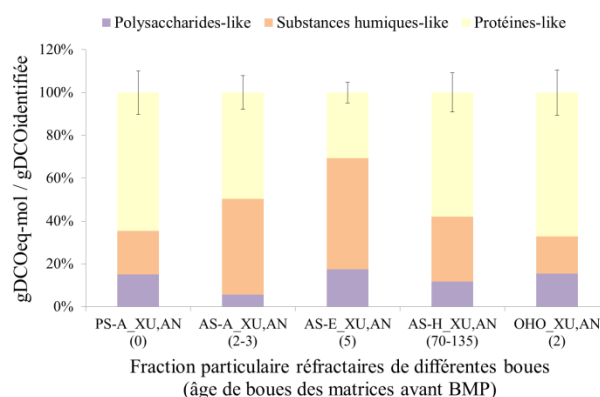
résultats sont respectivement exprimés en équivalent-BSA avec la méthode Lowry, en équivalent-glucose avec la méthode Anthrone et en équivalent-AH (Acide Humique commercial) avec la méthode Lowry modifié. La proportion de DCO identifiée est calculée en considérant les facteurs de conversion en DCO suivants pour chaque famille de molécules : $1,1 \text{ gDCO} \cdot \text{gAcide humique}^{-1}$; $1,1 \text{ gDCO} \cdot \text{gPolysaccharides}^{-1}$; $1,2 \text{ à } 1,5 \text{ gDCO} \cdot \text{gProtéines}^{-1}$ (gamme de variabilité en accord avec Annexe 8).

Le terme « like » est utilisé pour rappeler que le principe de quantification repose sur l'utilisation d'une calibration externe réalisée avec une molécule étalon pour chaque type de dosage et qu'aucun étalon interne ne peut être mis en œuvre et garantir la validité qualitative et quantitative de ces différents dosages colorimétriques. D'ailleurs, comme le soulignent Jimenez et al. (2013), le choix de la technique de dosage peut aussi induire une variabilité quantitative des résultats pour une même matrice analysée.

A- Pourcentage identifiée



B- Empreinte biochimique de la fraction identifiée



Nombre entre parenthèses : âge de boues des matrices avant digestion (Conditions de fonctionnement et d'alimentation des matrices avant digestion consignées dans le Tableau III.2).

Figure III.9. Empreintes biochimiques de la fraction particulaire des matrices réfractaires anaérobies des boues⁽¹⁾ PS-A, AS-A, AS-B, AS-E, AS-H et OHO

Il est évident que l'analyse des polysaccharides, des protéines et des acides humiques ne couvrent pas l'ensemble des molécules organiques réfractaires présentes dans les boues (Dignac et al., 1998). Toutefois, la Figure III.9-A montre que le dosage de ces trois familles de molécules permet d'identifier plus de 60% en $\text{gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$, de la matière organique réfractaire des fractions particulières.

La Figure III.9-B présente les empreintes biochimiques en $\text{gDCO}_{\text{eq-molécules}} \cdot \text{gDCO}_{\text{identifiée}}^{-1}$ pour les matrices particulières réfractaires anaérobies de la boue primaire PS-A (exempte de composés réfractaires endogènes aérobie), de la matrice OHO (exempte de composés réfractaires exogènes) et des différentes boues biologiques AS-A, AS-B, AS-E, AS-H produites à des âges de boues de 2-3, 5 et 70 jours.

Indépendamment des conditions d'alimentation et de production des matrices avant digestion, les polysaccharides-like n'excèdent pas 20% de la matière organique réfractaire particulière caractérisée. L'empreinte de la matrice $OHO_{XU,AN}$ indique que l'origine de ces composés n'est pas uniquement exogène et que l'accumulation de résidus endogènes peut aussi contribuer à la teneur globale de polysaccharides-like dans une matrice réfractaire de boue. Leur origine exogène tient probablement majoritairement aux résidus cellulotiques contenue dans une ERU dont la biodégradabilité peut être limitée par divers mécanismes (Chang et al., 2000, Hall et al., 2010). La Figure III.10 illustre que des résidus fibreux peuvent d'ailleurs demeurer présents au sein de la matrice réfractaire anaérobie d'une boue primaire.

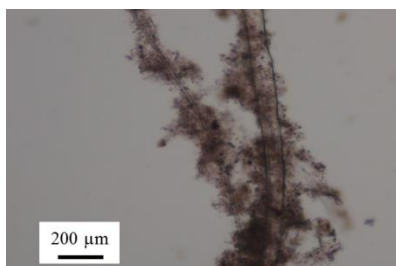


Figure III.10. Observation au microscope optique du résidu réfractaire de la boue primaire PS-A*

Le type d'eau usée traitée pourrait aussi impacter la qualité et la quantité des composés polysaccharidiques-like dans les matrices réfractaires. Toutefois, les dosages colorimétriques ne permettent pas de préciser la diversité moléculaire de cette famille de composés au sein des différentes matrices.

De manière globale, les composés de types protéiques et humiques marquent significativement la nature biochimique de la matière organique particulière réfractaire à la digestion anaérobie.

D'un point de vue chimique, les substances humiques sont caractérisées par une proportion abondante de cycles aromatiques. Elles résultent de l'assemblage en supramolécule de petites unités par des liaisons faibles (van der Waals, π - π) (Piccolo et al., 2002). L'origine des composés humiques-like dans les boues d'épuration est généralement assimilée à une origine exogène et souvent attribuée aux fibres lignocellulosiques présentes en forte proportion dans les ERU (21 % du carbone organique total pour l'eau usée caractérisée par Huang et al., 2010). Néanmoins, la réponse positive au dosage Lowry-modifié de molécules présentes au sein de la matrice cellulaire $OHO_{XU,AN}$ (exempte de composés exogènes) met en évidence que des composés d'origine bactérienne présentent une chimie similaire aux substances humiques et peuvent aussi contribuer à enrichir la matrice réfractaire globale en composés aromatiques.

Par ailleurs, compte tenu de la forte proportion en composés protéiques-like dans l'empreinte biochimique de $OHO_{XU,AN}$, la fraction endogène d'une boue contribuera probablement significativement à la fraction protéique de la matrice réfractaire globale. Toutefois, l'empreinte de

PS-A_{XU,AN} (matrice réfractaire d'une boue primaire) présente une forte proportion en composé protéiques. L'empreinte de PS-A_{XU,AN} souligne ainsi qu'une part significative des composés réfractaires d'origine exogène peut être de nature protéique (origine cellulaire, animale, végétale...).

Malheureusement, comme pour les composés réfractaires polysaccharides-like, les dosages colorimétriques ne permettent pas de rendre compte de la diversité moléculaire au sein des fractions protéiques et humiques quantifiées pour les différentes matrices réfractaires. Ainsi au-delà même de la question de la validité quantitative des résultats, les empreintes biochimiques obtenues par dosages ne permettent pas à elles seules de répondre à la question suivante : à empreintes quantitatives équivalentes, les matrices PS-A_{XU,AN} et OHO_{XU,AN}, ou AS-E_{XU,AN} et AS-H_{XU,AN} sont-elles chimiquement équivalentes ?

Enfin, du point de vue quantitatif, il est important de souligner que les empreintes biochimiques présentées dans la Figure III.9-B ne tiennent pas compte de la variabilité intra-STEP attribuable à chaque matrice réfractaire considérée. Par ailleurs, les barres d'erreurs qui encadrent la teneur en protéines soulignent que la valeur du facteur de conversion f_{PN} qui oscille entre 1,2 et 1,5 gDCO.g(protéines)⁻¹ dans la littérature induit une variabilité quantitative supplémentaire des empreintes. Toutefois, même si des questions quantitatives peuvent légitimement être posées, nos résultats indiquent que la filière peut avoir un impact sur la nature biochimique d'agréats réfractaires d'origines différentes. À titre d'exemple, les empreintes significativement différentes de AS-E_{XU,AN} et OHO_{XU,AN} peuvent être citées.

L'utilisation des dosages biochimiques pour caractériser les agrégats réfractaires issus de la digestion anaérobie de boues d'épuration a permis de qualifier semi-quantitativement et partiellement la nature biochimique de leurs composés organiques. De plus, la mise en évidence d'un effet filière contraste avec son absence d'effet sur la structure apparente de leur agencement floculé pourtant conditionné par la chimie des composés. Au demeurant, il est toujours impossible de distinguer les molécules réfractaires endogènes et exogènes. À l'issue de cette analyse, il est donc apparu nécessaire d'explorer d'autres approches de caractérisation pour améliorer la différenciation chimique des molécules composant des matrices réfractaires d'origines différentes. Ces approches seront développées dans les chapitres suivants.

III.7 CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce chapitre était de mieux cerner le caractère réfractaire des boues en relation avec la filière eau. Le critère était la proportion de matière réfractaire dans la boue.

Pour englober l'ensemble des configurations possibles, les boues analysées ont été prélevées sur des stations d'épurations ou « construites » à partir de pilotes de laboratoires aux conditions de fonctionnement contrôlées. Le jeu de boues était constitué de boues primaires et de boues biologiques. Les boues biologiques ont été produites pour des conditions d'alimentation des installations volontairement très différentes (ERU brute, ERU décantée, eau synthétique) pour une gamme d'âge de boues large (2 à 75 jours). Toutes ces boues ont présenté des différences très marquées vis-à-vis de leur teneur en matière organique réfractaire.

Les boues primaires, coagulées ou non, sont les boues dont les proportions en matière organique réfractaire sont les plus faibles (respectivement $33 \pm 7 \%$ et 16%). Ce résultat était attendu, en accord avec les données de la littérature. Cette matière réfractaire est composée de molécules réfractaires intrinsèques aux eaux usées. Pour les boues biologiques, la teneur en matière organique réfractaire est plus élevée et dépendant de l'âge de boue. Plus l'âge de boue est important, plus les processus de dégradation sont avancés (molécules lentement hydrolysables (X_B) et lyse cellulaire (X_{OHO})) et plus l'accumulation de molécules réfractaires est prononcée. La boue s'enrichit proportionnellement en molécules réfractaires exogènes et endogènes. La teneur en DCO réfractaire tend vers 70% avec l'augmentation de l'âge de boue. Sur la base de nos résultats, la décantation primaire ne semble pas avoir d'effet significatif sur la teneur en DCO réfractaire d'une boue biologique à même âge de boue. Ce résultat suggère que le fractionnement physique imposé par le décanteur ne s'accompagne pas d'une modification du fractionnement biologique, comme cela avait été proposé par Dold et al. (2007). Toutefois, ce résultat mériterait de démultiplier les mesures.

La cohérence de ces résultats expérimentaux vis-à-vis de la configuration de la filière d'épuration sera à nouveau évaluée dans le chapitre 4 à travers l'outil de simulation Biowin et la détermination des proportions en fractions endogène et exogène.

Les résidus réfractaires ont été obtenus en condition anaérobie sans inoculum. Leurs propriétés n'ont pas été altérées par le test BMP qui s'avère finalement une méthode « douce » d'isolement de la matière réfractaire par biogazéification de la matière biodégradable. Cette matière peut être caractérisée sans crainte d'interférences.

Les molécules réfractaires sont principalement des polymères de nature protéique, polysaccharidique ou encore aromatique. Ces molécules sont pour l'essentiel agencées sous la forme de particules ($85 \pm 5\%$) de tailles apparentes identiques à celles des floes d'origines, et similaires pour tous les résidus réfractaires. La structure de ces agrégats n'est pas discriminante. Nos résultats associés à ceux

de Perez (2009) suggèrent un processus générique de construction d'un floc bactérien, qui se trouverait à l'origine de l'organisation matricielle des molécules réfractaires. Le mécanisme de biofloculation est un mécanisme rapide présent en condition aérobie ou anaérobie. Les cellules excrètent des substances polymériques exocellulaires en partie résistantes à toute attaque enzymatique. Simultanément à leur excrétion, ces molécules interagiraient avec les molécules présentes réfractaires ou biodégradables formant une matrice intimement liée. La stabilité structurelle du floc serait assurée par ce réseau de molécules insensibles à la température (65°C) et à l'hydrolyse enzymatique (détection d'une activité cellulaire acidogène résiduelle). Ce réseau s'apparente à un squelette et constitue une caractéristique commune à tous les flocs des boues étudiées. La question quant à l'impact de cet agencement sur le caractère réfractaire de ces molécules reste néanmoins posée. Une déconstruction permettrait d'y répondre. D'après la littérature, des traitements drastiques sur boue entière (biodégradable et réfractaire) augmentant le potentiel de méthane intrinsèque iraient dans ce sens (Carrère et al., 2008, Bougrier et al., 2006).

Reste qu'au-delà de cette similitude structurelle entre les matrices réfractaires, leurs compositions biochimiques diffèrent. Globalement, les fractionnements obtenus soulignent une forte contribution des composés humiques-like et protéiques-like mais dans des proportions variables. Toutefois, il faut reconnaître que ces méthodes d'analyses moléculaires par familles de molécules fournissent une empreinte partielle et pauvre en regard de la probable diversité moléculaire au sein de la matière organique. De plus, l'état agrégé des molécules soulève la question de la fiabilité qualitative et quantitative de ces dosages biochimiques.

Par conséquent, un effort doit être fait pour améliorer la connaissance de la chimie de ces molécules réfractaires. Ceci fera l'objet des chapitres 5 et 6 à travers deux approches complémentaires, l'une non destructive avec la spectrométrie infrarouge de type ATR-FT-MIR (spectrométrie à Transformée de Fourier en Moyen InfraRouge mesurée en Réflection Totale Atténuée) et l'autre basée sur une déconstruction thermochimique de l'agrégat réfractaire.

IV.

Production de matrices organiques réfractaires contrastées

IV.1 INTRODUCTION

La teneur en matière organique réfractaire d'une boue est définie dans le cadre de ce travail comme la quantité de matière organique qui n'est pas méthanisée lors d'un test BMP de plus de 120 jours. Elle est calculée par différence entre la DCO totale contenue dans l'échantillon avant digestion et la mesure expérimentale de la DCO méthanisée. La matière organique résiduelle en fin de test correspond ainsi à l'ensemble des composés organiques réfractaires à la digestion anaérobie contenus dans une boue. Or, une matrice organique réfractaire réunit des composés d'origines diverses : ceux véhiculés par l'eau usée et qui ont traversé le système d'épuration (dits exogènes), et ceux produits par le métabolisme bactériens d'un traitement biologique (dits endogènes). Avec comme enjeu scientifique la compréhension des conditions qui limitent la biodégradation d'une fraction de la matière organique contenue dans une boue d'épuration, l'origine des composés réfractaires se devait d'être prise en compte. Or, évaluer objectivement l'impact de l'accumulation de composés endogènes sur les caractéristiques physico-chimiques de la matrice réfractaire d'une boue, nécessite de pouvoir estimer quantitativement la contribution des différents types de composés organiques réfractaires accumulés dans la matrice globale. Ce chapitre consiste donc à présenter la démarche utilisée pour déterminer le fractionnement DCO de nos matrices réfractaires contrastées produites dans le cadre de ce travail et dont la nature (bio)chimique va être caractérisée dans les chapitres 5 et 6.

À ce jour, aucune technique analytique ne permet expérimentalement de différencier la teneur en composés organiques réfractaires d'origine différente contenus dans une boue donnée. Sur la base d'une approche filière, certaines conditions de production de boues d'épuration ont été choisies pour exacerber les différents types de composés réfractaires possibles d'une boue. Deux types de boues sont considérés : les boues primaires purgées d'une décantation primaire simple, et les boues biologiques purgées au niveau d'une unité de traitement biologique. Ces dernières présentent la particularité d'avoir accumulé en plus des composés réfractaires exogènes véhiculés par l'eau usée, les résidus bactériens endogènes libérés par le métabolisme des microorganismes « épurateurs » actifs.

Une première partie de mon travail pour ce chapitre consiste alors à présenter et à justifier le choix des matrices boues étudiées en lien avec l'origine de leur fraction organique réfractaire.

Par ailleurs, la modélisation des processus biologiques est un outil mathématique qui permet d'établir l'évolution des différentes fractions organiques aux bornes d'un procédé donné. Limiter la caractérisation quantitative de la matrice réfractaire à l'étape de digestion anaérobie ultime en batch ne permettrait pas de distinguer les fractions organiques réfractaires exogène et endogène qui constituent la fraction réfractaire contenue dans la boue biologique avant digestion. Une estimation du

fractionnement de la DCO d'une boue a donc aussi été réalisée aux bornes des unités biologiques qui ont produit les boues biologiques considérées dans ce travail. Ainsi, une deuxième partie de ce chapitre consiste à estimer leur fractionnement grâce à l'utilisation d'une modélisation sur la plateforme Biowin 4.0, calibrée sur des résultats expérimentaux. De manière générale, la modélisation considère un certain nombre de processus caractérisés par des paramètres cinétiques et stœchiométriques dont les valeurs sont directement liées à la structure du modèle et aux méthodologies de quantification. Cet outil mathématique est ici utilisé pour estimer *in fine* le fractionnement de la matrice réfractaire correspondant à une boue biologique donnée. Une analyse de sensibilité du fractionnement d'une boue et de son résidu réfractaire est donc réalisée en lien avec des jeux de données disponibles dans la littérature notamment pour l'hydrolyse, processus qui *a priori* est susceptible d'induire le plus de viabilité au niveau du fractionnement DCO d'une boue biologique.

Ainsi, l'approche globale suivie pour caractériser quantitativement l'origine des différents composés organiques constitutifs d'un résidu réfractaire est illustrée par la Figure IV.1. L'analyse relative entre les données expérimentales et la modélisation est utilisée pour estimer le fractionnement DCO des différentes boues. La représentativité de la réalité biologique par les hypothèses et les paramètres biologiques choisis pour la description des processus de biodégradation des eaux usées n'étant pas garantis, une étape de validation des fractionnements DCO obtenus par modélisation a été mise en œuvre. Comme indiqué sur la Figure IV.1, elle est basée sur la confrontation de la teneur en DCO réfractaire d'une boue mesurée par BMP et celle estimée d'après le fractionnement DCO de la boue avant digestion anaérobie prédit par Biowin.

En résumé, les matrices biologiques contrastées, dont les résidus réfractaires vont être caractérisés par la suite (chapitres 5 et 6), sont présentées dans un premier paragraphe. La nomenclature utilisée pour suivre l'évolution de la DCO, de l'ERU brute au résidu réfractaire, est ensuite détaillée dans une deuxième partie. Le fractionnement DCO des différentes matrices avant digestion long terme est ensuite établi en lien avec le fractionnement des alimentations et la confrontation des données estimées et mesurées. Enfin, le fractionnement DCO correspondant aux résidus réfractaires des différentes boues est donné dans la dernière partie.

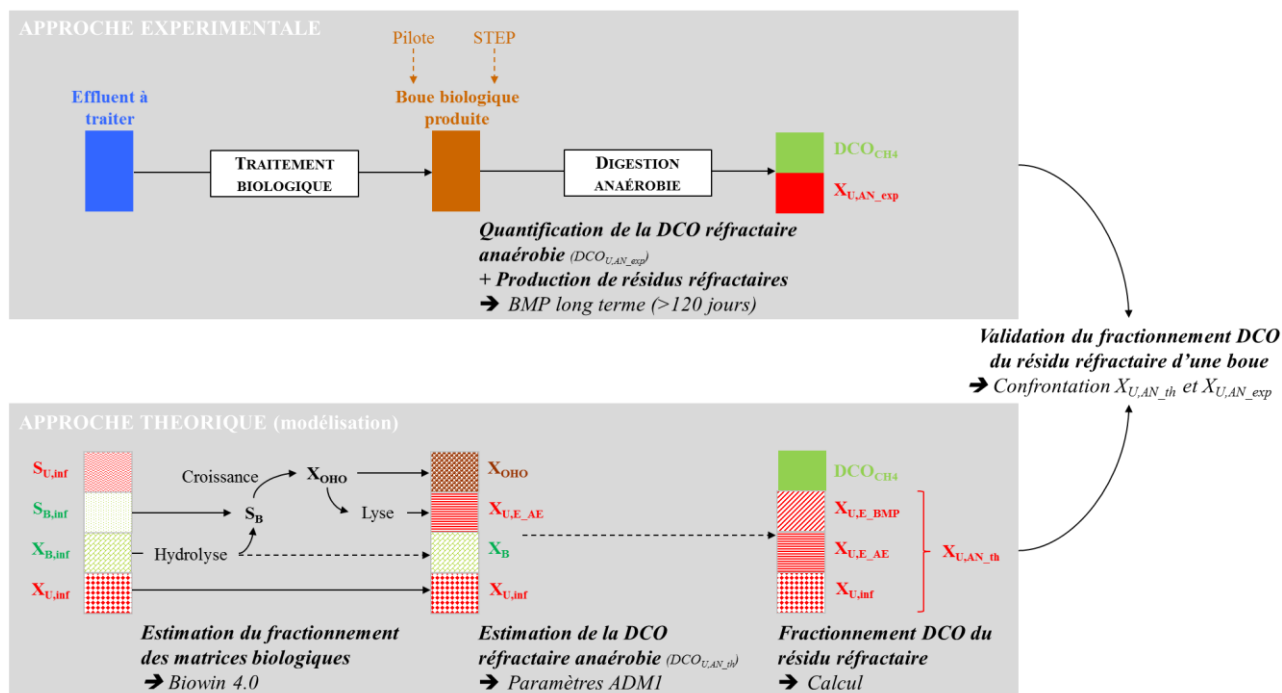


Figure IV.1. Approche globale de caractérisation quantitative du fractionnement DCO d'un résidu réfractaire anaérobie d'une boue d'épuration

IV.2 ORIGINE DES MATRICES CONTRASTEES

L'origine des composés organiques réfractaires constitutifs d'une boue d'épuration est un premier niveau de contraste à considérer. Une boue biologique accumule une fraction organique de composés réfractaires d'origine endogène, notés X_{U,E_AE} , qui s'ajoutent aux composés réfractaires d'origine exogène, notés $X_{U,inf}$. Si l'effluent à traiter est exempt de composés réfractaires exogènes ($X_{U,inf}=0$), la fraction réfractaire de la boue biologique est alors exclusivement composée de la fraction réfractaire endogène produit par le métabolisme de microorganismes actifs. Même si ce cas particulier, ne correspond pas à une réalité à l'échelle industrielle, il est ici opéré à l'échelle d'un pilote de laboratoire pour isoler spécifiquement ce type de composés. Le Tableau IV.1 permet ainsi de récapituler un premier niveau de contraste défini à une échelle macroscopique par la présence ou non d'un type de réfractaire.

Tableau IV.1. Origine contrastée des composés réfractaires des matrices avant digestion considérées dans l'étude

Type de matrices biologiques	Type de composés réfractaires	
	X_{U,E_AE}	$X_{U,inf}$
Boue primaire	0	✓
Biomasse cellulaire	✓	0
Boue biologique	✓	✓

Une boue biologique est donc la seule matrice, avant la digestion anaérobie, qui accumule des composés organiques réfractaires autres que ceux véhiculés dans l'eau usée. Or, sa teneur en composés endogènes, $X_{U,E-AE}$, n'est pas une donnée constante comme l'indique les expressions mathématiques décrites dans le chapitre 1 (Figure I.8). La contribution quantitative des différentes fractions X_{OHO} (biomasse cellulaire active), $X_{U,E-AE}$ (résidus de biomasse active) et $X_{U,inf}$ (composés organiques réfractaires exogènes) est directement dépendante de plusieurs paramètres :

- la qualité de l'effluent à traiter : teneurs en composés organiques réfractaires solubles et particulaires (f_{US} et f_{UX}),
- l'âge de boue imposé au procédé (θ_{b-AE}),
- les caractéristiques biologiques de croissance et de décès des microorganismes actifs (μ_H , Y_H , b_H , f_{AE}).
- la fraction de DCO totale entrante effectivement biodégradée, $(1-f_{US}-f_{UX})$, qui par la succession des processus de croissance et de lyse cellulaire conduit à l'accumulation de la fraction réfractaire endogène $X_{U,E-AE}$.

Les paramètres biologiques des microorganismes étant relativement conservés dans la littérature, les proportions relatives en $X_{U,E-AE}$ et $X_{U,inf}$ dans une boue biologique sont majoritairement impactées par la composition de l'alimentation du procédé et l'âge de boue appliqué au procédé. Pour révéler des différences, la démarche expérimentale choisie a donc été d'exacerber ces deux conditions de production pour caractériser des matrices biologiques contrastées :

- Certaines boues ont ainsi été prélevées sur les unités de traitement biologique de deux STEP toulousaines respectivement alimentées par une ERU décantée et une ERU brute, respectivement opérées à des âges de boues de 2-3 jours et 70 jours. Ces matrices sont respectivement nommées AS-A et AS-H. Elles diffèrent donc par la nature de l'effluent à traiter et leur âge de boue.

- D'autres ont été produites par des procédés à boues activées mis en place et suivis au laboratoire :

- ⇒ Les matrices nommées AS-B et AS-E ont été alimentées par une eau usée enrichie en composés réfractaires exogènes particulaires correspondant exclusivement à ceux d'une boue primaire. Cette boue primaire, PS-A*, a été prélevée sur la STEP A en volume suffisant pour alimenter ces procédés en DCO particulaire sur toute la durée de leur fonctionnement. Elle a été aliquotée et congelée le même jour de manière à limiter la variabilité de sa composition qualitative et quantitative.

- ⇒ La matrice nommée OHO a été alimentée par un mélange de sources de carbone exclusivement soluble et biodégradable de manière à ce que la fraction organique réfractaire n'accumule que des résidus de lyse d'origine bactérienne.

Les procédures de prélèvement et d'échantillonnage ainsi que les conditions opératoires des différents procédés biologiques sont détaillées dans le chapitre Matériels et Méthodes.

Au total, cinq matrices purgées au niveau d'un traitement biologique sont donc caractérisées dans le cadre de ce travail. La boue primaire PS-A* constitue la sixième matrice d'intérêt considérée. (L'astérisque indique que les caractéristiques de la boue primaire sont obtenues après décongélation.)

L'ensemble des matrices d'intérêt considérées avant digestion anaérobie est récapitulé dans le Tableau IV.2 selon la nature de l'alimentation qui véhicule la fraction réfractaire exogène ($X_{U,inf}$), et l'âge de boue aérobie (θ_{b_AE}). Ce dernier paramètre est spécifié car il borne le temps laissé au métabolisme bactérien pour dégrader la DCO biodégradable et donc indirectement, la quantité de résidus réfractaires endogènes accumulée dans les floccs biologiques au moment de la purge de la boue produite.

Tableau IV.2. Conditions de production contrastées des matrices avant digestion anaérobie

θ_{b_AE} Origine du $X_{U,inf}$	0	2	2-3	5	70	Site de production
ERU brute	AS-H					STEP H
ERU brute	PS-A*					STEP A
ERU décantée	AS-A					STEP A
Boue primaire (PS-A* ⁽¹⁾)	AS-B		AS-E			Pilote
Néant (alimentation exclusivement soluble et biodégradable)	OHO					Pilote

PS : boue primaire ; AS : boue biologique ; OHO : boue biologique exempte de composés réfractaires exogènes.

(1) : boue primaire prélevée sur la STEP A et qui correspond à l'unique source de $X_{U,inf}$ des procédés à boues activées B et E sur toute la durée de l'étude.

Les boues présentées dans le Tableau IV.2 sont donc contrastées en termes d'origine des composés réfractaires et de conditions de production. Leurs résidus réfractaires vont être récupérés par digestion anaérobie long terme (BMP > 120 jours) comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. La Figure IV.2 présente ainsi à l'échelle globale de la filière eau les conditions de production qui vont ainsi caractériser l'origine des résidus réfractaires dont le fractionnement DCO va être estimé dans ce chapitre.

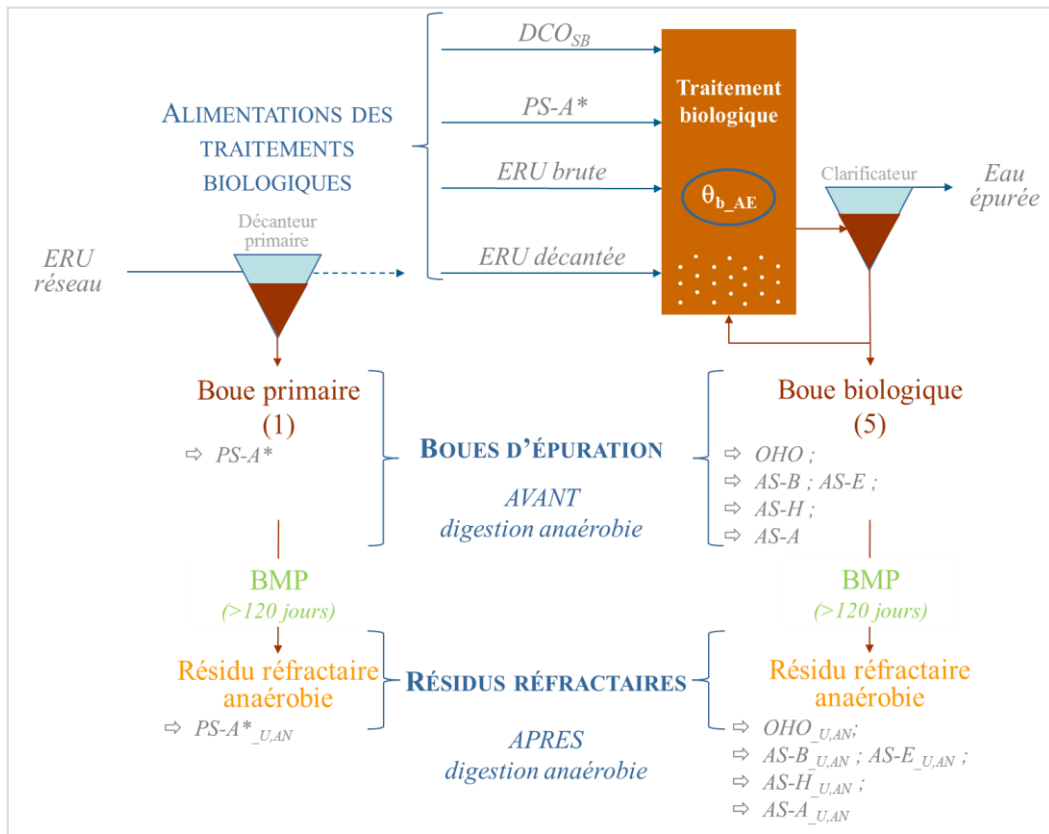


Figure IV.2. Origine des 6 matrices réfractaires étudiées

IV.3 NOMENCLATURE DES COMPOSES ORGANIQUES AU FIL DE L'EAU

L'évolution de la matière organique sur l'ensemble du système de traitement, de l'*ERU* qui entre sur la STEP au résidu réfractaire anaérobie, a été considérée dans ce travail. La Figure IV.3 présente ainsi la nomenclature attribuée aux bornes des différentes unités de traitement traversées par les composés organiques. En accord avec celle-ci, un résidu réfractaire ultime est donc composé au plus de trois fractions organiques : $X_{U,inf}$, X_{U,E_AE} , X_{U,E_BMP} .

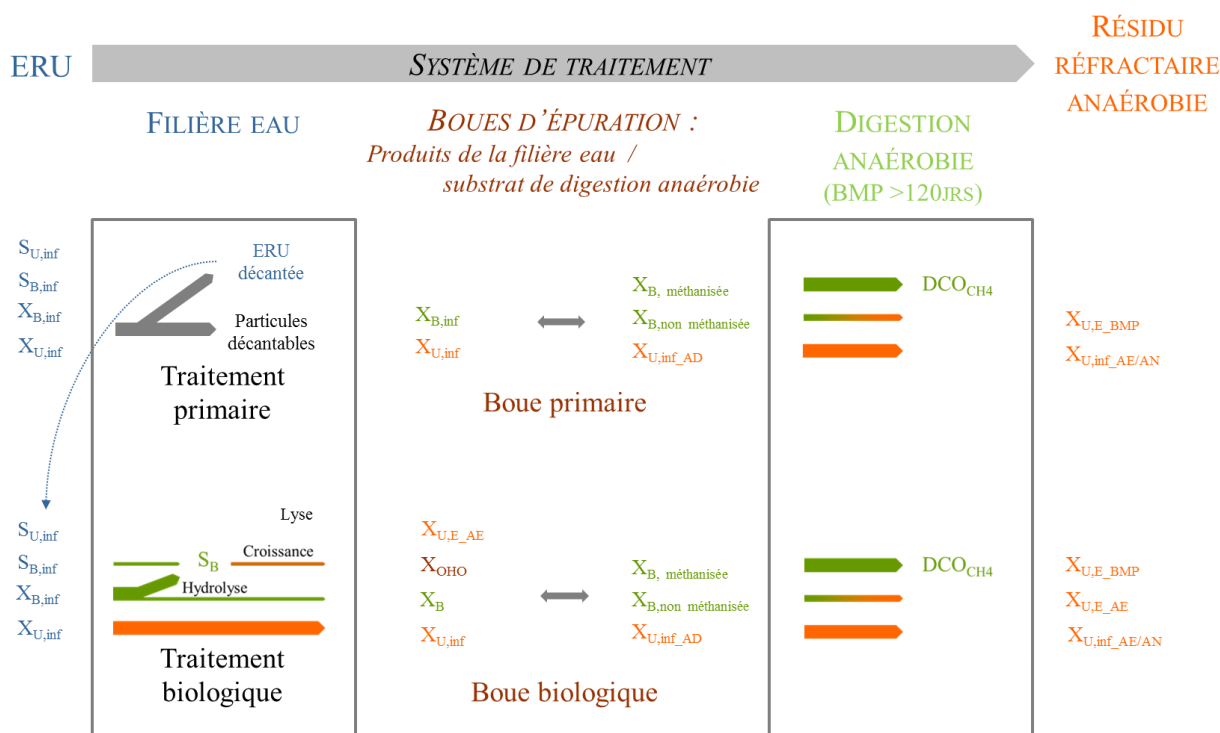


Figure IV.3. Nomenclature utilisée pour caractériser les fractions organiques constitutives des boues d'épuration et matrices réfractaires correspondantes :

Rq : Les boues d'épuration étant le plus souvent purgées par décantation, leur DCO est majoritairement particulaire. Seule la fraction particulaire « X » est donc considérée.

De manière globale, le fractionnement de l'ERU correspond aux caractéristiques de biodégradabilité de ses constituants organiques en lien avec la structure du modèle qui simule les processus biologiques en jeu. La nature brute ou décantée d'une ERU n'est pas distinguée du point de vue de la nomenclature car du point de vue de la description des processus de biodégradation, la modélisation est la même, et seules les valeurs des paramètres biologiques peuvent éventuellement changer. La flèche indiquée sur la figure IV.3 souligne simplement que la nomenclature du fractionnement d'une ERU décantée ou d'une ERU brute est la même. Toutefois, puisque l'impact quantitatif et qualitatif d'un décanteur primaire sur la fraction réfractaire particulaire, $X_{U,inf}$, véhiculée par une eau usée brute n'est pas établi dans la littérature, cette information est conservée et sera notamment considérée au niveau de la caractérisation de la matière présentée dans les chapitres 5 et 6.

La Figure IV.3 met en évidence qu'une fraction X_B peut être intégrée à la composition d'une boue biologique purgée de l'unité de traitement biologique aérobie. Elle correspond à une éventuelle part de $X_{B,inf}$ (composés lentement hydrolysables) qui n'a pas été biodégradée au niveau du traitement biologique du fait d'une limitation de l'hydrolyse.

La variable, $X_{U,inf_{AD}}$, représente la fraction de matière organique réfractaire dite non méthanisable contenue dans la boue d'alimentation de la digestion anaérobie. Les composés organiques endogènes

produits par les consortia bactériens anaérobies et qui vont aussi s'accumuler dans l'agrégat réfractaire récupéré en fin de digestion sont notés X_{U,E_BMP} .

Il est à noter que le fractionnement de la DCO du résidu réfractaire est basé sur l'hypothèse de la conservation du caractère réfractaire des composés organiques contenus dans la boue avant digestion anaérobie.

Ce critère ne fait pas consensus dans la littérature. Alors que Ekama et al. (2007) postulent pour une conservation du caractère réfractaire pour des temps de séjours anaérobies de 60 jours, Jones et al. (2007) soulignent une lente biodégradation de la fraction réfractaire endogène des boues biologiques à 40 jours de digestion. En aérobie, la biodégradabilité long terme des fractions $X_{U,inf}$ et X_{U,E_AE} fait aussi l'objet de travaux récents (Ramdani et al., 2010, Spérandio et al., 2013). La validité de cette hypothèse sera donc discutée par la suite en lien avec la confrontation des données de modélisation et des données expérimentales.

IV.4 FRACTIONNEMENT DES ALIMENTATIONS

IV.4.1 Fractionnement de la boue primaire PS-A*

Le fractionnement de la DCO contenue dans la boue primaire PS-A* est établi d'une part, car son résidu anaérobie fait partie des six matrices contrastées caractérisées dans le cadre de ce travail, et d'autre part, car cette boue constitue la source de DCO particulière des boues activées AS-B et AS-E produites au laboratoire. L'estimation de son fractionnement DCO de la boue primaire PS-A* est basée sur la combinaison de données physiques et biologiques quantifiées expérimentalement. La démarche calculatoire et les paramètres mesurés sont décrits dans la Figure IV.4. Les résultats associés sont présentés dans les paragraphes suivants.

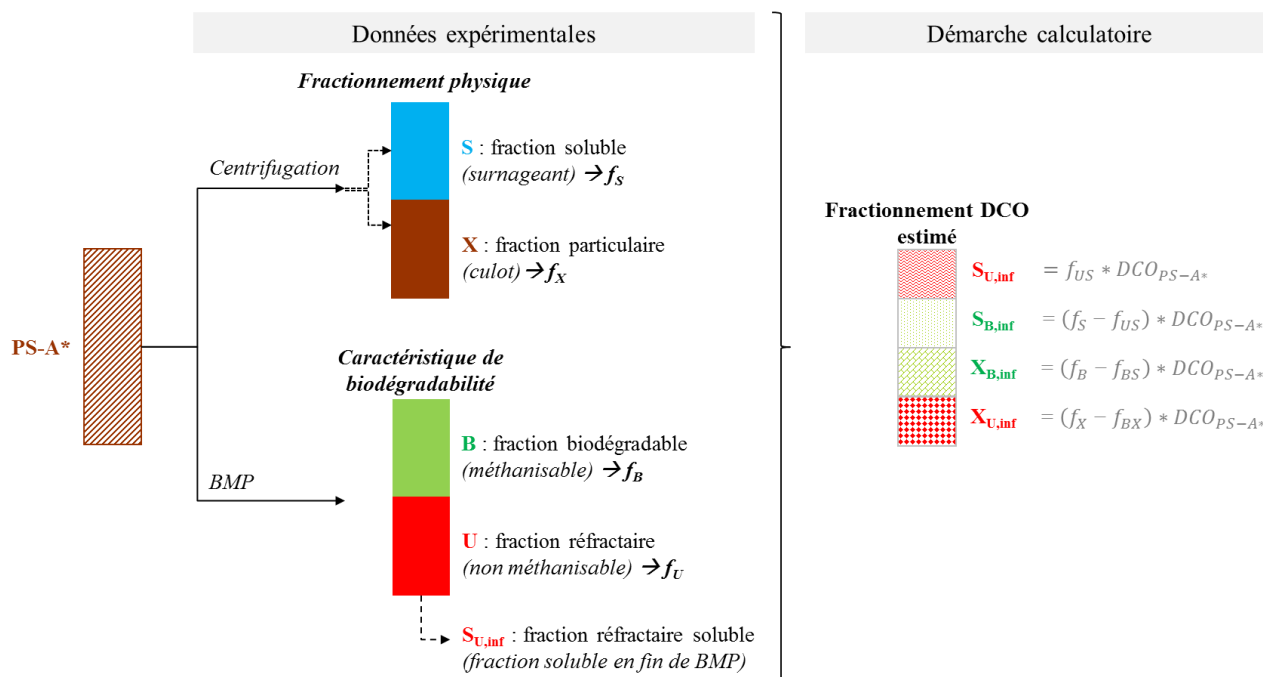


Figure IV.4. Estimation du fractionnement de la boue primaire PS-A*

IV.4.1.1 Répartition physique de la boue primaire PS-A* : f_X et f_S

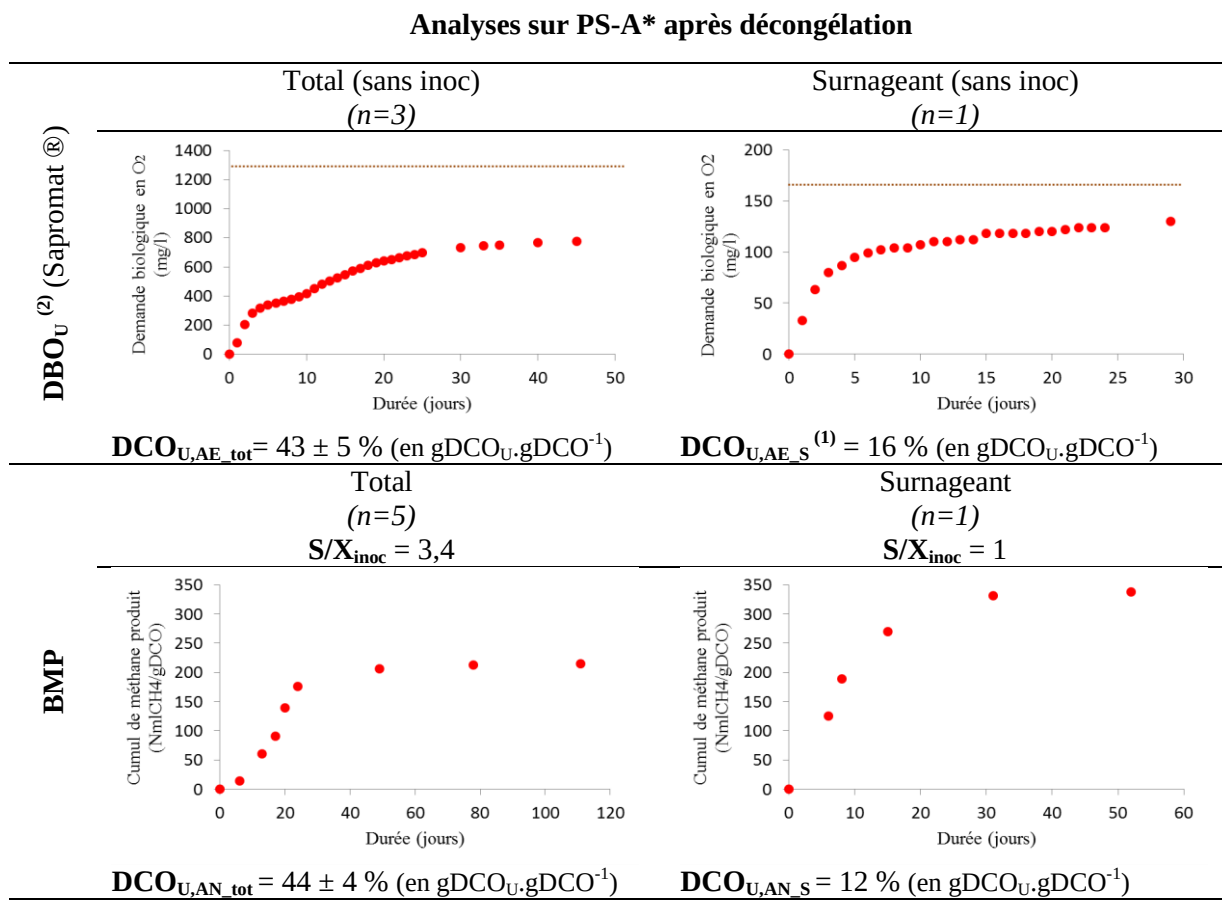
Le fractionnement de la boue primaire PS-A* est déduit des mesures de DCO particulaire et soluble réalisées après chaque préparation d'un tank d'alimentation pour les procédés à boues activées B et E. La répartition physique de la DCO de la boue primaire résulte de l'analyse en duplicat de 23 aliquots différents de boue primaire décongelée. En moyenne, la boue PS-A* est donc composée de $0,86 \pm 0,04$ gramme de DCO particulaire par gramme de DCO totale.

IV.4.1.2 Fractionnement biologique de la boue primaire PS-A* : f_B et f_U

La biodégradabilité de la boue primaire est mesurée par respirométrie long terme en aérobie et en anaérobie, respectivement par un test de DBO ultime (en Sapromat ®) et un test BMP. Les teneurs en DCO réfractaires aérobie et anaérobie sont notées $DCO_{U,AE}$ et $DCO_{U,AN}$. Les procédures de mise en œuvre et de calcul sont détaillées dans le chapitre Matériels et Méthodes.

Les méthodes de quantification de la biodégradabilité de PS-A* ont été appliquées à la fois à l'échantillon total et à la fraction soluble (correspondant au surnageant de centrifugation à 4200g, 15' à 4°C). Les résultats expérimentaux sont présentés dans le Tableau IV.3. Les graphiques correspondent à des résultats représentatifs des n mesures faites en aérobie ou en anaérobie (indiquées entre parenthèse dans le tableau).

Tableau IV.3. Mesures de la DCO réfractaire en aérobie et en anaérobie de la boue primaire PS-A*



(1) correction de la DBO mesurée par le terme $(1-f*Y)$ avec $f=0,2$ et $Y=0,67$ (Chapitre Matériels et Méthodes)
 (2) le trait en pointillé sur les résultats de DBO_U représente la concentration en DCO échantillon à t_0 .

Compte tenu des erreurs sur la mesure de biodégradabilité en aérobie et en anaérobie, la quantité de DCO réfractaire contenue dans la boue primaire PS-A* peut être considérée équivalente en aérobie et en anaérobie. La valeur de f_U est donc estimée à $0,44 \pm 0,05$ gDCO_U.gDCO⁻¹.

IV.4.1.3 Estimation de la fraction réfractaire soluble véhiculée par PS-A* : f_{US}

La fraction réfractaire soluble contenue dans PS-A* est un paramètre qui impacte directement la détermination de sa fraction réfractaire particulaire $X_{U,inf}$. Plusieurs approches expérimentales ont donc été mises en œuvre pour l'estimer.

Comme indiqué dans le Tableau IV.3, des mesures de biodégradabilité aérobie et anaérobie effectuées directement sur la fraction soluble de la boue primaire PS-A* indiquent qu'elle est majoritairement biodégradable (84 et 88% de la DCO soluble totale). Rapporté au fractionnement physique moyen de la boue PS-A* (paragraphe IV.4.1.1), la valeur de f_{US} déduite de ces expériences est de $0,02$ gDCO_{US}.gDCO_{PS-A*}⁻¹ en aérobie ou en anaérobie.

L'estimation de cette fraction a aussi été faite en rapportant la DCO soluble réfractaire mesurée en fin de tests BMP à la quantité de DCO totale de boue primaire avant digestion. Sur l'ensemble des 10 tests BMP réalisés sur différents échantillons décongelés de boue primaire PS-A*, la fraction f_{US} a été estimée comprise entre 0,04 et 0,1 $\text{gDCO} \cdot \text{gDCO}^{-1}$ en anaérobie.

Enfin, l'estimation de la fraction f_{US} de PS-A* a aussi été réalisée en continu, à partir des données de suivi des procédés biologiques aérobie B et E dont la DCO réfractaire est exclusivement apportée par la boue PS-A* (chapitre Matériels et Méthodes). Le calcul consiste alors à mesurer la proportion de DCO soluble sortant (non biodégradée) par rapport au flux total de DCO entrant pour ces deux procédés (Figure IV.5).

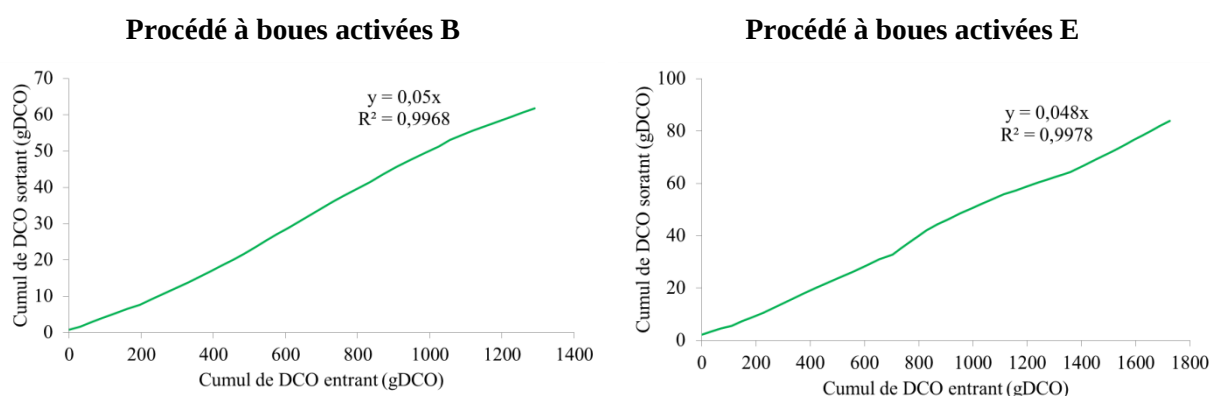


Figure IV.5. Cumul de DCO sortant en fonction du cumul de DCO entrant au niveau des boues activées B et E

La fraction f_{US} de la boue primaire PS-A* ainsi estimée est de 0,05 $\text{gDCO}_{US}/\text{gDCO}_{tot}$ pour les deux procédés B et E. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles déterminées par la mesure de la DCO soluble réfractaire en fin de tests BMP et légèrement supérieure à celles obtenues par mesure directe sur la fraction soluble de la boue primaire (Tableau IV.3).

De manière globale, ces résultats indiquent que les processus aérobie et anaérobie induisent peu de différences sur l'estimation de la fraction réfractaire soluble. Moins soumises à l'effet de l'échantillonnage et estimée sur une période de fonctionnement de plus de 40 jours pour les deux procédés, la valeur de f_{US} obtenue en continu est plus précise. La valeur de 0,05 $\text{gDCO}_{US} \cdot \text{gDCO}_{PS-A*}^{-1}$ est donc conservée pour définir le fractionnement DCO de la boue primaire PS-A* donné dans le (Tableau IV.4).

En accord avec la démarche calculatoire présentée dans la Figure IV.4, le fractionnement de la boue primaire PS-A* déduit des mesures expérimentales ainsi obtenues est donné dans le tableau suivant.

Tableau IV.4. Fractionnement DCO de la boue primaire PS-A*

Fractions	Valeurs $gDCO.gDCO_{PS-A^*}^{-1}$
f_{US}	0,05
f_{BS}	0,09
f_{BX}	0,47
f_{UX}	0,39

IV.4.2 Fractionnement DCO des alimentations des boues activées B et E

Comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes, le flux de DCO entrant sur le procédé à boues activées B est composé de 92% de la boue primaire PS-A* diluée dans de l'eau du robinet et de 8 % de DCO exclusivement soluble et biodégradable (acétate de sodium / citrate de sodium / éthanol dans les proportions 2/1/1 en gDCO). Le procédé à boues activées E est lui, exclusivement alimenté par la boue primaire PS-A* diluée dans de l'eau du robinet.

Les fractionnements DCO des alimentations traitées par les boues biologiques AS-B et AS-E sont déduits de la composition de leur alimentation et du fractionnement DCO de la boue PS-A* estimé précédemment (Tableau IV.5).

Tableau IV.5. Fractionnement DCO des alimentations traitées par les boues activées B et E

Fractions	Valeurs $gDCO.gDCO_{tot,inf}^{-1}$	
	Procédé B	Procédé E
f_{US}	0,05	0,05
f_{BS}	0,16	0,09
f_{UX}	0,35	0,39
f_{BX}	0,44	0,47

IV.4.3 Fractionnement des ERU traitées par les procédés biologiques des STEP A et H

Les boues biologiques AS-A et AS-H ont été prélevées ponctuellement sur deux STEP toulousaines car elles présentent des conditions opératoires contrastées en termes de nature de l'effluent à traiter (ERU décantée et ERU brute) et d'âges de boue appliqués (2-3 jours et 70 jours). Les conditions du prélèvement et les caractéristiques globales des STEP sont détaillées dans le chapitre Matériels et Méthodes.

Des données relatives à l'eau décantée de la STEP A indiquant un f_{UX} de l'ordre de 0,09 à 0,12 ont été obtenues lors d'études antérieures (Spérandio, 1998, Salhi, 2003). Toutefois, le fractionnement de

l'eau usée traitée par ces procédés biologiques n'ayant pas été évalué expérimentalement au moment du prélèvement de nos matrices, la démarche a été d'utiliser des données issues de la littérature. Celles-ci seront alors discutées par la suite au moment de l'étape de validation du fractionnement estimé.

Concernant le procédé de la STEP H alimenté avec une ERU brute, les données utilisées sont celles de Ekama et al. (2009), proches des données communément utilisées dans la littérature pour ce type d'effluent (Dold et al., 2007). Concernant le fractionnement classique d'une ERU décantée (telle que l'effluent qui alimente l'unité biologique de la STEP A), les données disponibles dans la littérature sont nettement plus variables. En effet, l'analyse des données de Dold et al. (2007) et Ekama et al. (2009), réalisée dans le chapitre 1 a révélé que les auteurs attribuent un rendement d'élimination de la DCO particulaire réfractaire différent au niveau de la décantation primaire. Ceci se traduit par des fractionnements DCO de la fraction particulaire significativement différents de l'effluent primaire. Les fractionnements proposés par les deux auteurs sont alors conservés pour l'estimation du fractionnement DCO de la boue biologique AS-A. Le Tableau IV.6 récapitule ainsi les fractionnements DCO théoriques qui vont être considérés pour établir par modélisation sous Biowin le fractionnement DCO des boues biologiques AS-A et AS-H prélevées sur STEP réelles.

Tableau IV.6. Fractionnements théoriques de la DCO traitée
par les procédés biologiques des STEP A et H

	Fractionnement DCO $\frac{gDCO}{gDCO_{tot,inf}}^{-1}$				Sources
	f_{US}	f_{BS}	f_{UX}	f_{BX}	
ERU décantée <i>(STEP A)</i>	0,12	0,32	0,04	0,52	<i>Ekama et al.2009</i>
	0,08	0,30	0,12	0,50	<i>Dold et al.2007</i>
ERU brute <i>(STEP H)</i>	0,07	0,19	0,15	0,59	<i>Ekama et al.2009</i>

IV.5 FRACTIONNEMENT DCO DES BOUES BIOLOGIQUES

L'objectif est d'établir la contribution quantitative des fractions organiques réfractaires exogènes et endogènes des différentes boues produites par traitement biologique aérobie. Ces fractions sont respectivement, $X_{U,inf}$, et X_{U,E_AE} . La modélisation des processus biologiques est un outil qui permet d'établir le fractionnement théorique d'une boue biologique à partir de la connaissance du fractionnement DCO de l'effluent d'alimentation et de l'âge de boue opéré. Néanmoins, l'exactitude des résultats de simulation est directement dépendante des données de fonctionnement renseignées (fractionnement de l'eau usée, âge de boue) et de la valeur des paramètres biologiques stœchiométriques et cinétiques considérés pour les différents processus pris en compte par le modèle.

Les résultats de simulation pour les boues biologiques prélevées sur STEP (AS-A, AS-H) et produites au laboratoire (AS-B, AS-E, et OHO) sont donc discutés après avoir présenté dans un premier temps les hypothèses et les paramètres de simulation utilisés.

IV.5.1 Hypothèses et paramètres de simulation

La Figure IV.6 représente les unités de traitement biologique simulées sur la plateforme Biowin 4.0 ® pour estimer le fractionnement théorique des boues biologiques : un simple procédé à boues activées avec recirculation de biomasse pour les matrices AS-A, AS-B, AS-E et OHO, et un procédé membranaire pour la boue AS-H.

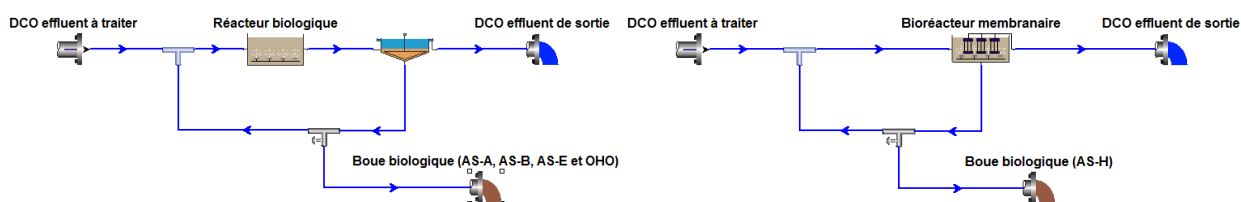


Figure IV.6. Unités de traitement biologique simulées sous Biowin 4.0 ®

La structure du modèle utilisé est celle de ASM1 (Henze et al., 1987). Les processus biologiques pris en compte sont la croissance cellulaire, la production de résidus réfractaires selon le concept mort-régénération et l'hydrolyse. L'écriture des bilans matière aux bornes d'un procédé biologique permet de calculer la production de chaque fraction de composés organiques (Annexe 1). Les proportions en X_{OHO} , $X_{U,E}$, $X_{U,inf}$ exprimées en $gDCO.gDCO^{-1}$ dans une boue biologique peuvent donc être calculées de la manière suivante :

$$X_{OHO}(\%) = \frac{\frac{Y_H}{1+b_H * \theta_{b_AE}} * (1-f_{US} - f_{UX})}{(1-f_{US} - f_{UX}) * \left[\frac{Y_H}{1+b_H * \theta_{b_AE}} * (1+b_H * f_{AE} * \theta_{b_AE}) \right] + f_{UX}}$$

$$X_{U,E_AE}(\%) = \frac{b_H * f_{AE} * \theta_{b_AE} * \frac{Y_H}{1+b_H * \theta_{b_AE}} * (1-f_{US} - f_{UX})}{(1-f_{US} - f_{UX}) * \left[\frac{Y_H}{1+b_H * \theta_{b_AE}} * (1+b_H * f_{AE} * \theta_{b_AE}) \right] + f_{UX}}$$

$$X_{U,inf}(\%) = \frac{f_{UX}}{(1-f_{US} - f_{UX}) * \left[\frac{Y_H}{1+b_H * \theta_{b_AE}} * (1+b_H * f_{AE} * \theta_{b_AE}) \right] + f_{UX}}$$

Ce système d'équation est valable si l'hydrolyse des composés lentement biodégradables contenus dans l'alimentation, notés $X_{B,inf}$, est totalement achevée et que les produits d'hydrolyse ont totalement été biodégradés. En effet, le terme $(1-f_{US}-f_{UX})$ revient à considérer que la totalité de la DCO biodégradable, $S_{B,inf}$ et $X_{B,inf}$ de l'ERU, a été biodégradée pendant le temps de séjour des solides imposé au procédé biologique. Or dans le cas d'une hydrolyse partielle, cette hypothèse peut conduire à une surestimation de la production de biomasse hétérotrophe et par conséquent à une surestimation de la fraction réfractaire endogène produite. Différents jeux de données ont été identifiés dans la littérature pour renseigner les variables k_{hyd} et K_X de l'expression cinétique du processus d'hydrolyse suivante :

$$\frac{dX_B}{dt} = -k_{hyd} * \frac{X_B / X_{OHO}}{K_X + X_B / X_{OHO}} * X_{OHO}$$

Les travaux de Ginestet et al. (2002) mettent en évidence que ces données sont dépendantes de la méthodologie mise en œuvre pour les déterminer et de la nature de l'alimentation (ERU brute, décantées, coagulée-décantée). La comparaison des données moyennes indiquées pour ASM3 (Gujer et al., 1999), qui tient compte de processus de stockage cellulaire, et ASM1 (Henze et al., 1987), qui n'en tient pas compte, révèle que la structure du modèle impacte aussi la valeur des paramètres biologiques.

Dans le cadre de ce travail, la modélisation est utilisée pour estimer au plus juste la proportion de X_{U,E_AE} dans une boue biologique. L'impact des valeurs utilisées pour paramétrer le processus d'hydrolyse sur l'estimation du fractionnement DCO d'une boue biologique a donc été évalué.

Trois jeux de valeurs contrastés ont donc été utilisés :

1. Données renseignées par défaut dans ASM1.
2. Données fixées de manière à être du même ordre de grandeur que les valeurs de K_H obtenues par Ginestet et al. (2002) (paramètre correspondant à la constante cinétique d'un modèle simplifié d'ordre un applicable quand $X_{OHO} \gg X_B$). Ces auteurs ont respectivement trouvés des valeurs de $9 \pm 2 \text{ j}^{-1}$ et $12 \pm 3 \text{ j}^{-1}$ pour des ERU brutes et décantées. Dans le cadre de cette étude, le choix a été de maintenir la valeur de k_{hyd} renseignée par défaut dans ASM1 et de fixer la valeur de K_X de sorte que le ratio des deux soit égal à 10 j^{-1} .
3. Données indiquées pour la fraction décantable d'une ERU, issues des travaux de Ginestet et al. (2002). Elles résultent de la confrontation de données expérimentales obtenues par respirométrie aérobie de 10 jours de la fraction décantable d'une ERU et des données estimées à partir d'un modèle d'hydrolyse limitée par la surface réactionnelle (même expression mathématique que celle considérée par le modèle utilisé dans cette étude). Une forte variabilité a été constatée par les auteurs : données comprises entre 0,25 et $1,05 \text{ j}^{-1}$ pour k_{hyd} et 0,33 et $0,95 \text{ gDCO.gDCO}^{-1}$ pour K_X . Dans le cadre de ce travail, seules les valeurs moyennes ont été prises en compte. Le choix de considérer ce jeu de valeurs a été fait notamment car la DCO particulaire d'alimentation des boues AS-B et AS-E correspond à une boue primaire, et donc à des composés dont la cinétique d'hydrolyse est potentiellement proche des données de Ginestet et al. (2002).

Le Tableau IV.7 récapitule ainsi l'ensemble des valeurs des paramètres biologiques associés aux simulations réalisées sur Biowin 4.0 ®.

Tableau IV.7. Valeurs des paramètres biologiques utilisés pour l'estimation par modélisation du fractionnement des boues biologiques produites.

Processus considérés	Paramètres biologiques	Unités	Valeurs utilisées		
			ASM1	ERU brute ou décantée	Fraction décantable ⁽¹⁾
Hydrolyse	k_{hyd}	$\text{gDCO}_{XB} \cdot \text{gDCO}_{XOHO} \cdot \text{j}^{-1}$	3	3	0,63
	K_X	$\text{gDCO}_{XB} \cdot \text{gDCO}_{XOHO}^{-1}$	0,03	0,3	0,71
	$K_H^{(2)}$	j^{-1}	100	$10^{(3)}$	0,9
Croissance	Y_H	$\text{gDCO}_{XOHO} \cdot \text{gDCO}_{BS}^{-1}$	0,666		
	$\mu_{OHO,max}$	j^{-1}	6		
	K_S	mgDCO.L^{-1}	5		
Décès	f_{AE}	$\text{gDCO}_{Xu,e} \cdot \text{gDCO}_{XOHO}^{-1}$	0,08		
	b_H	j^{-1}	0,62		

(1) : paramètres obtenus pour la fraction décantable d'une ERU avec batchs aérobies de 10 jours. Ginestet et al.(2002)

(2) : constante cinétique pour un modèle d'ordre 1 applicable si $X_{OHO} \gg X_B$ ($K_H = k_{hyd}/K_X$)

(3) : paramètre moyen choisi à partir des données obtenues sur ERU brute ou décantée par Ginestet et al. (2002)

L'âge des différentes boues biologiques correspond à des données industrielles pour les boues prélevées en STEP et à des données expérimentales pour les boues activées OHO, AS-B et AS-E (chapitre Matériels et Méthodes). Les conditions opératoires de production prises en compte pour la simulation sont récapitulées dans le Tableau IV.8 pour les différentes boues biologiques à caractériser dans cette étude. La nomenclature utilisée pour la présentation des résultats de simulation y est aussi indiquée.

Tableau IV.8. Conditions d'alimentation et de fonctionnement des boues biologiques

Boue biologique	Nature alimentation	Fractionnement DCO de l'alimentation ($gDCO.gDCO_{tot}^{-1}$)					Âge de boues, θ_{b_AE} (jours)
		f_{US}	f_{BS}	f_{UX}	f_{BX}	$(1-f_{US}-f_{UX})$	
OHO	DCO _{BS}	0	1	0	0	1	2
AS-A (1) ^(a)	ERU décantée	0,12	0,32	0,04	0,52	0,84	2
AS-A (2) ^(b)		0,08	0,30	0,12	0,50	0,8	
AS-B ^(c)	PS-A*/DCO _{BS} (0,92/0,08)	0,05	0,16	0,35	0,44	0,6	2
AS-E	PS-A* ^(c)	0,05	0,09	0,39	0,47	0,56	5
AS-H	ERU ^(a)	0,07	0,19	0,15	0,59	0,78	70

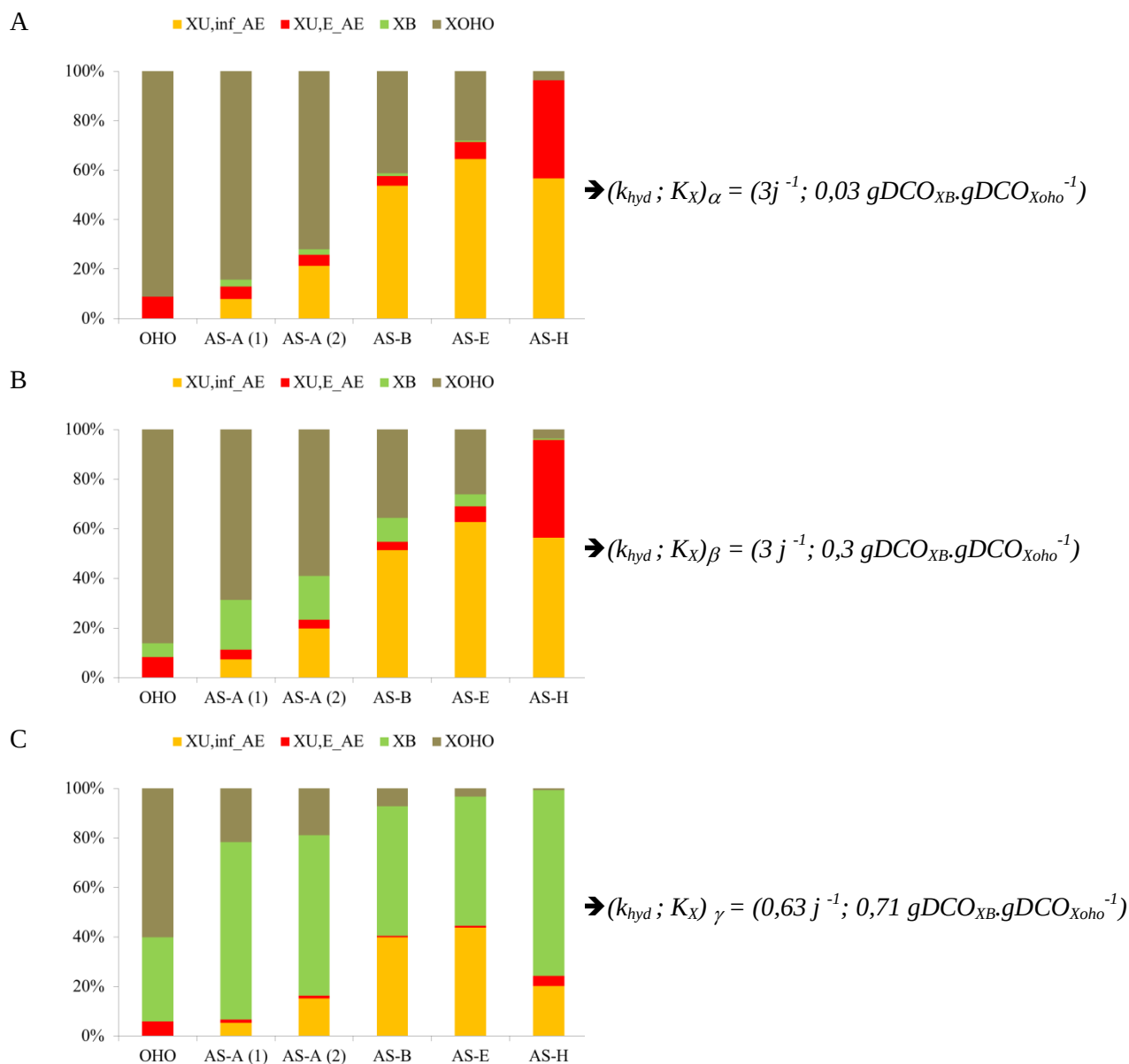
(a) : fractionnement Ekama et al., 2009

(b) : fractionnement Dold et al., 2007

(c) : fractionnement déterminé expérimentalement

IV.5.2 Sensibilité du fractionnement DCO d'une boue au paramétrage de l'hydrolyse

Les résultats de simulation obtenus avec Biowin 4.0 pour les matrices OHO, AS-A (1) et (2) (deux fractionnements DCO d'alimentation considérés), AS-B, AS-E et AS-H, sont présentés dans les Figure IV.7 -A, -B et -C pour les trois jeux de données pour l'hydrolyse (indiqués dans le Tableau IV.7).



(1) et (2) correspondent aux deux hypothèses de fractionnements DCO de l'ERU décantée (Ekama et al., 2009, Dold et al. 2007)

Figure IV.7. Fractionnement DCO des boues biologiques estimés pour différents jeux de paramètres biologiques d'hydrolyse ($k_{hyd}; K_X$)

IV.5.2.1 La fraction X_B

Une limitation cinétique croissante sur le processus d'hydrolyse induit l'augmentation de la fraction X_B résiduelle estimée pour les différentes boues produites.

Le fractionnement DCO de la matrice OHO indique la présence d'une fraction X_B lentement biodégradable pour les jeux de valeurs β et γ des paramètres k_{hyd} et K_X (Figure IV.7 B et C). Les composés organiques correspondant ne sont pas d'origine exogène puisque l'alimentation est exclusivement biodégradable et soluble ($f_{BS}=1$). Dans le concept mort-régénération utilisée dans

ASM1, la cinétique d'hydrolyse appliquée à $X_{B,inf}$ (contenue dans l'alimentation) est la même que celle appliquée à la fraction biodégradable libérée par la lyse cellulaire. La fraction X_B , indiquée pour OHO, n'est pas un reste de DCO exogène mais correspond en réalité à une fraction de DCO biodégradable libérée lors de la lyse cellulaire qui n'aurait pas été biodégradée en totalité compte tenu du paramétrage de l'hydrolyse. Ce résultat souligne que l'utilisation du concept mort-régénération peut conduire à une légère surestimation de la part de X_B estimée pour une boue biologique puisque l'origine endogène ou exogène de cette fraction n'est pas différenciée par le modèle.

Par ailleurs, l'estimation de la production de boue avec le jeu de données α , ($3j^{-1}$; 0,03), prédit de manière systématique la dégradation quasi-totale de la fraction lentement biodégradable $X_{B,inf}$. Ainsi, même pour la boue AS-B âgée de 2 jours et dont 44% de la DCO d'alimentation est lentement biodégradable, la simulation prédit une biodégradation quasi-complète de $X_{B,inf}$ (X_B représentant seulement 2% du fractionnement estimé pour AS-B, Figure IV.7-A). Or, les résultats de Spérandio et al. (2000) indiquent qu'une durée d'au moins 10 jours est requise pour dégrader totalement la fraction lentement biodégradable d'une ERU brute. Ce résultat pose donc la question de la plage de validité des valeurs d'hydrolyse proposées par défaut par ASM1 pour prédire de manière correcte la part de DCO lentement biodégradable effectivement biodégradée.

IV.5.2.2 Les fractions réfractaires $X_{U,inf}$ et $X_{U,E,AE}$

L'hydrolyse gouverne la part de DCO lentement biodégradable qui va être biodégradé au niveau de l'unité biologique. Ce processus impacte donc directement la teneur en $X_{U,E,AE}$ qui va s'accumuler dans les boues biologiques produites. Les différentes teneurs en $X_{U,E,AE}$ et $X_{U,inf}$ prédites par ASM1 au regard de l'hypothèse posée pour la cinétique de l'hydrolyse sont donc étudiées. La Figure IV.8 présente ainsi la comparaison des proportions relatives ($X_{U,E,AE} \cdot X_{U,inf}^{-1}$) estimées pour chaque boue biologique, et pour les trois jeux de données différents utilisés pour l'hydrolyse (Tableau IV.7).

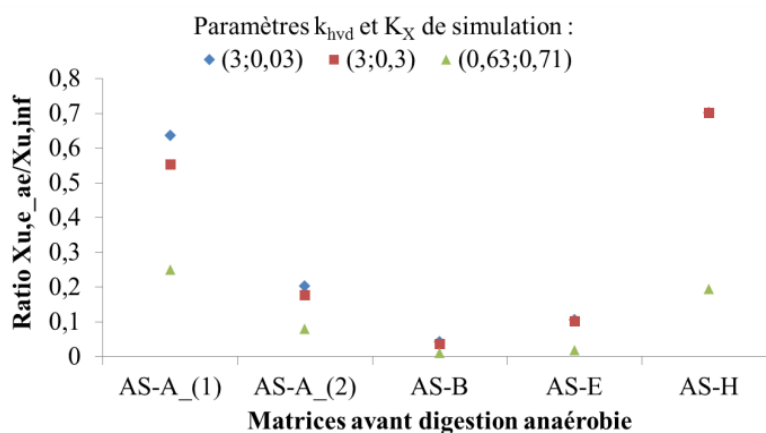


Figure IV.8. Comparaison de la proportion estimée des différentes fractions réfractaires accumulées dans les boues selon le paramétrage de l'hydrolyse.

Les résultats indiquent que les données α et β n'induisent pas de différences significatives au sein des boues produites. Par contre, le jeu de données γ , $(0,63j^{-1}; 0,71)$, conduit à des résultats nettement différents liés à la forte limitation de la biodégradation de $X_{B,inf}$ qui conduit à une accumulation de $X_{U,E_{AE}}$ nettement inférieure.

Nos résultats soulignent l'impact incontestable du paramétrage de l'hydrolyse sur l'estimation des proportions en composés organiques réfractaires endogènes, $X_{U,E_{AE}}$, et exogènes, $X_{U,inf}$, accumulés dans les boues biologiques. A ce stade, leur fractionnement DCO avant digestion anaérobie ne peut être établi avec certitude. La démarche de validation qui va nous permettre de trancher sur les paramètres d'hydrolyse appropriés aux différents procédés biologiques est détaillée dans le paragraphe suivant. Les différentes hypothèses de fractionnement DCO des boues OHO, AS-A (1), AS-A(2), AS-B, AS-E et AS-H présentées dans la Figure IV.7 sont donc conservées pour le moment.

IV.5.3 Démarche de validation du fractionnement DCO d'une boue biologique

La démarche mise en œuvre pour valider le fractionnement DCO d'une boue biologique prédit par Biowin consiste à comparer sa teneur en DCO réfractaire déduite expérimentalement de sa digestion anaérobie en tests BMP, $DCO_{U,AN_{exp}}$, avec les DCO réfractaires théoriques, $DCO_{U,AN_{th}}$, calculés d'après ses différents fractionnements DCO estimés avec Biowin 4.0.

IV.5.3.1 Hypothèses de calcul

a. Structure du modèle biologique considéré

Les différentes populations de microorganismes actifs en digestion anaérobie et la structure du modèle ADM1 le plus souvent utilisé pour modéliser la méthanisation ont été présentées dans le chapitre 1. Compte tenu de l'utilisation d'une digestion anaérobie en batch long terme pour quantifier le potentiel méthane d'une boue, les processus de dégradation ont été regroupés en un seul processus. Les flux de DCO tels qu'ils sont considérés dans l'estimation de la DCO réfractaire théorique sont présentés dans la Figure IV.9.

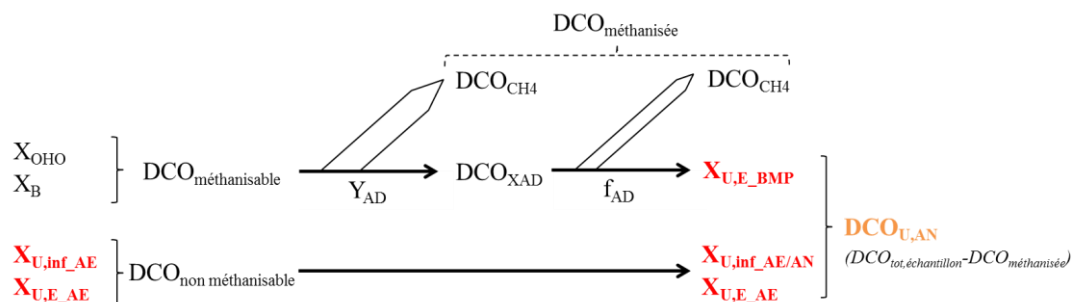


Figure IV.9. Transformation de la matière organique d'une boue biologique en digestion anaérobie long terme en anaérobie (BMP)

Le concept de dégradation de la biomasse active en anaérobie considéré dans le cadre de ce travail correspond au concept de respiration endogène décrit pour l'aérobie dans le chapitre 1. La fraction de DCO biodégradable contenue dans la biomasse est considérée comme directement dégradée et convertie en méthane. La fraction réfractaire contenue dans une cellule est alors estimée identique en aérobie et en anaérobie, soit $f_{AE} = f_{AD} = 0,2 \text{ gDCO}_{Xu,e}/\text{gDCO}_{X_{oho}}$.

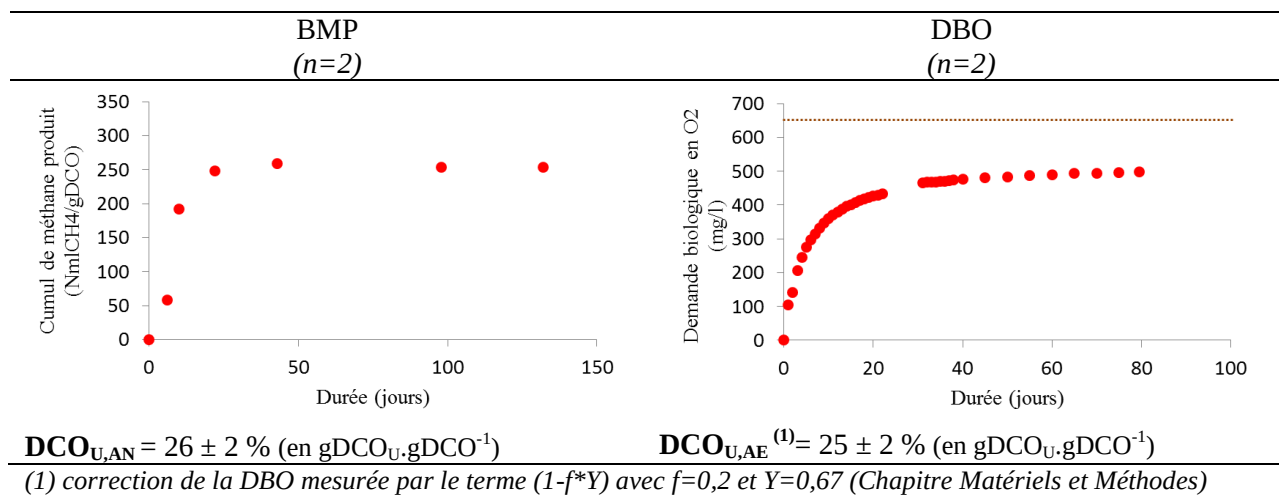
Un rendement de conversion globale de la biomasse anaérobie (DCO_{XAD}), Y_{AD} , de $0,2 \text{ gDCO}_{XAD}/\text{gDCO}_B$ est utilisé sur la base des données pour les acidogènes, les acétogènes et les méthanogènes renseignées dans ADM1 (Batstone et al., 2002).

b. Conservation du caractère réfractaire

La biodégradabilité de la matrice OHO a été mesurée par respirométrie long terme en aérobie et en anaérobie, respectivement par un test de DBO ultime (en Sapromat ®) et un test BMP. Les teneurs en DCO réfractaire aérobie et anaérobie sont notées $\text{DCO}_{U,AE}$ et $\text{DCO}_{U,AN}$. Les procédures de mise en œuvre et de calcul sont détaillées dans le chapitre Matériels et Méthodes. Les résultats sont présentés dans le Tableau IV.9.

Compte tenu de la similarité de la teneur en DCO réfractaire mesurée expérimentalement, en aérobie et en anaérobie, de la matrice OHO (Tableau IV.9) et de la boue primaire (Tableau IV.4), le caractère réfractaire des composés organiques réfractaires exogènes et endogènes est considéré comme conservé. Ainsi, les teneurs en $X_{U,inf}$ et X_{U,E_AE} estimées précédemment sur la plateforme Biowin 4.0 ® pour les différentes boues, seront conservées lors de l'estimation du fractionnement DCO d'un résidu réfractaire.

Tableau IV.9. Mesures de la DCO réfractaire en aérobie et en anaérobie de la matrice OHO



IV.5.3.2 Détermination de la $DCO_{U,AN_{th}}$ d'une boue biologique

La teneur en DCO réfractaire anaérobie théorique, $DCO_{U,AN_{th}}$, exprimée en $gDCO_{U,AN} \cdot gDCO_{boue}^{-1}$, peut être calculée par différence selon l'expression suivante : $DCO_{U,AN_{th}} = 1 - DCO_{CH4,th}$

Sur la base de la représentation des processus biologiques schématisés dans la Figure IV.9, la DCO méthanisée lors de la digestion long terme d'une boue biologique peut s'écrire de la manière suivante :

$$DCO_{CH4,th} = DCO_{X_{OHO},CH4} + DCO_{X_B,CH4} \quad \text{avec}$$

$$DCO_{X_{OHO},CH4} = (1 - f_{AE}) \cdot X_{OHO} \cdot (1 - f_{AD} \cdot Y_{AD})$$

$$DCO_{X_B,CH4} = X_B \cdot (1 - f_{AD} \cdot Y_{AD})$$

L'estimation de la teneur en DCO réfractaire anaérobie théorique en accord avec le fractionnement DCO d'une boue peut alors s'écrire :

$$DCO_{U,AN_{th}} = 1 - [(1 - f_{AD} \cdot Y_{AD}) \cdot ((1 - f_{AE}) \cdot X_{OHO} + X_B)]$$

Les $DCO_{U,AN_{th}}$ ainsi calculées et les $DCO_{U,AN_{exp}}$ mesurées pour chaque matrice sont ensuite comparées. Le fractionnement DCO estimé sera alors considéré admissible si la différence entre les deux n'est pas significativement différente. Les résultats de cette démarche sont présentés dans le paragraphe suivant.

IV.5.4 Fractionnement DCO des boues biologiques avant digestion anaérobie

La Figure IV.10 (A, B, et C) présente la confrontation de la $DCO_{U,AN_{exp}}$ moyenne, déduit de mesures expérimentales (tests BMP), avec les $DCO_{U,AN_{th}}$ calculées pour chaque fractionnement DCO estimé pour les boues OHO, AS-A (1), AS-A (2), AS-B, AS-E et AS-H (Figure IV.7). Les jeux de données avec lesquels ont été estimés leurs différents fractionnements DCO théoriques y sont aussi rappelés.

Pour chaque condition d'hydrolyse, le fractionnement DCO des différentes matrices a été estimé sous Biowin avec une variation de l'âge de boue du traitement biologique de l'ordre de 50% de manière à tenir compte d'une fluctuation éventuelle des conditions de fonctionnement. Celle-ci se traduit par une légère variabilité de la $DCO_{U,AN_{th}}$ indiquée par les barres d'erreur sur la Figure IV.10.

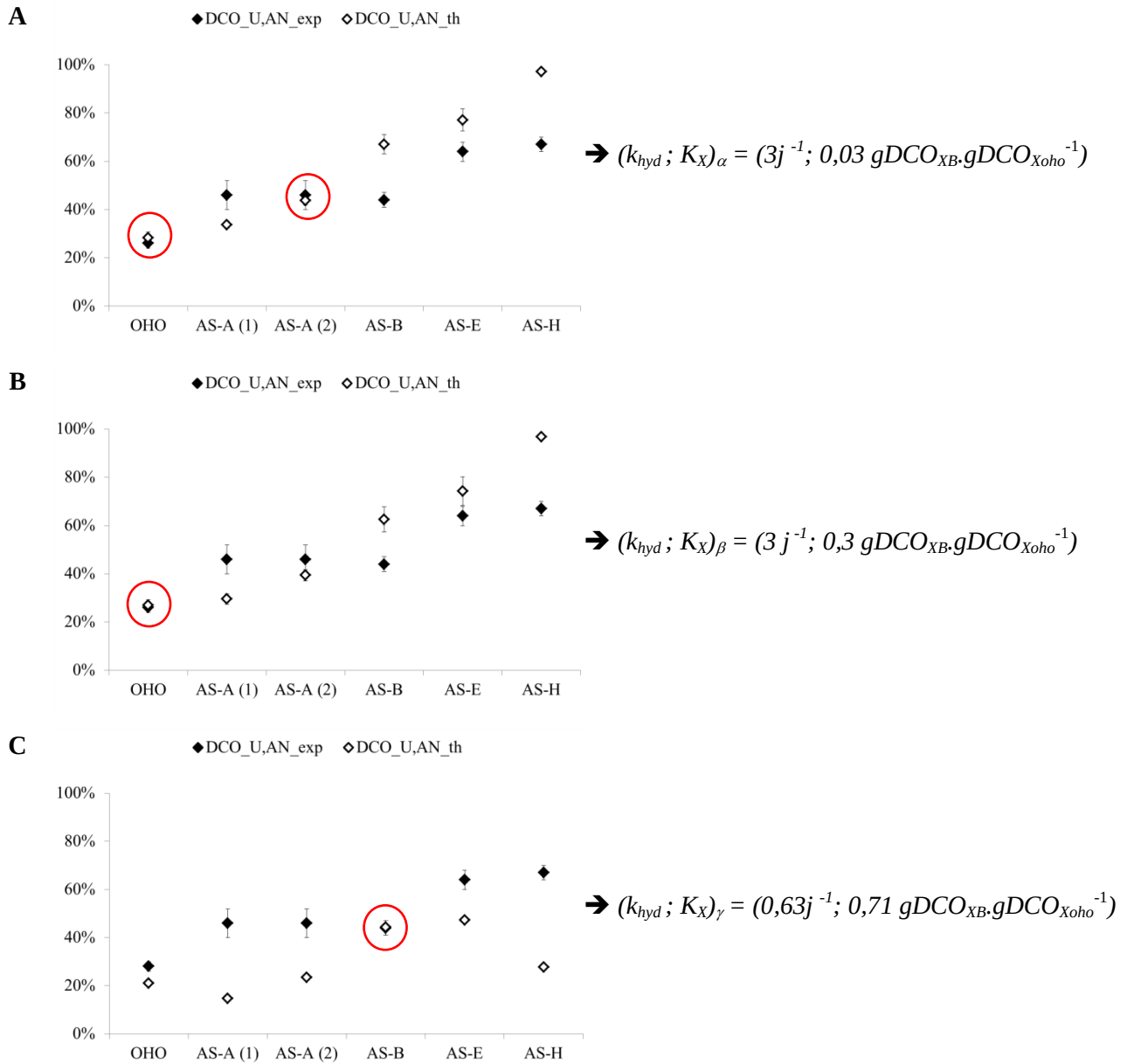


Figure IV.10. Confrontation de la DCO_{U,AN_th} et de la DCO_{U,AN_exp} des boues biologiques analysées

Les cercles en trait plein positionnés sur la Figure IV.10 indiquent les situations pour lesquelles les teneurs en DCO réfractaires théoriques et expérimentales ne sont pas significativement différentes, c'est-à-dire que l'erreur relative calculée entre les deux valeurs moyennes est inférieure à 5%. Les valeurs de DCO_{U,AN_exp} et DCO_{U,AN_th} tracées sur la figure IV.11 sont présentées dans le Tableau IV.10.

Tableau IV.10. Confrontation de la DCO_{U,AN_exp} et de la DCO_{U,AN_th} des boues biologiques OHO, AS-A (1), AS-A (2), AS-B, AS-E, AS-H avant digestion anaérobie

Boues biologiques	DCO_{U,AN_exp} (%)			DCO_{U,AN_th} (%)		Erreur (%)
	Moyenne	Ecart-type	Nombre de mesures	données pour l'hydrolyse	Valeur moyenne	$\left \frac{DCO_{U,AN_exp} - DCO_{U,AN_th}}{DCO_{U,AN_th}} \right * 100$
OHO	26	2	6	α	28	<u>7%</u>
				β	27	<u>4%</u>
				γ	21	24%
AS-A (1) ^(a)	46	6	11	α	34	27%
				β	30	36%
				γ	15	68%
AS-A (2) ^(b)				α	44	<u>5%</u>
				β	39	14%
				γ	24	49%
AS-B	44	3	4	α	67	52%
				β	63	42%
				γ	44	<u>1%</u>
AS-E	64	4	4	α	77	20%
				β	74	16%
				γ	47	26%
AS-H	67	3	4	α	97	30%
				β	97	30%
				γ	28	39%

(a) et (b) : fractionnement DCO de l'alimentation de Ekama et al., 2009 et Dold et al., 2007

α, β, γ : données attribuées aux paramètres de l'hydrolyse : $\alpha \rightarrow (3j^{-1}; 0,03)$; $\beta \rightarrow (3j^{-1}; 0,3)$; $\gamma \rightarrow (0,63j^{-1}; 0,71)$

La confrontation de la DCO_{U,AN_exp} et la DCO_{U,AN_th} permet de définir le fractionnement DCO correct des boues OHO, AS-A et AS-B estimés précédemment avec Biowin.

▪ Cas des boues biologiques AS-A et AS-B :

Notre démarche de validation met en évidence que les cinétiques d'hydrolyse ne sont pas été équivalentes pour les boues AS-A et AS-B, respectivement alimentées avec la fraction décantable et non décantable de l'ERU brute de la STEP A. Il est intéressant de noter que le paramétrage de l'hydrolyse permettant d'estimer un fractionnement DCO correct pour la boue AS-B (i.e. $DCO_{U,AN_exp} \cong DCO_{U,AN_th}$), correspond aux données de Ginestet et al. (2002) que les auteurs ont obtenus pour la dégradation de la fraction décantable d'une ERU. Concernant la matrice AS-A, nos résultats montrent par ailleurs que la qualité de l'ERU décantée traitée par l'unité biologique de la STEP A est plus proche du fractionnement DCO proposé par Dold et al., 2007. Après décantation, la teneur en DCO particulaire réfractaire, f_{UX} , serait plutôt de 0,12 $gDCO.gDCO^{-1}$ (au lieu de 0,04 d'après Ekama et al. 2009). Il est alors intéressant de remarquer que ce résultat est en accord avec l'ordre de grandeur déjà identifié sur cette eau lors d'études précédentes (0,09 à 0,12 $gDCO_{XU}.gDCO_{tot}^{-1}$ pour Spérandio (1998)).

Par ailleurs, nos résultats indiquent qu'à âges de boue équivalents (2 jours), la cinétique d'hydrolyse de la fraction lentement hydrolysable, véhiculée par la fraction décantable ou non décantable d'une

même ERU, est significativement différente (les boues AS-A et AS-B sont respectivement alimentées par l'ERU décantée et la boue primaire prélevés sur la STEP A).

▪ Cas de la matrice OHO exclusivement composée de cellules et d'EPS cellulaires ($X_{U,inf} = 0$) :

Notre démarche valide que l'hydrolyse des composés biodégradables issus de la lyse cellulaire ne présente pas une cinétique trop lente. En effet, le fractionnement DCO de la matrice OHO, estimé avec les données ($0,63j^{-1}$; $0,71g.g^{-1}$), n'est pas validé alors qu'il apparait correct avec les jeux de données ($3j^{-1}$; $0,03g.g^{-1}$) et ($3j^{-1}$; $0,3g.g^{-1}$).

Toutefois, notre démarche ne parvient pas à faire converger les valeurs de $DCO_{U,AN,exp}$ et de $DCO_{U,AN,th}$ pour les boues AS-E et AS-H.

▪ Cas de la matrice AS-E alimentée par la boue primaire PS-A* et avec $\theta_{b,AE} = 5$ jours :

La difficulté de définir précisément le fractionnement DCO de la matrice AS-E tient peut-être à l'inadéquation du modèle utilisé compte tenu de son alimentation. Composée de 100% de boue primaire (PS-A*), le paramétrage de la cinétique d'hydrolyse de la DCO lentement biodégradable à traiter devrait être proche des données de Ginestet et al. (2002) (comme pour la boue AS-B ayant la même source de DCO particulière : PS-A*). Or, le concept mort-régénération considéré par le modèle ASM1, applique la même cinétique aux composés biodégradables produits par la lyse cellulaire. L'utilisation du jeu de données ($0,63j^{-1}$; $0,71$) pour simuler l'hydrolyse conduit alors à surestimer la fraction X_B résiduelle puisque dans ces conditions les résidus biodégradables endogènes s'accumulent (Figure IV.7-C). Inversement, l'utilisation des jeux de données ($3j^{-1}$; $0,3$) ou ($3j^{-1}$; $0,03$), approprié à l'hydrolyse de la DCO hydrolysable issue de la lyse cellulaire (Figure IV.10 –B et –C), surestime probablement l'hydrolyse de la DCO particulière contenue dans la boue primaire d'alimentation.

Ce résultat pose donc la question de la plage de validité des données k_{hyd} et K_X renseignées pour un modèle donné et du champ d'application de la structure d'un modèle. Dans le cas présent, les données utilisées ne permettent pas de prédire précisément le fractionnement DCO d'une boue alimentée avec une DCO particulière significativement plus lentement hydrolysable que les composés libérés lors de la lyse cellulaire. L'estimation du fractionnement DCO du résidu réfractaire de la boue AS-E sera donc établie à partir des deux fractionnements DCO estimés par Biowin de manière à voir si le paramétrage de l'hydrolyse impacte ou non le fractionnement DCO de ce résidu réfractaire.

▪ Cas de la matrice AS-H alimentée par une eau usée brute et avec $\theta_{b,AE} = 70$ jours :

Notre approche ne permet pas d'établir précisément le fractionnement DCO de la boue biologique AS-H (âgée de 70 jours et alimentée avec une ERU brute). En accord avec Spérandio et al. (2000), la fraction lentement biodégradable X_B d'une ERU brute est quasi totalement dégradée après 10 jours. Le jeu de donnée ($0,63j^{-1}$; $0,71$) qui prédit l'accumulation de 75% de X_B malgré les 70 jours de temps de

séjour dans l'unité biologique de la STEP H n'est donc pas cohérent. D'autre part, les autres jeux de données qui prédisent une hydrolyse quasi-complète de la fraction $X_{B,inf}$ ne permettent pas d'expliquer une teneur résiduelle en DCO biodégradable de $33 \pm 3\%$ dans la matrice AS-H, pourtant quantifiés expérimentalement par 4 tests BMP (Figure IV.11).

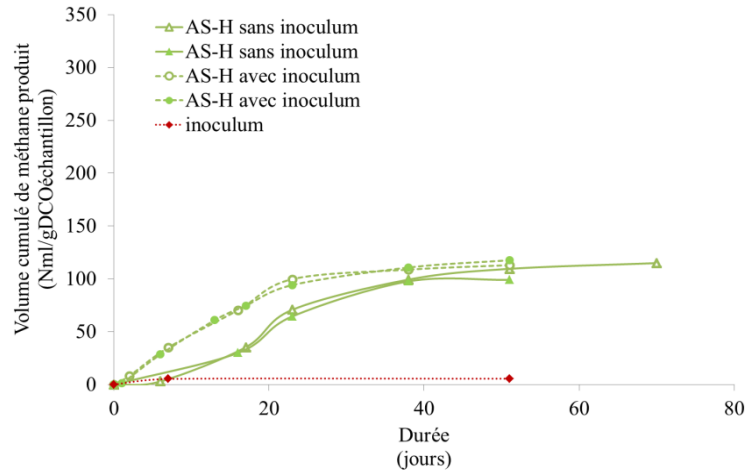


Figure IV.11. Potentiel méthane de la boue AS-H

Plusieurs hypothèses peuvent alors être proposées pour expliquer l'inadéquation des résultats de simulation avec la DCO biodégradable mesurée expérimentalement :

- L'échantillonnage de la boue : En effet, cette matrice a été prélevée une seule fois au niveau du bioréacteur à membranes industriel.
- La sous-estimation de la fraction X_{OHO} dans la boue du fait d'une potentielle surestimation de la cinétique de lyse cellulaire ($0,62 \text{ j}^{-1}$) : En effet, il est possible que des microorganismes capables de se maintenir à des âges de boues élevés présentent des processus métaboliques différents qui leur confèrent une cinétique de lyse plus lente.
- La biodégradabilité des fractions $X_{U,inf}$ et/ou $X_{U,E}$: Si comme le suggèrent certains travaux, des composés qui contribuent à la fraction réfractaire d'une boue biologique peuvent être à long terme biodégradable, une partie du biogaz mesurée pourrait être attribuée à leur méthanisation. Les cinétiques globales de dégradation de la matrice AS-H, déduites des tests BMP (Figure IV.11) sont comprises entre $0,07$ et $0,09 \text{ j}^{-1}$. Or, au regard des cinétiques de biodégradation long terme proposées dans la littérature pour les fractions réfractaires ($0,0075 \text{ j}^{-1}$ pour $X_{U,E_{AE}}$ d'après Jones et al. (2007), $0,005 \text{ j}^{-1}$ pour $X_{U,E_{AE}}$ d'après Ramdani et al. (2010), $0,007 \text{ j}^{-1}$ pour $X_{U,inf}$ et $X_{U,E_{AE}}$ d'après Spérandio et al. (2013)), la cinétique de biodégradation de la DCO biodégradable contenue dans AS-H est trop rapide pour que cette hypothèse soit validée.

Nos résultats ne permettant pas de valider, ou d'invalider les deux premières hypothèses. Deux fractionnements DCO sont donc considérés pour AS-H (Figure IV.12) :

1) Un fractionnement DCO correspondant aux résultats de simulation obtenus avec le jeu de données β et présentés précédemment dans la Figure IV.7-B,

2) D'après l'expression permettant de calculer la $DCO_{CH4,th}$, une $DCO_{CH4,exp}$ de 33% correspondrait à une fraction X_{OHO} résiduelle de l'ordre de 43% au lieu des 4% prédits (hypothèses de calcul : X_B résiduelle nulle, $f_{AE}=f_{AD}=0,2 \text{ g.g}^{-1}$, $Y_{AD}=0,2\text{g.g}^{-1}$). L'utilisation d'une constante de lyse cellulaire plus lente, k'_{dec} fixée à $0,07 \text{ j}^{-1}$ (10 fois inférieure à la constante communément utilisée), a donc été utilisée pour obtenir un fractionnement DCO correspondant à une fraction X_{OHO} plus importante que celle obtenue précédemment (4%). Ce fractionnement indicée « $\beta ; k'_{dec}$ » sur la Figure IV.12 est donc utilisé pour évaluer si la présence d'une biomasse résiduelle dans la matrice AS-H va impacter significativement le fractionnement DCO de son résidu réfractaire.

À l'issue de cette partie, l'ensemble des fractionnements DCO des boues biologiques qui vont être considérés pour estimer le fractionnement DCO de leurs résidus réfractaires est récapitulé dans la Figure IV.12. L'encadré en tirets indique les fractionnements DCO des matrices AS-A, AS-B et OHO qui ont été validés dans cette partie.

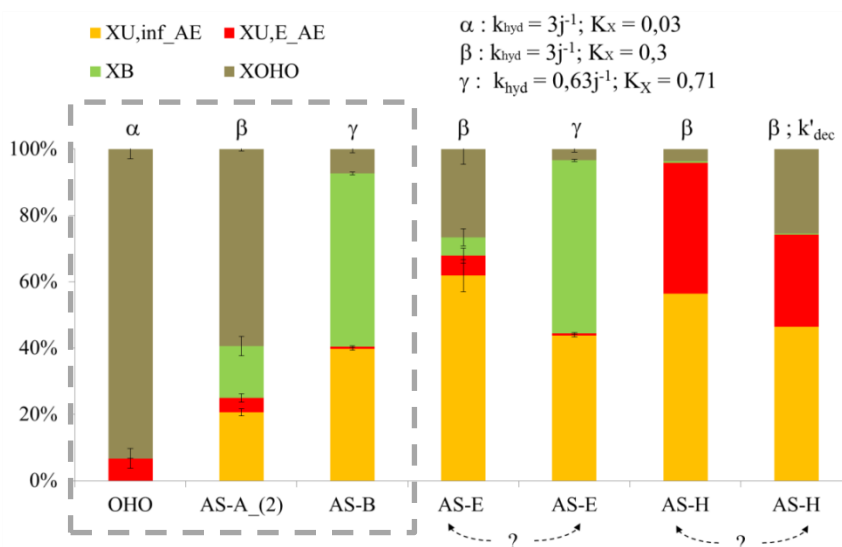


Figure IV.12. Fractionnements DCO estimés pour les matrices OHO, AS-A, AS-B, AS-E et AS-H

IV.6 FRACTIONNEMENT DCO DES RESIDUS REFRACTAIRES ANAEROBIES

Le fractionnement DCO d'un résidu réfractaire anaérobie est calculé en rapportant la teneur en composés organiques exogènes ($X_{U,inf}$), endogènes aérobies (X_{U,E_AE}) et endogènes anaérobies (X_{U,E_BMP}) à la DCO réfractaire totale. Il est estimé après avoir calculé la quantité de DCO réfractaire endogène produite pendant le test BMP dont sont issus les différents résidus réfractaires. La démarche

calculatoire utilisée est présentée dans le paragraphe suivant avant de donner les fractionnements DCO des résidus réfractaires produits et caractérisés dans le cadre de ce travail.

IV.6.1 Estimation du fractionnement DCO d'un résidu réfractaire

Sur la base de nos résultats, le caractère réfractaire des composés est considéré comme conservé (paragraphe IV.5.3.1.b). Les teneurs en X_{U,E_AE} et $X_{U,inf}$ estimées pour le fractionnement des boues avant digestion sont donc conservées.

Par ailleurs, la quantité de résidus réfractaires endogènes anaérobies, X_{U,E_BMP} , produite pendant la digestion long terme d'une boue en test BMP correspond à la « respiration endogène » du consortia X_{AD} qui dégrade la DCO biodégradable. En accord avec la simplification du modèle biologique anaérobie considéré dans le présent travail (Figure IV.9), le calcul de la quantité de X_{U,E_BMP} accumulée peut s'écrire de la manière suivante : $X_{U,E_BMP} = f_{AD} * Y_{AD} * [(1 - f_{AE}) * X_{OHO} + X_B]$.

Le fractionnement DCO d'un résidu réfractaire de boue est alors défini en rapportant la teneur de chaque fraction, X_{U,E_AE} , $X_{U,inf}$, et X_{U,E_BMP} , à la DCO_{U,AN_th}, selon les 3 équations suivantes :

$$f_{XU,E_AE} = \frac{X_{U,E_AE}}{DCO_{U,AN_th}} \quad f_{XU,inf_AE/AN} = \frac{X_{U,inf}}{DCO_{U,AN_th}} \quad f_{XU,E_BMP} = \frac{X_{U,E_BMP}}{DCO_{U,AN_th}}$$

IV.6.2 Fractionnement DCO des résidus réfractaires produits

La Figure IV.13 présente les résultats correspondant aux fractionnements DCO des résidus réfractaires des matrices suivantes : OHO, AS-A, AS-B, AS-E, AS-H et PS-A*. Leurs principales différences en lien avec leurs conditions d'alimentation y sont aussi rappelées.

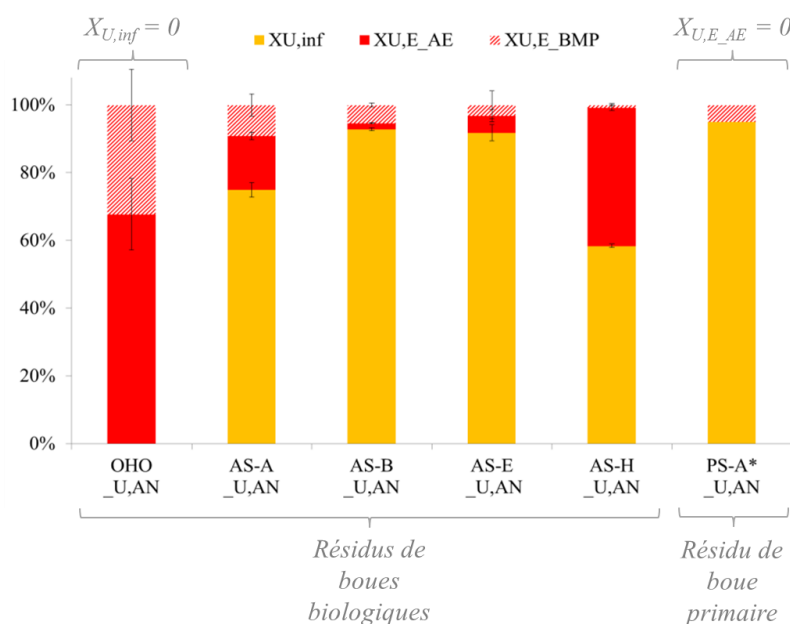


Figure IV.13. Fractionnements DCO des résidus réfractaires anaérobies produits

Les barres d'erreur indiquées pour les résidus OHO_{U,AN}, AS-A_{U,AN} et AS-B_{U,AN}, correspondent à la variabilité induite par la fluctuation de l'âge de boue prise en compte pour l'estimation du fractionnement DCO des matrices avant digestion anaérobie. Celles indiquées pour les résidus AS-E_{U,AN} et AS-H_{U,AN}, cumulent aussi les erreurs liées aux fractionnements DCO de AS-E et AS-H (avant digestion). Le Tableau IV.11 complète la présentation des résultats en récapitulant les valeurs estimées pour les différentes fractions présentées dans la Figure IV.13.

Tableau IV.11. Fractionnement DCO des résidus réfractaires anaérobies

Origine du $X_{U,inf}$	Résidus réfractaires anaérobies	$f_{X_{U,inf}}$ $gDCO.gDCO^{-1}$	$f_{X_{U,E,AE}}$ $gDCO.gDCO^{-1}$	$f_{X_{U,E,BMP}}$ $gDCO.gDCO^{-1}$	$\Sigma(f_{X_{U,E}})$ $gDCO.gDCO^{-1}$
0	OHO _{U,AN}	0	0,68±0,11	0,32±0,11	1
Fraction décantable d'une ERU (PS-A*)	PS-A* _{U,AN}	0,95	0	0,05	0,05
	AS-B _{U,AN}	0,93±0,00	0,02±0,01	0,05±0,00	0,07
	AS-E _{U,AN}	0,92±0,02	0,03±0,02	0,05±0,04	0,08
ERU brute	AS-H _{U,AN}	0,60±0,02	0,39±0,03	0,01±0,01	0,41
ERU décantée	AS-A _{U,AN}	0,75±0,02	0,16±0,03	0,09±0,01	0,25

Nos résultats mettent en évidence que l'erreur éventuelle commise sur le fractionnement DCO des boues avant digestion impacte plus significativement la proportion entre les différents types composés endogènes ($X_{U,E,AE} / X_{U,E,BMP}$) que la proportion entre les composés exogènes et endogènes totaux ($X_{U,inf} / [X_{U,E,AE} + X_{U,E,AN}]$). Ainsi, la différenciation quantitative des composés réfractaires libérés lors de la lyse de microorganismes actifs en aérobie ou anaérobie ne pourra être considérée.

IV.7 CONCLUSION GENERALE

Les matières réfractaires obtenues expérimentalement sont un mélange complexe de molécules issues de l'eau usée et produites par les métabolismes aérobie et anaérobie. Leur composition biochimique est donc a priori filière-dépendante. L'objectif de ce chapitre était donc d'établir un fractionnement DCO de ces résidus réfractaires de manière à aider et consolider l'interprétation des analyses relatives à leurs caractéristiques chimiques (chapitres 5 et 6).

Un des résultats marquants est la conservation des fractions réfractaires exogènes et endogènes quel que soit l'environnement métabolique aérobie ou anaérobie. En effet, les tests aérobie et anaérobie aboutissent à une DCO réfractaire identique pour une boue primaire contenant exclusivement la fraction exogène et une boue contenant exclusivement des cellules et des EPS cellulaires (OHO). Nos

résultats sont donc en accord avec ceux d'Ekama et al. (2007) en faveur de la conservation des fractions réfractaires en anaérobie. Même si la validité de ce résultat mériterait d'être confortée par un spectre de boues plus large, il simplifie grandement la problématique et conforte la modélisation utilisée (absence de dégradation en condition anaérobie des fractions exogènes et endogènes aérobies) pour estimer chaque compartiment de la DCO réfractaire : DCO exogène, DCO endogène aérobie et DCO endogène anaérobie.

La démarche a consisté à estimer dans un premier temps le fractionnement DCO des matrices avant digestion anaérobie et de le valider par confrontation de données expérimentales et théoriques de quantification de $DCO_{U,AN}$. Nos résultats ont permis de souligner l'impact significatif du paramétrage de l'hydrolyse sur l'estimation du fractionnement DCO d'une boue et de son potentiel méthane. Par ailleurs, l'utilisation du modèle ASM1 s'est avérée inappropriée pour prédire le fractionnement des matrices AS-E et AS-H, entre autre en raison du concept mort-régénération attribué à la dégradation de la biomasse qui conduit à des incohérences dans le cas de cinétiques d'hydrolyse trop lentes. Toutefois, notre démarche a permis de définir la contribution quantitative des fractions réfractaires d'origine exogène ($X_{U,inf}$) et endogène ($X_{U,E_{AE}} + X_{U,E_{BMP}}$) des six résidus réfractaires caractérisés dans la suite de l'étude. En effet, les incertitudes relatives aux fractionnements DCO avant digestion des boues AS-E et AS-H n'entraînent pas de modifications significatives à l'échelle du fractionnement DCO de leur résidu réfractaire anaérobie. Ce résultat souligne que si le calage du modèle biologique au niveau de la filière eau peut impacter significativement la prédiction du potentiel méthane d'une boue, il ne modifie pas drastiquement la qualité du résidu réfractaire correspondant (i.e. proportion relative entre les composés réfractaires exogènes et endogènes du même ordre de grandeur). Nos résultats ont par contre indiqué que la proportion relative entre les fractions endogènes produites en aérobie et en anaérobie ne pouvait être définie avec certitude. À l'échelle d'une filière, nos résultats renforcent la nécessité de définir au mieux les caractéristiques biologiques de l'eau usée et des procédés utilisés au niveau de la filière pour améliorer l'estimation de la DCO réfractaire et la prédiction des performances attendues au niveau de la méthanisation des boues produites.

Dans le cadre de la caractérisation des matrices réfractaires présentée dans les chapitres 5 et 6, les fractionnements DCO estimés pour les résidus réfractaires $OHO_{XU,AN}$, $AS-A_{XU,AN}$, $AS-B_{XU,AN}$, $AS-E_{XU,AN}$ et $AS-H_{XU,AN}$ sont donc considérés représentatifs de la contribution quantitative des composés organiques exogènes et endogènes accumulés au fil des unités de traitements traversées. La variabilité inter-échantillon est supérieure à la variabilité intra-échantillon attribuée aux différentes fractions. Les résidus peuvent effectivement être considérés comme contrastés en termes de proportion entre composés d'origine exogène et endogène, et en termes d'origine de la matière réfractaire exogène, $X_{U,inf}$ (ERU brute, ERU décantée ou la fraction décantable d'une ERU brute).

V.

**Spécificités de la nature chimique
des composés réfractaires
contenus dans les boues
d'épuration**

V.1 INTRODUCTION

La biodégradation de la matière organique est globalement gouvernée par de multiples paramètres physiques, chimiques et biologiques. Dans un objectif de compréhension, l'enjeu est ici de mieux définir la nature chimique des composés particuliers demeurant réfractaires en fin de digestion anaérobie (BMP > 120jours) pour laquelle il n'existe aucune donnée dans la littérature. Compte tenu de la diversité probable des molécules véhiculées par un effluent urbain, une caractérisation exhaustive est difficilement envisageable. Notre problématique porte sur la caractérisation de matrices, multi-composées, particulières et hétérogènes.

Du point de vue technique de caractérisation, le choix s'est porté sur la spectroscopie d'absorption en moyen infrarouge car c'est une méthode non-destructive et sensible qui permet d'obtenir des empreintes représentatives des fonctions chimiques contenues dans l'échantillon irradié. Elle constitue une technique de caractérisation directe et non-invasive de la nature chimique globale des fractions particulières de résidus réfractaires de boues, matrices qui concentrent l'essentiel des composés non biodégradables (chapitre 3). La spectroscopie d'absorption en moyen infrarouge est communément utilisée pour caractériser des matrices particulières complexes de type lisiers (Marcato et al., 2009), composts (Ouatmane et al., 2000, Smidt et al. 2007, Smidt et al., 2008), déchets d'abattoirs (Cuetos et al., 2010)... Si quelques travaux se sont intéressés aux boues (Smidt et al., 2009, Francioso et al., 2010), aucune étude de caractérisation infrarouge de la fraction réfractaire des boues n'a été trouvée. La première partie de ce chapitre consiste donc à **évaluer les caractéristiques chimiques accessibles par l'utilisation de la spectroscopie d'absorption en ATR-FT-MIR** (*spectroscopie à Transformée de Fourier par Réflexion Totale Atténuée en Moyen InfraRouge*) pour caractériser la nature chimique de nos matrices boues et résidus réfractaires. La variabilité intra-échantillon de l'information spectrale y est en outre évaluée d'une part, pour valider et borner la représentativité d'une empreinte chimique obtenue par ATR-FT-MIR, et d'autre part, pour définir la méthodologie permettant de valider la significativité des différences inter-échantillons. À l'issue de cette partie, la méthodologie de caractérisation de nos matrices complexes par spectroscopie ATR-FT-MIR est ainsi donnée.

La composition des matrices étudiées résulte de la nature des eaux à traiter et des conditions de fonctionnement des unités de traitement. **L'enjeu est alors d'identifier s'il existe des signatures chimiques particulières liées à l'origine des composés (exogène ou endogène, bactérienne ou non) et/ou à leur caractère réfractaire.** La seconde partie présente ainsi les résultats de l'analyse relative des empreintes spectrales d'une part, à l'échelle des matrices avant digestion, et d'autre part, à l'échelle de leurs résidus réfractaires récupérés en fin de digestion anaérobie long terme (BMP > 120 jours).

Une dernière partie conclura enfin sur le potentiel de la caractérisation de matrices contrastées par spectroscopie ATR-FT-MIR couplée à des outils statistiques d'analyse relative multi-variée.

V.2 ÉVALUATION DE L'UTILISATION DE L'ATR-FT-MIR POUR CARACTERISER LA NATURE CHIMIQUE DE MATRICES COMPLEXES TYPE BOUES ET REFRACTAIRES

La spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier en moyen infrarouge est une technique de caractérisation de la chimie qui est appliquée sur un large spectre d'échantillons solides multi-composants : matériaux ligno-cellulosiques (Xu et al., 2013), composts (Smidt et al., 2007), lisiers (Marcato et al., 2009), EPS extraits de boues biologiques (Garnier et al., 2005, Görner et al., 2003, D'abzac et al., 2010), substances humiques extraites de boues (Réveillé et al., 2003, Polak et al., 2009), déchets solides (Lesteur et al., 2011). Elle a été choisie dans le cadre de ce travail, principalement car c'est une technique sensible qui ne requiert l'ajout d'aucun réactif chimique pour sa mise en œuvre (limite l'introduction d'interférences de l'empreinte chimique) et qui renvoie une empreinte chimique détaillée de l'échantillon analysé.

L'enregistrement de l'absorption du rayonnement infrarouge du fait de la vibration moléculaire des liaisons chimiques irradiées est ici réalisé en réflexion totale atténuée (ATR) (principe détaillé dans le chapitre Matériels et Méthodes). De manière globale, le spectre ATR-FT-MIR, qui va constituer l'empreinte chimique de nos échantillons, est défini sur la fenêtre spectrale allant de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} par deux paramètres :

1. **La position des pics d'absorption**, exprimée par convention en nombres d'onde (exprimés en cm^{-1}), est directement liée aux fonctions chimiques présentes dans l'échantillon irradié,
2. **L'intensité d'absorption**, exprimée en unité arbitraire d'absorbance, est directement liée à la concentration des liaisons irradiées qui absorbent de l'énergie lumineuse, à leurs coefficients d'extinctions moléculaires et au trajet optique du rayonnement dans l'échantillon (distance de pénétration). Elle renseigne de manière semi-quantitative sur l'abondance des diverses fonctions chimiques présentes.

Aucune caractérisation par ATR-FT-MIR de la matière réfractaire contenue dans des boues d'épuration n'ayant été trouvée dans la littérature, une première partie du présent paragraphe s'attache donc à définir les caractéristiques chimiques accessibles par l'analyse de l'empreinte ATR-FT-MIR de matrices telles que des boues et des résidus réfractaires. Au regard de la diversité moléculaire, l'enjeu analytique n'est pas de déterminer des fonctions chimiques. Nous nous sommes plutôt focalisés sur la détermination des régions spectrales d'intérêt au regard de leurs possibles attributions à des familles de molécules ou à leur sensibilité aux fluctuations. L'évaluation de la variabilité intra-échantillon de

l’empreinte chimique de nos matrices a en ce sens été évaluée dans une seconde partie. Elle constitue un préalable qui permet d’une part, de valider la représentativité de l’information spectrale et d’autre part, de garantir la significativité des différences inter-échantillons au regard de la variabilité intra-échantillon. Enfin, les outils d’analyse relative multi-variée couplés à l’ATR-FT-MIR pour mettre en évidence des différences ou des similitudes entre les matrices et/ou révéler des signatures chimiques spécifiques du caractère réfractaire de la matière sont présentés.

À l’issue de cette première partie, la méthodologie ainsi que les potentialités et les limites de l’utilisation de l’ATR-FT-MIR comme outil de caractérisation de la nature chimique de nos matrices sont définies avant de l’appliquer à nos matrices d’étude.

V.2.1 Caractéristiques accessibles par analyse directe d’échantillons complexes de composition inconnue

Par définition, un spectre d’absorption infrarouge en ATR est directement lié aux fonctions chimiques présentes dans l’échantillon irradié. L’objectif de ce paragraphe est ainsi d’établir la nature de l’information chimique accessible par analyse directe des principales bandes d’absorption qui définissent le spectre ATR-FT-MIR d’un échantillon complexe de composition inconnue. Les caractéristiques chimiques accessibles sont alors déclinées pour deux échelles d’interprétation de l’empreinte obtenue en ATR-FT-MIR : fonctions chimiques et familles de molécules.

Les procédures de récupération, de préparation d’échantillon et de mesure sont décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes.

V.2.1.1 Distinction entre des fonctions chimiques absorbant dans des régions spectrales proches (niveau de résolution)

Les spectres infrarouges obtenus en moyen infrarouge ($400\text{--}4000\text{cm}^{-1}$) peuvent être approximativement divisés en quatre régions spectrales : région des X-H ($4000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$) ; région des triples liaisons ($2500\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$) ; région des doubles liaisons ($2000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) ; région de $1500\text{ à }600\text{ cm}^{-1}$, essentiellement liée à des absorptions induites par des effets stériques et électroniques au sein des molécules et diverses liaisons (Stuart, 2004). Le Tableau V.1 indique les domaines d’attribution de liaisons chimiques des principales molécules organiques biologiques (adapté de Socrates (2004), livre de référence en spectroscopie infrarouge pour l’attribution des bandes d’absorption aux fonctions chimiques). Le domaine spectral allant de $1800\text{ à }2500\text{ cm}^{-1}$ n’est pas indiqué car il correspond à la zone d’absorption du cristal diamant utilisé pour l’analyse ATR-FT-MIR dans cette étude.

Tableau V.1. Table d'attribution des bandes d'absorption aux groupes fonctionnels

Position des bandes d'absorption (cm ⁻¹)	Groupes fonctionnels attribués
4000-2500	
3600 - 2500	O-H
3600 - 3500	<i>alcool, phénol</i>
3300 - 2500	<i>acide carboxylique</i>
3100 - 3000	C-H étirement
2960 - 2930	<i>arom. (y compris de composés hétérocycliques)</i>
2870 - 2850	<i>CH₂ (sym.) et CH₃ (asym.)</i>
	<i>CH₂ (asym.) et CH₃ (sym.)</i>
2000-1500	
1750 - 1640	C=O étirement
1750 - 1720	<i>ester aliph., aldéhyde aliph.</i>
1730 - 1700	<i>cétone aliph. ester arom.,</i>
1720 - 1680	<i>cétone arom., aldéhyde arom.</i>
1700	<i>acide carboxylique</i>
1680 - 1640	<i>amide I et II</i>
1650 - 1530	N-H flexion
1615	<i>amine</i>
1650 - 1620	<i>amide I (NH₂)</i>
1560 - 1530	<i>amide II</i>
1680 - 1430	C=C étirement
1680 - 1600	<i>alcène</i>
1600 - 1430	<i>squelette aromatique</i>
1500-600	
1360 - 1220	C-N étirement
1220 - 1220	<i>aliph.</i>
1360 - 1250	<i>arom.</i>
1300 - 1000	C-O étirement
1200 - 1000	<i>alcool</i>
1300 - 1100 / 1310 - 1250	<i>ester aliphatique / ester aromatique</i>
1240 / 930 / 1430	<i>acide carboxylique (C-O / C-O-H hors plan / dans le plan)</i>
1100	<i>ether (C-O-C)</i>
1400 - 600	=C-H flexion
1400	<i>hydrocarbures aliph. (dans le plan)</i>
1275 - 1000	<i>composés arom. (dans le plan)</i>
1000 - 600 / 900 - 690	<i>composés aliph. / arom. (hors du plan)</i>
1350 - 1240	P=O étirement
1260 - 1240	<i>aliph.</i>
1350 - 1300	<i>arom.</i>
1250 - 750	P-O étirement
1040 - 930	<i>ester P-OH</i>
1050 - 950 / 830 - 750	<i>aliph.(P-O-C sym. / asym.)</i>
1250 - 1160 / 1050 - 870	<i>arom.</i>
1060 - 1020	S=O étirement
550 - 450	S-S étirement

aliph.=aliphatique; *arom.* = aromatique; *sym.* ou *asym.*= étirement symétrique ou asymétrique

Une des problématiques en IR est la transposition de la donnée spectrale liée à l'absorption de liaisons chimiques à l'identification de la présence d'une molécule ou d'une famille de molécules (ce qui est l'objectif *in fine*). À titre d'exemple, les fonctions N-H et C=C communément attribuées à des composés protéiques-like (liaison peptidique) et à des structures aromatiques, telles que les substances humiques, absorbent sur des régions spectrales qui se superposent (Tableau V.1).

Selon la connaissance *a priori* de la composition qualitative et quantitative des échantillons analysés, l'attribution plus ou moins fiable des bandes d'absorption aux fonctions chimiques peut toutefois être établie. Néanmoins, dans une démarche de caractérisation approfondie des fonctions chimiques constitutives d'un échantillon, la diffusion Raman est communément couplée à la spectroscopie infrarouge pour valider l'attribution des bandes d'absorption aux fonctions chimiques présentes. En effet, il y a complémentarité entre ces deux méthodes : les fonctions polaires étant nettement plus discernables en spectroscopie infrarouge que des fonctions symétriques non polarisées, cette démarche analytique permet notamment de distinguer la contribution des fonctions N-H et C=C sur le domaine allant de 1430 à 1680 cm^{-1} (d'autant plus que les deux familles de molécules majoritairement composées de ces fonctions ne sont *a priori* pas présentes en proportions contrastées dans les résidus réfractaires analysés, chapitre 3). La possibilité de coupler les deux techniques spectroscopiques pour la caractérisation de la nature chimique de nos échantillons a donc été testée. Les trois longueurs d'onde monochromatiques communément utilisées pour enregistrer la diffusion Raman ont été appliquées lors de tests préliminaires sur des échantillons de boues et de résidus réfractaires lyophilisés : 514, 632 et 1064 nm. **L'utilisation de la diffusion Raman couplée à la spectrométrie infrarouge s'est alors avérée inapplicable** du fait de la fluorescence de certains composés qui masquent totalement le phénomène de diffusion Raman.

Ainsi, compte tenu de la superposition de certains groupes fonctionnels et de l'impossibilité de coupler la spectroscopie Raman à l'analyse ATR-FT-MIR de nos échantillons, **la discrimination de certaines fonctions chimiques correspondant à des bandes d'absorption similaires en moyen infrarouge ne pourra être réalisée de manière directe.**

V.2.1.2 Possibilité d'attribuer des bandes d'absorption à des familles de molécules

L'attribution des bandes d'absorption de fonctions chimiques n'est pas forcément liée à leur appartenance à une molécule. Toutefois la majorité des travaux associent la présence de certaines bandes d'absorption à des familles de molécules. L'enjeu de ce paragraphe est d'évaluer, par des analyses réalisées sur des échantillons de nature biochimique contrastée, la possibilité de discriminer la présence de différents types de molécules dans des échantillons multi-composés.

Le Tableau V.2 présente ainsi des spectres ATR-FT-MIR réalisés sur des molécules isolées appartenant à différentes familles moléculaires communément identifiées dans des échantillons de boues et de résidus réfractaires : protéines, polysaccharides et composés aromatiques.

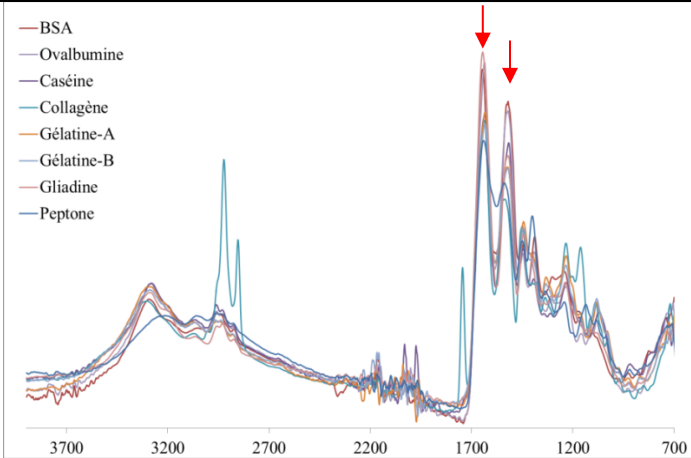
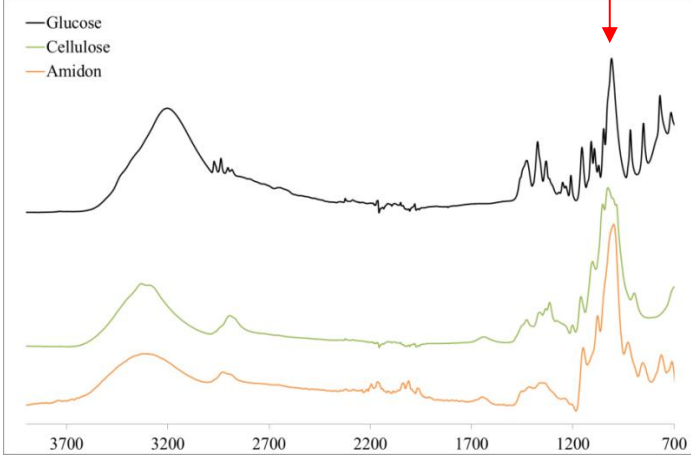
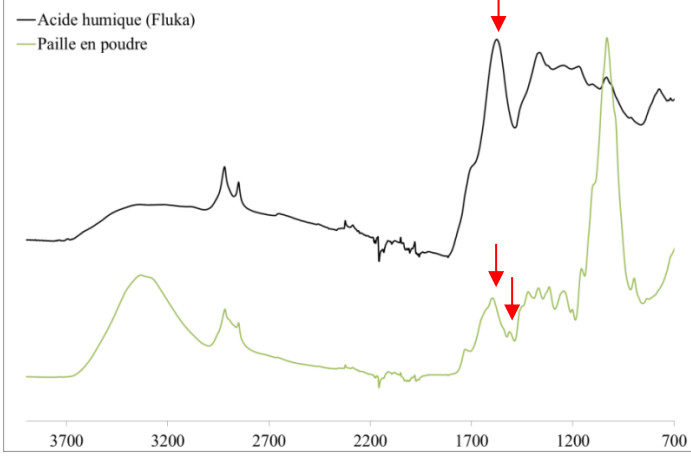
Les différents modèles protéiques choisis pour l'analyse se différencient en terme de conformation (globulaire/fibrillaire), d'origine (végétale/animale), de composition en acides aminés et de nombre d'acides aminés (500 à plus de 3000). Leurs spectres présentent néanmoins des bandes d'absorption

communes aux nombres d'onde 1640-1660 et 1550 cm^{-1} indépendamment de leurs variabilités physico-chimiques. Ces bandes d'absorption sont caractéristiques de la vibration moléculaire des liaisons C=O et N-H impliquées dans la liaison peptidique et dont la quantité est évidemment significative dans un échantillon protéique.

Les spectres infrarouges des modèles polysaccharidiques montrent des intensités d'absorption intenses dans la région spectrale allant de 1000 et 1200 cm^{-1} . Ce résultat est cohérent avec la forte proportion des groupes éthers (C-O-C) et alcools (C-O-H) dans ce type de molécules, dont l'étirement de la liaison C-O induit effectivement une absorption du rayonnement infrarouge dans cette région (Tableau V.2). Cette région est d'ailleurs souvent directement attribuée à la présence de composés polysaccharidiques (Pons et al., 2004, Garnier et al., 2005, Grube et al., 2006). Il est à noter que l'implication de la molécule de glucose dans une structure polymérique modifie effectivement le profil de son empreinte chimique mais pas le caractère intense de l'absorption dans cette région spectrale.

Enfin, les spectres ATR-FT-MIR d'un acide humique commercial et d'une paille broyée ont été analysés pour identifier les bandes d'absorption de composés riches en fonctions chimiques aromatiques, véhiculés dans les ERU (Jardé et al. 2003), et connus pour leur faible biodégradabilité (Filip et al., 2007, Tuomela et al., 1999). Les spectres infrarouges obtenus présentent des pics d'absorption larges centrés sur 1560 cm^{-1} et 1590 cm^{-1} respectivement pour l'acide humique et la paille. Un pic de faible intensité à 1510 cm^{-1} est identifié. Il est caractéristique de la présence de lignine (Hergert, 1960, Shen et al., 2008, Smidt et al., 2009). Ces résultats sont en accord avec les domaines d'absorbances caractéristiques de la liaison C=C impliquée dans un squelette ou un noyau aromatique. (Tableau V.2).

Tableau V.2. Spectres ATR-FT-MIR de différentes familles de molécules

Famille de molécules	Spectres ATR-FT-MIR	Bandes d'absorption caractéristiques
Protéines		1640-1660 cm^{-1} et 1550 cm^{-1} ➔ Liaison peptidique : ✓ C=O ✓ N-H
Polysaccharides		1100 cm^{-1} ➔ C-O-C 1200 - 1000 cm^{-1} ➔ O-H
Composés aromatiques		1600 - 1430 cm^{-1} ➔ Squelette aromatique. 1510 cm^{-1} ➔ Lignine

De manière générale, l'analyse relative des résultats obtenus sur des molécules isolées soulignent que les familles de molécules protéiques, polysaccharidiques et aromatiques de nos matrices ne présentent pas de régions d'absorption discriminantes. En effet, leurs principales bandes d'absorption en moyen infrarouge se superposent partiellement sur les différentes régions de l'empreinte spectrale :

- De 2860 à 2960 cm^{-1} : Absorption spécifique de la liaison C-H. Néanmoins, le caractère commun de la présence de ce type de liaison dans des composés organiques, ne permet pas d'attribuer spécifiquement à une famille particulière.
- De 1500 à 2000 cm^{-1} : Absorption des liaisons C=O et N-H de la liaison peptidique et des liaisons C=C des structures aromatiques (dont les différences de sensibilités au rayonnement infrarouge peuvent aussi contribuer à perdre de l'information).
- De 1000 à 1200 cm^{-1} : Absorption des liaisons éther et alcool en proportion importante dans les composés polysaccharidiques mais aussi des liaisons =C-H des noyaux aromatiques.

V.2.1.3 Conclusion

A une longueur d'onde incidente donnée, λ_i , l'intensité de l'absorption globale de l'énergie lumineuse infrarouge incidente, A_{λ_i} , correspond à la somme des absorptions des n différentes fonctions j présentes comme l'indique l'équation suivante : $A_{\lambda_i} = \sum_1^n A_{\lambda_i,j} = \sum_1^n (\varepsilon_j * c_j * l_j)$ (avec ε , le coefficient d'absorption moléculaire, c , la concentration, et l , le trajet optique) $A_{\lambda_i} = \sum_1^n A_{\lambda_i,j} = \sum_1^n (\varepsilon_j * c_j * l_j)$.

La connaissance *a priori* de la composition des échantillons analysés ou de la forte proportion de certains composés relativement aux autres font que certains travaux se permettent d'attribuer certaines bandes d'absorbance à la présence de certains composés. Ainsi, des travaux de caractérisation infrarouge d'échantillons de compost attribuent les bandes d'absorption présentes entre 1500 et 1650 cm^{-1} aux composés humiques-like (Amir et al., 2010) alors que des travaux relatifs à des EPS extraits de boues, ces bandes sont attribuées plutôt à des composés protéiques (Görner et al., 2003, Garnier et al., 2005).

Dans le cadre de notre étude, la discrimination de ces deux familles de molécules apparaît donc compromise par interprétation directe du spectre ATR-FT-MIR (d'autant plus que les résultats de dosages biochimiques présentés dans le chapitre 3 n'ont pas mis en évidence des proportions contrastées dans nos différents résidus réfractaires). De plus, il est difficile d'attribuer spécifiquement chaque bande d'absorption à une fonction chimique susceptible d'avoir absorbées lors de l'irradiation du fait de la diversité et de la méconnaissance des différents composés qui composent nos matrices.

La démarche d'interprétation utilisée dans le cadre de ce travail est donc basée sur l'identification des principales bandes d'absorption distinguables dans différentes régions du spectre ATR-FT-MIR. Celles-ci sont présentées dans la Figure V.1. Les zones (1), (2) et (3) sont présentées en lien avec les principales fonctions auxquelles elles sont attribuables. Les différentes familles de molécules

auxquelles ces bandes sont attribuées dans la littérature sont aussi précisées. Par ailleurs, le choix a été de conserver les autres régions du spectre dans notre approche de caractérisation de manière à ne pas éliminer l'existence de signatures chimiques spécifiques dans ces zones moins étudiées ou moins intenses.

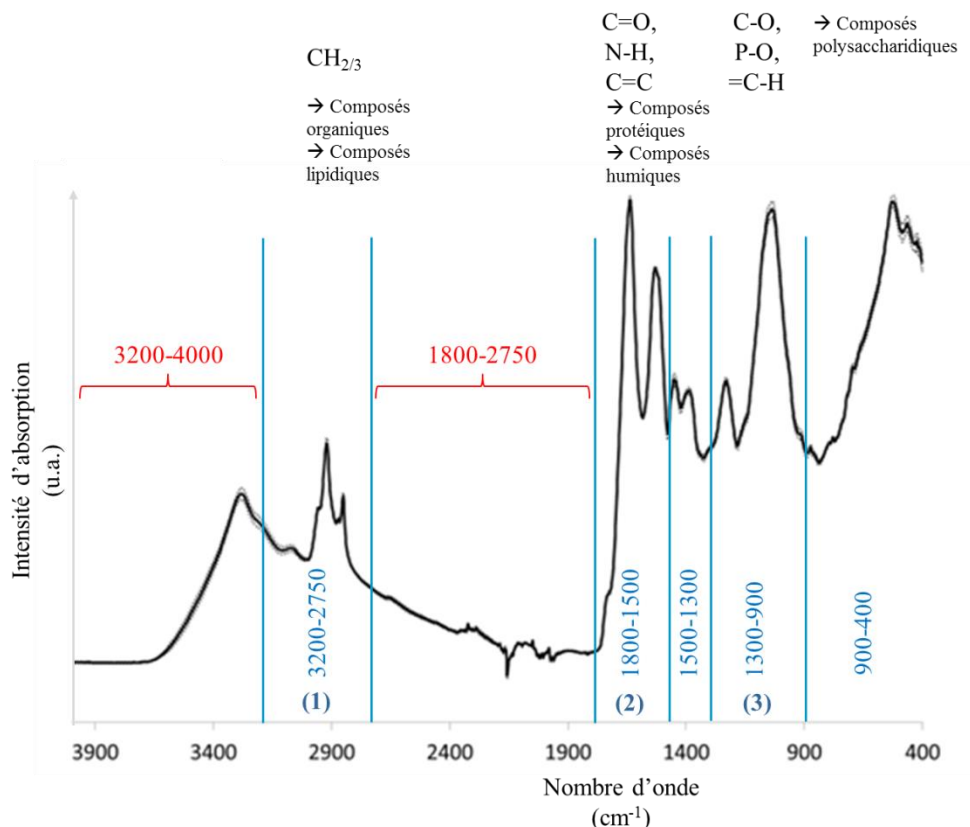


Figure V.1. Découpage d'un spectre ATR-FT-MIR en zones d'attribution

Comme précisé précédemment, les régions allant de 3200 à 4000 et de 1800 à 2750 cm⁻¹ sont retirées des données spectrales considérées en ATR-FT-MIR dans le cadre de ce travail, car elles sont respectivement trop impactées par les liaisons hydrogènes et par le domaine d'absorbance du cristal diamant (régions spectrales identifiées par les accolades rouges sur la Figure V.1). Chaque spectre est alors défini par 961 valeurs d'intensité d'absorption.

V.2.2 Variabilité d'un spectre ATR-FT-MIR de boues et de réfractaires

Le spectre ATR-FT-MIR d'un échantillon de boues ou de résidus réfractaires est utilisé dans le cadre de ce travail comme empreinte de leur nature chimique globale. Malgré la sensibilité de l'analyse infrarouge, cette démarche pose néanmoins la question de la représentativité d'un spectre infrarouge enregistré sur une surface de l'ordre du μm² alors que le diamètre moyen des particules des matrices analysées est de l'ordre d'une centaine de μm (soit une surface de l'ordre du mm²). L'objectif de ce paragraphe est de valider *in fine* l'utilisation de l'ATR-FT-MIR comme outil de caractérisation

pertinent de la nature chimique de matrices complexes et hétérogènes telles que des agrégats de boues et de résidus réfractaires.

V.2.2.1 Représentativité de l'empreinte spectrale pour un échantillon particulière complexe ?

La reproductibilité du spectromètre infrarouge a été établie sur un échantillon physiquement et chimiquement homogène, le glucose (chapitre Matériels et Méthodes). Les analyses soulignent que les données spectrales brutes doivent être centrées réduites de manière à éliminer la variabilité des intensités d'absorption induite par la quantité d'échantillon déposée (« effet dépôt »). L'évaluation de la variabilité intra-échantillon est donc réalisée dans ce paragraphe par quantification des variations des données spectrales centrées réduites de différents dépôts d'une même matrice complexe.

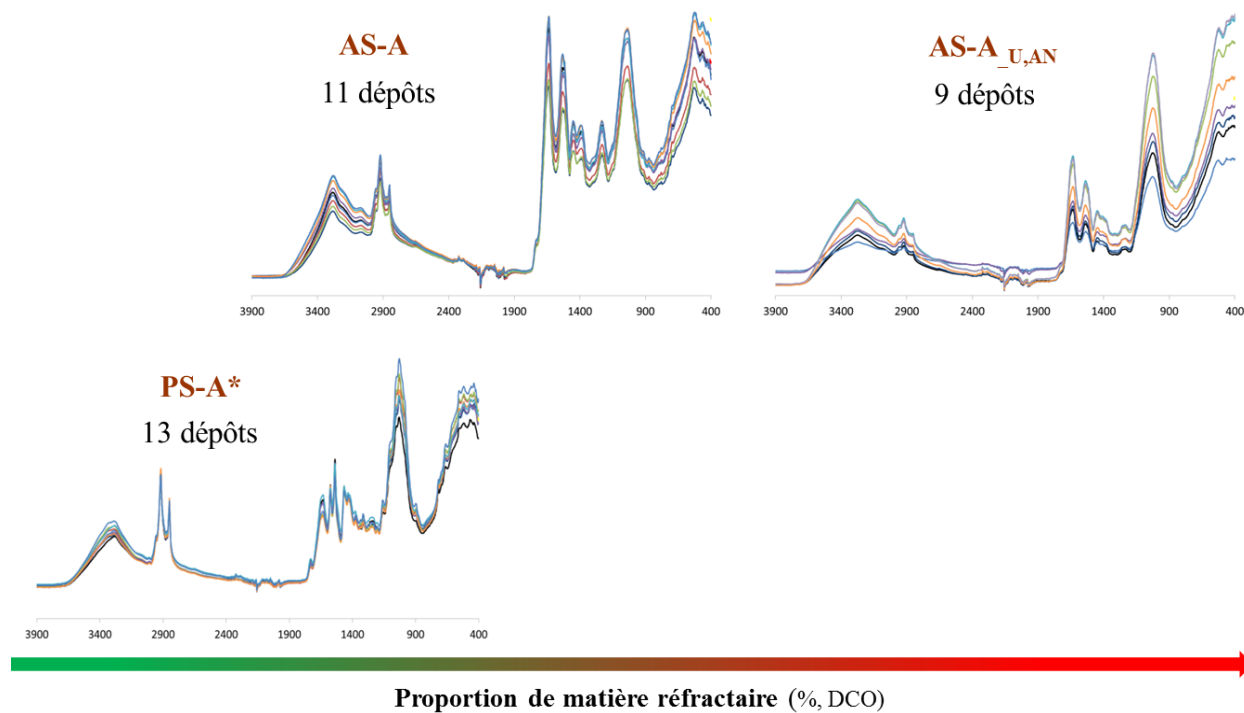
Trois matrices particulières ont été choisies pour évaluer la qualité de représentation de la nature chimique par ATR-FT-MIR d'échantillons complexes : PS-A*, AS-A et AS-A_{U,AN}. Ces matrices présentent des caractéristiques granulométriques (Tableau III.4) et des propriétés de biodégradabilité qui permettent de couvrir un panel représentatif des différents types de matrices envisagées. Le calcul de l'indice de confiance à 95 % du spectre moyen calculé à partir de l'ensemble des spectres ATR-FT-MIR mesurés pour un échantillon donné a alors été utilisé pour rendre compte de la dispersion de l'empreinte chimique d'un échantillon donné.

La Figure V.2 représente ainsi d'une part, les spectres ATR-FT-MIR bruts des différents dépôts de PS-A*, AS-A et AS-A_{U,AN}, et d'autre part, les spectres moyens encadrés par les intervalles de confiance à 95 % pour chaque (IC⁻, borne inférieure ; IC⁺, borne supérieure).

Nos résultats révèlent que, pour chaque matrice analysée, aucune nouvelle bande d'absorption n'a été décelée lors de l'analyse spectrale des différents dépôts. De plus, la position des sommets de pics a toujours été inférieure à la résolution admise lors de la mesure sur échantillon solide (8cm⁻¹). Une analyse renvoie donc bien une empreinte représentative de la chimie d'échantillons complexes et hétérogènes.

Néanmoins, malgré la correction de l'effet du dépôt par centrage-réduction, les intensités d'absorption présentent une certaine variabilité dont l'amplitude n'est pas identique sur l'ensemble du domaine spectral. Ce résultat est directement lié à la variabilité des proportions des différentes fonctions irradiées. Il ne remet pas en question la qualité de représentation mais souligne néanmoins la nécessité de caractériser cette variabilité pour établir le seuil de significativité des différences inter-échantillons lors d'analyses relatives.

I – Spectres ATR-FT-MIR bruts (sans prétraitement des données spectrales)



II – Spectres ATR-FT-MIR moyens bornés par l'intervalle de confiance à 95 % des données centrées réduites

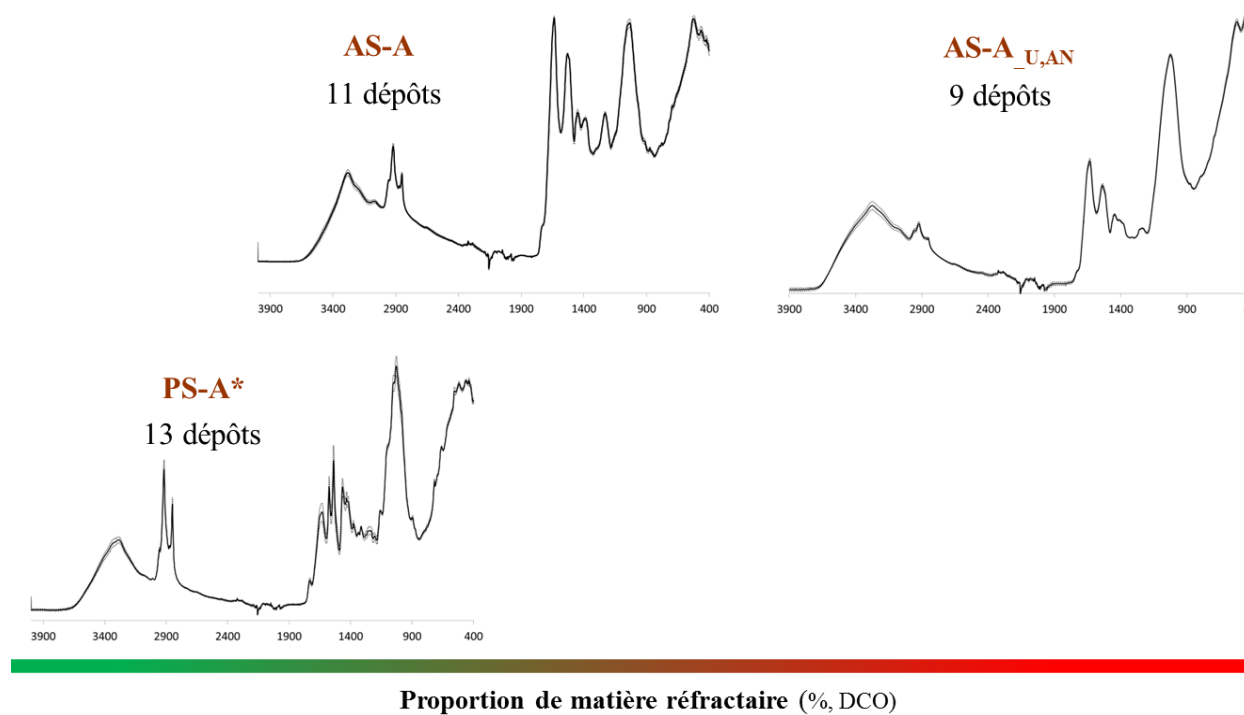
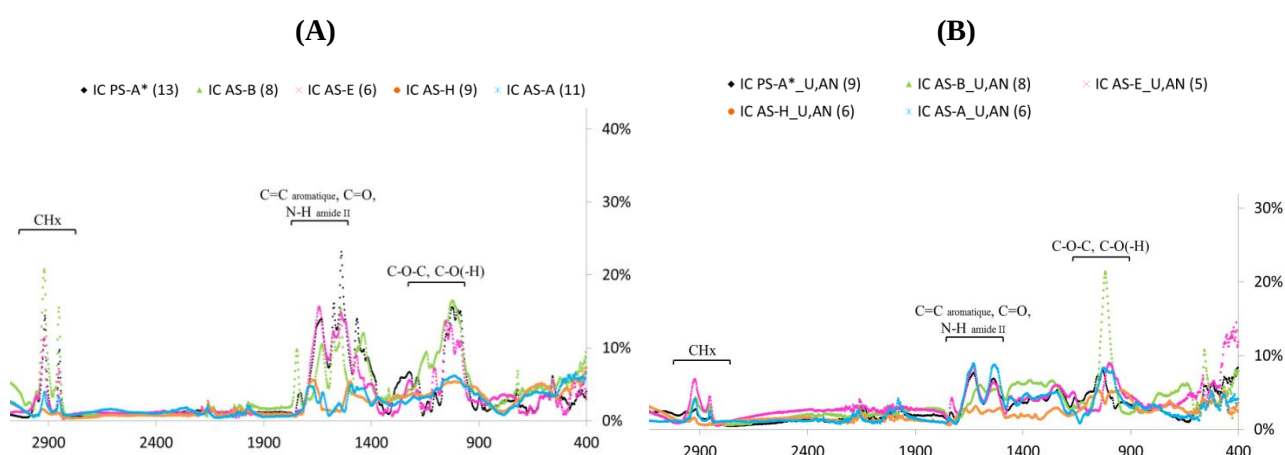


Figure V.2. Analyse de la qualité de représentation de la nature chimique de matrices complexes par ATR-FT-MIR

V.2.2.2 Variabilité matrice-dépendante ?

La même démarche a donc été appliquée aux différentes matrices, boues et réfractaires, considérées dans le cadre de ce chapitre. Aucune nouvelle bande d'absorption ou déplacement significatif ($>8\text{cm}^{-1}$) n'ont été constaté entre les analyses des différents dépôts d'un même échantillon. La variabilité concerne exclusivement l'intensité d'absorption quelles que soient les matrices.

L'erreur relative, exprimée en pourcentage et obtenue par le rapport de l'intervalle de confiance à 95% sur l'intensité moyenne, a alors été calculée. L'objectif est ici d'évaluer si l'amplitude de la variabilité des différentes valeurs d'intensité d'absorption est une caractéristique commune aux boues ou aux résidus réfractaires. La Figure V.3-A représente ainsi les erreurs relatives calculées pour la boue primaire PS-A* (congelée/décongelée), les boues biologiques AS-B et AS-E âgées de 2 et 5 jours et alimentée par PS-A* pour la DCO particulaire, les boues biologiques AS-A et AS-H prélevées sur des STEP alimentées respectivement par une ERU décantée et une ERU brute aux âges de boues de 2-3 jours et 70 jours. La Figure V.3-B représente les erreurs relatives calculées sur leurs résidus réfractaires obtenus après digestion anaérobie long terme (BMP > 120jours).



(..) : Nombre de spectres mesurés pour calculer l'intervalle de confiance à 95%

Figure V.3. Intervalles de confiance à 95% sur les intensités moyennes de l'empreinte spectrale de particules avant (A) et après (B) digestion anaérobie long terme (durée BMP>120jours)

Indépendamment de l'origine des échantillons particuliers analysés, l'intensité d'absorption varie, et ce, de manière différente selon la fréquence incidente considérée (nombre d'onde) :

- Au niveau des matrices boues, les boues biologiques AS-B et AS-E présentent une empreinte chimique plus hétérogène que les boues biologiques AS-A et AS-H sur quasiment l'ensemble de l'empreinte infrarouge. Leur variabilité est relativement proche de celle de la boue primaire PS-A* qui constitue leur unique source de DCO particulaire. Compte tenu de la faible biodégradation de la fraction particulaire au niveau du traitement biologique (fractionnement DCO chapitre 4), il est

cohérent de retrouver une dispersion de l’empreinte chimique similaire entre la boue primaire et les boues biologiques AS-B et AS-E dont la composition est alors encore fortement empreinte de la chimie des composés de la boue primaire. En revanche, la plus faible variabilité de l’empreinte spectrale des boues biologiques AS-A et AS-H est potentiellement liée à une moindre, voire quasi inexistante, contribution des composés lentement biodégradables (X_B) (chapitre 4). Ce résultat laisse donc penser que l’état de biodégradation d’une boue biologique pourrait impacter significativement l’hétérogénéité de sa chimie.

- Au niveau des matrices particulières réfractaires, l’erreur relative attribuable aux différentes valeurs d’intensités d’absorption est majoritairement inférieure à 10%. La nature chimique de particules réfractaires après digestion apparaît donc plus homogène que celle des particules de boues avant digestion.

En conclusion, nos résultats indiquent que les fonctions chimiques présentes ne sont pas réparties de façon homogène au sein des différentes matrices. L’amplitude de la variabilité intra-échantillon ne peut être fixée par défaut et doit impérativement être évaluée pour l’ensemble du domaine spectral considéré et pour les différentes matrices analysées.

Dans le cadre de ce travail, l’évaluation de la variabilité intra-échantillon garantit d’une part, la représentativité de l’empreinte chimique d’un échantillon donné, et d’autre part, la significativité des différences lors de la comparaison des empreintes chimiques des différentes matrices. Pour chaque échantillon, elle est donc évaluée par l’enregistrement de plusieurs spectres infrarouges pour un même échantillon (le nombre de répliquas a été arbitrairement fixé entre 5 et 10).

V.2.3 Démarche d’interprétation des caractéristiques chimiques

L’enjeu de ce paragraphe était d’auditer l’utilisation de l’ATR-FT-MIR pour caractériser la nature chimique de différentes matrices particulières de type boue et/ou réfractaires. Les résultats ont permis de mettre en évidence que cette technique spectroscopique permettait d’obtenir une empreinte représentative de leur chimie globale et que l’analyse de plusieurs dépôts permettait d’évaluer sa variabilité pour un échantillon donné.

Dans le cadre de ce travail, la définition des caractéristiques chimiques de nos matrices est réalisée par analyse relative de leurs empreintes spectrales. L’enjeu est alors de pouvoir d’une part, établir le caractère différencié, ou non, de leur chimie (empreinte considérée dans sa globalité), et d’autre part, identifier des régions spectrales d’intérêt (signatures chimiques discriminantes).

Puisqu’aucune étude de ce genre n’a été menée auparavant, rien ne permet de choisir *a priori* les données spectrales à comparer parmi les 961 valeurs d’intensités d’absorption qui définissent les différents spectres ATR-FT-MIR (de 400 à 1800 et de 2750 à 3200 cm^{-1}). Deux outils statistiques

d'analyse relative multi-variée ont alors été couplés à l'utilisation de l'ATR-FT-MIR afin d'avoir une approche objective et complémentaire pour révéler des différences : la classification ascendante hiérarchique (CAH) et l'analyse en composantes principales (ACP). Leurs principes et leurs principaux critères d'interprétation, déjà introduits dans le chapitre Matériels et Méthodes, sont brièvement rappelés afin de faciliter la lecture des résultats qui vont suivre :

▪ **La classification ascendante hiérarchique, CAH**

La classification ascendante hiérarchique (CAH) est un outil mathématique basé sur le regroupement d'individus statistiques (ici des spectres ATR-FT-MIR). L'ensemble des individus est alors réparti par ordre de proximité croissante selon un critère de dispersion minimale (méthode d'agrégation appelée « ward » détaillée dans le chapitre Matériels et Méthodes). Son résultat est représenté graphiquement, par l'intermédiaire d'un dendrogramme, ou arbre hiérarchique. L'histogramme des indices de niveaux des nœuds permet d'identifier les niveaux pertinents de partition de l'arbre hiérarchique obtenu (regroupements pertinents). De manière générale, un découpage en $(k+1)$ classes est jugé pertinent, lorsque k correspond aux k derniers nœuds de l'arbre qui sont concernés par des sauts de valeurs de niveaux importants.

▪ **L'analyse en composantes principales, ACP**

Cet outil mathématique condense la dispersion totale initiale existant entre les spectres ATR-FT-MIR comparés. L'analyse en composantes principales permet de synthétiser l'information contenue dans un grand nombre de variables, sans la déformer, par la création de nouvelles variables, dites composantes principales. Le plan factoriel qui correspond à la projection des valeurs des deux premières composantes principales (Dim1;Dim2) pour chaque individu statistique (spectres ATR-FT-MIR comparés). L'ACP permet ainsi de représenter graphiquement des regroupements ou des oppositions entre les empreintes spectrales des différents échantillons comparés.

Dans le cadre de ce travail, la CAH a donc été utilisée pour mettre en évidence des divergences ou des similitudes d'empreintes spectrales en tenant compte de la totalité des intensités d'absorption qui les définissent. L'ACP, appliquée à la comparaison de spectres ATR-FT-MIR, est utilisée en complément de la classification ascendante hiérarchique, pour identifier les régions spectrales significativement impliquées dans la discrimination des différentes matrices.

Dans une démarche basée sur l'analyse relative des empreintes ATR-FT-MIR, la qualité des conclusions est liée au seuil de significativité des **différences inter-échantillons**. La comparaison des empreintes réalisée CAH et/ou ACP doit permettre de conserver l'information relative à la **variabilité intra-échantillon d'un échantillon donné**. L'ensemble des spectres ATR-FT-MIR réalisés pour un échantillon donné sont donc conservés lors de l'analyse multi-variée de différentes matrices boues ou réfractaires et les différences seront jugées significative si la variabilité inter-échantillon est supérieure à la variabilité intra-échantillon.

Au final, la Figure V.4 illustre la démarche analytique globale mise en place et les caractéristiques recherchées (position des principales bandes d'absorption, le caractère différencié ou non des empreintes chimiques de différentes matrices, les régions spectrales discriminantes associées à la clusterisation des échantillons). Les résultats obtenus pour les matrices boues et les résidus réfractaires de boues sont alors présentés dans la partie suivante.

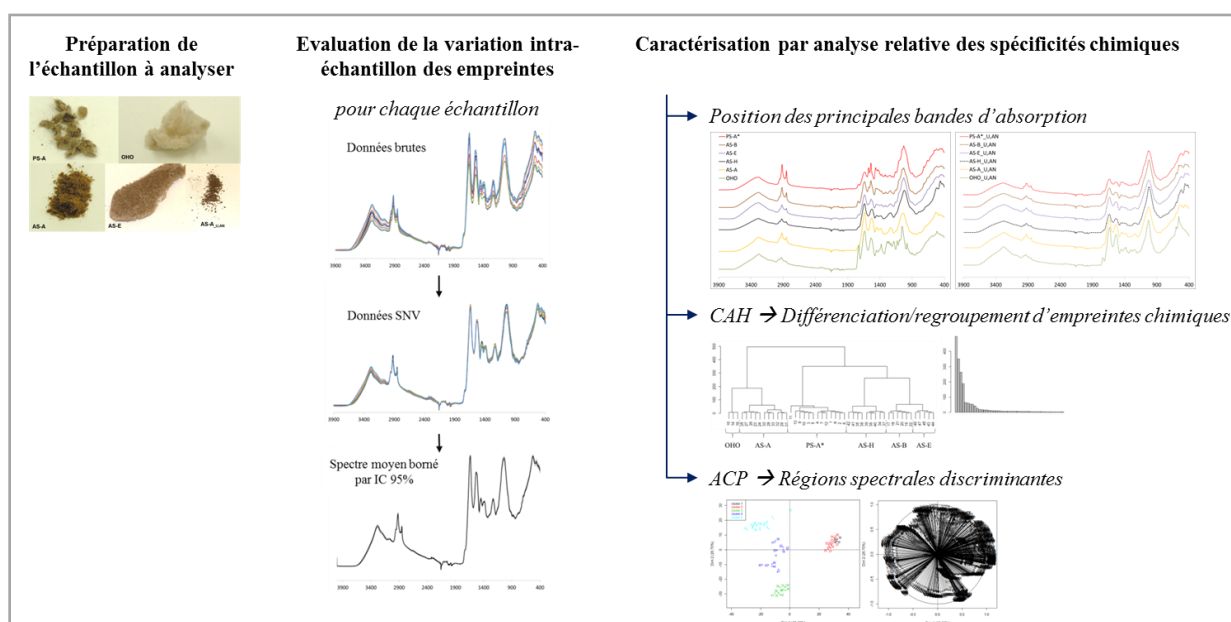


Figure V.4. Méthodologie d'analyse relative des caractéristiques chimiques définies par ATR-FT-MIR d'échantillons complexes de composition inconnue

V.3 IDENTIFICATION DES SPECIFICITES CHIMIQUES DES MATRICES AVANT ET APRES DIGESTION ANAEROBIE LONG TERME

L'analyse relative des spectres ATR-FT-MIR des matrices avant digestion anaérobie est réalisée dans un premier temps de manière à identifier si les conditions de production et d'alimentation contrastée conduisent à la production de matrices chimiquement différentes. Les empreintes obtenues pour les résidus réfractaires sont ensuite analysées. La chimie de chaque résidu réfractaire est d'abord comparée à celle de la matrice avant digestion de manière à établir si elle est significativement différente. Ensuite, les empreintes des **différents résidus réfractaires** sont comparées entre elles pour identifier s'ils sont chimiquement différents et s'ils existent des spécificités liées à l'origine de leurs constituants.

V.3.1 Caractérisation des boues

Les boues PS-A*, AS-B, AS-E, AS-A, AS-H et OHO correspondent aux matrices produites dans des conditions de traitement et d'alimentation contrastées définies dans le chapitre Matériels et Méthodes

et dont les principales caractéristiques données dans les chapitres 3 et 4 sont rappelées dans le Tableau V.3. Elles constituent la nature chimique de la matière avant digestion (qui contient encore de la matière biodégradable).

Tableau V.3. Caractéristiques globales des boues

Matrices boues	Type de boue	STEP d'origine	Nature de l'effluent à traiter		Âge de boue aérobie (jours)	Teneur en DCO réfractaire anaérobie (% DCO _{tot})	Origine de la matière réfractaire
			Avec $X_{U,inf}$	Sans $X_{U,inf}$			
PS-A*	Boue primaire	A	/		0		Exogène
OHO	Biomasse cellulaire	Pilote 1	Mélange de DCO _{S,B}		2		Endogène aérobie
AS-A	Boues biologiques	A	ERU décantée		2-3		Exogène + Endogène aérobie
AS-H		H	ERU brute		70		
AS-B		Pilote 2	PS-A*		2		
AS-E		Pilote 2	diluée		5		

L'objectif est ici de définir si ces matrices produites en conditions contrastées et composées de molécules réfractaires d'origines diverses présentent des caractéristiques chimiques spécifiques.

V.3.1.1 Analyse des principales régions d'absorption

La Figure V.5 présente les spectres infrarouges mesurés en ATR-FT-MIR des différentes matrices boues considérées dans ce chapitre.

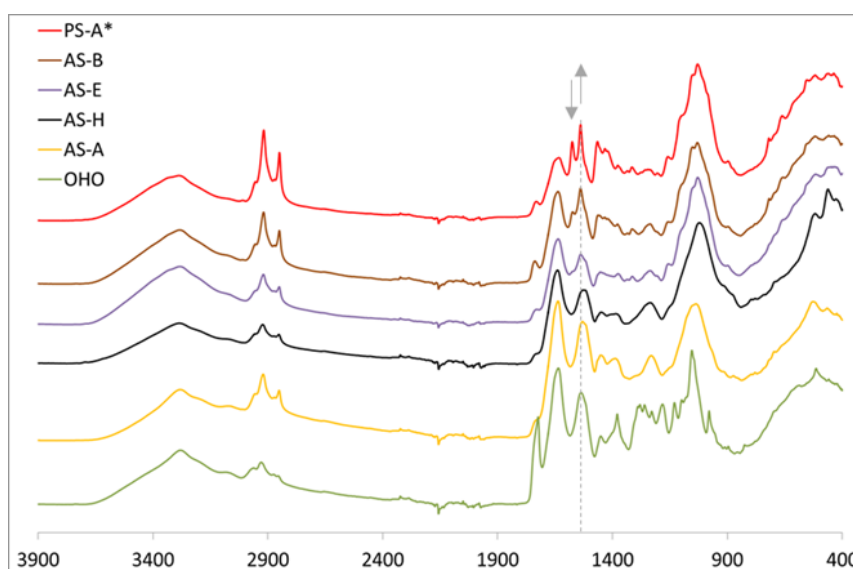


Figure V.5. Spectres ATR-FT-MIR d'une boue primaire et de différentes boues biologiques

L'analyse de l'empreinte spectrale des différents résidus réfractaires révèle les informations suivantes :

1. Quel que soit l'échantillon considéré, les pics d'absorption centrés sur 2920 et 2850 cm^{-1} , caractéristiques des liaisons C-H aliphatiques, sont présents. Cette caractéristique n'est pas surprenante car les groupes méthyl ou méthylène sont relativement prépondérants dans les composés organiques.

2. Considérant le domaine allant de 1500 à 1800 cm^{-1} , cinq positions de pics sont distinguables dans les matrices considérées (*les fonctions chimiques sont déduites du Tableau V.1 et l'écart-type correspond à la variabilité de la position de l'intensité max des pics pour les différentes matrices considérées*) :

- 1734 $\pm$ 1 cm^{-1} : la fonction C=O plutôt impliqué dans des liaisons ester et/ou aldéhyde,
- 1635 $\pm$ 2 cm^{-1} : les fonctions N-H d'amide primaire, C=O d'amide primaire et secondaire et/ou C=C d'alcène,
- 1575 cm^{-1} : la fonction C=C d'un squelette aromatique,
- 1537 $\pm$ 3 cm^{-1} : les fonctions C=C d'un squelette aromatique et/ou N-H d'une amide II,
- 1518 $\pm$ 1 cm^{-1} : la fonction C=C d'un squelette aromatique.

Le pic à 1575 cm^{-1} , indiqué par une flèche orientée vers le bas, est discernable uniquement dans la boue primaire et dans les boues biologiques alimentées par cette même boue primaire. Néanmoins, plus l'âge de boue augmente, plus il tend à disparaître (quasiment disparu à 5 jours pour AS-E).

Le pic à 1518 cm^{-1} , indiqué par une flèche orientée vers le haut, est plus discernable sur les spectres infrarouges de boues biologiques (moins évident pour AS-B dont la contribution quantitative des composés de la boue primaire est probablement encore trop significative).

La similitude des positions des pics d'absorption les plus intenses entre les spectres de boues biologiques AS-A et AS-H et celui de la matrice OHO (exclusivement composée de biomasse cellulaire et de résidus bactériens), est par ailleurs remarquable.

Enfin, le pic d'absorption à 1734 cm^{-1} apparaît intense dans le cas de la matrice OHO. Cependant, son attribution ne peut être établie de manière certaine compte tenu des différentes molécules cellulaires qui disposent de cette fonction (ex. fonction ester comme intermédiaire entre la tête polaire et la queue lipidique des phospholipides membranaires (Figure I.21), acides aminés avec fonction carboxylique tels que l'aspartate et le glutamate (Annexe 7), bases pyrimidiques et puriques de l'ADN...).

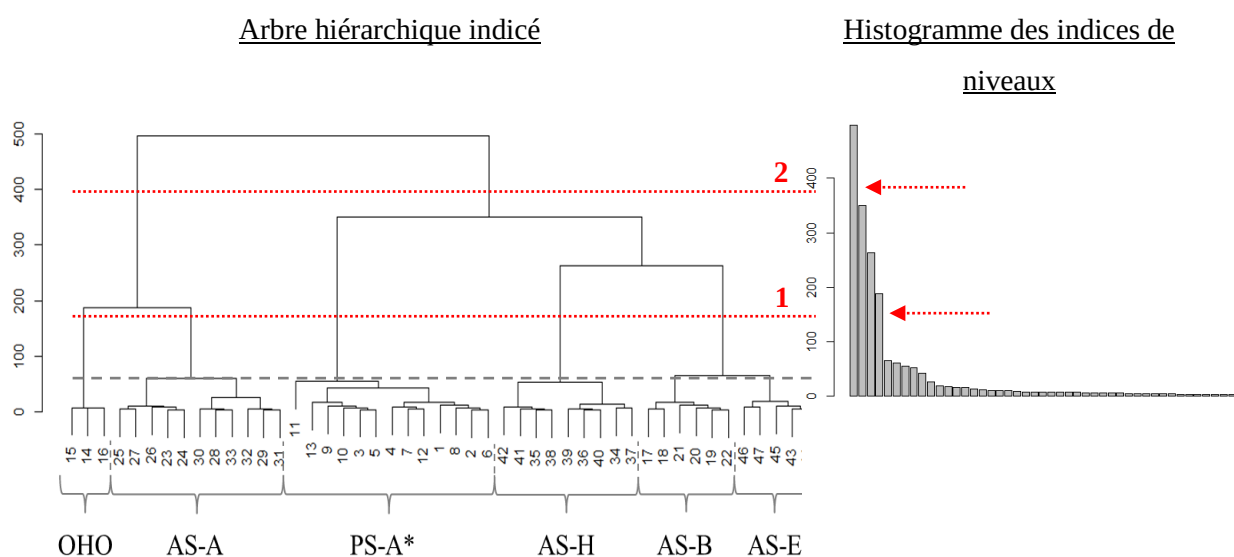
3. Sur le domaine allant de 400 à 1500 cm^{-1} , un pic intense centré sur 1028 $\pm$ 4 cm^{-1} sur tous les échantillons analysés est à noter. Majoritairement attribué à des fonctions C-O (généralement liées à la présence de composés polysaccharidiques), les fonctions P-O et =C-H dans le plan du noyau aromatique peuvent venir contribuer à la largeur et à l'amplitude de cette bande d'absorption. Il est intéressant de remarquer qu'à l'opposé des régions spectrales allant de 2750 à 3000 cm^{-1} et de 1500 à 1800 cm^{-1} précédemment analysées, les profils des empreintes infrarouges de la matrice OHO et des

boues sont significativement différents sur cette fenêtre spectrale. En effet, la nature chimique de la matrice cellulaire OHO présente davantage de pics distincts, particulièrement sur le domaine allant de 900 à 1500 cm^{-1} .

De manière globale, les spectres de boues d'épuration présentent des profils légèrement différents en termes de positions des pics d'absorption observables. La nature chimique de la boue primaire et des boues biologiques diffèrent notamment au niveau du domaine allant de 1500 à 1800 cm^{-1} avec la disparition progressive du pic à 1575 cm^{-1} de la boue primaire et l'apparition d'un pic à 1518 cm^{-1} dans le spectre des boues biologiques. La similitude entre les spectres infrarouges de boues biologiques et celui de la matrice cellulaire OHO sur cette même région spectrale confirme la contribution significative de la chimie des composés d'origine bactérienne à la chimie globale des boues biologiques.

V.3.1.2 Différenciation des boues selon leur spectre ATR-FT-MIR

La Figure V.6 montre les résultats obtenus pour la classification ascendante hiérarchique (CAH) réalisée sur l'ensemble des spectres ATR-FT-MIR enregistrés sur les particules de boues d'épuration produites par le pilote (AS-B, AS-E, OHO) et prélevées sur STEP (PS-A*, AS-A, AS-H).



Numéro de 1 à 42 : individus statistiques comparés et représentant les différents spectres ATR-FT-MIR dont les données ont été centrées-réduites

Figure V.6. Résultats de la CAH des différents spectres ATR-FT-MIR des boues avant digestion anaérobie long terme (BMP>120 jours)

Quelles que soient les matrices analysées, les différents spectres ATR-FT-MIR mesurés sont regroupés dans une même classe comme le souligne les accolades sur la Figure V.6. Pour chaque échantillon, l'indice du nœud réunissant l'ensemble des individus statistiques qui le caractérise représente la dispersion intra-échantillon de son empreinte spectrale. La boue biologique AS-A est la

matrice qui présente la variabilité intra-échantillon la plus importante. Elle fixe ainsi le seuil de significativité des différences inter-échantillons : la nature chimique de deux matrices sera considérée différente si le nœud entre leurs empreintes est supérieur au nœud de la matrice AS-A (signalé par le trait en tirets sur la Figure V.6). Dans ces conditions, la différence entre les empreintes des boues biologiques AS-B et AS-E, *a priori* réparties dans deux classes différentes (Figure V.6), ne sont pas significativement différentes. La nature chimique de ces deux boues est statistiquement similaire.

Au regard des sauts de niveaux, l'histogramme des indices de niveaux indique que **deux partitions sont statistiquement pertinentes**. Celles-ci sont indiquées par des flèches en pointillés, reportées au niveau de l'arbre hiérarchique par les traits en pointillés 1 et 2.

- Le niveau de différenciation le plus élevé mis en évidence par la CAH (trait en pointillés n°1) différencie toutes les boues les unes par rapport aux autres sauf AS-B et AS-E comme discutées précédemment. Les empreintes chimiques de OHO, AS-A, AS-H, PS-A* et [AS-B ; AS-E] sont donc significativement différentes. Compte tenu de la proximité entre les empreintes des boues AS-B et AS-E alimentées par PS-A*, il semble qu'un temps de séjour compris entre 2 et 5 jours n'induit pas de différence chimique significative des boues activées produites. Par ailleurs, à faible temps de séjour, l'empreinte chimique d'une boue biologique alimentée par la fraction décantable ou non décantable d'une ERU apparaît significativement modifiée. En effet, la CAH a mis en évidence la différence significative de nature chimique existant entre les boues AS-B/E et la boue AS-A, respectivement alimentées par la boue primaire ou l'ERU décantée de la STEP A.
- La classification met néanmoins en évidence que malgré leurs différences des empreintes de boues peuvent être rapprochées entre elles par opposition aux autres. Ainsi, les deux regroupements suivants peuvent donc être considérés comme statistiquement pertinents par la CAH (trait en pointillés n°2) :

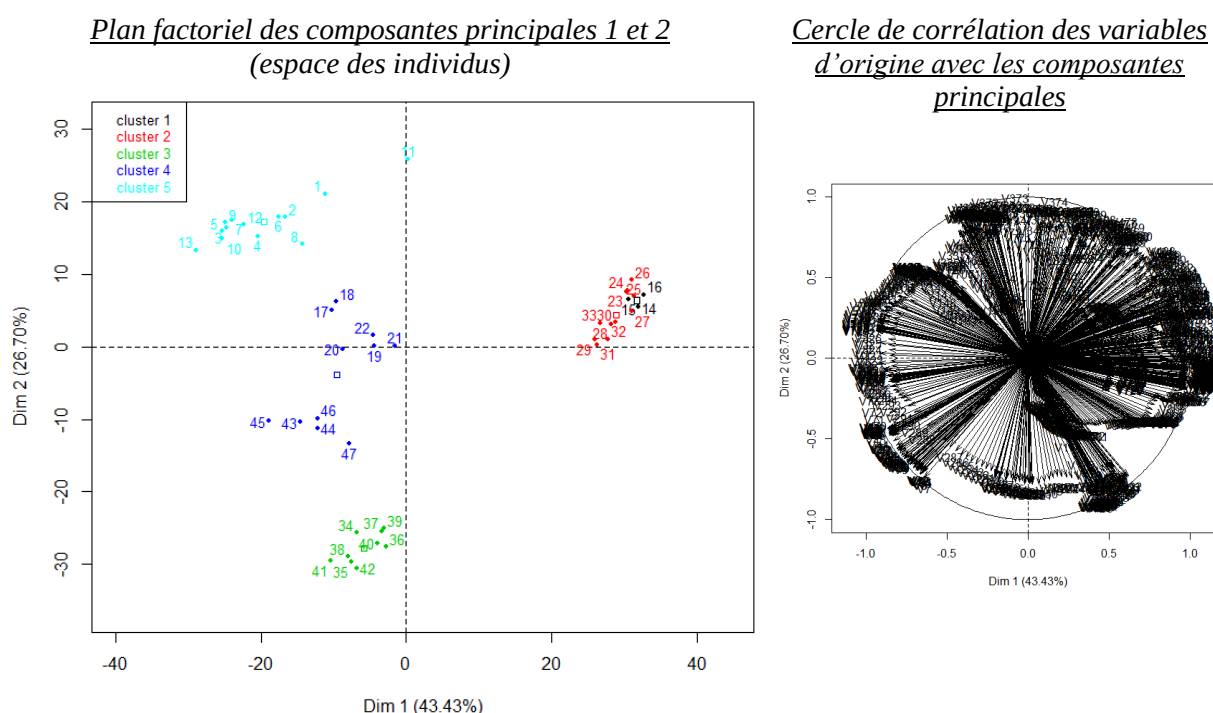
1. [OHO ; AS-A]
2. [PS-A* ; AS-H ; AS-B ; AS-E]

La chimie de la boue biologique AS-A alimentée par une ERU décantée est significativement différente de celle d'autres boues biologiques alimentées par une ERU brute ou par PS-A*. De plus, le regroupement des spectres relatifs à AS-A et à la matrice OHO produite sur alimentation exempte de DCO particulière réfractaire indique que la chimie d'une boue biologique alimentée par une ERU décantée apparaît significativement proche de celle de composés exclusivement d'origine cellulaire.

Ces résultats indiquent que la chimie de la fraction décantable impacte très significativement et systématiquement l'empreinte chimique d'une boue activée. De plus, ils soulignent que le fractionnement du flux de matière organique au niveau de la décantation primaire pourrait être un critère majeur impactant la chimie globale des boues ainsi produites.

V.3.1.3 Régions spectrales discriminant la nature chimique des différentes boues

La Figure V.7 montre les résultats de l'ACP réalisée sur le même ensemble de spectres ATR-FT-MIR (boues du Tableau V.3). L'axe « Dim1 » différencie les individus statistiques selon le même critère de différenciation mis en évidence par la CAH. En effet, les nuages de points-individus bleu clair, bleu foncé et vert correspondant aux échantillons PS-A*, AS-B, AS-E et AS-H ont une coordonnée négative sur l'axe de la première composante, alors que les nuages de points rouge et noir correspondant aux échantillons AS-A et OHO ont une coordonnée positive. L'axe « Dim2 » permet essentiellement de différencier les empreintes de la boue primaire de celles des boues AS-B et AS-E dont elle a composé l'alimentation.



Nomenclature des individus statistiques (spectres ATR-FT-MIR) représentés sur le plan factoriel (1 ; 2) :
 (bleu clair) 1 à 13 : Spectres ATR-FT-MIR de PS-A* ;
 (noir) 14 à 16 : Spectres ATR-FT-MIR de OHO ;
 (bleu foncé) 17 à 22 + 43 à 47 : Spectres ATR-FT-MIR de [AS-B + AS-E] ;
 (rouge) 23 à 33 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-A ;
 (vert) 34 à 42 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-H.

Figure V.7. Résultats de l'ACP réalisée sur l'ensemble des spectres ATR-FT-MIR des boues d'épuration avant digestion anaérobie long terme

L'analyse du cercle de corrélation entre les variables d'origines (nombre d'onde) et les composantes principales met en évidence que les différentes régions spectrales qui contribuent majoritairement à la première composante « Dim1 » sont : 482-566 ; 968-1274 ; 1346-1403 ; 1483-1533 ; 1546-1564 ; 1587-1708 cm^{-1} . Elles constituent des indicateurs spécifiques de la chimie des différentes matrices. Il est intéressant de noter que les bandes d'absorption à 1537, 1575 et 1635 cm^{-1} , précédemment identifiées dans la Figure V.5, correspondent à des fonctions attribuables à des protéines (C=O et N-H)

et/ou à des composés aromatiques (C=C). Ces observations ne permettent néanmoins pas de postuler sur un enrichissement spécifique de l'une ou l'autre de ces familles de molécules.

V.3.1.4 Conclusion

Globalement, des différences de caractéristiques chimiques sont clairement identifiables entre une boue primaire et une boue biologique du fait de la présence ou de l'absence de certains pics dans l'empreinte spectrale. Malgré des bandes relativement communes parmi les boues biologiques, nos résultats ont mis en évidence qu'une boue biologique alimentée par une ERU décantée présente des caractéristiques chimiques proches de celle d'une matrice exclusivement cellulaire. Les boues primaires ont donc un impact important sur l'empreinte chimique d'une boue. Il est probable que la présence ou non d'un décanteur conditionne au final la chimie de la boue secondaire et donc sa biodégradabilité aérobie et anaérobie. Au final, la chimie même de la fraction réfractaire pourrait être impactée et les mécanismes à l'origine de sa récalcitrance variables.

V.3.2 Caractérisation des résidus réfractaires

Les résidus réfractaires PS-A*_{U,AN}, AS-B_{U,AN}, AS-E_{U,AN}, AS-A_{U,AN}, AS-H_{U,AN} et OHO_{U,AN} correspondent aux matrices particulières récupérées en fin de BMP dont la durée de digestion est au moins de 120 jours. L'origine de leurs différents composés organiques (exogène, endogène aérobie et endogène anaérobie) est rappelée dans le Tableau V.4. Les données quantitatives correspondent aux fractionnements DCO estimés dans le chapitre 4 (Tableau IV.11).

Tableau V.4. Origine et proportion des différents composés organiques des résidus réfractaires considérés

Résidus réfractaires	Origine des composés exogènes (X _{U,inf})			Fractionnement DCO (% DCO)		
	ERU brute	ERU décantée	Fraction décantable (PS-A*)	Fraction exogène	Fraction endogène aérobie	Fraction endogène anaérobie
PS-A* _{XU,AN}			✓	0,95		0,05
OHO _{XU,AN}		aucun			0,68±0,11	0,32±0,11
AS-A _{XU,AN}		✓		0,75±0,02	0,16±0,03	0,09±0,01
AS-H _{XU,AN}	✓			0,60±0,02	0,39±0,03	0,01±0,01
AS-B _{XU,AN}			✓	0,93±0,00	0,02±0,01	0,05±0,00
AS-E _{XU,AN}			✓	0,92±0,02	0,03±0,01	0,05±0,04

L'objectif est ici de définir l'existence, ou non, de caractéristiques chimiques particulières liées à l'origine des composés réfractaires. Une première partie s'attache d'abord à comparer la chimie d'un résidu réfractaire par rapport à celle de la boue avant digestion anaérobie (encore empreinte de composés biodégradables). Les empreintes chimiques des différents résidus réfractaires sont ensuite comparées de manière à révéler des similitudes ou des divergences, ainsi que les régions spectrales discriminantes.

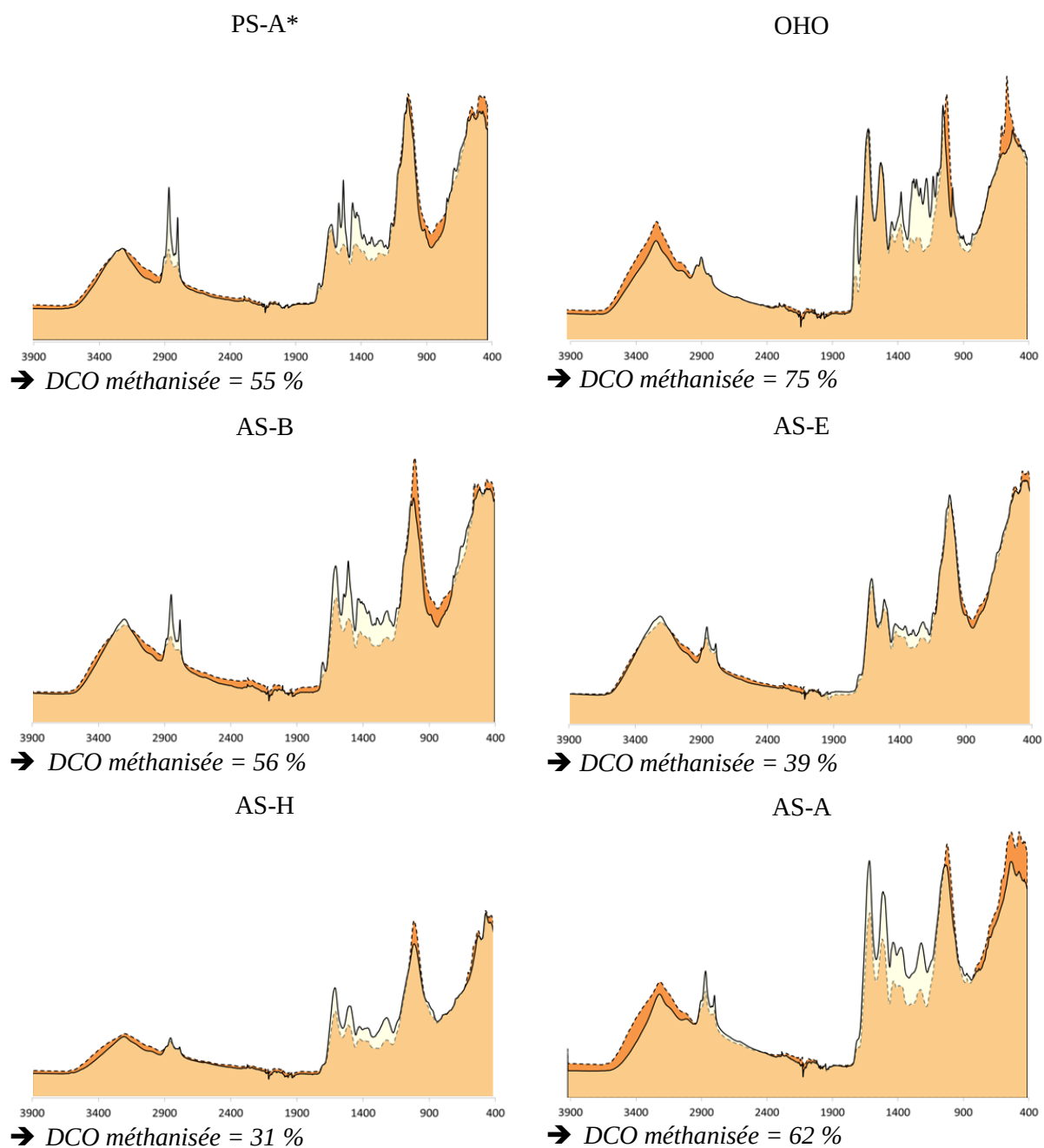
La chimie d'un résidu réfractaire de boue est-elle différente de la chimie de la boue avant digestion ?

L'évolution des empreintes chimiques occasionnée par la digestion anaérobie de la fraction biodégradable des boues PS-A*, OHO, AS-A, AS-B, AS-E et AS-H, est représentée sur la Figure V.8. Pour plus de clarté, seuls les spectres ATR-FT-MIR moyens mesurés avant et après digestion anaérobie long terme sont représentés. De plus, un mode de représentation graphique en surface a par ailleurs été choisi pour mettre en évidence les modifications subies par les différentes régions des spectres infrarouges lors de la biogazéification de la DCO biodégradable contenue dans les boues. De manière générale, la disparition de fonctions chimiques induite par la biodégradation ultime va se traduire par une diminution de l'intensité des bandes d'absorption correspondantes. L'augmentation de l'intensité d'absorption indique les domaines qui, en proportion, contribuent davantage à la chimie globale des particules résiduelles.

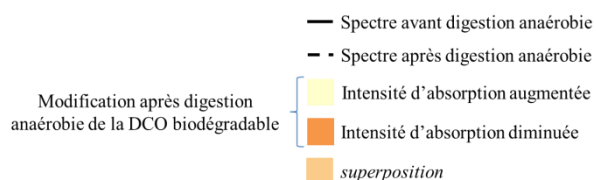
L'analyse de la Figure V.8 indique que la biodégradation a un effet relativement commun sur l'empreinte chimique des matrices avant digestion, et ce, indépendamment de la qualité et de la quantité de la DCO méthanisable :

- diminution des bandes d'absorption à 2850 et 2920 cm^{-1} et de celles comprises dans la région spectrale allant de 1500 à 1800 cm^{-1} ,
- augmentation de celles présentes dans les régions allant de 3000 à 3200 cm^{-1} et de 900 à 1100 cm^{-1} .

Toutefois, la modification des empreintes se révèle différente selon les boues. Une analyse plus approfondie de l'effet de la digestion anaérobie sur la nature chimique des boues est alors réalisée en considérant dans un premier temps, une seule région spectrale en accord avec des données de la littérature, et dans un second temps, la globalité de l'empreinte chimique des échantillons.



Légende



Rappels de quelques fonctions chimiques d'après le Tableau V.1

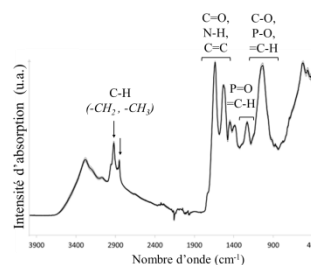


Figure V.8. Effet de la biodégradation anaérobie sur la chimie du substrat particulaire des boues PS-A*, OHO, AS-B, AS-E, AS-A, AS-H

a. Évolution des bandes centrées à 2851 et 2922 cm^{-1}

Les travaux de Smidt et al. (2009) suggèrent que la région spectrale allant de 2750 à 3050 cm^{-1} , essentiellement marquée par l'absorbance des fonctions C-H, pourrait être un indicateur du changement de l'état de biodégradation de boues activées en lien avec leur composition (résultats obtenus par analyse de l'analyse relative de boues activées, avant et après digestion anaérobie, avec ou sans post-aération, par ACP réalisée sur la région allant de 2750 à 3050 cm^{-1} de spectres mesurés en moyen infrarouge sur pastille de KBr (transmission)). Sur la base de ces données, l'intensité d'absorption des deux bandes centrées sur 2851 et 2922 cm^{-1} , présentes dans ce domaine, ont été comparés pour l'ensemble de nos matrices avant et après digestion anaérobie long terme. Les ratios d'intensités entre ces deux bandes étant conservés (Annexe 4), seule l'intensité d'absorption à 2922 cm^{-1} a été représentée sur la Figure V.9.

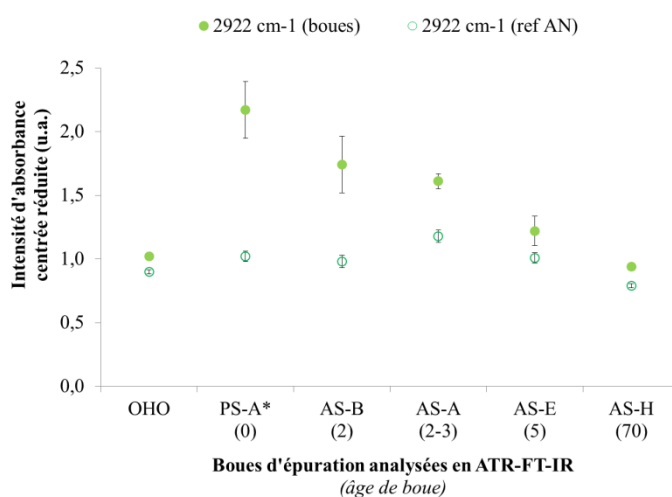


Figure V.9. Evolution de l'intensité d'absorption du pic à 2922 cm^{-1} pour des boues et leurs résidus réfractaires

La Figure V.9 indique que, malgré la variabilité intra-échantillon de l'intensité d'absorption à 2922 cm^{-1} (signalée par les barres d'erreur), plus l'âge des boues analysées augmente, plus l'intensité d'absorption de la bande à 2922 cm^{-1} diminue. De plus, la digestion anaérobie des composés organiques biodégradables se traduit par la diminution de l'absorption mesurée à 2922 cm^{-1} pour chaque matrice. Toutefois, l'amplitude de la diminution n'est pas directement corrélée à la teneur en DCO biodégradable contenue dans la boue avant digestion anaérobie.

Au final, l'analyse de la Figure V.9 vient compléter le résultat de Smidt et al. (2009) en soulignant que cette région spectrale pourrait être utilisée comme indicateur de la stabilisation de la matière avant digestion anaérobie en lien avec son âge de boue. Néanmoins, il doit être souligné que l'intensité d'absorption à 2922 cm^{-1} semble être un critère moins discriminant entre les différents résidus réfractaires.

b. Analyse relative des empreintes chimiques de l'ensemble des matrices avant et après digestion anaérobie

Une classification ascendante hiérarchique a par ailleurs été réalisée sur l'ensemble des spectres ATR-FT-MIR mesurés sur les matrices avant et après digestion anaérobie (dont les spectres moyens ont été comparés dans la Figure V.8). Le dendrogramme correspondant est présenté dans la Figure V.10.

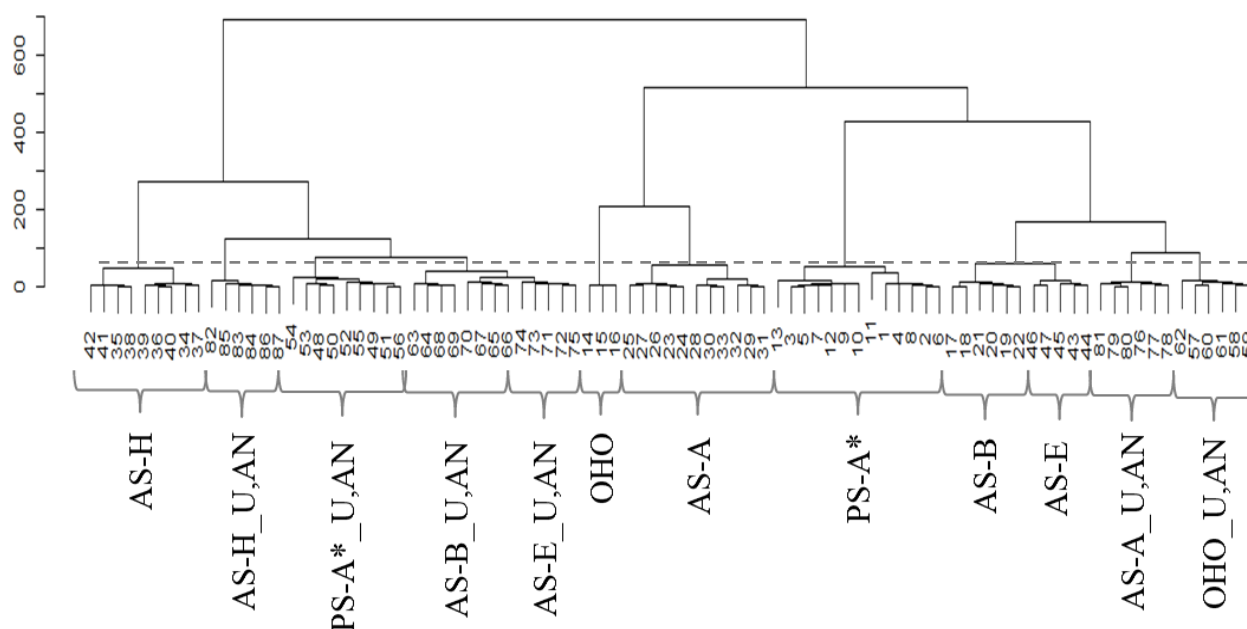


Figure V.10. Dendrogramme des différents spectres ATR-FT-MIR de boues avant et après digestion long terme (BMP>120 jours)

Comme précédemment, le niveau de significativité des différences entre les empreintes chimiques des échantillons est indiqué par le trait en pointillé (nœud de AS-A et PS-A*). Exceptés pour les boues AS-B et AS-E et leurs résidus réfractaires AS-BU,AN et AS-EU,AN, dont les empreintes ne sont pas significativement différentes (au regard du seuil de significativité), l'ensemble des spectres ATR-FT-MIR d'un même échantillon est toujours suffisamment proche pour qu'ils soient réunis dans une même classe (indiqués par les accolades).

L'arbre hiérarchique valide que, malgré la similarité des profils de certaines empreintes ATR-FT-MIR avant et après digestion anaérobie (ex. AS-A/AS-A_{XU,AN} et AS-H/AS-H_{XU,AN}), **la nature chimique de la matière avant digestion est toujours significativement différente de celle du résidu réfractaire correspondant**. Ce résultat est d'ailleurs confirmé par les ACP réalisées pour chaque matrice boue (présentées en Annexe 3). Il est toutefois intéressant de remarquer que cette différence est plus ou moins importante selon la matrice considérée (distance entre les classes correspondant aux empreintes avant et après digestion). La boue biologique AS-H et son résidu réfractaire anaérobie, AS-H_{XU,AN}, présentent ainsi la différence de nature chimique la moins significative. Ce résultat souligne

qu'une boue produite avec un âge de boues très élevé, aura non seulement un faible potentiel méthane mais aussi que sa chimie sera peu modifiée par la biodégradation anaérobie.

V.3.2.1 Analyse des principales bandes d'absorption associées aux molécules réfractaires

Les spectres ATR-FT-MIR des résidus particuliers réfractaires obtenus en fin de digestion anaérobie long terme sont présentés dans la Figure V.11. L'objectif est d'identifier la présence de bandes d'absorption particulières.

Indépendamment de l'origine des matrices digérées en anaérobie (conditions de production des boues, nature de l'effluent à traiter, présence de composés exogènes), **les spectres ATR-FT-MIR des résidus réfractaires correspondants présentent de nettes similitudes en termes de position des bandes d'absorption**. Les pics d'absorption indiqués par des flèches ainsi que les fonctions chimiques associées à ces domaines sont les suivants :

- 2920 et 2850 cm^{-1} : les fonctions C-H aliphatiques,
- 1635 $\pm$ 2 cm^{-1} : les fonctions N-H d'amide primaire, C=O en tant que radical d'amide primaire et secondaire et/ou C=C d'alcène;
- 1537 $\pm$ 3 cm^{-1} : les fonctions C=C d'un squelette aromatique et/ou N-H d'une amide II;
- 1518 $\pm$ 1 cm^{-1} : la fonction C=C d'un squelette aromatique;
- 1028 $\pm$ 4 cm^{-1} : les fonctions C-O majoritairement et dans une moindre mesure les fonctions P-O et =C-H des noyaux aromatiques.

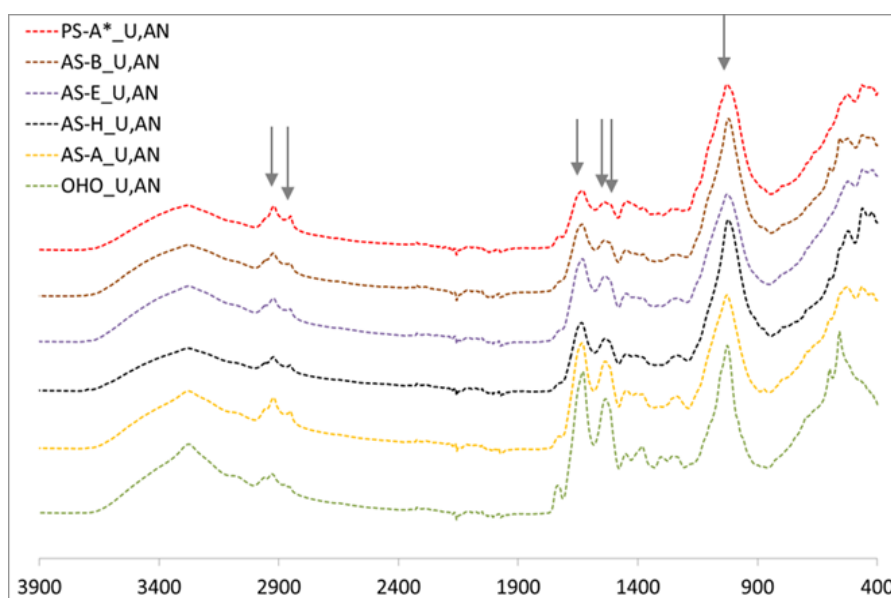


Figure V.11. Spectres ATR-FT-MIR des particules réfractaires à la digestion anaérobie long terme (BMP>120 jours) de différentes matrices biologiques (PS-A*, AS-B, AS-E, AS-A, AS-H, OHO)

Ces résultats mettent ainsi en évidence que la position des pics ne semble pas être un critère clairement discriminant de la nature chimique globale des différents types de réfractaires. La dégradation ultime anaérobie de différentes boues conduit à des résidus réfractaires présentant des empreintes similaires.

V.3.2.2 Différenciation des résidus réfractaires par leur spectre ATR-FT-MIR

Une classification ascendante hiérarchique a été réalisée sur les spectres ATR-FT-MIR enregistrées sur les particules réfractaires à la digestion anaérobie pour analyser plus spécifiquement les différences et les similitudes de leurs empreintes. La Figure V.12 montre l'arbre hiérarchique indicé obtenu et l'histogramme des indices de niveaux des nœuds.

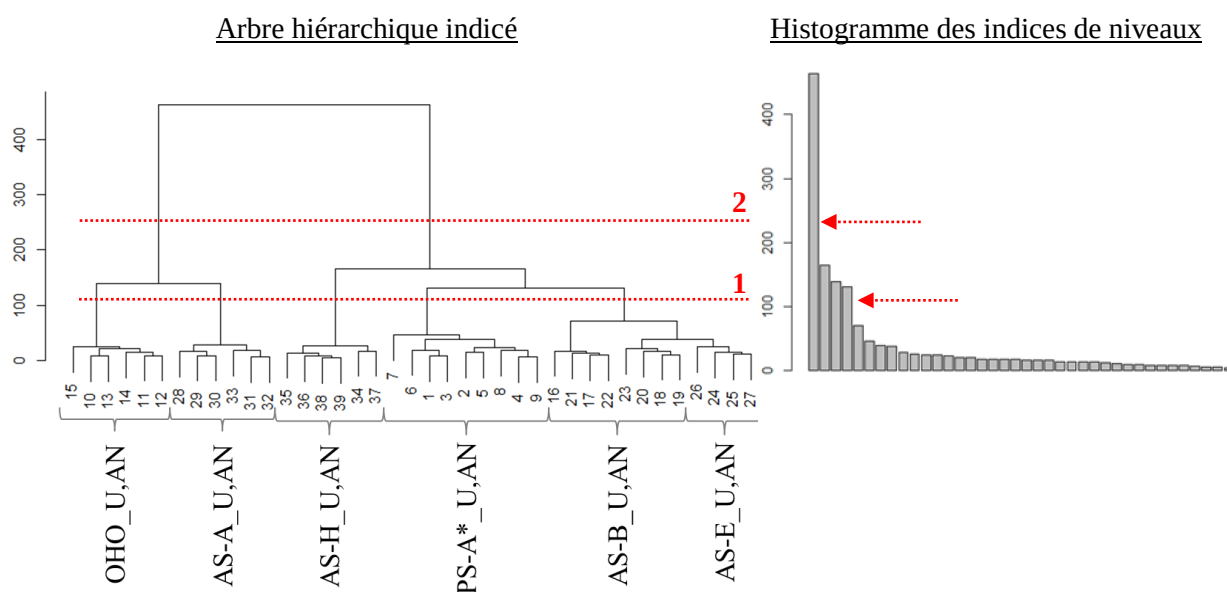


Figure V.12. Résultats de la CAH des différents spectres ATR-FT-MIR des particules réfractaires à la digestion anaérobie long terme (BMP>120 jours)

L'analyse de l'histogramme des indices de niveaux indique que les découpages en 5 et 2 classes, respectivement indiqués par les traits en pointillés rouges (1) et (2) sur l'arbre hiérarchique, sont statistiquement les plus pertinents. Ces partitions révèlent ainsi différents critères de discrimination de la nature chimique des particules réfractaires à la digestion anaérobie.

Le niveau de dispersion le plus élevé mis en évidence par la CAH sépare les empreintes chimiques des résidus réfractaires de la manière suivante (trait en pointillés n°1) : OHO_U,AN, AS-A_U,AN, AS-H_U,AN, PS-A*_U,AN et [AS-B_U,AN ; AS-E_U,AN].

La nature chimique des résidus réfractaires de AS-B_U,AN et AS-E_U,AN n'apparaît donc pas significativement différente. Ce résultat est cohérent avec l'origine des composés réfractaires et le faible contraste estimés entre leurs proportions relatives. Il est par ailleurs intéressant de noter que si les résidus PS-A*_U,AN, AS-B_U,AN et AS-E_U,AN présentent une teneur en composés exogènes $X_{U,inf}$ majoritaire et du même ordre de grandeur comprise entre 92 et 95% (Tableau V.4), la chimie du

réfractaire de PS-A* apparaît néanmoins différente. Ainsi, malgré une contribution quantitative estimée faible des résidus bactériens accumulés pendant le traitement biologique aérobie (2%), il est possible qu'elle suffise à impacter la chimie globale des composés réfractaires à la biodégradation anaérobie.

Par ailleurs, les empreintes chimiques des résidus réfractaires PS-A*_{U,AN} et AS-A_{U,AN} sont significativement différentes alors qu'elles sont composées respectivement de 95 et 75 % de DCO réfractaire exogène. Ainsi, malgré une proportion majoritaire en composés exogènes originaires d'un même réseau d'assainissement (STEP A), la chimie de résidus réfractaires de boues produites sur des fractions différentes de l'ERU brute est significativement différente. Nos résultats ne permettent cependant pas de préciser si cette différence est liée à la contribution des composés accumulés pendant le traitement biologique de la filière eau ou à la nature des composés véhiculés par la fraction non décantable contenue dans l'ERU brute entrant sur la STEP A.

L'analyse de l'histogramme des indices de niveaux indique qu'une deuxième partition des différents résidus réfractaires est statistiquement pertinente (trait en pointillés n°2 sur la Figure V.12). Leurs empreintes chimiques peuvent ainsi être regroupées dans les deux groupes suivants :

1. [OHO_{U,AN} ; AS-A_{U,AN}]
2. [AS-H_{U,AN} ; PS-A*_{U,AN} ; AS-B_{U,AN} ; AS-E_{U,AN}]

On retrouve l'influence de la fraction décantable sur les empreintes chimiques des résidus réfractaire comme précédemment sur les matrices avant digestion. Ainsi, même si la matrice AS-H_{U,AN} présente la contribution quantitative en composés d'origine endogène la plus importante ($0,41\text{gDCO}_{\text{Xu,e}}\cdot\text{gDCO}_{\text{U,AN}}^{-1}$), elle est significativement différente de celle de OHO_{U,AN}. La classification indique par contre que la chimie de la matrice AS-A_{U,AN}, composée de $0,25\text{gDCO}_{\text{Xu,e}}\cdot\text{gDCO}_{\text{U,AN}}^{-1}$, est par contre statistiquement plus proche de la chimie de la matrice OHO_{U,AN} exclusivement composée de résidus d'origine bactérienne. Le rapprochement des résidus réfractaires OHO_{U,AN} et AS-A_{U,AN} sur la base de leur empreinte infrarouge indique que la nature chimique de la fraction réfractaire d'une boue biologique alimentée par une ERU décantée est potentiellement plus impactée par la chimie de résidus réfractaires d'origine bactérienne. Plusieurs travaux ont mis en évidence que la décantation tend à augmenter la teneur en biomasse cellulaire dans l'ERU décantée par rapport à l'ERU brute (Foladori et al., 2010, Spérandio et al., 2001). Ce résultat souligne que le fractionnement de la matière opéré par simple décantation induit une fraction réfractaire exogène potentiellement plus empreinte de composés d'origine cellulaire. D'ailleurs, la différence significative entre les matrices [AS-B_{U,AN} ; AS-E_{U,AN}] et la matrices AS-A_{U,AN} révèle que la fraction réfractaire exogène véhiculée par le flux de matière décantable, ou non décantable, d'une ERU sont de natures chimiques significativement différentes.

Ainsi, la contribution qualitative des composés d'origine cellulaire à la chimie globale d'un résidu réfractaire apparaît davantage liée à la nature de l'effluent à traiter qu'à la contribution quantitative des

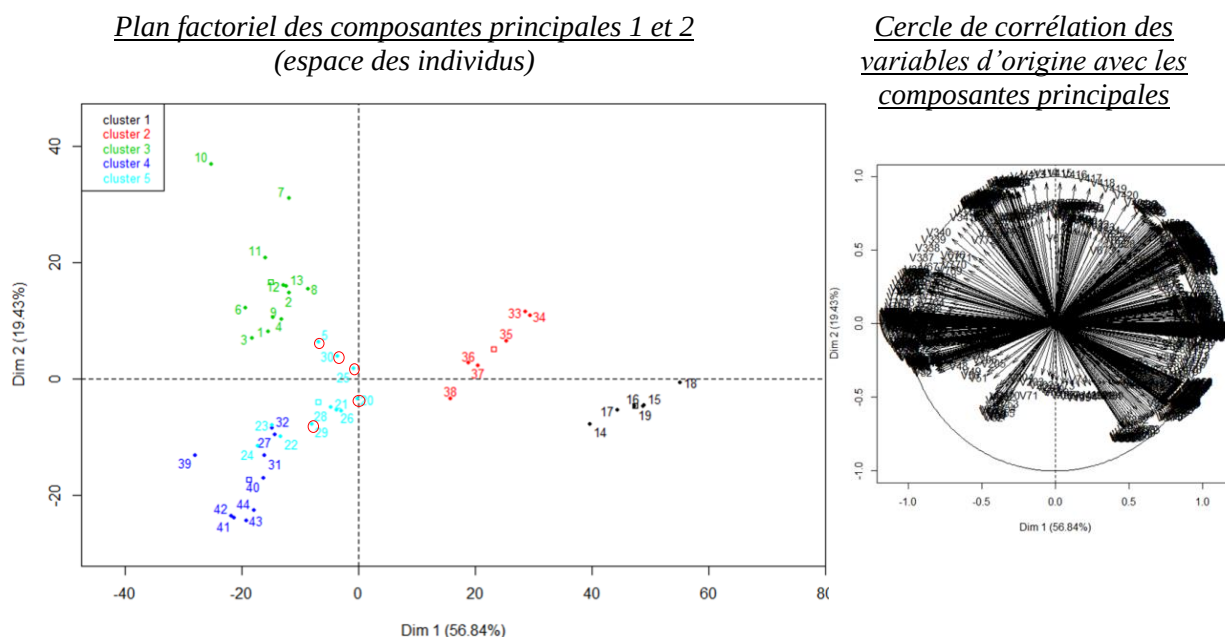
fractions X_{U,E_AE} et X_{U,E_BMP} . En ce sens, **la proportion en composés d'origine cellulaire au sein de la fraction réfractaire exogène pourrait constituer un facteur déterminant de la chimie d'un résidu de boue**. De plus, nos résultats mettent en évidence que la chimie des différents résidus réfractaires est différente malgré la similitude des principales bandes d'absorption identifiées dans le paragraphe précédent. **La proportion relative des différentes fonctions chimiques présentes (intensités des bandes) apparaît donc être un critère plus discriminant de la chimie globale de différents résidus réfractaires que leur nature (position des bandes)**.

V.3.2.3 Régions spectrales discriminant la nature chimique des différents résidus réfractaires

La Figure V.13 montre les résultats obtenus pour l'ACP réalisée sur l'ensemble des spectres ATR-FT-MIR des particules réfractaires anaérobies. Les points entourés en rouge sont considérés mal représentés en accord avec la démarche d'interprétation d'une ACP (détaillée dans le chapitre Matériels et Méthodes ($\Sigma \cos^2(\theta) < 0,4$)).

Considérant les points bien représentés, l'axe de la première composante rend compte d'une différenciation des spectres ATR-FT-MIR des différents résidus réfractaires similaire à celle du dernier nœud du dendrogramme obtenu par la classification de ces mêmes échantillons (Figure V.12). Ainsi, les empreintes chimiques des matrices PS-A*_{U,AN}, AS-B_{U,AN}, AS-E_{U,AN}, AS-H_{U,AN}, dont la composante principale Dim1 est négative, apparaissent significativement différentes de celles des résidus AS-A_{U,AN} et OHO_{U,AN}, dont la composante principale Dim1 est positive.

L'analyse du cercle de corrélation permet alors de mettre en évidence les variables d'origine majoritairement impliquées dans la définition de la composante principale 1 qui représente 56,84% de la dispersion initiale entre ces échantillons. Les régions spectrales qui ne contribuent quasiment pas à Dim1 ou, qui au contraire contribuent significativement, sont récapitulées dans le Tableau V.5. La distinction des résultats faite dans les colonnes « Dim<0 » et « Dim>0 » permet de préciser vers quelle valeur de Dim1 feront tendre les intensités d'absorption mesurées dans les régions spectrales identifiées.



Nomenclature des individus statistiques (empreintes IR) représentés sur le plan factoriel (1 ; 2) :
 (vert) 1 à 13 : Spectres ATR-FT-MIR de PS-A*_{U,AN} (un échantillon de 1 à 9 et un autre de 10 à 13) ;
 (noir) 14 à 19 : Spectres ATR-FT-MIR de OHO_{U,AN} ;
 (bleu clair) 20 à 27 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-B_{U,AN}, et 28 à 32 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-E_{U,AN} ;
 (rouge) 33 à 38 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-A_{U,AN} ;
 (bleu foncé) 39 à 44 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-H_{U,AN}.

Figure V.13. Résultats de l'ACP réalisée sur l'ensemble des spectres ATR-FT-MIR de particules réfractaires anaérobies

Tableau V.5. Tableau récapitulatif de l'analyse du cercle de corrélation entre les variables d'origine (nombre d'onde) et la composante principale Dim1

Zones du spectre ATR-FT-IR	Contribution significative à la composante principale Dim1 (abs(coord)>0,7)			
	Dim1 < 0		Dim1 > 0	
	0,7 < cos ² < 0,86	0,86 < cos ²	0,7 < cos ² < 0,86	0,86 < cos ²
400-900	420-422 428-447 860-891	899-900	605-613 642-679 713-730	681-712
900-1300	1011-1043	902-1009	1234-1238 1296-1307	
1300-1500			1367-1406	
1500-1800	1708-1722 1739-1749	1751-1799	1493-1510 1660-1682	1512-1658
2750-3200	2750-2792		3180-3200	

coord: contribution quantitative à la combinaison linéaire

cos²: contribution qualitative à la combinaison linéaire (plus l'angle θ formé entre le vecteur variable et Dim1 est petit, plus la variable est représentée par Dim1 : cos²>0,7 $\rightarrow$ θ < 45°, cos²>0,86 $\rightarrow$ θ < 30°)

La région spectrale dans laquelle se trouvent les pics d'absorption centrés sur 2850 et 2922 cm^{-1} ne semble pas contribuer significativement à la différenciation de la chimie des matrices réfractaires sur Dim1 *a priori* liée à la nature de l'effluent traité au niveau de la filière eau. Ce résultat est en accord avec l'analyse précédente de la Figure V.9 qui présentait l'intensité d'absorption à 2922 cm^{-1} de ces différents résidus réfractaires.

Quatre régions spectrales contribuent très significativement à la composante principale 1. Elles sont rappelées ci-dessous en lien avec les nombres d'onde correspondant aux principales bandes d'absorption identifiées sur leurs empreintes (Figure V.11) (leurs positions sont indiquées entre parenthèses) :

1. 681 à 712 cm^{-1} (697 $\pm$ 2 cm^{-1})
2. 1493 à 1682 cm^{-1} (1518 $\pm$ 1 ; 1537 $\pm$ 3 ; 1635 $\pm$ 2 cm^{-1})
3. 899 à 1043 cm^{-1} (1028 $\pm$ 4 cm^{-1})
4. 1708 à 1799 cm^{-1} (1734 $\pm$ 1 cm^{-1})

En accord avec le Tableau V.1, les fonctions =C-H de noyau aromatique, C=C , N-H (amide I) et C=O (associée à une fonction amide I) feront tendre vers une Dim1 positive alors que les fonctions C-O (éther, alcools) et C=O auront tendance à faire tendre vers une Dim1 négative. Néanmoins, puisque par définition, la valeur des composantes principales pour chaque point-individu est la résultante d'une combinaison linéaire des différentes intensités d'absorption de l'empreinte, nos résultats ne permettent pas de préciser davantage les fonctions qui différencient la chimie des résidus réfractaires.

V.3.3 Conclusion

L'analyse des principales bandes d'absorption distinguables au niveau des empreintes ATR-FT-MIR des matrices avant digestion a mis en évidence la différence de nature chimique entre une boue primaire et une boue biologique alimentée par une ERU brute (AS-H) ou décantée (AS-A). Cette diversité des caractéristiques disparaît au niveau des résidus réfractaires dont les spectres ATR-FT-MIR sont équivalents en termes de position des principaux pics d'absorption, indépendamment de l'origine des composés et de la nature des boues dont ils sont issus. Toutefois, l'analyse relative multivariée par CAH et ACP de leurs empreintes a révélé que leur nature chimique est significativement différente en lien avec les intensités d'absorption. La chimie demeure un mécanisme possible de limitation de la biodégradation.

Par ailleurs, sur la base du regroupement des empreintes chimiques des résidus réfractaires de OHO et de AS-A par opposition à ceux de PS-A*, AS-B, AS-E et AS-H, la contribution quantitative de la fraction endogène ne semble pas être le principal facteur impactant la chimie globale de la fraction réfractaire. La nature de l'effluent à traiter (boues primaires entre autre), et notamment la contribution

qualitative de la fraction véhiculée par le flux de matière décantable contenue dans une eau usée paraît être un critère plus déterminant de la chimie de la boue produite et de sa fraction réfractaire.

V.4 CONCLUSION GENERALE

Les molécules organiques réfractaires sont organisées sous la forme de matrices insolubles et particulières. Cette matrice est structurellement stable et non discriminante des boues étudiées, de nature et d'origine très contrastées. La notion de squelette a d'ailleurs été introduite, et un processus d'édification a été précédemment proposé. Cette organisation est un mécanisme qui gêne potentiellement la bio-accessibilité de ces molécules, leur conférant ce caractère récalcitrant apparent. Elles engagent des interactions fortes entre ces molécules, impliquant nécessairement une chimie particulière. C'est cette chimie qui est le second verrou potentiel à analyser. L'objet de ce chapitre a donc été de caractériser cette chimie dans son état natif, c'est-à-dire, en conservant ces molécules associées les unes aux autres. L'enjeu est d'identifier s'il existe des signatures chimiques particulières liées à l'origine des composés (exogène, endogène aérobie, endogène anaérobie) et/ou à leur caractère réfractaire.

Pour cela, nous avons développé une méthode reposant sur la spectrométrie infra-rouge ATR-FT-MIR couplée à des outils statistiques d'analyses multi-variées (Classification Ascendante Hiérarchique, CAH, et Analyse en Composantes Principales, ACP). Le choix s'est porté sur la spectrométrie Infra-rouge car c'est une technique sensible qui ne requiert l'ajout d'aucun réactif chimique pour sa mise en œuvre (aucun risque d'interférences) et qui renvoie une empreinte détaillée de la nature chimique globale de l'échantillon analysé.

Dans un premier temps, il a fallu démontrer la pertinence analytique d'une telle méthode, compte tenu de la complexité et de la diversité des molécules présentes. L'effort a tout d'abord porté sur la mesure elle-même de l'empreinte et les questions liées à l'hétérogénéité de l'échantillon (dispersion granulométrique en particulier) et les biais potentiels liés à la préparation de l'échantillon (lyophilisation/qualité du dépôt sur le cristal). Un traitement mathématique et une analyse statistique des mesures spectrales ont permis de valider la représentativité des empreintes et rendent possible la comparaison d'empreintes entre matrices particulières d'origines différentes.

Néanmoins, l'attribution des fonctions ainsi mesurées aux familles de molécules recherchées (protéines, polysaccharides ou polymères aromatiques) est délicate. Les empreintes chimiques de molécules modèles ou de matériaux simples (protéines globulaires ou fibrillaires, cellulose, acide humique, lignocellulose) indiquent une superposition partielle des bandes d'absorption caractéristiques. Cette interprétation directe du spectre est d'autant plus limitée que d'après nos analyses biochimiques, les protéines et les polymères aromatiques seraient présents dans des proportions relativement proches. Pour contourner cette difficulté, nous avons couplé cette mesure

spectrale à deux traitements statistiques prenant en compte l'ensemble des intensités d'absorptions qui définissent un spectre ATR-FT-MIR (CAH et ACP). De cette manière, il a été possible de clusteriser les boues et leurs résidus réfractaires en lien avec leurs similarités ou leurs divergences de nature chimique, et aussi d'identifier les régions spectrales qui contribuent spécifiquement à discriminer les matières réfractaires.

Cette approche originale et nouvelle montre que les fractions réfractaires exogène et endogène se distinguent globalement par leur chimie. Les molécules qui les composent sont de nature différente. Ce résultat était attendu mais cette méthode permet de le mettre en évidence de manière robuste et relativement simple. Cette méthode doit permettre de différencier la qualité de la fraction réfractaire d'une boue en fonction des proportions respectives des fractions réfractaires exogène et endogène. Ainsi, il a été possible d'identifier la présence significative de résidus cellulaires dans la composition de la fraction exogène véhiculée par une eau décantée. Cette caractéristique rappelle que le réseau d'assainissement est déjà un réseau réacteur qui produit de la matière réfractaire à travers son activité bactérienne. Ces empreintes chimiques ont permis de distinguer les boues de l'étude en lien avec les conditions de fonctionnement de la station.

Cette méthode ouvre des perspectives d'application intéressantes même si celles-ci restent à valider. En effet, l'analyse ATR-FT-MIR couplée à la CAH est facile et rapide à mettre en œuvre. L'empreinte chimique pourrait être un indicateur de qualité des boues produites sur une filière, et sa variabilité, estimée par CAH, un indicateur clé de fonctionnement des ouvrages : efficacité du décanteur primaire, taux de purge du procédé biologique qui affecte l'âge de boue. De plus, il existe de nombreux traitements proposés pour améliorer la digestion d'une boue. Cette méthode pourrait aussi être utile pour qualifier l'impact de tels traitements vis-à-vis de la chimie de la matière réfractaire et de mieux cerner leurs efficacités.

Enfin, même si des régions spectrales particulières ont été identifiées comme différenciantes de la nature chimique des résidus réfractaires (681-712, 899-1043, 1493-1682, et 1708-1799 cm^{-1}), il est délicat d'y associer précisément des familles de molécules. Par conséquent, nous avons évalué une méthode de déconstruction de ces agrégats pour libérer ces molécules tout en respectant au mieux leur intégrité moléculaire. Les résultats de cette approche sont présentés dans le chapitre 6.

VI.

**Déconstruction de
l'agrégat réfractaire**

VI.1 INTRODUCTION

Les résidus organiques réfractaires à la digestion anaérobie long terme caractérisés dans ce chapitre ont accumulés des composés d'origines différentes. Ceux-ci peuvent être rangés dans trois catégories :

- Exogène : les molécules véhiculées par l'ERU à traiter qui contient des composés d'origine bactérienne et non bactérienne,
- Endogène aérobie : les résidus bactériens sécrétés ou libérés par la lyse des microorganismes actifs au niveau du traitement biologique de la filière eau,
- Endogène anaérobie : les résidus bactériens sécrétés ou libérés par la lyse des microorganismes actifs au niveau de la digestion anaérobie.

Compte tenu de cette complexité, la démarche a été basée sur l'analyse relative de caractéristiques mesurées sur des résidus réfractaires, contrastés en termes de contribution quantitative des différents types de composés réfractaires (distingués selon leur origine par rapport à la STEP). Le fractionnement DCO des matrices réfractaires produites a été estimé dans le chapitre 4 (Figure IV.13). Ces résultats aident à l'interprétation des analyses de la matière réfractaire en donnant la possibilité d'établir un lien entre origine et nature des composés.

Indépendamment du type de boues d'épuration et des conditions opératoires du procédé biologique, 85±5% de la DCO réfractaire reste agrégée et organisée selon une structure floculée de diamètre apparent moyen d'une centaine de microns. La fraction particulaire concentre donc la majorité des composés non biodégradés dans des conditions conventionnelles de digestion anaérobie. Des dosages biochimiques colorimétriques sont souvent utilisés pour établir la composition moléculaire de matrices biologiques telles que les boues biologiques (Jimenez et al., 2013). Ces mêmes techniques ont été appliquées aux résidus réfractaires. Les résultats présentés dans le chapitre 3 laissent penser que les composés protéiques et humiques sont des molécules majoritaires de la matière réfractaire particulaire. Néanmoins, l'analyse seulement partielle des constituants de la matière, les risques incontrôlables d'interférences, la quantification par identification à un étalon externe (aucun étalon interne possible de la mesure), l'inaccessibilité à la diversité moléculaire au sein même d'une famille de molécules... sont autant de paramètres qui ont motivé la prospection d'autres démarches de caractérisation des molécules immobilisées dans l'agrégat réfractaire.

Deux approches ont donc été mises en œuvre pour les caractériser et les comparer.

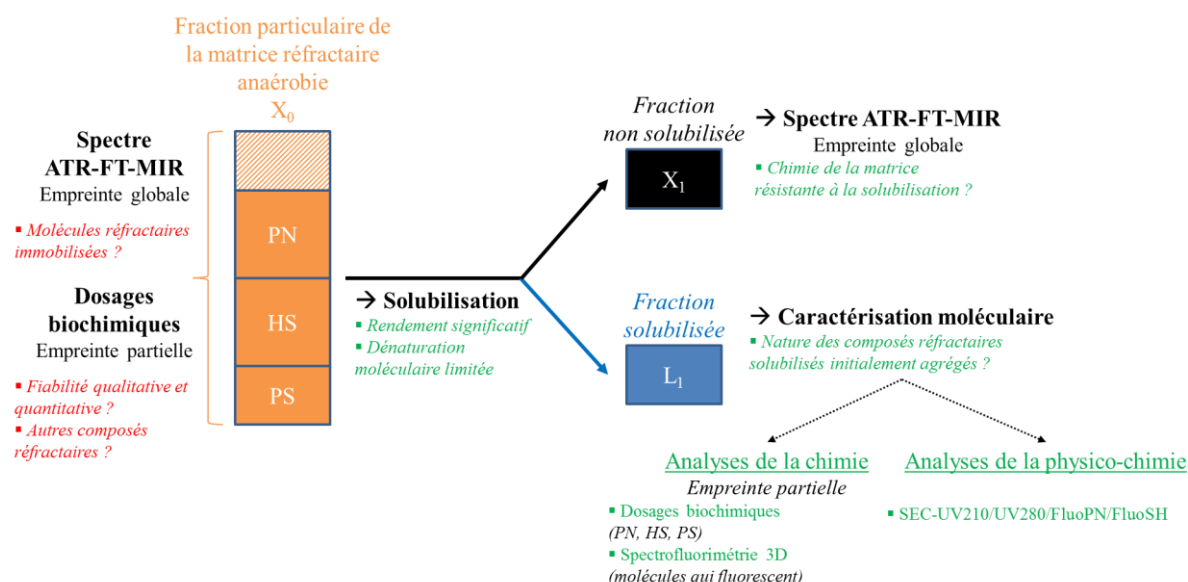
La spectrométrie infrarouge a été utilisée directement sur les différentes matrices réfractaires produites lors de cette étude. Détaillée dans le chapitre 5, l'analyse relative des empreintes spectrales des différentes matrices a permis de mettre en évidence que la nature de l'alimentation du traitement biologique de la filière impacte fortement la chimie globale du résidu réfractaire anaérobie. Ainsi, la

chimie du résidu d'une boue biologique alimentée par une ERU décantée apparaît plus proche de la chimie de composés réfractaires d'origine bactérienne que de celle d'autres boues biologiques alimentées par une ERU brute. Malgré le principal atout de cette démarche qui a été de caractériser l'empreinte chimique de l'ensemble des constituants d'un échantillon et de révéler des fonctions différenciantes, cette technique n'a pas permis d'accéder précisément à la nature des molécules significativement impliquées.

Une approche indirecte, plus invasive, qui consiste à déconstruire l'état agrégé des résidus réfractaires pour solubiliser les composés constitutifs et les analyser par des techniques de caractérisations moléculaires a donc été entreprise. Cette déconstruction fait l'objet de ce chapitre. La procédure de solubilisation des composés initialement agrégés doit dans l'absolu répondre à deux exigences :

- libérer un maximum de molécules organiques réfractaires, ainsi accessibles à l'analyse moléculaire
- limiter la dénaturation des molécules solubilisées pour conserver le plus d'informations possibles (ou connaissances) sur leurs propriétés physiques, chimiques et biochimiques et ainsi rendre possible et représentative leur identification.

Cette approche de déconstruction et de caractérisation moléculaire appliquée à chaque matrice réfractaire est schématisée sur la Figure VI.1.



PN : Protéine-like ; HS : Substances humiques-like ; PS : Polysaccharides-like ;

X_0 : fraction particulaire d'une résidu réfractaire de boue ; X_1 : fraction non solubilisée après déconstruction ; L_1 : fraction solubilisée après déconstruction

ATR-FT-MIR : spectrométrie à Transformée de Fourier en Moyen InfraRouge en Réflexion Totale Atténuée ; SEC : filtration sur gel

Figure VI.1. Déconstruction de l'agrégat réfractaire couplée à la caractérisation moléculaire

Les résultats de cette démarche de déconstruction se déclinent en quatre parties. Une première partie est un préambule qui détaille les raisons qui ont conduit au choix d'une hydrolyse thermochimique. La deuxième partie présente les résultats de différentes conditions de déconstruction réalisées sur une matrice réfractaire dite modèle, d'un point de vue quantitative (potentiel de solubilisation) et qualitative. La troisième partie est dédiée à l'évaluation de la dénaturation moléculaire induite par la méthode de déconstruction choisie d'après les résultats obtenus sur agrégat réfractaire. L'analyse de l'effet de la condition d'hydrolyse thermo-chimique sur les propriétés physico-chimiques de molécules témoins (BSA, acide humique, lignine), représentatives de composés majoritairement présents dans les résidus réfractaires, permet de préciser la compatibilité de la déconstruction avec notre enjeu de caractérisation moléculaire. Enfin, la dernière partie présente l'analyse relative des caractéristiques obtenues après déconstruction des résidus réfractaires de boues contrastées, PS-A*_{XU,AN}, OHO_{XU,AN}, AS-A_{XU,AN} et AS-B_{XU,AN}.

VI.2 QUELLES METHODES DE DECONSTRUCTION CHOISIR ?

VI.2.1 Contexte scientifique

De manière générale, le maintien de l'état agrégé de composés organiques est assuré par des interactions intermoléculaires. Différents mécanismes impliqués dans le maintien de la structure d'un floc ont d'ailleurs été rappelés dans le chapitre 1. Aucune étude spécifique des interactions entre les composés d'un résidu particulaire réfractaire n'a été trouvée dans la littérature. Néanmoins, la stabilité de l'état agrégé a pu être illustrée par les travaux de Ramdani et al. (2010) et de Perez (2009). En effet, Ramdani et al. (2010) n'ont réussi à solubiliser que 11 à 17% de la DCO de résidus réfractaires exclusivement d'origine bactérienne (11% avec les ultrasons (2' à 37W à 4°C), 12% avec la température (2' à 80°C), 16% avec CH₂O (37%)/NaOH (1N), 17% avec un détergent (Triton X-100 à 0,5%)). De même, Perez (2009) met en évidence que la fraction organique non méthanisable d'une boue biologique est majoritairement résistante à une solubilisation à 65°C appliquée pendant 150h et demeure agrégée. Par ailleurs, nos tests de stabilité à 65°C appliqués directement sur des résidus réfractaires de digestion anaérobie, présentés dans le chapitre 3, ont complété ce résultat en indiquant que la distribution granulométrique des résidus réfractaires demeurerait inchangée.

Les rendements de solubilisation des méthodes de déconstruction disponibles dans la littérature sont majoritairement liés aux boues biologiques de la filière eau et concernent des thématiques de recherches différentes : extractions des EPS, prétraitements de digestion anaérobie, réduction de production de boues, quantification ou caractérisation de composés spécifiques (lipides, acides humiques, HAP...). Les procédures sont plus ou moins spécifiques des mécanismes d'agrégation, plus ou moins dénaturantes et plus ou moins efficaces en terme de solubilisation. Aucune étude dédiée à la solubilisation de résidus réfractaires ultimes de boues n'a été trouvée. La température est une approche

de déconstruction dont le mécanisme est mal défini mais qui présente l'avantage de n'utiliser aucun agent chimique. Les rendements de solubilisation de boues biologiques observés à des températures supérieures à 150°C (Carrère et al. 2008, Bougrier et al., 2006) indiquent la mobilisation de composés réfractaires. Néanmoins, des données ont montré que l'application même courte de températures élevées peut induire des réactions non-enzymatiques de brunissement des sucres qui correspondent soit à leur caramélisation (pyrolyse), soit à des produits de la réaction de Maillard (polymérisation entre les sucres et le N-terminal de la fonction amine des protéines) (Wilson et Novak, 2009). Une gamme de température de travail supérieure à 100°C est donc à privilégier.

VI.2.2 Le choix d'une attaque thermo-chimique

Dans le cadre de cette étude, pour répondre à l'enjeu de caractérisation moléculaire, la procédure de déconstruction à mettre en œuvre doit répondre à deux aspects majeurs :

1. Rendement de solubilisation significatif
2. Dénaturation limitée des molécules solubilisées.

De plus, le milieu dans lequel sont solubilisés les composés doit être compatible avec les techniques de caractérisation moléculaire envisagées (dosages biochimiques colorimétriques, spectrofluorimétrie 3D, spectrométrie infrarouge (ATR-FT-MIR) et filtration sur gel). Dans ce contexte, les techniques ayant recours à des agents chimiques organiques ont été estimées inéligibles du fait des risques d'interférences et de pertes de composés d'intérêt en cas de mise en place de procédure de lavage de type dialyse. Sont concernées, des procédures telles que l'utilisation de l'EDTA (chélateur de cations bivalents) ou le Tween (détergent amphiphile) qui sont des composés organiques qui pourraient entre autre interférer sur l'analyse par ATR-FT-MIR de l'empreinte chimique des fractions solubilisées et non solubilisées après traitement.

Malgré la diversité des molécules susceptibles de composer un résidu réfractaire, les fractionnements biochimiques présentés dans le chapitre 3 et les analyses en ATR-FT-MIR de différents résidus réfractaires (chapitre 5) indiquent que les composés de type protéiques, humiques, polysaccharidiques semblent être des familles de molécules qui contribuent majoritairement à la matrice réfractaire. Assimilés à des macromolécules, une méthode de déconstruction des agrégats réfractaires basée sur une hydrolyse chimique a donc été envisagée. Néanmoins, compte tenu de la méconnaissance de la chimie des composés constitutifs d'un agrégat réfractaire, de la diversité des fonctions chimiques et de leur environnement, l'effet d'une attaque acide ou basique ne peut être établi *a priori* (sensibilité des différents types de liaisons chimiques, performances de solubilisation, nature des molécules libérées, altérations des propriétés physico-chimique des molécules solubilisées...). Le choix a donc été de tester, dans un premier temps, ces deux types d'hydrolyse pour déconstruire un agrégat réfractaire.

L'hydroxyde de sodium, NaOH, et l'acide chlorhydrique, HCl, sont des réactifs communément utilisés dans des procédures d'extraction des substances humiques de boues (Amir et al., 2004, Polak et al., 2009) et de composts (Albrecht, 2007), d'extraction d'EPS notamment avec NaOH (Ramdani et al., 2011, D'Abzac et al., 2010, Jimenez 2013), ou d'hydrolyse totale des liaisons peptidiques notamment en amont de l'analyse de leur composition en acides aminés (Huang et al., 2010). À ce titre, ils ont été choisis comme réactifs d'hydrolyse chimique. Toutefois, pour limiter une dénaturation drastique de ces composés, des conditions moins sévères que celles utilisées pour une hydrolyse totale des protéines (HCl 6N 24h à 110°C, NaOH 4N 24h à 110°C) ont été appliquées.

Enfin, la température étant connue pour permettre la catalyse d'une réaction d'hydrolyse chimique (abaissement de l'énergie d'activation), la combinaison d'une température de 60 ou 95°C à chaque condition d'hydrolyse a été évaluée. L'utilisation de ces températures seules est par ailleurs conservée pour évaluer l'effet d'une simple déstabilisation de liaisons faibles sur la physico-chimie de molécules réfractaires agrégées, entre 60 et 95°C.

La partie suivante va alors évaluer quantitativement et qualitativement la déconstruction induite par plusieurs couples (réactifs d'hydrolyse-température) sur un agrégat réfractaire modèle.

VI.3 DECONSTRUCTION D'UN AGREGAT REFRACTAIRE MODELE

Les procédures de préparation de la fraction particulaire d'un résidu réfractaire anaérobie et de mise en œuvre d'une déconstruction thermo-chimique sont décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes.

L'utilisation d'un agrégat réfractaire modèle a pour objectif de définir les conditions de déconstruction thermo-chimique permettant à la fois d'obtenir des rendements de solubilisation significatifs et d'isoler des composés peu dénaturés. La matrice AS-A_{XU,AN} produite dans le cadre de ce travail a été choisie comme matrice modèle car elle est composée des différents types de composés qui peuvent s'accumuler dans la fraction non biodégradable d'une boue (75% exogène, 16% endogène aérobie et 9% endogène anaérobie). Pour rappel, elle correspond au résidu réfractaire récupéré en fin de digestion anaérobie long terme (BMP>120jours) de la boue AS-A produite par le traitement biologique de la STEP A, alimentée par une ERU décantée et opérée avec un âge de boue de 2-3 jours.

VI.3.1 Efficacité de solubilisation d'une hydrolyse thermo-chimique sur une matrice particulaire réfractaire modèle

VI.3.1.1 Cinétique de déconstruction et bilan DCO

Une première série d'expériences a été réalisée pour analyser la cinétique de la réaction de déconstruction afin d'établir par la suite une durée systématique à appliquer pour les essais

d'hydrolyse. Les rendements de solubilisation ont donc été mesurés après 0,5, 2 et 24 h de temps de contact entre la matrice particulaire à déconstruire et le réactif d'hydrolyse. Cette analyse a été réalisée en présence d'eau déminéralisée ou de soude à 0,1M et 2M. L'effet de la température sur la cinétique de déconstruction a par ailleurs été estimé à 60°C et 95°C.

Les résultats sont présentés dans la Figure VI.2. Le pourcentage de DCO solubilisée correspond au rapport de la DCO mesurée sur la fraction soluble de la matrice réfractaire particulaire après hydrolyse par la DCO de l'échantillon à t_0 (chapitre Matériels et Méthodes). Il représente le potentiel de solubilisation. La fraction soluble correspond au surnageant de l'échantillon traité, récupéré après centrifugation (4200g, 15', 4°C).

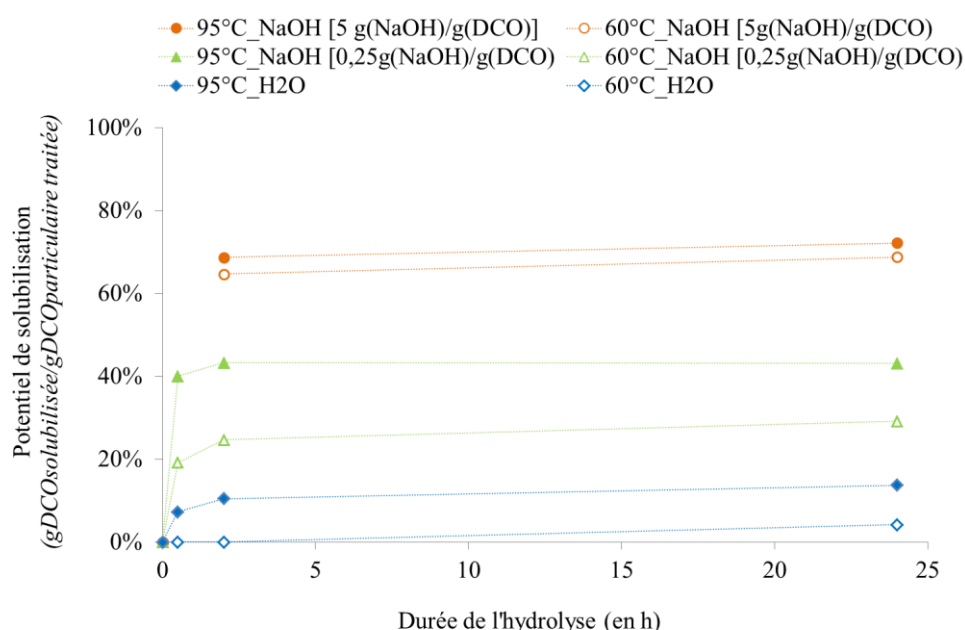


Figure VI.2. Effet du temps de réaction, de la température et de la concentration en NaOH sur le potentiel de solubilisation de la fraction particulaire de AS-A_{XU,AN}

Indépendamment des réactifs utilisés ou et de la température appliquée, la quantité de matière solubilisée à 2h représente 85 à 95 % du potentiel de solubilisation mesuré après 24h sur l'ensemble des conditions testées. **Un temps de contact de 2h est donc suffisant pour accéder au potentiel de solubilisation d'une condition de déconstruction donnée.** Cette durée est donc appliquée par la suite.

Par ailleurs, utilisée seule ou couplée à NaOH, une température de 95°C appliquée au milieu réactionnel a un effet positif sur le potentiel de solubilisation par rapport à 60°C. Avec l'augmentation de la quantité de soude, les différences de potentiel de solubilisation entre les deux températures se réduisent (5% de plus à 95 °C par rapport à 60°C à 5gNaOH.gDCO⁻¹). La température joue probablement le rôle de catalyseur de la réaction chimique en abaissant l'énergie d'activation des différentes réactions chimiques engagées. Sous réserve de ne pas entraîner la dénaturation des

molécules solubilisées, l'utilisation d'une démarche de déconstruction à 95°C semble *a priori* plus pertinente qu'à 60°C.

De plus, utilisée uniquement avec de l'eau déminéralisée, une température à 60 ou à 95°C permet de solubiliser respectivement 0 et 8% de DCO réfractaire de AS-A_{XU,AN} après 2h. Il est à noter que l'absence de solubilisation à 60°C est cohérente avec la non-solubilisation de DCO constatée lors des tests de stabilité réalisés à 65°C pendant 150h sur différentes matrices réfractaires (chapitre 3). Couplée à NaOH compris entre 0,25 ou 5 g(NaOH)/g(DCO), les potentiels de solubilisation sont nettement supérieurs, compris entre 25 et 69% de la DCO particulaire traitée. L'utilisation d'**une hydrolyse thermo-chimique permet donc une déconstruction significative des agrégats réfractaires.**

Enfin, un bilan DCO a été mesuré pour la condition d'hydrolyse à la soude la plus sévère (5,2 gNaOH.gDCO⁻¹ à 95°C) pour s'assurer de la conservation du degré d'oxydo-réduction global de la matière organique et, en particulier, de l'absence d'une minéralisation avancée. Ainsi, pour une concentration en DCO particulaire réfractaire initiale de 7658±193 gDCO.L⁻¹, la concentration après traitement a été mesurée à 7463±26 g DCO.L⁻¹. L'écart entre les concentrations initiale et finale est inférieur à l'écart inhérent à la mesure de DCO (5%). L'hydrolyse thermo-alkaline permet donc de solubiliser les molécules organiques sans altérer de manière significative leur chimie (minéralisation d'une fraction du carbone organique en dioxyde de carbone, substitution massive de fonctions oxygénées sur les atomes de carbone).

VI.3.1.2 Application de différentes conditions d'hydrolyse thermo-chimique

Différentes conditions de déconstruction thermo-chimique ont été appliquées à la matrice AS-A_{XU,AN}. Elles sont récapitulées dans le Tableau VI.1. Comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes, les volumes de réactifs et d'échantillon à déconstruire sont égaux et constants pour toutes les conditions testées. Les ratios réactionnels, définis comme la quantité de réactifs apportée par gramme de DCO échantillon à solubiliser, sont calculés à partir des concentrations en réactif et en échantillon dans la cuve d'hydrolyse.

Tableau VI.1. Récapitulatif des différentes conditions thermo-chimique appliquées à AS-A_{XU,AN}

Réactif d'hydrolyse chimique	Concentration en réactif (mol.L ⁻¹)	Concentration agrégat réfractaire ⁽¹⁾ (gDCO.L ⁻¹)	Ratio réactionnel g(réactif).g(DCO _{XU}) ⁻¹	Température de réaction (°C)
Aucun (eau déminéralisée)				60
				95
NaOH	0,1	15,6	0,25	60
				95
	0,1	7,7	0,5	60
				95
	0,5	7,7	2,6	60
				95
HCl	1	7,7	5,2	60 ⁽²⁾
				95
	2	15,6	5,1	60
				95
HCl	0,1	7,7	0,5	60
				95
	0,5	7,7	2,4	60
				95

(1) : matrice AS-A_{XU,AN} traitée pour deux concentrations différentes

(2) : problème analytique

Les différents potentiels de solubilisation obtenus après 2h d'application de chaque condition sont présentés dans la figure ci-dessous.

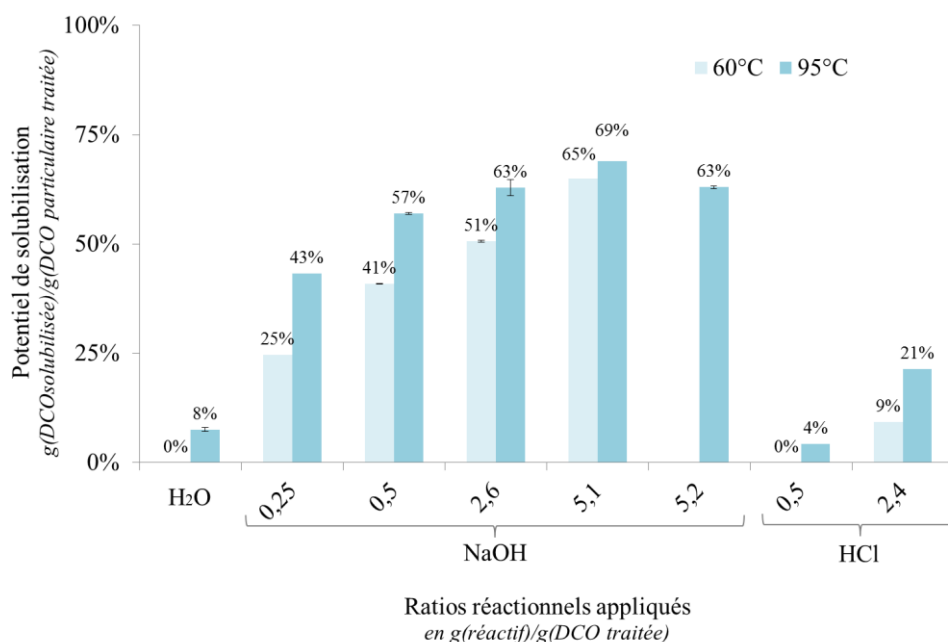


Figure VI.3. Potentiel de solubilisation de composés organiques réfractaires agrégés soumis à différentes conditions d'hydrolyse thermo-chimique

Le potentiel de solubilisation moyen maximal atteint avec l'acide chlorhydrique est de 21% avec un ratio de $2,4\text{gHCl.gDCO}^{-1}$ à 95°C . Avec un apport massique 10 fois inférieur ($0,25\text{gNaOH.gDCO}^{-1}$ à 60°C) et une température de 60°C , l'hydroxyde de sodium permet de solubiliser une quantité de DCO réfractaire agrégée équivalente (25%). **La déconstruction de particules réfractaires en condition alcaline apparait donc significativement plus efficace qu'en condition acide.**

Par ailleurs, nos résultats indiquent que les potentiels de solubilisation observés avec NaOH tendent à se stabiliser malgré l'augmentation de l'apport massique en soude pour une même quantité de DCO réfractaire à déconstruire (ratio réactionnel). Compte tenu des potentiels de solubilisation maximums obtenus, compris entre 63 et 69%, un potentiel de solubilisation de $65\pm 3\%$ de DCO particulaire traitée semble correspondre à une valeur seuil atteignable par hydrolyse thermo-alcaline. 35 % de la DCO particulaire réfractaire seraient ainsi réfractaires à une hydrolyse chimique alcaline réalisée à une température inférieure à 100°C .

Enfin, nos résultats montrent que l'effet positif d'une température de 95°C sur le potentiel de solubilisation par hydrolyse à la soude est dépendant de la charge en soude appliquée. La Figure VI.4 met en évidence que plus le ratio réactionnel en NaOH augmente, moins l'utilisation d'une température de 95°C améliore significativement le potentiel de solubilisation. L'application d'une température de 95°C apparait donc pertinente seulement si l'apport massique en soude par gramme de DCO réfractaire est inférieur à $2,6\text{gNaOH.gDCO}^{-1}$.

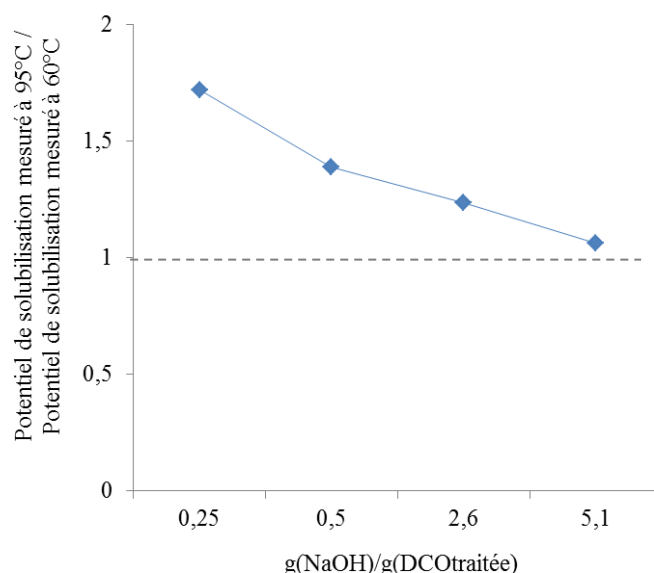


Figure VI.4. Amélioration du potentiel de solubilisation de la soude utilisée à 95°C plutôt qu'à 60°C

Le potentiel de solubilisation de l'agrégat réfractaire AS-A_{XU,AN} atteint après 2h à 95°C avec NaOH 0,1M (équivalent à $0,5\text{gNaOH.gDCO}^{-1}$) est de 57% de la DCO de AS-A_{XU,AN}. Il représente 87% du

potentiel de solubilisation maximal estimé en condition alcaline à partir des rendements observés. Cette condition semble donc être *a priori* une condition d'hydrolyse pertinente, car efficace et compatible avec les techniques analytiques utilisées pour identifier les solubilisats. Dans le cadre de l'application de cette condition à d'autres matrices particulières réfractaires, pour une concentration en NaOH de 0,1M, la gamme de concentration en DCO réfractaire devra être inférieure à 8g.L^{-1} pour être dans des conditions supérieures ou égales à $0,5\text{gNaOH.gDCO}^{-1}$, *a priori* optimales pour atteindre des potentiels de solubilisation intéressants.

Afin de valider le choix et de généraliser l'application de cette condition réactionnelle à d'autres matrices réfractaires, l'évaluation de l'impact de l'hydrolyse thermo-chimique sur les propriétés physico-chimiques des composés solubilisés est réalisée dans la partie suivante.

VI.3.2 Caractérisation physico-chimique des composés réfractaires solubilisés

L'objectif de cette partie est d'évaluer qualitativement l'effet d'une hydrolyse thermo-chimique sur la nature et les propriétés physico-chimiques des molécules réfractaires libérées, et rendues ainsi accessibles à la caractérisation moléculaire. Même si les potentiels de solubilisation accessibles avec NaOH sont quantitativement les plus intéressantes, les conditions de déconstruction avec la température seule et avec HCl ont également été analysées.

Les caractéristiques moléculaires considérées ainsi que les techniques analytiques mises en œuvre sont les suivantes :

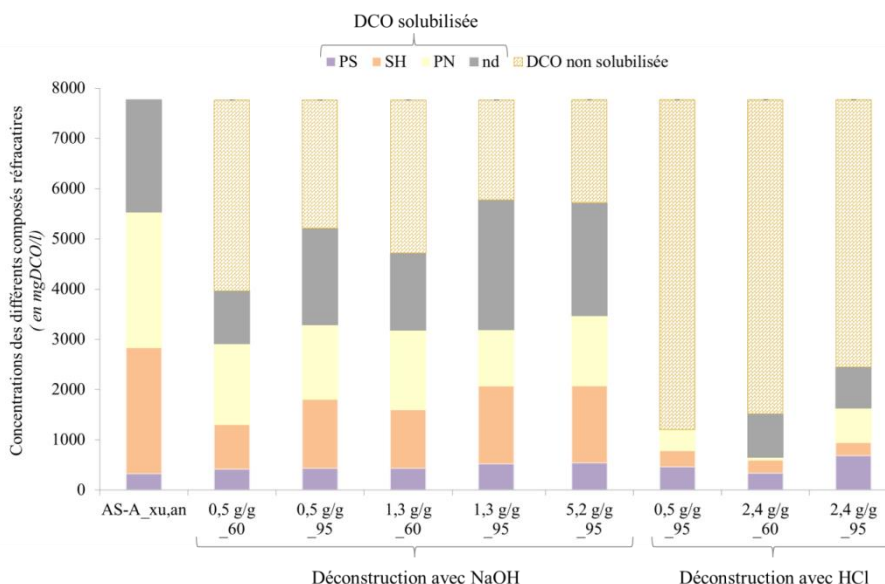
- Nature biochimique des molécules solubilisées : dosages biochimiques colorimétriques des protéines-like, des polysaccharides-like et des substances humiques-like ;
- Empreinte chimique des molécules solubilisées et non-solubilisées : spectres ATR-FT-MIR (spectroscopie en moyen infrarouge et réflexion totale atténuée) réalisés après lyophilisation (chapitre Matériels et Méthodes) ;
- Taille et nature chimique des composés solubilisés : filtration sur gel couplée à différents détecteurs (UV 210, UV 280, et fluorescence 2D à 221/350 (protéine-like) et à 345/443 (substances humiques-like)).

VI.3.2.1 Nature biochimique des fractions solubilisées

La composition en protéine-like, polysaccharides-like et substances humiques-like des différentes fractions solubilisées et isolées après 2h, à 60 ou 95°C, avec HCl ou NaOH, est présentée dans la Figure VI.5. La concentration de la matrice AS-A_{XU,AN} avant traitement est la même pour les 8 conditions de déconstruction considérées ($7658 \pm 193 \text{ mgDCO.L}^{-1}$). En accord avec les données présentées dans le chapitre Matériels et Méthodes, les mesures réalisées par dosages colorimétriques

exprimées en $\text{g}(\text{eq-BSA})\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{g}(\text{eq-Glc})\cdot\text{L}^{-1}$ et en $\text{g}(\text{eq-AH})\cdot\text{L}^{-1}$ sont converties en $\text{gDCO}\cdot\text{L}^{-1}$ grâce aux facteurs de conversion respectifs suivants : 1,3, 1,1 et 1,1 $\text{g}(\text{eq-molécule})\cdot\text{gDCO}^{-1}$. La fraction « nd » correspond à la quantité de DCO solubilisée qui n'a pas été quantifiée par les dosages biochimiques, autrement dit dont la chimie n'est *a priori* ni protéique, ni humique, ni polysaccharidique.

La fiabilité qualitative et quantitative des dosages colorimétriques biochimiques appliqués à des matrices particulières ne fait pas consensus dans la littérature. Néanmoins, dans la mesure où les résultats concernent la même matrice de départ, AS-A_{XU,AN}, et donc les mêmes composés, les résultats des dosages biochimiques avant et après traitement sont considérés comparables. Ceux-ci sont donc réunis sur la Figure VI.5 de manière à évaluer la sensibilité des différents types de molécules aux méthodes de déconstruction considérées.



PS : Polysaccharides-like; PN : Protéines-like; SH : Substances humiques-like; nd : non déterminé;
facteurs de conversion des molécules en DCO : $f_{PS} = 1,1 \text{ g(DCO)}\cdot\text{g}(\text{eq-PS})^{-1}$; $f_{PN} = 1,3 \text{ g(DCO)}\cdot\text{g}(\text{eq-PN})^{-1}$; $f_{SH} = 1,1 \text{ g(DCO)}\cdot\text{g}(\text{eq-SH})^{-1}$.

Figure VI.5. Fractionnements biochimiques déterminés par dosages colorimétriques, avant et après traitement, de la matrice AS-A_{XU,AN}

Les composés réfractaires agrégés de type polysaccharidique sont quasiment totalement solubilisés par hydrolyse thermo-chimique, indépendamment du réactif utilisé (HCl ou NaOH). Les molécules protéines-like et humiques-like restant minoritaires dans le solubilisé, **l'hydrolyse acide induit une solubilisation préférentielle des composés de type polysaccharidique.**

L'hydrolyse à la soude solubilise davantage de composés organiques réfractaires initialement agrégés. Les composés protéiques-like et humiques-like sont majoritairement dosés dans les fractions solubilisées. Sur l'ensemble des conditions avec NaOH, $58\pm 5\%$ des molécules solubilisées correspondent à ces deux familles moléculaires (en $\text{gDCO}_{[PN+SH]}\cdot\text{gDCO}_{\text{solubilisée}}^{-1}$). De plus, la quantité

de molécules quantifiables par les dosages biochimiques est relativement stable alors que la quantité de composés organiques solubilisés non identifiés, « nd », tend à augmenter avec la sévérité des conditions de déconstruction appliquées. Nos résultats ne permettent pas pour le moment de préciser si cette caractéristique est liée à la dénaturation de composés protéiques et/ou humiques, ou à la solubilisation effective de composés de nature biochimique différente. Ce paramètre sera évalué dans la partie 4 de ce chapitre. A ce stade, il est intéressant de noter que l'utilisation d'un ratio de $0,5\text{gNaOH.gDCO}^{-1}$, 2h à 95°C , solubilise 57% de la DCO réfractaire particulaire dont 63% sont quantifiables par dosages biochimiques colorimétriques.

VI.3.2.2 Chimie d'un agrégat réfractaire

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier utilisée en réflexion totale atténuée sur le domaine du moyen infrarouge (ATR-FT-MIR) donne une empreinte chimique représentative de l'ensemble des molécules agrégées ou à l'état dissous (sous réserve de lyophilisation complète de l'eau qui interfère sur l'analyse). Les bandes d'absorption positionnées sur les domaines spectraux compris entre 1500 et 1800 cm^{-1} et 1000 et 1100 cm^{-1} ont été identifiées comme pouvant discriminer la chimie de particules réfractaires d'origines différentes (Chapitre 5). De plus, les fonctions chimiques susceptibles d'absorber dans ces zones sont caractéristiques de composés protéiques-like, humiques-like et polysaccharides-like (Chapitre 5).

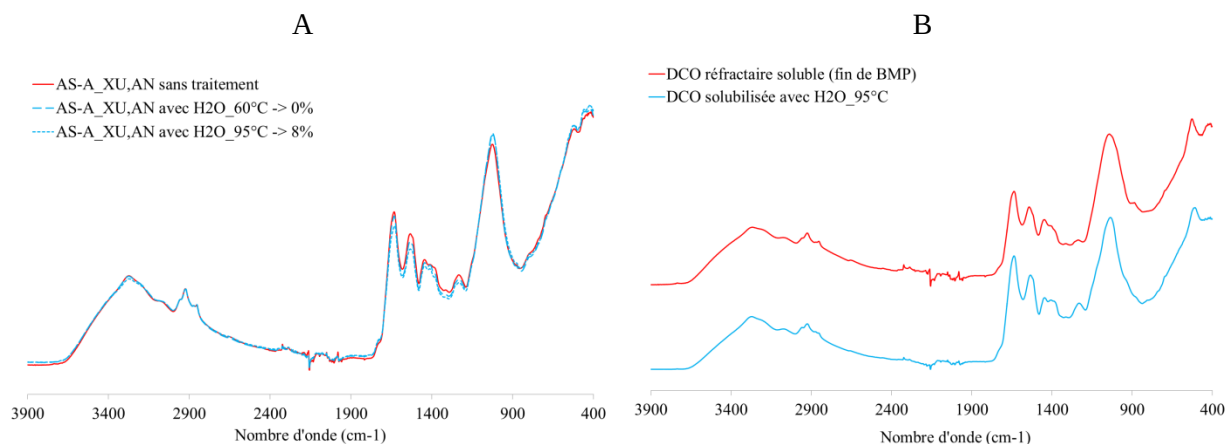
Ce paragraphe a donc pour objectif d'évaluer la sensibilité de ces zones spectrales d'intérêt aux différentes méthodes de déconstruction appliquées à la matrice réfractaire modèle AS-A_{XU,AN}. Après traitement, les fractions solubilisées ont donc été séparées des fractions non solubilisées par centrifugation (Matériels et Méthodes). Après lyophilisation, les spectres ATR-FT-MIR de ces deux fractions ont été enregistrés et sont comparées aux spectres ATR-FT-MIR des matrices AS-A_{XU,AN} et AS-A_{SU,AN} (fractions réfractaires particulières et solubles obtenues en fin de BMP).

L'effet des différentes méthodes de déconstruction (température seule, température-HCl, température-NaOH) est analysé successivement avant d'en établir un bilan relatif aux hydrolyses thermo-chimiques. Les spectres ATR-FT-MIR des matrices sans traitement sont toujours indiqués en rouge.

Pour rappel, les bandes d'absorption dont l'intensité diminue correspondent à des fonctions chimiques qui contribuent moins à l'empreinte chimique globale. Ce résultat peut être induit par la solubilisation de composés ou par l'accumulation significative d'une nouvelle fonction. Celles dont les intensités augmentent correspondent aux fonctions chimiques des composés qui se concentrent dans l'agrégat après traitement.

a. Action directe de la température

Deux températures (60 et 95 °C) ont été systématiquement testées en combinaison avec un acide ou une base. Son action directe a été évaluée. La Figure VI.6-A permet de comparer la nature chimique globale de la matrice AS-A_{XU,AN}, avant et après 2h à 60 et à 95°C..



Les pourcentages indiquent les potentiels de solubilisation mesurés correspondants

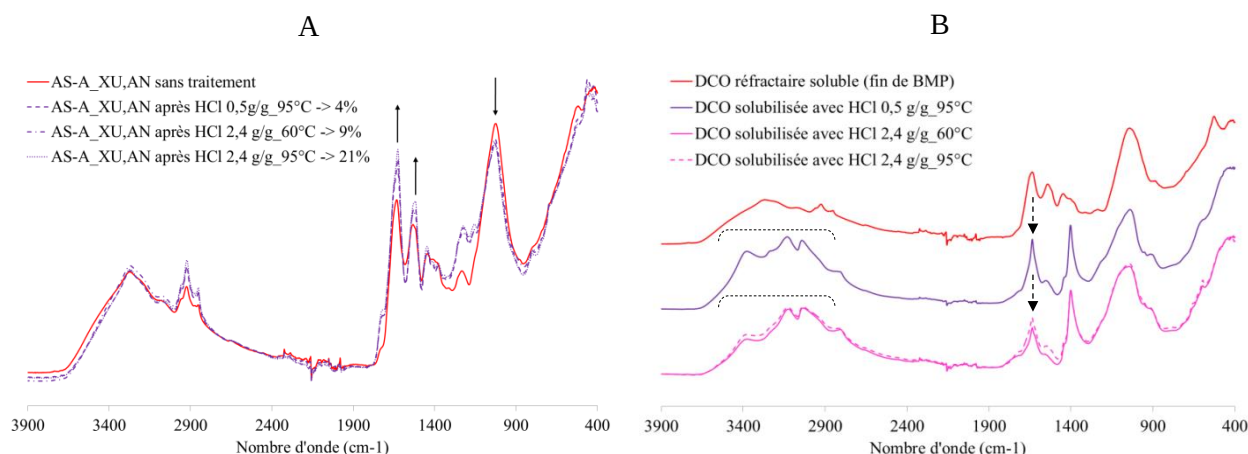
Figure VI.6. A-Modification de la chimie d'une matrice particulière réfractaire après 2h à 60 ou 95°C ;
 B-Comparaison de la chimie des composés réfractaires particuliers solubilisés aux composés réfractaires solubles en fin de BMP à 35°C

L'absence d'apparition de nouvelles bandes d'absorption sur le spectre ATR-FT-MIR indique qu'appliquée seule, une température comprise entre 60 et 95°C n'a pas d'effet sur la chimie globale des composés qui demeurent agrégés.

La Figure VI.6-B confronte l'empreinte des 8% de composés organiques solubilisés après chauffage de AS-A_{XU,AN}, 2h à 95°C, à celle des composés réfractaires solubles demeurant en fin de digestion anaérobie de AS-A (équivalent à AS-A_{SU,AN}). La similitude des empreintes indique que des interactions moléculaires non covalentes, mais relativement stables, permettent de maintenir agrégés des composés réfractaires de nature chimique équivalente aux composés réfractaires solubles obtenus en fin de test BMP à 35 °C. Néanmoins, vu la faible proportion de molécules solubilisées à 95°C, les molécules réfractaires sont majoritairement maintenues par des interactions physico-chimiques très stables.

b. Attaque thermo-chimique acide

La Figure VI.7-A illustre l'effet de l'utilisation d'une hydrolyse thermo-acide sur la fraction particulière de AS-A_{XU,AN} en confrontant les spectres ATR-FT-MIR, avant et après traitement. Les flèches indiquent le sens de la modification de l'empreinte provoqué par le traitement thermo-acide.



Les pourcentages indiquent les potentiels de solubilisation mesurés correspondants

Figure VI.7. A-Modification de la chimie d'une matrice particulaire réfractaire après différentes hydrolyses thermo-acides ; B-Comparaison de la chimie des composés réfractaires particuliers solubilisés par rapport aux résidus réfractaires solubles en fin de BMP

Les spectres ATR-FT-MIR des composés non solubilisés de AS-A_XU,AN après application de 0,5 à 2,4 gHCl.gDCO⁻¹, 2 h, à 60°C ou à 95°C, sont identiques, indépendamment des potentiels de solubilisation associés. De plus, l'hydrolyse thermo-acide n'induit pas l'apparition de nouveaux pics d'absorption après hydrolyse acide. Par contre une variation significative des intensités d'absorption est observée. La proportion relative des différentes fonctions chimiques est modifiée par ce traitement. De plus, il est intéressant de remarquer que la modification de l'empreinte globale est constatée même aux potentiels de solubilisation faibles (inférieurs à 9%). Ce résultat révèle qu'à potentiel de solubilisation équivalent à l'application d'une température de 95°C seule (8%), l'hydrolyse acide cible des molécules différentes.

Vis-à-vis des zones d'intérêt, discriminantes de la chimie de différents résidus réfractaires (chapitre 5), le traitement avec HCl se traduit par une diminution de la bande d'absorption centrée sur 1018 cm⁻¹ et une augmentation des bandes d'absorption comprises entre 1480 à 1800 cm⁻¹ (flèches indiquées sur la Figure VI.7-A). Comme détaillé dans le chapitre 5, les composés de type protéique et humique (aromatique) présentent des fonctions caractéristiques qui absorbent entre autre sur ce domaine (N-H, C=O et C=C), alors que les composés de type polysaccharidique, enrichis en fonctions C-O, sont communément assimilés aux pics compris entre 1000 et 1200. La diminution du pic à 1018cm⁻¹ concomitante à une augmentation des deux bandes à 1630 et 1515-1530 cm⁻¹ est donc cohérente avec la solubilisation préférentielle des polysaccharides en condition acide et avec les analyses biochimiques sur les solubilisés.

De même, la chimie des composés organiques solubilisés n'est pas significativement différente. Les positions et les intensités des pics d'absorption sont en effet conservées quelles que soient les conditions testées (Figure VI.7-B). La quantité d'acide apportée a uniquement un effet quantitatif.

Par comparaison aux empreintes de molécules témoins de différentes familles de molécules (protéines, acide humique, polysaccharides du Tableau V.2 du chapitre 5) et de matrices complexes (boue, matières réfractaires solubles et particulières (Figure VI.7 A et B), l'empreinte chimique des composés solubilisés par l'acide présente des particularités sur la Figure VI.7-B :

- plusieurs bandes d'absorbance différenciées entre 2750 et 3400 cm^{-1} (accolade en pointillés)
- une intense absorption à 1630 cm^{-1} , nettement supérieure à celle de du pic à 1515-1530 cm^{-1} (flèche en tirets)

L'hydrolyse acide libère des molécules dont la proportion en fonctions chimiques diffère donc significativement des différentes matrices analysées jusqu'alors. Cette empreinte peut résulter non seulement de la chimie des molécules autres que celles habituellement identifiées (protéique-like, humique-like, ou encore polysaccharide-like) (Figure VI.5), mais aussi de l'environnement acide qui altère l'état des fonctions chimiques et leurs interactions. À titre d'exemple, la présence d'acide peut modifier la proportion des liaisons intégrant l'atome d'hydrogène telle que la fonction N-H (ex. fonction amine des protéines : $\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$). Comme l'indique la Figure VI.8, cette fonction est caractérisée par des bandes d'absorption intenses qui correspondent en partie à des bandes d'absorption particulières identifiées sur les spectres ATR-FT-MIR des fractions solubilisées avec HCl (Figure VI.7-B). Compte tenu de la diversité des molécules solubilisées, cette hypothèse ne peut être validée mais doit être soulignée.

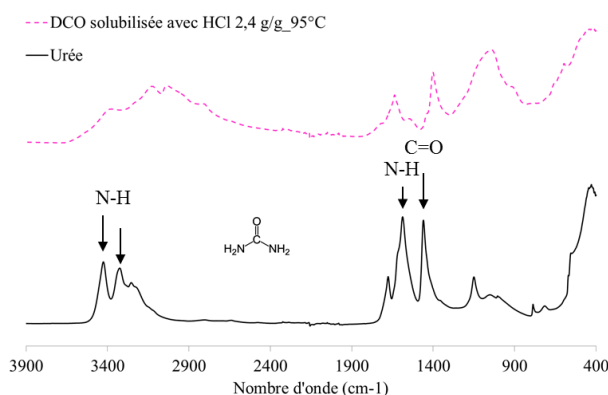


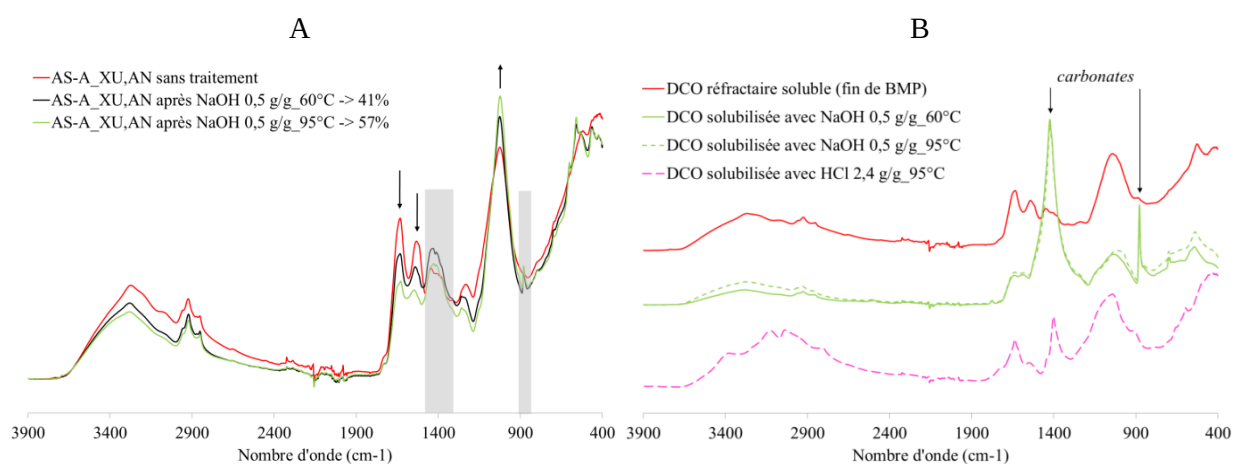
Figure VI.8. Spectre ATR-FT-MIR de l'urée et de la fraction solubilisée de AS-A_XU,AN à 2,4gHCl.gDCO⁻¹, 2h à 95°C

De manière globale, les empreintes ATR-FT-MIR sont cohérentes avec une libération préférentielle de composés polysaccharidiques en conditions thermo-acides. L'augmentation de la quantité d'acide apportée se traduit essentiellement par une augmentation du taux de solubilisation sans modifier la nature moléculaire du solubilisat.

c. *Attaque thermo-chimique alcaline*

La Figure VI.9-A illustre l'effet de l'utilisation d'une hydrolyse thermo-alcaline sur la fraction particulaire AS-A_{XU,AN} en comparant les spectres ATR-FT-MIR, avant et après traitement.

Seuls les spectres de la fraction non solubilisée après application de 0,5 gNaOH.gDCO⁻¹ sont présentés. Les fractions non solubilisées par l'application des ratios 2,6 et 5,2 gNaOH.gDCO⁻¹ présentent d'intenses bandes d'absorption centrées sur 1420 et 880 cm⁻¹, identifiées par les encadrés gris sur la Figure VI.9. Leurs spectres sont toutefois présentés dans l'Annexe 5.1. Les pics à 1420 et 880 cm⁻¹ sont attribuables à la fonction C=O d'ions carbonates qui se sont accumulés du fait du milieu alcalin (spectres ATR-FT-MIR de Na₂CO₃ Annexe 5.1). Ce résultat met en évidence que l'utilisation d'une hydrolyse alcaline à des ratios supérieurs à 0,5 gNaOH.gDCO⁻¹ n'améliore pas significativement la quantité de composés réfractaires libérés mais peut, par contre, conduire à une accumulation significative de matière minérale dans la fraction particulaire récupérée après traitement et interférer ainsi avec l'analyse de l'empreinte infra-rouge.



Les pourcentages indiquent les potentiels de solubilisation mesurés correspondants,
Les régions spectrales grisées sont sensibles à la présence de C=O de carbonates.

Figure VI.9. A-Modification de la chimie d'une matrice particulaire réfractaire après différentes hydrolyses thermo-alcalines ; B-Comparaison de la chimie des composés réfractaires particuliers solubilisés par rapport aux résidus réfractaires solubles en fin de BMP

Malgré des potentiels de solubilisation élevés, le profil de l'empreinte infrarouge des fractions non solubilisées n'est pas significativement modifié en termes de positions des principales bandes d'absorbance, conservées après traitement. Par contre, la solubilisation de 41 et 57% de la DCO particulaire réfractaire a significativement impacté leurs intensités et donc la proportion relative des différentes fonctions. L'intensité des bandes d'absorption centrées sur 1638 et 1550 cm⁻¹ diminue alors que celle de la bande centrée sur 1030 cm⁻¹ augmente (flèches sur la Figure VI.9-A). Cette évolution de l'empreinte chimique est en accord avec les dosages biochimiques réalisés sur les fractions solubilisées. En effet, les composés protéiques et humiques, qui présentent des bandes caractéristiques

dans la région spectrale allant de 1500 à 1650 cm^{-1} , sont fortement solubilisés en condition alcaline. La diminution des intensités d'absorption des deux bandes est donc cohérente.

Par contre, les dosages ont mis en évidence que les polysaccharides-like semblaient quasi-totalement solubilisés. Or, l'augmentation de la bande centrée sur 1030 cm^{-1} , communément attribué à cette famille de composés, indique que d'autres familles de molécules réfractaires intègrent des fonctions C-O ou O-H (ex. acides humiques extraits de boues présentés en Annexe 5.3). De plus, d'autres analyses en spectrométrie infrarouge indiquent que des composés minéraux pourraient aussi contribuer à cette bande d'absorption : spectres ATR-FT-MIR de cendres issues de la combustion à 500°C pendant 24h d'échantillons de boues et de matrices réfractaires (Annexe 5.2), des ions phosphates (Annexe 5.2), de la silice (Si-O-Si, Socrates (2004)). Nos résultats mettent donc clairement en évidence que l'attribution des fonctions absorbant dans la région comprise entre 1000 et 1100 cm^{-1} ne se limite pas à la seule famille des composés polysaccharidiques.

Une autre particularité de l'empreinte après attaque thermo-alcaline est la diminution significative des bandes d'absorption des fonctions aliphatiques CH_2 et CH_3 , à 2850 et 2920 cm^{-1} . Les réactions chimiques possibles en présence de soude sont très nombreuses. Néanmoins la solubilisation de composés lipidiques après hydrolyse de la liaison ester de molécules telles que les triglycérides ou des phospholipides pourrait l'expliquer. En présence de soude, les acides gras longues chaines libérés sont sous forme dissociée, plus soluble que la forme acide obtenue lors d'une hydrolyse acide. D'ailleurs, l'intensité des bandes à 2850 et 2920 cm^{-1} de l'empreinte de la fraction non solubilisée par hydrolyse acide est supérieure à celle de la fraction non traitée (Figure VI.7).

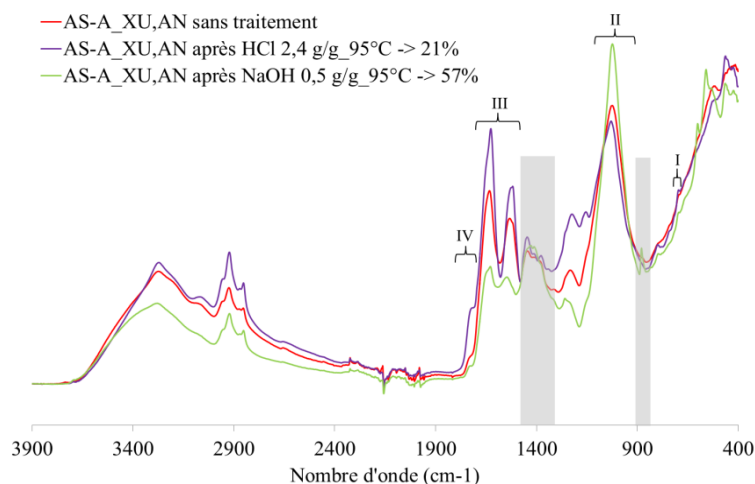
La Figure VI.9-B représente l'empreinte chimique des composés organiques solubilisés par 0,5gNaOH.gDCO⁻¹ (spectres des fractions solubilisées par 1,3 et 5,2 gNaOH.gDCO⁻¹ présentés en Annexe 5.1). La présence de carbonates est une nouvelle fois identifiée par les bandes d'absorption centrées sur 1420 et 880 cm^{-1} . Tout comme pour les fractions non solubilisées (Figure VI.9-A), cette caractéristique gêne l'interprétation des spectres ATR-FT-MIR des fractions solubilisées d'une part, en modifiant les intensités des bandes voisines, et d'autre part, en rendant trop minoritaire l'absorbance des autres fonctions qui sont, pour une même quantité d'échantillon analysé, moins concentrées (modification de la proportion relative des composés irradiés par le rayonnement infrarouge). Ainsi, même si l'analyse relative des empreintes spectrales des fractions solubilisées par HCl ou NaOH montre des différences significatives, nos résultats ne permettent pas de préciser avec certitude si ces différences sont attribuables à une nature biochimique différente des molécules solubilisées ou à une modification des fonctions induite par l'environnement (pH, bicarbonate...).

De manière globale, les empreintes ATR-FT-MIR valident une libération significative des composés protéiques et humiques dont les bandes d'absorption caractéristiques diminuent significativement

après traitement avec NaOH (Figure VI.9-A). De plus, elles soulignent que l'attribution de la région spectrale comprise entre 1000 et 1100 cm^{-1} majoritairement attribuables aux fonctions C-O et O-H n'est pas exclusivement liée aux composés polysaccharidiques dans nos matrices d'étude. Les sels de phosphates sont entre autres soupçonnés. Enfin, nos résultats ont mis en évidence que l'utilisation de la soude s'accompagnait de l'augmentation de la proportion en ions carbonates aussi bien dans la fraction solubilisée que non solubilisée. Du point de vue de l'interprétation, l'analyse qualitative de l'effet d'une telle hydrolyse chimique doit donc se limiter à la comparaison des fractions non solubilisées, moins soumises aux interférences.

d. Bilan : Sensibilité contrastée de régions spectrales d'intérêt

Le chapitre 5 a mis en évidence que des résidus réfractaires d'origines différentes présentaient des empreintes chimiques différentes. Certaines régions spectrales ont alors été identifiées comme particulièrement discriminantes : 681 à 712 cm^{-1} (I), 899 à 1043 cm^{-1} (II), 1493 à 1682 cm^{-1} (III), 1708 à 1799 cm^{-1} (IV) sur la Figure VI.10.



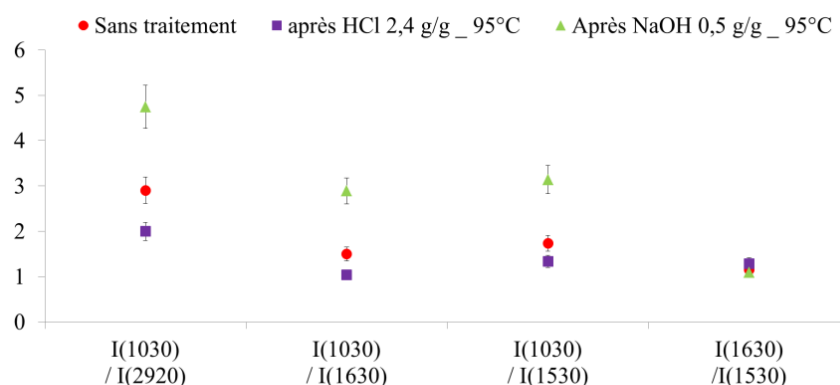
% : Les pourcentages indiquent les rendements de solubilisation mesurés correspondants
Les régions spectrales grisées sont sensibles à la présence de C=O de carbonates.

Figure VI.10. Effet contrasté d'une hydrolyse acide et alcaline sur un agrégat réfractaire

En plus d'un potentiel de solubilisation significativement supérieur avec NaOH, l'analyse relative des empreintes ATR-FT-MIR des fractions non solubilisées après traitement par rapport à l'empreinte de AS-A_XU,AN sans traitement indique un effet clairement contrasté d'une attaque acide ou basique au niveau des régions spectrales d'intérêt II, III, et IV (Figure VI.10).

Afin de l'illustrer, des ratios d'intensités ont été calculés de manière à rendre compte de l'évolution des intensités d'absorption dans ces zones, avant et après traitement. Au regard de l'effet sur la région correspondant aux nombres d'ondes supérieurs à 2750 cm^{-1} , l'évolution de l'intensité du pic centré sur

2920cm⁻¹ a aussi été analysée. Au final, les intensités utilisées correspondent aux intensités maximales mesurées aux nombres d'onde 2920 (C-H), 1630 (N-H, C=O, C=C), 1530 (N-H, C=C) et 1030 cm⁻¹ (C-O, O-H). Puisqu'aucune fonction de référence n'a pu être identifiée (pour fixer une intensité de référence), les ratios calculés ont été choisis arbitrairement. Les résultats sont présentés dans la Figure VI.11.



Erreur fixée à 10% (variabilité du ratio maximal constaté)

Figure VI.11. Sensibilité contrastée à une hydrolyse acide ou alcaline des principales bandes d'absorption identifiées comme discriminante de la nature chimique de résidus réfractaires.

D'après la Figure VI.11, la proportion relative des bandes d'absorption à 2920, 1630, 1530 cm⁻¹ ne demeurent pas constante par rapport à la bande à 1030 cm⁻¹. Les composés solubilisés sont de nature différente et l'écart entre les ratios calculés avant et après traitement thermo-alcalin, soulignent l'importance de la modification induite par la solubilisation avec NaOH.

Par ailleurs, le ratio I_{1630}/I_{1530} n'est pas sensible à la nature de l'hydrolyse chimique. Les valeurs de ce ratio ne sont pas significativement différentes pour une matrice particulière avant ou après traitement, indépendamment de l'hydrolyse thermo-chimique. Or, ces deux domaines d'absorption correspondent à des fonctions caractéristiques de composés de nature biochimique différente (protéique et humique). Comme discuté dans le chapitre 5, l'attribution de ces bandes à l'une ou l'autre famille de molécules ne peut se faire par analyse directe. À ce stade, deux hypothèses peuvent néanmoins être proposées :

- Les fonctions chimiques sont portées par des molécules distinctes. Néanmoins ces molécules sont agencées les unes avec les autres dans une configuration intime telle, qu'une déconstruction aboutit à une libération conservant leur proportion : quand l'une est libérée, l'autre est libérée aussi
- Les fonctions chimiques sont portées par les mêmes molécules.

Que l'hydrolyse soit acide ou basique, elle modifie significativement les régions spectrales discriminant la chimie de matrices réfractaires. L'hydrolyse à la soude qui présente un potentiel de solubilisation nettement supérieur à l'acide, demeure une condition plus intéressante dans le cadre

d'une démarche de déconstruction généralisée à d'autres matrices que la matrice modèle. De plus, compte tenu de l'accumulation de carbonates induite par le milieu alcalin, une condition avec un ratio inférieur ou égal à 0,5 gNaOH.gDCO⁻¹ semble *a priori* plus intéressante pour limiter l'interférence avec l'analyse spectrale.

VI.3.2.3 Physico-chimie des molécules solubilisées

La déconstruction thermo-chimique conduit à la solubilisation de molécules. Les propriétés physico-chimiques de ces molécules sont analysées par chromatographie d'exclusion (ou filtration sur gel). Après traitement de la matrice AS-A_{XU,AN}, les fractions solubilisées sont récupérées par centrifugation à 4200g comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Une filtration à 0,2 µm est réalisée avant injection sur les différentes colonnes chromatographiques. Sur l'ensemble des fractions particulières réfractaires solubilisées, la fraction de DCO soluble injectée représente 83 à 96% de la DCO totale solubilisée (quantifiée après séparation par centrifugation). Cette caractéristique doit être soulignée car elle permet d'une part, de valider le caractère représentatif des résultats présentés ci-après, et d'autre part, de montrer que la déconstruction d'un agrégat réfractaire par hydrolyse chimique ne s'arrête pas à l'état supra-colloïdale.

Deux colonnes de chromatographie différentes ont été utilisées. La colonne *Superdex 75* et la colonne *Superdex 200* permettent de séparer des molécules de poids moléculaires compris respectivement entre 1000 à 150 000 Da et entre 10 000 et 600 000 Da. L'échelle de taille en Daltons (Da) est associée aux volumes d'élution exprimés en mL sur les chromatogrammes. La correspondance entre les deux unités résulte des courbes de calibration présentées dans le chapitre Matériels et Méthodes.

Selon le type de détecteur positionné en sortie de colonne, la caractéristique chimique associée au critère de taille diffère. Dans ce travail, plusieurs types de détecteurs ont été utilisés :

- UV à deux longueurs d'onde :
 - 210 nm (noté « UV 210 ») : détection de tout composé organique
 - 280 nm (noté « UV 280 ») : détection de composés possédant des noyaux aromatiques. (Cette propriété est d'ailleurs communément utilisée pour quantifier les protéines grâce aux acides aminés aromatiques tels que le tryptophane. Néanmoins, en présence de composés non protéiques avec des noyaux aromatiques, ce détecteur ne pourra les différencier.)
- Fluorescence 2D à deux couples d'excitation/émission :
 - 221/350 (noté « fluo PN ») : détection de protéines-like. Ce signal peut être perturbé par plusieurs phénomènes : surestimation en présence de molécules humiques qui présentent une légère fluorescence pour ce couple, sous-estimation par quenching de la longueur d'onde émise après excitation par des molécules de type humique qui présentent un massif de fluorescence important au couple 345/443.

- 345/443 (noté « fluo SH ») : détection de molécules humiques-like. Contrairement au couple précédent, la mesure est soumise à moins d'interférences liées aux autres composés (notamment de nature protéique). C'est donc un moyen de les distinguer.

Les chromatogrammes mesurés lors de l'élution des fractions solubilisées de AS-A_{XU,AN}, en condition acide et alcaline, sont présentés dans la Figure VI.12. L'échelle de poids moléculaire est donnée en lien avec les volumes d'élution. L'analyse des chromatogrammes A et B réalisés sur *Superdex 75* visent à caractériser l'effet des deux types hydrolyses sur la physico-chimie des molécules. Les chromatogrammes C et D réalisés sur *Superdex 200*, concernent uniquement la fraction solubilisée à 0,5gNaOH.gDCO⁻¹ à 95°C.

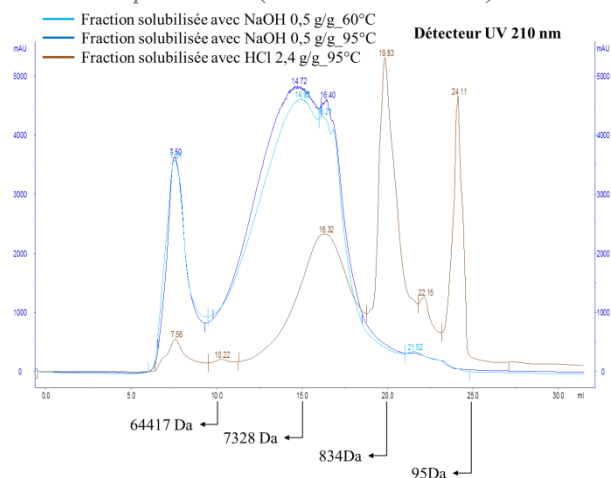
L'analyse et l'interprétation de la Figure VI.12 s'articulent autour de trois points : la distribution en taille des molécules solubilisées par hydrolyse acide ou alcaline, l'aromaticité des composés, et le rôle de la température sur l'hydrolyse chimique alcaline.

■ Comparaison de la taille des molécules solubilisées

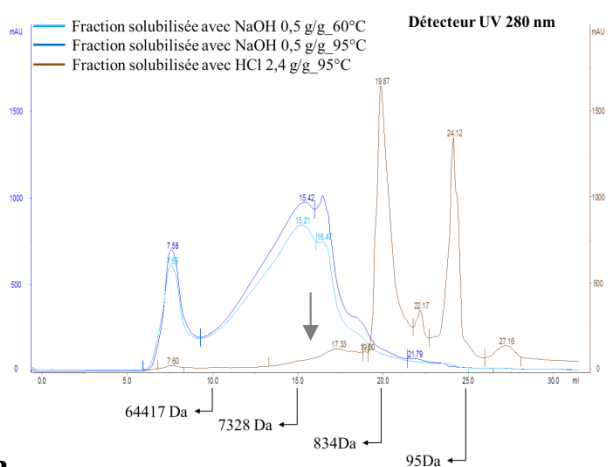
Le chromatogramme A, enregistré en UV210, donne la distribution en taille des molécules organiques solubilisées par HCl ou NaOH. Les résultats montrent une nette différence selon le réactif utilisé pour l'attaque chimique. Ainsi, les composés organiques solubilisés par une hydrolyse avec 2,4 gHCl.gDCO⁻¹ sont majoritairement plus petits que ceux solubilisés avec NaOH. Sur la base des aires calculées sous les pics, 56% des composés solubilisés avec HCl ont une taille inférieure à 1000 Da alors qu'aucun des composés solubilisés avec la soude n'est détecté dans cette gamme de taille (chromatogramme A et C en UV210). D'après le chromatogramme A enregistré en UV210, 85% des composés solubilisés par la soude présentent un poids moléculaire compris entre 1000 et 60 000 Da. Le volume d'exclusion correspond aux composés qui ne sont pas retenus lors de l'élution du fait d'une taille supérieure à la taille des pores de la phase fixe. Ainsi, seuls 3% des composés organiques solubilisés avec HCl sont exclus de la colonne *Superdex 75* (poids moléculaire > 150 000Da) alors que 15% de ceux solubilisés avec NaOH le sont. Le chromatogramme C obtenu sur *Superdex 200* met par ailleurs en évidence que parmi les composés exclus de la *Superdex 75*, aucun ne présente un poids moléculaire inférieur à 600 000 Da. En effet, les 15% de composés organiques exclus de la colonne *Superdex 75*, le sont aussi sur *Superdex 200*. L'analyse des chromatogrammes ne permet pas de préciser si les 15% de composés organiques de poids moléculaire supérieur à 600 000Da correspondent à des molécules isolées ou à des associations de molécules, et si cette conformation est native ou induite par l'environnement chimique des composés solubilisés. Pour conclure, il est intéressant de noter que les conditions d'hydrolyse avec NaOH à 0,5g.gDCO⁻¹, 2h à 95°C, n'aboutissent pas à une hydrolyse totale des composés solubilisés.

Fraction solubilisée avec 0,5gNaOH.gDCO⁻¹, 2h à 60 ou 95°C, ou 2,4gHCl.gDCO⁻¹

Superdex 75 (1000 à 150 000Da)



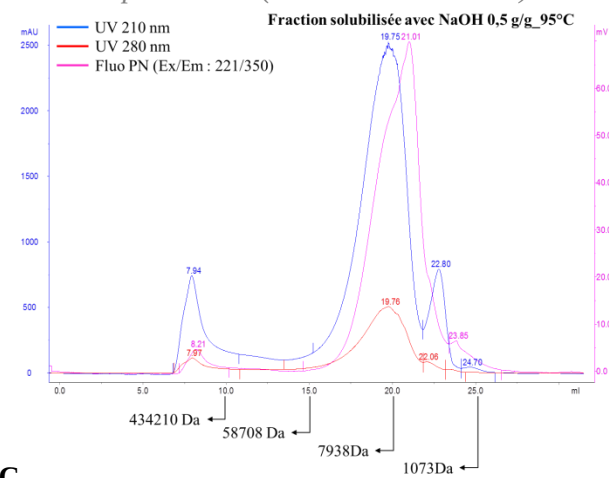
A



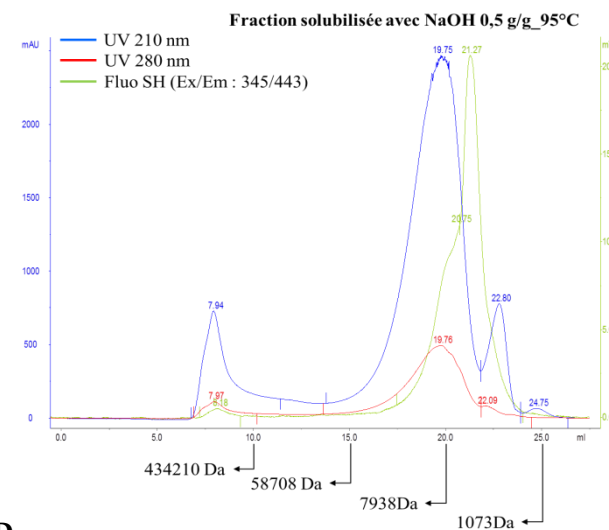
B

Fraction solubilisée avec 0,5gNaOH.gDCO⁻¹, 2h à 95°C

Superdex 200 (10 000 à 600 000 Da)



C



D

Figure VI.12. Chromatogrammes de filtration sur gel des fractions solubilisées de la matrice AS-A_{XU,AN}

▪ **Aromaticité des composés solubilisés**

La comparaison des chromatogrammes A et B, obtenus en UV à 210 et 280 nm, permettent de mettre en évidence que certains composés organiques solubilisés avec HCl ne présentent pas de noyaux aromatiques. En effet, alors que l'aire sous le pic centré sur 16,32 ml (environ 4000 Da) représente 44% de l'aire totale mesurée à 210 nm (chromatogramme A), le même pic ne représente plus que 9% de l'aire totale mesurée en UV à 280 nm (pic indiqué par une flèche sur le chromatogramme B). Ce résultat indique que 41% des molécules organiques solubilisées par HCl, de taille comprise entre 1000 et 10000Da, sont pauvres en noyaux aromatiques et donc, à ce titre, pauvres en composés protéiques-like et humiques-like. En accord avec les fractionnements biochimiques qui indiquaient une solubilisation préférentielle des composés polysaccharidiques avec HCl, ces composés organiques peuvent en partie être de nature polysaccharidique. Néanmoins, compte tenu des 33% de DCO solubilisée non identifiée dans cette fraction (Figure VI.5), d'autres composés peuvent aussi y contribuer.

Concernant les fractions solubilisées avec NaOH, les pics d'absorbances identifiables à 210 et 280 nm correspondent à des fractions de composés qui sortent sensiblement aux mêmes temps de rétention. Ce résultat met en évidence que contrairement aux fractions solubilisées avec HCl, toutes les molécules ou associations de molécules solubilisées par NaOH sont empreintes de noyaux aromatiques. Le détecteur en UV280 ne permet pas de différencier la nature protéique ou humique des composés. L'élution de la fraction solubilisée par 0,5gNaOH.gDCO⁻¹ à 95°C, a aussi été analysée en fluoPN (chromatogramme C) et en fluoSH (chromatogramme D). Ces résultats mettent ainsi en évidence que des composés protéiques-like et humiques-like sont présents parmi les 85 % de composés organiques de taille comprise entre 1000 et 60000 Da. Une nouvelle fois ces deux familles de composés semblent avoir un comportement commun face à l'attaque chimique. Toutefois, les 15% dont la taille dépasse 600 000Da sont légèrement moins empreints de composés humiques-like.

▪ **Rôle de la température**

Les composés solubilisés avec NaOH à 60 et 95 °C présentent les mêmes chromatogrammes en UV210 et en UV 280 (chromatogrammes A et B). L'utilisation d'une température à 95°C couplée à NaOH, améliore le potentiel de solubilisation sans modifier significativement les propriétés physico-chimiques des molécules solubilisées. La température joue donc bien essentiellement un rôle de catalyseur de l'hydrolyse chimique.

VI.3.3 Conclusion

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VI.2. Récapitulatif de l'effet quantitatif et qualitatif d'une hydrolyse thermo-chimique

		Hydrolyse avec HCl 0,5 à 2,4 gHCl.gDCO ⁻¹	Hydrolyse avec NaOH 0,25 à 5,2 gNaOH.gDCO ⁻¹
Potentiel de solubilisation		0 à 21 %	25 à 69 %
Nature biochimique des fractions solubilisées		Solubilisation quasi-totale des polysaccharides-like Composés non identifiés : 33 à 56%	Majorité de composés protéiques-like et humiques-like Composés non identifiés : 26 à 45%
Impact des régions spectrales discriminantes	bandes centrées sur 2920, 1630 et 1530 cm ⁻¹	↑	↓
	bande centrée sur 1018 cm ⁻¹	↓	↑
Taille des molécules solubilisées		56 % < 1000 Da 41 % ∈ [1000 ;60000] Da 3% > 150 000 Da	≈0 % < 1000 Da 85 % ∈ [1000 ;60000] Da 15% > 600 000 Da
Déconstruction à 95°C par rapport à 60°C		Amélioration des potentiels de solubilisation Similarité des caractéristiques qualitatives des composés solubilisés à une condition chimique donnée	

De manière globale, ils ont mis en évidence qu'une déconstruction par thermo-hydrolyse acide ou alcaline d'un agrégat réfractaire avait un effet quantitativement et qualitativement contrasté. De plus, la sensibilité similaire des molécules protéiques-like et humiques-like doit être soulignée. Deux hypothèses ont été formulées : (1) Les fonctions chimiques sont portées par des molécules distinctes mais intimement associées dans l'agrégat réfractaire, leur conférant cette sensibilité commune à la déconstruction ; (2) Les fonctions chimiques sont portées par les mêmes molécules.

Sur la base de l'ensemble de nos résultats, la condition retenue pour la déconstruction est l'application d'un ratio supérieur ou égal à 0,5 gNaOH.gDCO⁻¹, 2h à 95°C. L'utilisation d'une concentration en NaOH de 0,1M a été choisie pour imposer le ratio réactif/DCO souhaité. Ce choix est essentiellement basé sur les résultats suivants :

- Potentiel de solubilisation important : 57 % de la DCO traitée,
- 63% de la DCO solubilisée identifiée avec des dosages colorimétriques,
- Modification significative des régions spectrales discriminant la chimie ces molécules réfractaires,

- Taille des molécules solubilisées comprise entre 1000 et 60 000 Da (85%) et supérieure à 600 000 Da (15%) qui indique que l'hydrolyse n'est pas totale (relative conservation de chimie des molécules).

La déconstruction de la matrice réfractaire modifie très probablement les propriétés physico-chimiques des composés solubilisés qui sont alors altérées ou perdues. La généralisation d'une démarche de déconstruction doit donc s'appuyer sur un compromis entre déconstruction et dénaturation des molécules. Or, l'effet dénaturant d'une attaque thermochimique sur les caractéristiques de molécules initialement agrégées ne peut être estimé par analyse directe qui suppose de connaître *a priori* les propriétés physiques, chimiques et biochimiques des composés. Une démarche expérimentale spécifique basée sur l'utilisation de molécules modèles a donc été mise en œuvre pour cette question. Cette étude fait l'objet du paragraphe suivant.

VI.4 DENATURATION DES MOLECULES SOLUBILISEES APRES 2H A 95°C AVEC NaOH 0,1M

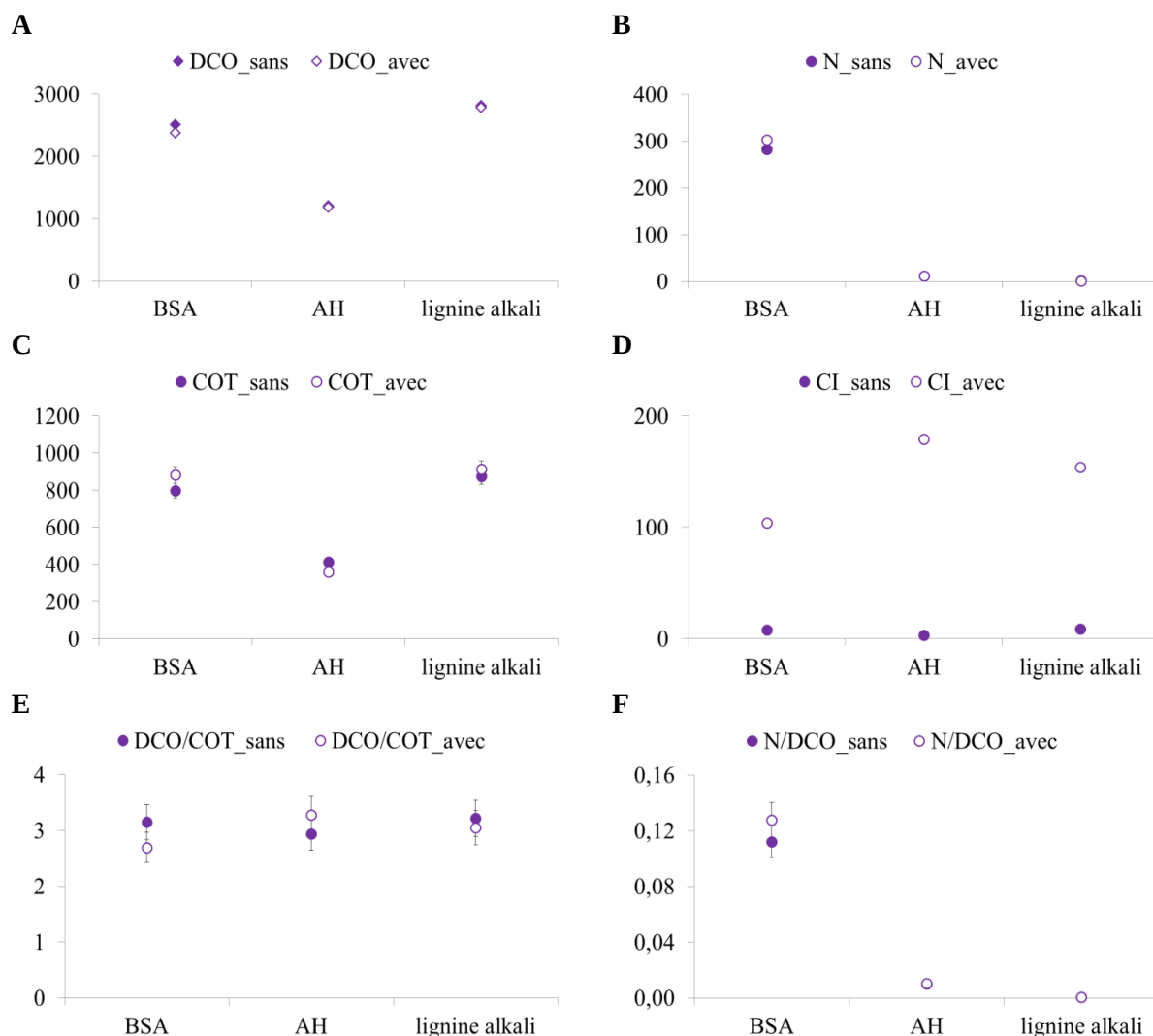
L'objectif de ce paragraphe est d'apprécier la dénaturation induite par une attaque thermo-chimique réalisée en 2h à 95°C avec NaOH 0,1M. Cette évaluation a été réalisée en utilisant des molécules modèles représentatives des familles majoritairement identifiées dans ce type de résidus à savoir les protéines-like et les acides humiques-like. Les polysaccharides n'ont pas été conservés dans l'étude. Les caractéristiques physiques et chimiques de deux types de molécules ont donc été comparées, avec ou sans traitement. Les molécules utilisées sont les suivantes :

- Protéine-like : l'albumine de serum bovin, BSA, car elle est communément utilisée comme étalon externe pour les dosages colorimétriques appliqués aux matrices de type boue ou EPS extraits. Elle est donc considérée comme représentative de la chimie de composés protéiques présents.
- Aromatique-like :
 - un acide humique commercial, AH, utilisé pour les dosages Lowry modifié dans le cadre de ce travail.
 - une lignine commerciale dite alkali, L, car ce type de composé dont la biodégradabilité est limitée peut éventuellement contribuer à la chimie d'un résidu réfractaire de boue d'épuration en qualité de composés d'origine exogène (chapitre 1).

Les ratios réactionnels appliqués sont supérieurs à 0,5 gNaOH.gDCO⁻¹ (respectivement de 1,7, 3,3 et 1,4 gNaOH.gDCO⁻¹). L'analyse relative des différentes caractéristiques, avant et après traitement, est réalisée dans les deux premiers paragraphes avant d'en établir le bilan en lien avec l'enjeu de caractérisation des molécules réfractaires initialement agrégées.

VI.4.1 Conservation des paramètres chimiques globaux ?

La DCO totale, la teneur en azote organique (N), la teneur en carbone organique (COT), la teneur en carbone inorganique (CI) sont des paramètres chimiques globaux. Les mesures avant et après traitement ainsi que les ratios DCO/COT et N/DCO sont présentés sur la Figure VI.13 pour les 3 molécules modèles.



Les concentrations tracées en ordonnées sont toutes exprimées mg/l.

Figure VI.13. Comparaison de paramètres chimiques globaux (DCO, COT, CI, N) mesurés sur des molécules modèles, avec ou sans traitement 2h avec NaOH 0,1M à 95°C et des ratios DCO/COT et N/DCO

La conservation des paramètres chimiques globaux (DCO, COT et N) confirme que l'hydrolyse thermo-alkaline ne minéralise pas la matière organique. De plus, le maintien des ratios DCO/COT et N/DCO indique que le degré d'oxydation de la molécule et la composition élémentaire ne sont pas significativement modifiés par la coupure de certaines liaisons covalentes par hydrolyse. Néanmoins, ces résultats ne permettent pas de garantir la conservation des caractéristiques physico-chimiques des composés qui sont donc plus spécifiquement abordées dans les paragraphes suivants.

Par ailleurs, l'analyse de la teneur en carbone inorganique, avant et après traitement (Figure VI.13-D), confirme que l'utilisation de la soude comme réactif d'hydrolyse chimique engendre une augmentation significative de la teneur en carbone inorganique dans le milieu réactionnel (identifiée précédemment avec les analyses ATR-FT-MIR des fractions solubilisées et non solubilisées – Figure VI.9). Compte tenu de la non-minéralisation des composés organiques, l'origine de ce carbone inorganique est essentiellement liée à l'absorption du CO₂ atmosphérique.

VI.4.2 Conservation des propriétés chimiques et physiques ?

VI.4.2.1 Fluorescence des molécules

La fluorescence d'un composé organique tient à sa capacité à émettre spontanément un photon après avoir été excité. Les propriétés de fluorescence d'un échantillon sont donc directement liées à la nature chimique de ses composés. La spectrofluorimétrie 3D a ici été utilisée comme technique de caractérisation qualitative des composés réfractaires solubilisés. Une cartographie des spectres de fluorescence, basée sur les travaux de Chen et al. (2003), repris et complétés par ceux de Jimenez (2013), permet d'établir *a priori* le type de composés qui constituent l'échantillon analysé (protéique, humique, lignocellulosique...) (Figure VI.14, rappel de la Figure II.12 du chapitre Matériels et Méthodes).

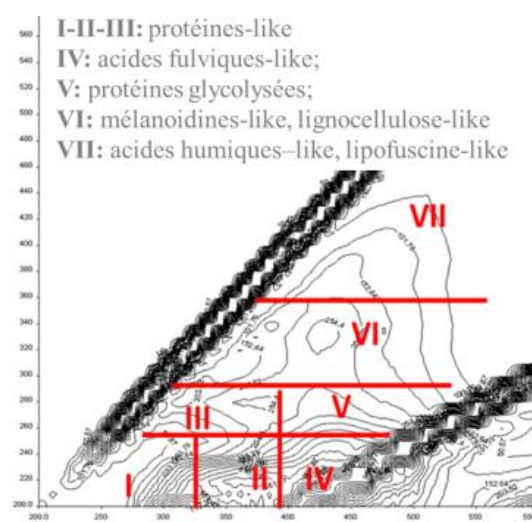
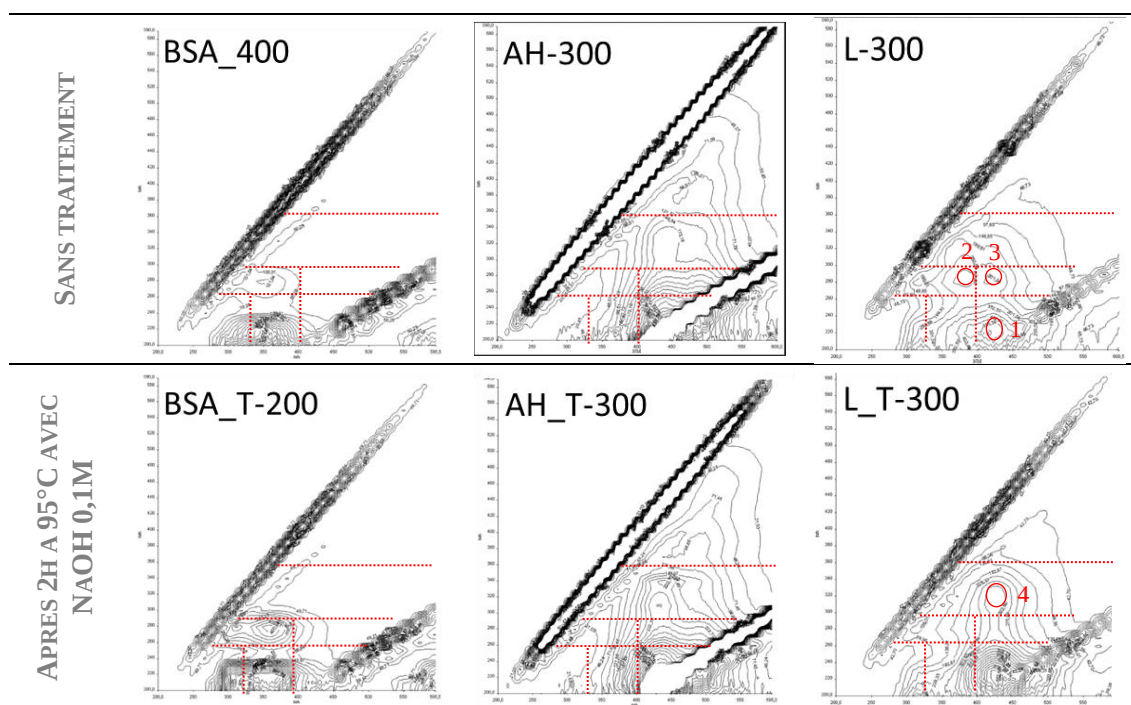


Figure VI.14. Cartographie qualitative d'un spectre de fluorescence 3D

Dans le cadre de ce travail, cette technique est utilisée pour évaluer si la nature chimique des molécules modèles a été qualitativement impactée par la soude. Cette analyse consiste à comparer l'empreinte, avant et après traitement, et d'identifier de possibles modifications de position des massifs de fluorescence. Les spectres de fluorescence 3D des différentes molécules modèles, avec ou sans traitement, sont alors présentés dans la Figure VI.15.



nombre : taux de dilution de l'échantillon analysé; T : Traitée; BSA : albumine de sérum bovin commerciale; AH : acide humique commercial; L : Lignine alkali commerciale

Figure VI.15. Comparaison du spectre de fluorescence 3D des molécules modèles avec ou sans traitement 2h à 95°C avec NaOH 0,1M

La comparaison des spectres de fluorescence 3D avec ou sans traitement ne révèle pas de différences significatives en termes de positions des principaux massifs de fluorescence pour la BSA et l'acide humique commercial (AH). La conservation de leurs caractéristiques de fluorescence témoigne que l'hydrolyse alcaline n'a pas provoqué de réarrangements moléculaires significatifs.

Le spectre de fluorescence de la lignine avant traitement présente un massif de fluorescence majoritaire pour les longueurs d'onde d'émission (ordonnées) comprises entre 200 et 250 nm (cercle 1) et deux autres massifs moins intenses centrés aux couples Ex/Em 290nm/375nm (cercle 2) 290nm/420nm (cercle 3). Après traitement, le massif majoritaire est conservé. Par contre, les deux massifs (2) et (3) ont disparu tandis qu'un massif est apparu au couple 320nm/420nm (cercle 4). Puisque les massifs de fluorescence les plus intenses ont été conservés, la chimie de ce composé est probablement globalement conservée. Les modifications mettent en évidence que certaines parties de cette molécule ont toutefois pu être impactées par l'hydrolyse.

Pour finir, la Figure VI.15 indique que le principal massif de fluorescence de l'acide humique commercial apparaît dans une zone qui ne correspond pas à la cartographie établie par Chen et al. (2003) (Figure VI.14) : zone VI au lieu de VII. Dans le cadre de l'interprétation qualitative des fractions solubilisées qui sera faite par la suite, les zones IV, VI et VII sont donc réunies pour

identifier globalement la présence de composés aromatiques autres que protéiques (ex. humique-like, ligno-cellulosique-like...).

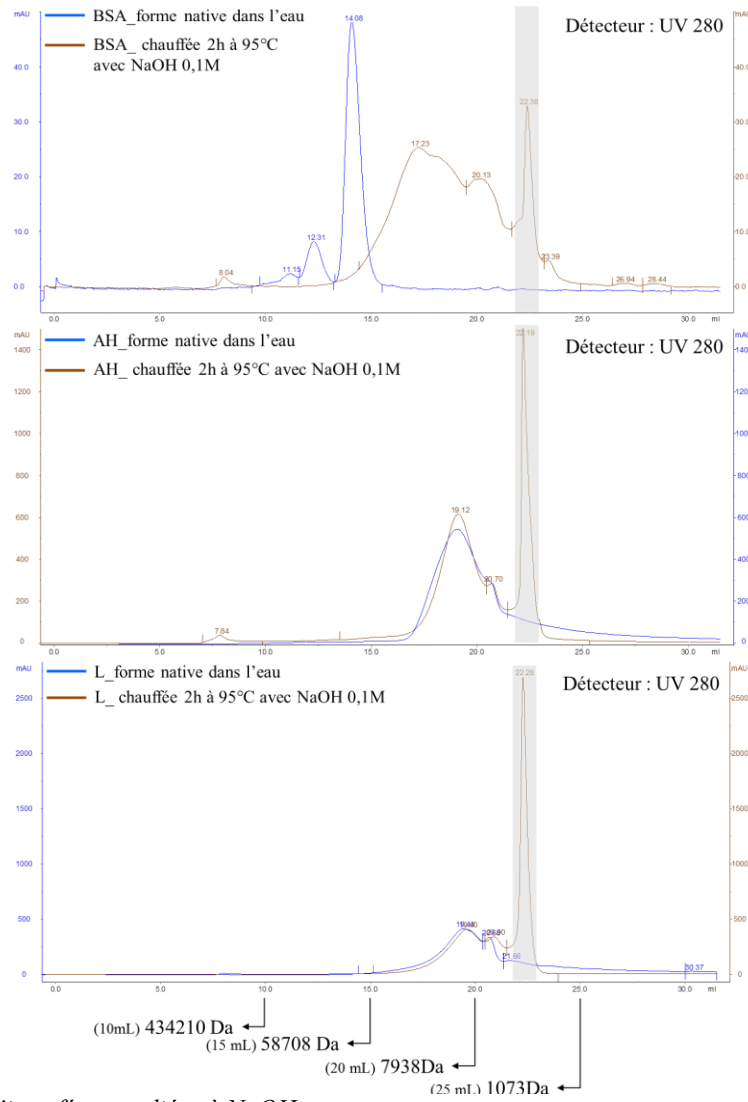
VI.4.2.2 Physico-chimie des molécules

La filtration sur gel est utilisée ici pour comparer la taille des molécules et leur aromaticité, avant et après traitement. Les détecteurs UV 210nm et UV 280nm ont donc été placés en sortie d'une *colonne Superdex 200* (séparation sur gamme de 10 000 à 600 000 Da). Pour les trois molécules, les chromatogrammes obtenus en UV 210 et en UV 280 sont identiques, avant et après traitement. Pour plus de clarté, seuls les chromatogrammes en UV280 nm de la protéine (BSA), de l'acide humique (AH) et de la lignine (L) sont présentés dans la Figure VI.16.

Par ailleurs, le chromatogramme de la soude à 0,1M élue seule après 2h à 95°C indique que le réactif peut absorber en UV 210 et en UV280 (Figure VI.17). Les causes de cette interférence n'ont pas été clairement établies mais ce résultat indique qu'une absorbance identifiée à 22±0,2 ml n'est pas forcément attribuable à des molécules organiques solubilisées par NaOH. Cette zone est donc retirée de l'interprétation (encadré grisé sur la Figure VI.16).

Le pic d'absorbance principal des chromatogrammes de la BSA non traitée indique que cette protéine est majoritairement sous la forme d'un monomère de taille moyenne 89000Da. De manière moins significative, la BSA peut aussi être associée en dimères et en trimères respectivement élués à 12,31 et 11,15ml. Le chromatogramme de la BSA après traitement indique que des composés organiques commencent à sortir de la colonne seulement après un volume d'élution de 15 ml (58708 Da). Ce résultat montre que la protéine a été hydrolysée en polypeptides plus petits de poids moléculaire compris entre 1000 et 58000 Da, probablement du fait de l'hydrolyse partielle de la liaison peptidique.

L'analyse relative des chromatogrammes de l'acide humique et de la lignine, avec ou sans traitement, révèle, qu'au contraire, la conformation stérique de ce type de composés n'est pas altérée.



encadré gris : zone d'interférences liées à NaOH

Figure VI.16. Chromatogrammes en UV 280nm de la BSA, de AH et de L, avec ou sans traitement

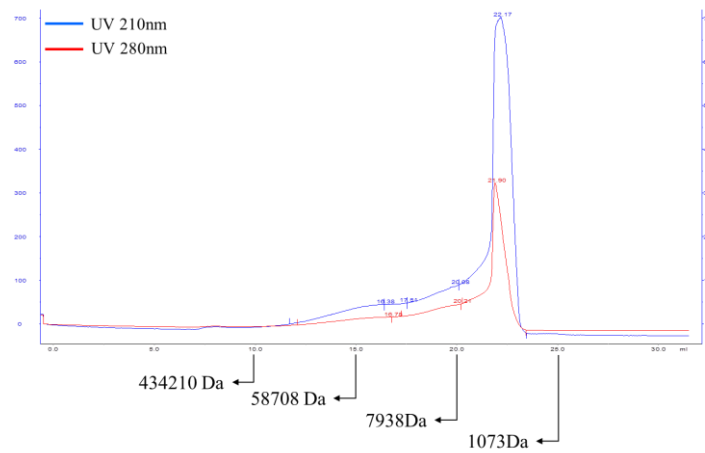


Figure VI.17. Chromatogrammes en UV 210 et 280nm de NaOH 0,1M seule, chauffée 2h à 95°C

VI.4.3 Conclusion

L'effet dénaturant de la procédure de déconstruction de l'agrégat a été étudié à travers des molécules modèles solubles représentatives de la nature biochimique des composés organiques réfractaires majoritairement identifiés dans un agrégat réfractaire.

Cette procédure tend à dénaturer les composés protéiques solubilisés en modifiant leur structure primaire (rupture de la chaîne d'acides aminés) alors qu'*a priori* elle ne modifiera pas les caractéristiques de composés riches en aromatiques. La taille des composés protéiques réfractaires solubilisés ne sera donc pas représentative de leur état au sein de la matrice agrégée. Toutefois, la conservation des paramètres chimiques globaux (DCO, COT, N) et de leurs propriétés de fluorescence révèle que la chimie de leurs constituants (acides aminés) sera globalement conservée. Ainsi, même si la structure primaire des composés protéiques solubilisés est partiellement modifiée, cette méthode de déconstruction ouvre la possibilité d'appliquer des techniques de caractérisation moléculaire chimiques et biochimiques plus fines.

L'hydrolyse de la BSA libère des fragments peptidiques dont la distribution de tailles est similaire à celle des composés aromatiques analysés (comprise entre 3000 et 40000 Da). Ainsi, si la déconstruction solubilise des molécules de type humiques-like et protéiques-like, la taille ne sera probablement pas un caractère discriminant et les molécules libérées auront des poids moléculaires relativement proches. L'analyse des propriétés physico-chimiques des molécules réfractaires de AS-A_{XU,AN} vient d'ailleurs confirmer cette tendance avec l'identification de la présence de protéines-like et de composés humiques-like parmi les 85% de composés solubilisés de taille comprise entre 1000 et 60000Da (Figure V.13).

Enfin, le mécanisme de déconstruction implique la rupture de certaines liaisons covalentes. Les liaisons peptidiques des protéines sont susceptibles de réagir et de libérer des peptides libres de taille variable. Ce mécanisme est illustré par la décomposition de la de la BSA. Toutefois, ce constat ne garantit pas une solubilisation de tous les composés protéiques. Certains fragments sont susceptibles de rester associés à d'autres molécules. Ainsi, des molécules de poids moléculaire supérieur à 600 000Da ont été identifiées pour la fraction solubilisée de AS-A_{XU,AN} (Figure VI.12). A l'inverse, des molécules s'apparentant à des acides humiques ou une lignine sont peu sensibles à l'attaque thermo-alkaline et conservent leur intégrité

L'utilisation de l'attaque thermo-chimique avec NaOH 0,1M, 2h à 95°C constitue donc un bon compromis pour solubiliser une quantité significative de composés réfractaires initialement agrégés sans en altérer drastiquement les caractéristiques. La dernière partie s'attache donc à évaluer l'effet de cette procédure de déconstruction sur différentes matrices réfractaires

VI.5 DECONSTRUCTION DE LA FRACTION PARTICULAIRE REFRACTAIRE DE BOUES D'EPURATION CONTRASTEES

Avec un potentiel de solubilisation minimum de 57% de la DCO AS-A_{XU,AN}, la non-minéralisation de la matière organique traitée et une dénaturation limitée de la chimie des composés protéiques-like et aromatiques-like solubilisés, la condition de déconstruction [apport en NaOH supérieur ou égal à 0,5g.gDCO⁻¹, 2h, à 95°C] a été choisie pour être appliquée à d'autres résidus réfractaires. L'enjeu est ici d'une part, de mieux définir la nature des composés réfractaires, et d'autre part, de préciser si celle-ci est origine dépendante (exogène, endogène). Compte tenu de la diversité moléculaire et de l'impossibilité de fractionner expérimentalement les composés organiques selon leur origine, l'interprétation est basée sur l'analyse relative de résidus réfractaires contrastés.

Une première partie s'attache donc à faire un bref rappel des caractéristiques quantitatives et qualitatives des résidus qui vont être soumis à une déconstruction thermo-alkaline et qui ont été produits dans le cadre de ce projet de recherche. L'efficacité de solubilisation, les propriétés physico-chimiques des fractions solubilisées ainsi que la modification de la chimie des fractions non solubilisées sont ensuite présentées dans une seconde partie avant d'établir le bilan global des connaissances acquises par cette approche de caractérisation.

VI.5.1 Objets d'étude

Les matrices réfractaires traitées par hydrolyse thermo-alkaline à la soude sont issues de la digestion anaérobie en batch long terme (BMP > 120jours) des boues suivantes :

- PS-A* : boue primaire prélevée sur la STEP A qui a servi à l'alimentation au procédé à boues activées E (l'astérisque correspond à son mode de conservation - chapitre Matériels et Méthodes)
- AS-E : boue biologique produite par un procédé à boues activées alimenté par la boue primaire PS-A* diluée dans de l'eau du robinet et fonctionnant avec un âge de boues de 5 jours.
- OHO : matrice exclusivement composée de biomasse cellulaire et de résidus de lyse bactérienne, produite par un procédé à boues activées alimenté par un mélange de sources carbonées totalement solubles et biodégradables (acétate de sodium /citrate de sodium/éthanol en proportion DCO 2/1/1) et fonctionnant à un âge de boues de 2 jours.
- AS-A : boue biologique prélevée sur l'unité de traitement biologique de la STEP A alimentée par une ERU décantée et fonctionnant à un âge de boues de 2-3 jours. Le résidu réfractaire AS-A_{XU,AN} correspond au modèle utilisé pour la mise en place de la méthode (paragraphe VI.3).

Les conditions de productions de ces boues et de leurs résidus réfractaires sont détaillées dans le chapitre Matériels et Méthodes.

La contribution quantitative des différents composés organiques réfractaires, distingués par leur origine, a par ailleurs été estimée dans le chapitre 4. Le Tableau VI.3 rappelle ainsi l'origine des

différents composés réfractaires et les fractionnements DCO des 4 matrices réfractaires considérées dans cette partie.

Tableau VI.3. Origine et contribution quantitative des différents composés réfractaires constitutifs des 4 résidus réfractaires anaérobies avant déconstruction (extrait du Tableau IV.11)

Origine du $X_{U,inf}$	Résidus réfractaires anaérobies	$f_{XU,inf}$ $gDCO.gDCO^{-1}$	$f_{XU,E_{AE}}$ $gDCO.gDCO^{-1}$	$f_{XU,E_{BMP}}$ $gDCO.gDCO^{-1}$	$\Sigma(f_{XU,E})$ $gDCO.gDCO^{-1}$
/	OHO _{XU,AN}	0	0,71	0,29	1
PS-A*	PS-A* _{XU,AN}	0,95	0	0,05	0,05
	AS-E _{XUAN}	0,93	0,02	0,05	0,07
ERU décantée de la STEP A	AS-A _{XU,AN}	0,74	0,16	0,10	0,26

Du point de vue qualitatif, l'analyse relative multi-variée de leurs empreintes spectrales, réalisée dans le chapitre 5, a permis de mettre en évidence que si la chimie de ces quatre résidus réfractaires est significativement différente, des regroupements statistiquement pertinents peuvent être effectués. Ainsi, les résidus réfractaires OHO_{XU,AN} et AS-A_{XU,AN} présentent des empreintes significativement proches par opposition à celles des résidus PS-A*_{XU,AN} et AS-E_{XUAN}. De plus, les régions spectrales suivantes ont été identifiées comme particulièrement discriminantes : 681 à 712 cm^{-1} , 899 à 1043 cm^{-1} , 1493 à 1682 cm^{-1} , 1708 à 1799 cm^{-1} .

VI.5.2 Caractéristiques des molécules solubilisées et non solubilisées

Les quatre matrices particulières réfractaires ont été traitées 2h à 95°C avec NaOH 0,1M. Les ratios réactionnels appliqués correspondants sont compris entre 0,5 et 5,5 gNaOH.gDCO⁻¹. Ils correspondent à des conditions de solubilisation *a priori* efficace au regard des résultats obtenus sur la matrice réfractaire modèle (Figure VI.3).

Le Tableau VI.4 récapitule l'ensemble des données quantitatives et qualitatives qui ont été obtenues par déconstruction thermo-alkaline. Leur analyse va se décliner en trois points :

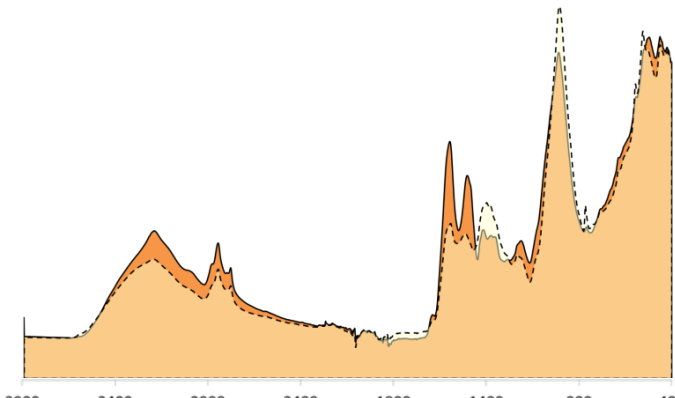
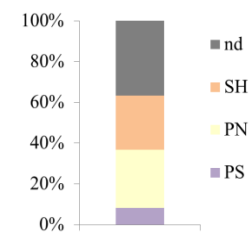
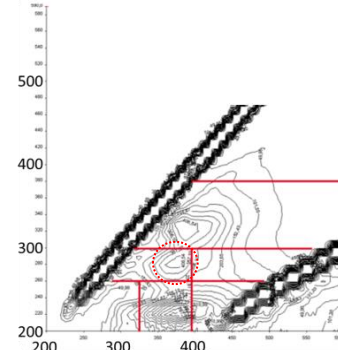
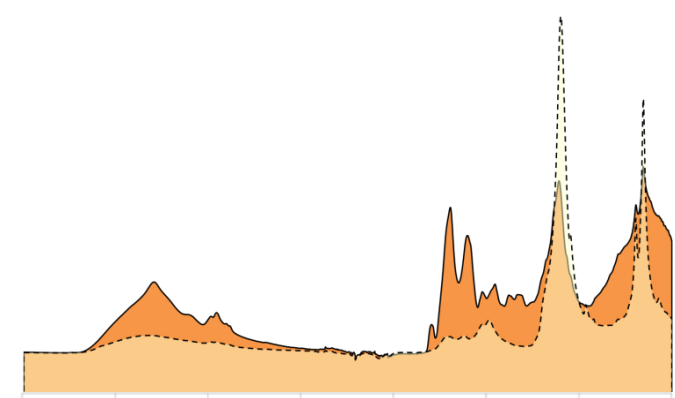
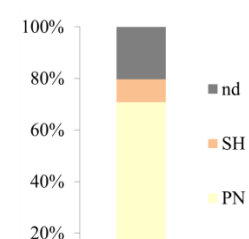
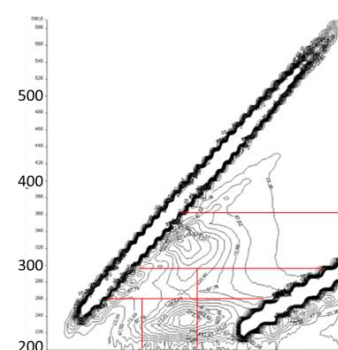
- l'efficacité de la solubilisation,
- la modification de la chimie des agrégats
- et les propriétés physiques, chimiques et biochimiques des molécules solubilisées.

Tableau VI.4. Caractéristiques des différentes particules réfractaires traitées 2h à 95°C avec NaOH 0,1M

Résidus réfractaires traités	Ratio réactionnel $\frac{gNaOH}{gDCO^{-1}}$	$\eta_{\text{solubilisation}}$ $\frac{gDCO_{\text{solubilisée}}}{gDCO_{\text{traitée}}}$	Analyse relative des empreintes ATR-FT-MIR des fractions particulières, avant et après traitement		Analyse de la fraction solubilisée	
					Dosages biochimiques colorimétriques	Spectres de fluorescence 3D
			— Spectre avant traitement - - Spectre après traitement Modification après traitement : ■ Intensité d'absorption augmentée ■ Intensité d'absorption diminuée ■ superposition			
PS-A* _{XU,AN}	1,1	63%				
AS-E _{XU,AN}	2,2	71%				

H : substances humiques-like; *PN* : protéines-like; *PS* : polysaccharides-like; *nd* : non identifiés par dosages biochimiques;

Tableau VI.4. Caractéristiques des différentes particules réfractaires traitées 2h à 95°C avec NaOH 0,1M (suite)

Résidus réfractaires traités	Ratio réactionnel $\frac{gNaOH}{gDCO^{-1}}$	$\eta_{\text{solubilisation}}$ $\frac{gDCO_{\text{solubilisée}}}{gDCO_{\text{traitée}}^{-1}}$	Analyse relative des empreintes ATR-FT-MIR des fractions particulières, avant et après traitement		Analyse de la fraction solubilisée	
					Dosages biochimiques colorimétriques	Spectres de fluorescence 3D
			— Spectre avant traitement - - Spectre après traitement	Modification après traitement ■ Intensité d'absorption augmentée ■ Intensité d'absorption diminuée ■ superposition		
AS-A _{XU,AN}	0,5	57%				
OHO _{XU,AN}	5,5	93%				

VI.5.2.1 Efficacité de solubilisation

La mesure de la teneur en DCO, avant et après traitement, pour l'ensemble des expériences valide que la déconstruction n'a induit aucune minéralisation de matière organique (données non présentées). Les potentiels de solubilisation de 63 et 71 % de la DCO traitée, respectivement mesurés pour les résidus PS-A*_{XU,AN} et AS-E_{XU,AN}, sont du même ordre de grandeur que les maximums atteints pour AS-A_{XU,AN} traité à 95°C avec des ratios compris entre 2,6 et 5,2 gNaOH.gDCO⁻¹ (Figure VI.3). Ce résultat confirme que l'hydrolyse thermo-alkaline est une méthode de déconstruction efficace de la fraction réfractaire d'une boue d'épuration, indépendamment des conditions de production. De plus, il est intéressant de noter que la fraction non solubilisable par hydrolyse alcaline des différents résidus de boues, PS-A*_{XU,AN}, AS-A_{XU,AN} et AS-E_{XU,AN}, est du même ordre de grandeur, compris entre 29 et 37%.

Le potentiel de solubilisation du résidu OHO_{XU,AN}, exempt de composés exogènes, a atteint 93%. Ce résultat indique que les interactions moléculaires qui maintiennent agrégés des résidus d'origine bactérienne sont nettement plus sensibles à l'hydrolyse alcaline que des matrices combinant aussi des composés exogènes d'origine non bactérienne. À ce titre, il est intéressant de rappeler que pour des ratio équivalents (5,1 et 5,2 gNaOH.gDCO⁻¹), le potentiel de solubilisation atteint pour la matrice AS-A_{XU,AN} est compris entre 63 et 69% (Figure VI.3). La quasi-totalité des molécules réfractaires d'origine endogène, agrégées dans la matrice OHO_{XU,AN}, sont alors rendues disponibles à la caractérisation.

VI.5.2.2 Modification de l'empreinte ATR-FT-MIR des résidus réfractaires

Parmi les différentes modifications qui sont induites par la solubilisation de composés (Tableau VI.4), la diminution des régions spectrales allant de 2750 à 3200 cm⁻¹ et de 1500 à 1800 cm⁻¹ et l'augmentation de l'intensité d'absorbance du pic centré sur 1018 cm⁻¹ peuvent être remarquées. L'effet identifié précédemment sur la matrice modèle semble être une caractéristique commune à tous les résidus réfractaires de boues traités par déconstruction thermo-alkaline. La déconstruction permet donc de solubiliser des composés dont la chimie contribue significativement aux régions spectrales différenciant la chimie des résidus OHO_{XU,AN} et AS-A_{XU,AN} par rapport à celle de PS-A*_{XU,AN} et AS-E_{XU,AN}.

Néanmoins, le maintien d'une absorption dans ces domaines pour les fractions non solubilisées de PS-A*_{XU,AN}, AS-E_{XU,AN} et AS-A_{XU,AN} doit être souligné. Ce résultat met en évidence que d'autres molécules que celles solubilisées par l'hydrolyse contribuent à ces régions. Les bandes encore identifiables dans la région spectrale allant de 1500 à 1800 cm⁻¹ montrent d'ailleurs que des composés protéiques-like et/ou humiques-like demeurent probablement encore agrégés.

Par ailleurs, l'effet extrême de l'hydrolyse à la soude sur le spectre ATR-FT-MIR de OHO_{XU,AN} doit être souligné. Il est cohérent avec la quantité de matière solubilisée (93%). En effet, la libération de la

quasi-totalité de la matière organique se traduit par la quasi-disparition des différentes bandes d'absorption caractéristiques de fonctions présentes dans des molécules organiques (C-H, O-H, N-H, C=C, C=O, N-H, P-O, Socrates (2004)). Le maintien d'une intense absorption au nombre d'onde 1020 cm^{-1} doit par ailleurs être remarqué. Compte tenu de la disparition de la majorité de la matière organique, elle confirme que des composés minéraux participent à l'absorption du rayonnement infrarouge dans cette région. En lien avec l'alimentation synthétique de cette matrice, la contribution probable de composés phosphates est privilégié à celle de composés de type silice. À l'échelle de l'agrégat, ce résultat souligne que la matière minérale d'origine cellulaire, notamment des ions phosphates, pourrait aussi contribuer à la stabilité de la structure, via des composés de nature chimique différente.

VI.5.3 Propriétés physico-chimiques des molécules réfractaires solubilisées

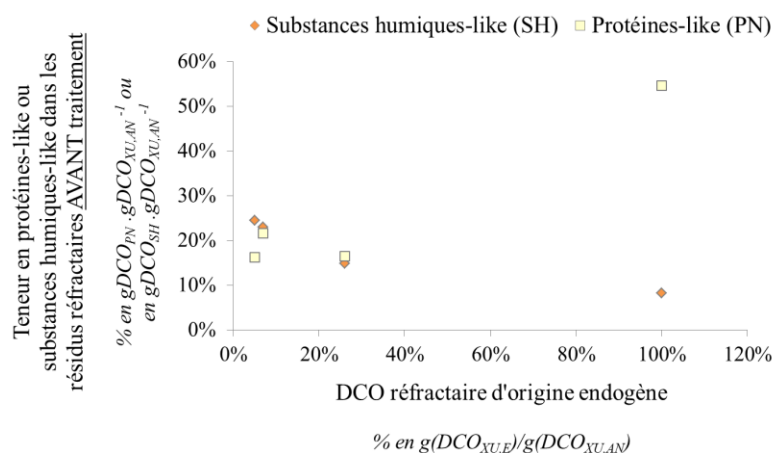
a. *Empreinte biochimique*

Les composés polysaccharides-like quantifiés par dosages colorimétriques constituent la famille de molécules la moins présente dans les fractions solubilisées, et ce indépendamment des particules réfractaires considérées. Cette famille de molécules ne contribue pas significativement à la fraction réfractaire d'une boue d'épuration.

Les composés protéiques-like et humiques-like représentent 63 à 68 % de la DCO solubilisée des quatre matrices traitées. Compte tenu des fonctions caractéristiques de ces deux familles de molécules, la diminution des bandes allant de 1500 à 1800 cm^{-1} est cohérente avec ce résultat. Néanmoins, une différence significative de leur proportion relative doit être remarquée. Celle-ci est calculée en rapportant la quantité de composés protéiques-like solubilisées à la quantité de composés humiques-like solubilisés. Ainsi, alors que ce ratio est compris entre 0,7 et 1,1 $\text{gDCO}_{\text{PN}}.\text{gDCO}_{\text{SH}}^{-1}$ pour les fractions solubilisées de PS-A*_{XU,AN}, AS-A_{XU,AN} et AS-E_{XU,AN}, il est de 6,6 $\text{gDCO}_{\text{PN}}.\text{gDCO}_{\text{SH}}^{-1}$ pour OHO_{XU,AN}. Ces caractéristiques mettent en évidence deux résultats majeurs :

- ⇒ les composés humiques-like et protéiques-like d'un résidu réfractaire ont une sensibilité similaire à la déconstruction alcaline, quelle que soit l'origine des boues avant digestion anaérobie ultime. Les deux hypothèses proposées précédemment pour AS-A_{XU,AN} peuvent à nouveau être suggérées : soit les deux familles de molécules sont intimement liées au sein de l'agrégat, et lors de l'hydrolyse elles sont libérées de manière concomitante et dans des proportions conservées, soit il s'agit de mêmes molécules, portant l'ensemble des fonctions mesurées. Nos résultats ne permettent pas d'y répondre et de préciser les mécanismes qui maintenaient agrégés les composés avant déconstruction.
- ⇒ les composés réfractaires endogènes (issus du métabolisme bactérien) sont significativement empreints de molécules protéiques-like. En effet, rapportée au potentiel solubilisé (93%), la

matrice $OHO_{XU,AN}$ est composée de 55% de protéines (en $gDCO_{PN} \cdot DCO_{OHO_{xu,an}}^{-1}$). Ainsi, à l'échelle d'un résidu réfractaire de boue, la fraction d'origine endogène va essentiellement contribuer à accumuler des composés de nature protéique dans la matrice réfractaire globale. Ainsi, même si des composés de type humiques-like sont produits par le métabolisme bactérien et demeurent réfractaires (8% en $gDCO_{SH} \cdot gDCO_{OHO_{xu,an}}^{-1}$), les composés humiques-like quantifiés au sein d'un résidu réfractaire de boue seront majoritairement d'origine exogène. D'ailleurs, la Figure VI.18 souligne que plus un résidu réfractaire a accumulé de composés endogènes (aérobie et anaérobie cumulés), plus sa teneur en composés humiques-like est faible.



$X_{U,E_{AE}}$: fraction organique réfractaire endogène produite en aérobie ; $X_{U,E_{AN}}$: fraction organique réfractaire endogène produite lors de la digestion anaérobie long terme ; $X_{U,E} = X_{U,E_{AE}} + X_{U,E_{AN}}$

Figure VI.18. Relation entre la teneur en composés d'origine endogène et la teneur en composés protéiques-like et humiques-like

Par ailleurs, si nos résultats montrent que l'origine des composés humiques-like est essentiellement exogène et que les résidus d'origine endogène vont contribuer à augmenter la part de protéines-like dans un résidu réfractaire de boue, la Figure VI.18 met aussi en évidence que des composés réfractaires protéiques ont aussi une origine exogène. En effet, la fraction réfractaire endogène des matrices $PS-A^*_{XU,AN}$, et $AS-E_{XU,AN}$ est respectivement de 5 et 7 % en $gDCO_{XU,E} \cdot gDCO_{XU,AN}^{-1}$. Or leurs teneurs en protéines-like analysées après déconstruction, respectivement de 17 et 22 % en $gDCO_{PN} \cdot gDCO_{XU,AN}^{-1}$, est nettement supérieure à leur fraction DCO endogène. Les composés réfractaires véhiculés par les eaux usées contribuent donc aussi à la fraction protéique réfractaire contenue dans une boue.

Enfin, les composés organiques solubilisés non quantifiés par les dosages biochimiques, notés « nd », correspondent à des molécules de nature chimique autre que protéique, humique ou polysaccharidique. Ils représentent 20 % de la DCO solubilisée de $OHO_{XU,AN}$ et entre 20 et 37% de la DCO solubilisée des résidus réfractaires de $PS-A^*_{XU,AN}$, $AS-A_{XU,AN}$ et $AS-E_{XU,AN}$. Ce résultat indique premièrement

que la chimie des composés n'est pas significativement modifiée puisque 63 à 80 % des molécules sont quantifiables. Par ailleurs, la teneur en composés non identifiés dans les matrices PS-A*_{XU,AN}, AS-A_{XU,AN} et AS-E_{XU,AN}, est significativement supérieure à la quantité de composés non identifiés d'origine endogène (au regard des 20 % dans OHO_{XU,AN} et de leur teneur en composés endogènes). Ainsi, l'origine de ces composés ni protéiques, ni humiques, ni polysaccharidiques est très probablement majoritairement d'origine exogène.

b. Empreinte en fluorescence 3D

L'ensemble des fractions solubilisées présentent un massif de fluorescence dans la zone VI attribuable à des composés aromatiques-like. Ce résultat met en évidence que les composés réfractaires à la biodégradation sont marqués par une chimie aromatique, indépendamment de leur origine. Concernant la matrice OHO_{XU,AN}, ce résultat vient conforter la présence de molécules de type humique-like dans la fraction solubilisée identifiée précédemment par les dosages biochimiques.

Les massifs de fluorescence présents dans les zones I, II et III sont attribuables à des composés protéiques. Il est intéressant de noter que toutes les fractions solubilisées présentent un massif intense dans la zone II. Les composés véhiculés dans une ERU correspondant partiellement à de la biomasse cellulaire (débris cellulaires et/ou cellules), la présence de composés protéiques exogènes et endogènes de nature chimique similaire n'est donc pas surprenante. Toutefois, les spectrogrammes des fractions solubilisées de résidus réfractaires contenant des composés d'origine exogène présentent des massifs de fluorescence supplémentaires (*la position de ces massifs est indiquée par des cercles en pointillés sur les spectres de fluorescence 3D présentés dans le Tableau VI.4*) :

- ⇒ AS-A_{XU,AN} → zone III,
- ⇒ PS-A*_{XU,AN} → zones I et III,
- ⇒ et AS-E_{XU,AN} → zone I.

L'absence de massifs dans les zones I et III pour la matrice OHO_{XU,AN}, dont 93% de la DCO a été solubilisée, indique que les composés qui fluorescent dans ces zones sont très probablement d'origine exogène. Ce résultat met donc en évidence que certaines molécules protéiques exogènes présentent des spécificités chimiques qui les différencient des composés protéiques d'origine bactérienne.

c. Taille et chimie des molécules après solubilisation

Les chromatogrammes des fractions solubilisées de PS-A*_{XU,AN}, AS-A_{XU,AN}, AS-E_{XU,AN} et OHO_{XU,AN}, sont présentés dans la Figure VI.19. Ils ont été mesurés en UV 210 et 280 nm et en FluoSH (345/443) après élution sur colonne Superdex 200 (gamme de travail : 10 000 à 600 000Da).

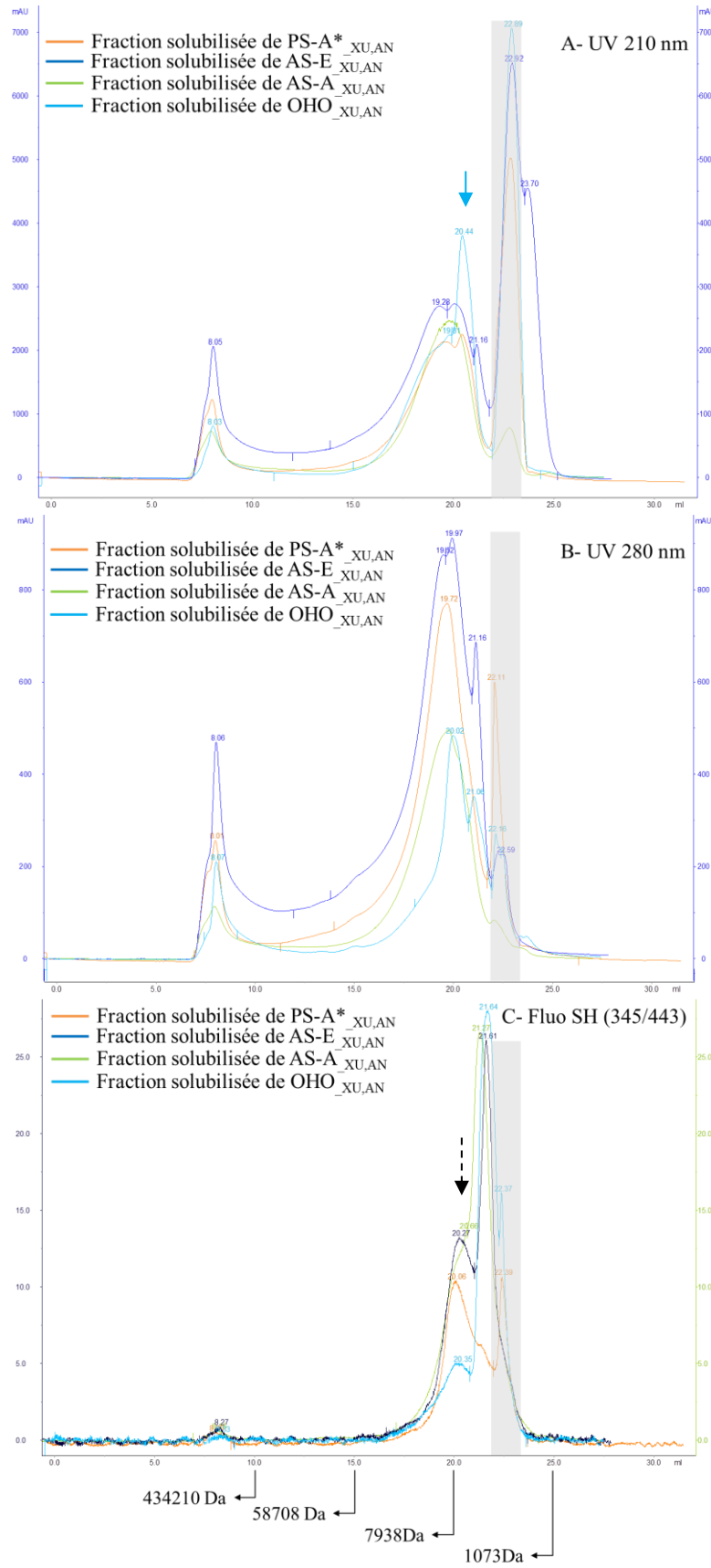
L'analyse en UV 210 permet de déterminer la répartition en termes de taille de l'ensemble des composés organiques présents dans les fractions solubilisées. La Figure VI.19-A révèle que les

molécules issues de l'hydrolyse thermo-alcaline des résidus PS-A*_{XU,AN}, AS-A_{XU,AN} et AS-E_{XU,AN} sont réparties selon deux gammes de poids moléculaires et dans des proportions quasi-identiques (calculées par rapport des aires d'absorbances) :

1. 85 % entre 4000 et 60 000 Da
2. 15% supérieurs à 600 000 Da (composés exclus de la colonne).

Les molécules organiques de OHO_{XU,AN} solubilisées ont une répartition légèrement différente avec seulement 7% exclue de la colonne. Le pic centré sur 20,44 ml (soit 6600 Da) (flèche bleue sur la Figure VI.19-A) indique par ailleurs la présence d'une proportion plus importante de composés de taille inférieure à 8000 Da que dans les autres fractions réfractaires solubilisées.

L'analyse en UV280 témoigne de la présence, sans distinction, de composés protéiques et humiques. La Figure VI.19-B met en évidence que ces deux familles de molécules sont *a priori* présentes sur l'ensemble des chromatogrammes des différentes fractions solubilisées. L'analyse en FluoSH est plus spécifique des composés humiques-like (chapitre Matériels et Méthodes). La Figure VI.19-C révèle alors une nette différence de répartition des molécules réfractaires humiques-like solubilisées. En effet, le signal de fluorescence est quasi-nul pour les composés organiques de plus de 600 000Da, exclus de la colonne. De plus, le temps de rétention du pic présent sur la partie « exploitable » du chromatogramme C est compris entre 20,07 et 20,35ml pour les quatre fractions (équivalents à 6900 et 7700 Da) (indiqué par une flèche en tirets). Les composés réfractaires humiques-like solubilisés correspondent donc majoritairement à des composés de faibles poids moléculaires contenus dans les solubilisats. Par ailleurs, la non dénaturation de la molécule témoin AH après hydrolyse thermo-alcaline (Figure VI.16) laisse penser que ces molécules étaient effectivement de faibles poids moléculaires avant déconstruction, et donc tel quel au sein de l'agrégat réfractaire. Enfin, l'absence de composés humiques-like dans la fraction de composés organiques aromatiques de taille supérieure à 600 000 Da, identifiés en UV280, montre que ces derniers correspondent majoritairement à des composés protéiques-like. La différence d'intensité en UV210 et en UV280 indique toutefois que d'autres composés y contribuent probablement (polysaccharides-like ? lipides ?).



encadré gris : zone d'interférences liées à NaOH retirée de l'interprétation

Figure VI.19. Chromatogrammes en UV 210 (A), UV280 (B) et FluoSH (C) des fractions solubilisées avec NaOH 0,1M, 2h à 95°C des matrices PS-A*_{XU,AN}, AS-E_{XU,AN}, AS-A_{XU,AN} et OHO_{XU,AN}

VI.5.3.1 Conclusion

Les résultats majeurs obtenus grâce à la déconstruction des agrégats réfractaires contrastés PS-A*_{XU,AN}, AS-A_{XU,AN}, AS-E_{XU,AN} et OHO_{XU,AN}, sont les suivants :

⇒ La forte sensibilité d'un agrégat réfractaire à la déconstruction thermo-alkaline (NaOH 0,1M, 2h à 95°C avec des ratios compris entre 0,5 à 5,5gNaOH.gDCO⁻¹) : potentiel de solubilisation de 57 à 71% sur des résidus de boues et de 93% sur une matrice réfractaire exclusivement d'origine bactérienne.

⇒ Le potentiel de solubilisation des composés réfractaires de type polysaccharidiques paraît similaire avec HCl ou NaOH alors que l'efficacité de solubilisation des composés protéiques-like et humiques-like est nettement supérieure en condition alcaline.

⇒ Des potentiels de solubilisation sur résidus réfractaires de boues du même ordre de grandeur que le potentiel de solubilisation maximal atteignable sur AS-A_{XU,AN} (65±3%), alors que potentiel de solubilisation de OHO_{XU,AN} est quasi-total (93%). Ce résultat pose d'ailleurs la question de l'origine et des mécanismes qui maintiennent ces composés agrégés après déconstruction.

⇒ Les composés de type humiques-like et protéiques-like contribuent majoritairement à la chimie des résidus réfractaires particuliers des boues d'épuration.

⇒ Les composés réfractaires issus du métabolisme bactérien sont majoritairement protéique (55% identifiés). À l'échelle d'un résidu réfractaire de boue, les résidus réfractaires d'origine cellulaire contribueront donc essentiellement à la fraction protéique réfractaire.

⇒ Une diversité de la nature chimique des composés protéiques essentiellement liée aux composés exogènes.

⇒ La capacité des microorganismes à synthétiser des molécules riches en noyaux aromatiques (autres que protéiques-like) qui ne sont en partie pas dégradées. À l'échelle d'un résidu réfractaire de boue, ces composés d'origine cellulaire contribueront donc à la fraction humique-like mais de manière minoritaire, l'essentiel demeurant d'origine exogène.

Concernant le rapprochement des empreintes spectrales de AS-A_{XU,AN} et OHO_{XU,AN} par opposition à celles de PS-A*_{XU,AN} et AS-E_{XU,AN} (identifié dans le chapitre 5), les analyses moléculaires globales mises en œuvre ne permettent pas de préciser avec certitude ce qui le justifie. Néanmoins, l'enrichissement de l'effluent en primaire en biomasse cellulaire exogène constaté après décantation primaire (Foladori et al., 2010, Spérandio et al., 2001) souligne que la contribution des composés d'origine cellulaire ne se réduit pas à la seule fraction dite endogène produite au niveau du traitement biologique. La similitude de la chimie entre AS-A_{XU,AN} et OHO_{XU,AN} est potentiellement liée à une forte contribution de composés réfractaires bactériens, d'origines exogène et endogène confondues.

VI.6 CONCLUSION GENERALE

La stratégie de caractérisation des agrégats réfractaires s'est structurée autour de deux approches expérimentales. La première est une analyse directe de l'agrégat sans dénaturation par spectrométrie infrarouge. L'empreinte chimique ainsi déterminée révèle des fonctions différenciantes liées à la proportion relative des molécules dites exogènes et endogènes mais ne permet pas d'accéder précisément à la nature des molécules. La deuxième approche a donc consisté à proposer une déconstruction de l'état agrégé des matrices réfractaires pour autoriser des analyses moléculaires conventionnelles (analyses biochimiques, séparation chromatographique, distribution de tailles moléculaires, spectrométrie de fluorescence 3D). Cette méthode de déconstruction fait l'objet de ce chapitre et a été appliquée aux différentes matrices réfractaires. Cette procédure de déconstruction devait répondre à 3 exigences : (1) libérer et solubiliser une proportion importante de molécules organiques pour que les analyses moléculaires subséquentes soient représentatives du contenu de l'agrégat ; (2) la compatibilité des conditions de mise en œuvre avec les analyses moléculaires et la spectrométrie infra-rouge (interférences, biais) ; (3) limiter la dénaturation physique et chimique de ces mêmes molécules pour conserver le plus d'informations possibles.

L'état agrégé résulte d'une multitude d'interactions moléculaires, supposées mais mal définies (hydrophobe, ionique, hydrogène...), qui confère à l'ensemble sa stabilité. Nos résultats confirment effectivement qu'une température inférieure à 95°C reste inefficace pour désassembler ces molécules. Notre stratégie de déconstruction a été imaginée à partir d'une compilation des travaux de la littérature proposant des techniques de solubilisation plus ou moins drastiques, et pour la plupart appliquées à des boues entières. Cette analyse a abouti au choix de l'hydrolyse chimique, acide ou alcaline, couplée à une température inférieure à 95 °C.

Cette méthode de déconstruction a donc été évaluée sur les 3 critères : rendement de solubilisation, compatibilité avec les techniques analytiques de caractérisation des solubilisats et des agrégats résiduels, et enfin dénaturation chimique et physique des molécules. Pour cela, il a fallu définir des objets d'étude pour mieux cerner l'impact d'une hydrolyse thermochimique. La complexité de ces agrégats a été prise en compte en choisissant une matière réfractaire agrégée dite modèle, incluant les deux sources, endogène et exogène, de molécules réfractaires (la matrice AS-A_{XU,AN}). Les actions dénaturantes ont été étudiées plus spécifiquement avec des molécules modèles : la BSA pour les protéines, un acide humique et une lignine (produits commerciaux) pour les polymères aromatiques.

L'attaque thermo-alcaline d'un agrégat est nettement plus efficace et moins sélective (nature des molécules libérées) que l'attaque thermo-acide, avec respectivement 69 % et 21 % de rendements de solubilisation (exprimés en % de DCO). Cette différence est liée à la solubilisation préférentielle des

protéines et des polymères aromatiques en condition alcaline. L'attaque thermo-alcaline permet de répondre à la première exigence.

Les conditions de cette hydrolyse ont aussi été optimisées vis-à-vis des interférences potentielles avec les techniques analytiques de caractérisation. Ces interférences sont liées à la soude, directement (pic parasite en chromatographie, modification de la sensibilité des dosages colorimétriques) ou indirectement (pic d'absorption des bicarbonates sur les empreintes spectrales). Au final, la méthode proposée (NaOH 0,1M, 2h à 95°C) permet de répondre à la deuxième exigence.

Les analyses globales (DCO, COT) et l'empreinte spectrale sur la matrice modèle ont montré que cette méthode de déconstruction n'engendrait pas de modification du degré d'oxydo-réduction de la matière organique et plus précisément n'impliquait pas l'apparition de nouvelles fonctions chimiques. À signaler que la méthode développée sur ATR-FT-MIR s'est avérée un outil de caractérisation pertinent pour évaluer les conséquences d'un traitement de solubilisation sur la chimie du solubilisé et de l'agrégat résiduel. Ainsi, la comparaison des empreintes a confirmé la solubilisation préférentielle des composés polysaccharidiques en condition acide.

Les actions dénaturantes potentielles ont été plus précisément mises en évidence en soumettant des molécules simples et isolées à la méthode de déconstruction (absence de l'effet matrice). La chimie de ces molécules semble conservée (spectrométrie de fluorescence 3D). Par contre, une protéine sera hydrolysée en polypeptides dont la taille varie de 1000 à 60000 Da (comparativement à la taille initiale de 85000 Da) alors que les polymères aromatiques (lignine et acide humique) conserveront leur taille native. Cette gamme de taille pour les polypeptides obtenus sur BSA est comparable à celle obtenue sur la matrice modèle (AS-A_{XU,AN}).

Au final, cette méthode de déconstruction a été appliquée à l'ensemble des matrices réfractaires et les solubilisats ont été analysés (SEC, fluorescence 3D, dosages biochimiques colorimétriques, spectrométrie ATR-FT-MIR). L'objectif était d'identifier à l'échelle moléculaire une différenciation constatée par l'empreinte infra-rouge associée aux proportions relatives des molécules dites exogènes et endogènes. D'une manière générale, la déconstruction de toutes les matrices converge vers des familles de molécules dont la distribution de taille est identique, que ce soit pour les protéines (ou polypeptides) ou les polymères aromatiques. Deux populations sont observées : 85 % de 4000 à 60000 Da, et 15 % > 600 000 Da (exclus de la colonne et molécules < 0,2 µm). La fluorescence indique que ces macromolécules sont en partie des macro-protéines ou des assemblages de protéines mais ne sont pas des polymères aromatiques. Il est possible que ces amas moléculaires aient « échappé » à l'attaque alcaline et aient conservé leur intégrité physique.

L'analyse du processus de déconstruction suggère que les polysaccharides sont libérés indépendamment des conditions d'hydrolyse et que les protéines et les polymères aromatiques sont

solubilisés de manière conjointe. Ceci laisse entendre que ces deux familles de molécules sont intimement liées dans la matrice réfractaire.

La rupture des structures primaires des protéines est une voie de déconstruction pertinente de l'agrégat, et de donc de libération de l'ensemble des molécules réfractaires le composant. Réalisée par voie chimique dans le cadre de ce travail, l'effet d'une déconstruction par traitement enzymatique via des protéases à spécificité croissante serait à évaluer. De la même manière, une attaque ciblée sur des structures aromatiques (par exemple avec l'ozone) pourrait être envisagée pour évaluer l'implication de ces molécules dans le mécanisme d'agrégation.

Un des résultats marquants est la solubilisation quasi-totale de la matrice réfractaire (93 % de la DCO traitée) composée exclusivement de molécules d'origine bactérienne (matrice OHO_{XU,AN}). La stabilité de la matrice réfractaire d'une boue est certainement fortement influencée par les interactions entre les molécules exogènes (provenant de l'eau) et les molécules endogènes. Les dosages biochimiques, qui caractérisent 80% de la DCO solubilisée de OHO_{XU,AN}, ont montré une prédominance des protéines. La faible proportion de polymères aromatiques bactériens démontre que cette famille de molécules, qui contribue significativement à la composition des résidus réfractaires des boues, est majoritairement constituée de molécules issues de l'eau usée. Par fluorescence 3D, on constate par ailleurs que la fraction protéique d'origine exogène tend à augmenter la diversité des molécules protéiques réfractaires. Au final, comme avec les empreintes infrarouges, la composition moléculaire (en termes de proportion respective de protéines et de polymères aromatiques) est très différente entre une matrice composée exclusivement de produits bactériens et une matrice constituée à la fois de ces molécules et de molécules constitutives de l'eau usée.

Cette technique de déconstruction rend accessible la majorité de la matière à une caractérisation moléculaire plus fine et ouvre la possibilité de tester d'autres techniques de caractérisation que celles utilisées dans ce travail. Reste qu'il nous paraît avant tout prioritaire de mesurer l'impact de cette déconstruction sur la biodisponibilité de ces molécules pour répondre à la question majeure posée par la récalcitrance de cette matière organique : bioaccessibilité ou chimie ?

VII .

Conclusions générales

et

perspectives

Les boues sont un sous-produit inévitable du traitement des eaux usées. Elles sont la conséquence d'un transfert partiel de polluants organiques et minéraux, initialement sous forme dissoute ou particulaire. Ces boues constituent donc un gisement de carbone et/ou d'énergie. Industriellement, une des voies de valorisation les plus exploitées est actuellement la digestion anaérobie de ces boues qui conduit à une transformation du carbone organique en méthane (Appels et al., 2010). Cependant, cette transformation n'est que partielle et ses performances sont très variables. La gamme de biodégradabilité des boues est très large et est *a priori* filière-dépendante (boue primaire, boue physico-chimique, boue biologique). Par conséquent, les performances du digesteur de boue seront directement impactées par la configuration de la filière eau et sa dynamique de fonctionnement (efficacité du décanteur primaire, stabilité de l'âge de boue). Ce constat a d'ailleurs motivé des travaux de recherche qui ont récemment abouti à des outils de prédiction de la biodégradabilité globale potentiellement utilisables dans un contexte d'exploitation (potentiel méthane : Lesteur et al. (2011), bioaccessibilité de la matière : Jimenez (2013)).

Au-delà de cette question de « variabilité », une proportion significative de la matière organique d'une boue reste définitivement récalcitrante à toute attaque biologique dans les conditions conventionnelles de culture. On parle de matière ou fraction réfractaire. L'état particulaire des boues est la plupart du temps considéré comme la cause principale de la limitation réactionnelle (hydrolyse de macromolécules). Sous couvert de ce postulat, de nombreux travaux, qui pour certains ont abouti à des procédés industriels de prétraitement ou de co-traitement, ont évalué des techniques de désintégration de ces agrégats (thermolyse, sonication, biodégradation aérobie thermophile...). Néanmoins, l'approche reste globale, de type boîte noire, et concerne la boue « entière » (à savoir la matière organique biodégradable et la matière organique réfractaire). Des effets marqués sont constatés en particulier sur la solubilisation de la matière organique. Toutefois, ils ne sont pas toujours en relation avec un gain de biodégradabilité. L'accélération de l'hydrolyse biologique des molécules initialement biodégradables est vérifiée et indiscutable. Cependant, l'amélioration de la biodisponibilité et de la biodégradabilité des molécules initialement réfractaires est encore sujette à caution, ou tout au moins aléatoire au vu des résultats présentés dans la littérature. La variabilité des performances est aussi à mettre en lien avec des réactions chimiques parasites identifiées pour certains traitements drastiques qui produisent des molécules inhibitrices et/ou réfractaires (condensation d'acides aminés et de sucres). Au final, la recherche permet aujourd'hui aux exploitants de disposer d'une large gamme de procédés de traitement ou de co-traitement, mais leurs performances sont encore discutables et certainement pénalisées par la qualité variable et filière-dépendante des boues.

Le constat est donc un manque de connaissances précises et exploitables sur cette fraction réfractaire qui est la clé des optimisations et des améliorations envisageables des performances des digesteurs de boues. Notre recherche s'est donc attachée à caractériser cette fraction réfractaire dans la perspective d'identifier les mécanismes à l'origine de sa récalcitrance. Cet objectif de compréhension répond à de

vrais enjeux industriels. Néanmoins, l'objet d'étude est complexe, complexe par sa physique, complexe par sa chimie. En effet, ces boues se présentent sous forme d'agrégats ou de floccs de tailles réduites (autour de 100 μm). Cet état physique résulte d'un processus de biofloculation basé sur une transformation de molécules organiques en bactéries et en exopolymères. Via des mécanismes physiques concomitants (adsorption, coagulation, interactions ioniques...), le floc concentre également d'autres molécules lentement ou difficilement assimilables, initialement présentes dans l'eau usée sous forme soluble, colloïdale ou encore particulaire (polymère aromatique, amas lipidiques, fibre cellulosique, protéines fibreuses). Le milieu exo-cellulaire intra-floc est, en effet, souvent assimilé à une structure de type gel (Neyens et al., 2004).

Le floc est donc un assemblage complexe et mal connu de cellules et de polymères rassemblés sous le terme EPS. Il est le siège des réactions et fixe les conditions environnementales affectant ces mêmes réactions. La dégradation des molécules par les micro-organismes engage des processus préalables dits d'hydrolyse. Ces processus sont assurés par des enzymes exocellulaires attachées ou non à la paroi externe d'une bactérie. Par conséquent, la compréhension du caractère réfractaire passe alors par une série de questions qui ont constitué le fil rouge de ce travail et qui sont autant d'axes d'investigations à l'échelle du floc :

- Le rôle de la filière d'épuration dans la « fabrication » du contenu réfractaire d'une boue ?
- La récalcitrance et la bioaccessibilité limitée des molécules organiques ?
- La récalcitrance et la chimie résistante des molécules organiques ?
- La récalcitrance et la diversité microbienne aérobie / anaérobie ?
- La récalcitrance et une défaillance de la diversité biologique hydrolytique ?

Pour cela, le travail de thèse a été structuré autour de 4 chapitres qui ont permis de fournir différents niveaux d'informations et de connaissances en termes de données, mécanismes, méthodologies et outils d'intérêt pour le secteur industriel et dont voici la synthèse.

La complexité structurale et chimique d'un floc biologique a nécessité le développement de méthodologies adaptées. C'est un des apports importants de ce travail.

Il a été nécessaire dans un premier temps de séparer la fraction biodégradable de la fraction réfractaire. Les résidus réfractaires ont été obtenus en condition anaérobie sans inoculum. Leurs propriétés n'ont pas été altérées par le test BMP. Cette méthode s'avère être une méthode « douce » d'isolement de la matière réfractaire par biogazéification des molécules biodégradables, intimement mélangées avec les molécules réfractaires. D'autres travaux antérieurs au laboratoire avaient également montré qu'il était possible de séparer sélectivement, et plus rapidement, les fractions biodégradables (solubilisat) et réfractaires (particulaire) par un test dit de solubilisation à 65°C. Cette dernière solution n'a pas été utilisée, car il était impératif d'éliminer complètement la fraction biodégradable.

La fraction réfractaire ainsi isolée se présente sous la forme d'une matrice insoluble et particulaire (85 %). La stratégie de caractérisation physicochimique de ces agrégats réfractaires s'est structurée autour des deux approches expérimentales complémentaires. La première approche a été gouvernée par l'intérêt de caractériser la chimie des molécules dans leurs états natifs, c'est-à-dire en conservant ces molécules associées les unes aux autres. Pour cela, nous avons développé une méthode reposant sur la spectrométrie en ATR-FT-MIR couplée à des outils statistiques d'analyse multi-variée (Classification Ascendante Hiérarchique et Analyse en Composantes Principales). Le choix s'est porté sur la spectrométrie infrarouge car c'est une technique sensible qui ne requiert l'ajout d'aucun réactif chimique pour sa mise en œuvre (aucun risque d'interférences) et qui renvoie une empreinte de la nature chimique globale de l'échantillon analysé. Les empreintes chimiques ainsi déterminées ont permis entre autre de révéler des fonctions différenciantes entre les boues. Néanmoins, cette méthode ne permet pas d'accéder précisément à la nature des molécules.

Une des perspectives serait d'intégrer dans cette procédure d'autres données telles que la teneur en DCO réfractaire des boues, l'âge de boue...

Une deuxième approche complémentaire a donc été développée basée sur une déconstruction maîtrisée des agrégats. Cette déconstruction est une attaque thermo-alkaline. Les conditions (NaOH à 0,1N, 2h, 95 °C) ont été définies pour respecter au mieux 3 exigences : (1) libérer et solubiliser une proportion importante des molécules organiques pour que les analyses moléculaires subséquentes soient représentatives du contenu de l'agrégat réfractaire (57 à 71 %) ; (2) la compatibilité des conditions de mise en œuvre avec les analyses moléculaires et la spectrométrie infrarouge (interférences, biais) ; (3) limiter la dénaturation physique et chimique de ces mêmes molécules pour conserver le plus d'informations possibles (conservation de la chimie, altération des protéines partiellement hydrolysées en polypeptides et conservation de l'intégrité physique des polymères aromatiques). Les solubilisats ainsi obtenus ont été caractérisés à travers des techniques conventionnelles : analyses biochimiques colorimétriques, séparation chromatographique par exclusion, distribution de tailles moléculaires, spectrométrie de fluorescence 3D. Cette technique de déconstruction rend accessible la majorité de la matière à une caractérisation moléculaire plus fine et ouvre la possibilité de tester des techniques de caractérisation autres que celles utilisées dans ce travail, qui permettraient en particulier une meilleure résolution de séparation par la taille et aussi par la chimie.

Cette méthode de déconstruction est perfectible également. Il serait intéressant de la compléter par des actions ciblées sur la matière résiduelle particulaire, au travers par exemple d'un traitement enzymatique avec des protéases commerciales, d'une attaque de la structure aromatique par ozonation, de la chélation des cations (EDTA).

Ces techniques de caractérisation disponibles, elles ont alors été utilisées pour mieux cerner dans un premier temps le caractère réfractaire des boues en relation avec la filière eau. Le critère était la

proportion et la diversité de la matière réfractaire dans la boue. Pour englober l'ensemble des configurations possibles, les boues analysées ont été prélevées sur des stations d'épurations ou « construites » à partir de pilotes de laboratoires aux conditions de fonctionnement contrôlées. Le lot de boues était constitué de boues primaires et de boues biologiques d'origines très contrastées (ERU brute, ERU décantée, eau synthétique, âge de boues entre 2 à 70 jours). Ces matières réfractaires obtenues expérimentalement sont un mélange complexe de molécules issues de l'eau usée et produites par les métabolismes aérobie et anaérobie. Au sens de la modélisation, ces molécules réfractaires sont rangées en deux compartiments, exogène et endogène, respectivement notés $X_{U,inf}$ et $X_{U,E}$. Ce fractionnement théorique basé sur le fractionnement de l'eau usée et du fonctionnement du procédé biologique a permis d'estimer la proportion de chaque famille de molécules de manière à aider et consolider l'interprétation des analyses de caractérisation des matières organiques réfractaires contenues dans les différentes boues.

Un des résultats marquants est la conservation des fractions réfractaires exogènes et endogènes quel que soit l'environnement métabolique aérobie ou anaérobie. En effet, les tests aérobies et anaérobies aboutissent à une DCO réfractaire identique pour une boue primaire contenant exclusivement la fraction exogène et une boue contenant exclusivement la fraction endogène aérobie. Ce résultat, en accord avec ceux d'Ekama et al. (2007) et Perez (2009), simplifie grandement la problématique et conforte la modélisation utilisée (absence de dégradation des fractions exogène et endogène aérobie en condition anaérobie) pour estimer chaque compartiment de la DCO réfractaire : DCO exogène, DCO endogène aérobie et DCO endogène anaérobie.

Toutes ces boues ont effectivement présenté des différences très marquées vis-à-vis de leur teneur en matière organique réfractaire (16 à 70 %) et de leur chimie. Par la méthode des empreintes infrarouges, il a été possible de clusteriser les boues et les résidus réfractaires qui présentaient une empreinte chimique globale proche, et d'identifier les régions spectrales qui contribuent spécifiquement à discriminer les matières réfractaires. Cette approche originale et nouvelle a mis en évidence que les fractions réfractaires exogène et endogène se distinguent globalement par leur chimie. Les analyses biochimiques suite à la déconstruction confirment une composition moléculaire (en termes de proportion respective en protéines et en polymères aromatiques) très différente entre une matrice composée exclusivement de produits bactériens et une matrice constituée à la fois de ces molécules et de molécules constitutives de l'eau usée. Les polymères aromatiques sont majoritairement constitués de molécules constitutives de l'eau usée. Le métabolisme produit essentiellement des protéines. Le métabolisme et l'eau usée contribuent à la diversité protéique réfractaire. Les molécules qui les composent sont de natures différentes. Ce résultat était attendu mais cette méthode permet de le mettre en évidence de manière robuste et relativement simple.

Cette méthode permet aussi de différencier la qualité de la fraction réfractaire d'une boue en fonction des proportions respectives des fractions réfractaires exogène et endogène. Ainsi, il a été possible d'identifier la présence significative de résidus cellulaires dans la composition de la fraction exogène,

rappelant que le réseau d'assainissement est déjà un réseau réacteur qui produit de la matière réfractaire à travers son activité bactérienne. Ces empreintes chimiques ont permis de distinguer les boues de l'étude, plus ou moins marquées par une fraction réfractaire exogène, en directe relation avec les conditions de fonctionnement de la station. Ainsi l'empreinte chimique des boues primaires est différenciable des empreintes de boues produites sur substrat totalement biodégradable ou sur eaux décantées. Cela suggère que le décanteur capte préférentiellement des molécules de type fibres (kératine, cellulose cristalline, ligne) observables au microscope. À l'inverse, l'eau décantée se charge en colloïdes dont l'empreinte chimique est proche d'un matériel cellulaire.

Cette méthode ouvre des perspectives d'application intéressantes même si celles-ci restent à valider. En effet, la spectrométrie en ATR-FT-MIR couplée à la CAH est facile et rapide à mettre en œuvre. L'empreinte chimique pourrait être un indicateur de qualité des boues produites sur une filière, et sa variabilité, estimée par CAH, un indicateur clé de fonctionnement des ouvrages: efficacité du décanteur primaire, taux de purge du procédé biologique qui affecte l'âge de boue.

Enfin, ces techniques de caractérisation nous ont permis d'émettre des hypothèses quant au processus de formation d'un floc et d'échafauder un modèle structurant gouverné par la bio-floculation.

Toutes les boues, quelle que soit leur chimie, présentent une matrice particulaire réfractaire. La distribution de taille de ces particules est identique pour tous les résidus, et similaire à la distribution de taille des flocs d'origine (c'est-à-dire contenant encore la fraction biodégradable). Cette conservation du diamètre apparent est observée même lorsque la proportion en matière organique biodégradable dans le floc atteint 80%. Cette structure est aussi très stable. Les interactions et les liaisons entre ces molécules résistent à un traitement thermique de 95 °C. Perez (2009) a montré que la matière organique biodégradable contenue dans un floc était quant à elle sensible à la température, puisqu'il était possible de solubiliser à 65 °C la majeure partie de la DCO biodégradable (80 %).

De plus, les empreintes infra-rouges et les analyses moléculaires montrent que ces matrices présentent des chimies différentes car elles contiennent une proportion variable (et fonction de la filière) de molécules réfractaires constitutives de l'eau usée. Ces molécules sont en particulier des polymères aromatiques. Malgré cette chimie différente, les propriétés de la matrice réfractaire résultante présente des propriétés physiques équivalentes (taille, stabilité). Le processus de floculation (à l'échelle de notre observation) n'est pas affecté par la proportion plus ou moins importante de ces molécules réfractaires exogènes.

Enfin, d'après nos résultats de déconstruction des matrices réfractaires, la rupture des structures primaires des protéines en polypeptides de taille variable (4000 à 60 000 Da) pourrait entraîner une libération massive de l'ensemble des molécules réfractaires le composant, en particulier les polymères aromatiques. La physico-chimie de ces derniers serait plus ou moins insensible à l'attaque alcaline. À noter que 15 % des molécules réfractaires ont été séparées sélectivement lors de la chromatographie

d'exclusion. Ces molécules sont des macromolécules ($> 600\,000$ Da) qui répondent positivement à la fluorescence spécifique des protéines et négativement à celles des acides humiques (aromatiques). Ces macromolécules pourraient se rapprocher des molécules dans leur état natif.

La déconstruction de la matrice réfractaire de la boue contenant exclusivement des cellules et des EPS a aussi permis de vérifier que les EPS impliqués dans le processus de biofloculation sont majoritairement des protéines.

Sur la base de tous ces éléments, il est possible de proposer un nouveau modèle structurant d'un floc. Ce modèle est basé donc sur un réseau « interne » qui s'apparente à un squelette. Sa formation serait gouvernée par le processus de biofloculation et de croissance cellulaire avec l'excrétion d'EPS (macro-protéines essentiellement). De par la colonisation des fibres et des particules en partie biodégradable, les molécules réfractaires particulières ou colloïdales de l'eau usée se retrouveraient alors piégées stériquement dans cette matrice et intimement associées aux EPS. Cet ensemble donnerait cette matrice réfractaire qui fut l'objet de ce travail. À noter que ce processus de biofloculation est rapide puisqu'observé dès l'âge de boue de 2 jours.

Il n'a pas été possible dans le cadre de ce travail de répondre à la question majeure posée par la récalcitrance de cette matière organique : bioaccessibilité ou chimie ? **La déconstruction massive des agrégats en macromolécules solubles dans l'eau permet de l'envisager désormais en réalisant des tests de biodégradabilité sur les solubilisats.** Nous rappelons uniquement que ces molécules demeurent réfractaires en aérobie ou anaérobie et que l'activité métabolique acidogène a été détectée et réactivée après 160 jours dans les matrices réfractaires (substrat glucose). Même s'il aurait été pertinent de tester aussi des polymères biodégradables, ce dernier résultat conforte l'idée que les enzymes indigènes sont inefficaces vis-à-vis de ce squelette.

Nous ne pouvions finir sans discuter des retombées pour le secteur industriel.

Le modèle structurant du floc légitime l'objectif de solubilisation de la plupart des procédés industriels de prétraitement cherchant à améliorer la biodégradabilité des boues (accélération de la cinétique d'hydrolyse). Néanmoins, la stabilité de la fraction particulaire réfractaire à une température de 95°C confirme que l'augmentation du potentiel de méthanisation passe par une mobilisation de cette fraction et requiert des traitements énergivores dont la pertinence nécessite de faire un bilan énergétique (gain net). Par conséquent, les performances des procédés industriels thermophiles ou hyperthermophiles ne pourront pas excéder le potentiel de méthane disponible en condition mésophile. C'est une certitude.

Les traitements énergivores devraient être raisonnés et ciblés sur la fraction réfractaire de la boue. Par conséquent, ils seraient plus appropriés en co-traitement (positionner sur une boucle de recirculation du digesteur) plutôt qu'en prétraitement. La proportion de DCO réfractaire dans la boue devrait aussi

être un critère d'optimisation. Ces traitements seraient plus appropriés sur des boues biologiques à fort âge de boue (> 15 jours), toujours sous couvert d'un bilan énergétique positif.

Au niveau de la filière (traitement de l'eau et digestion des boues), les fractions réfractaires exogène et endogène restent réfractaires en aérobie et en anaérobie. Par conséquent, l'optimisation de la conversion en méthane passe par une optimisation du décanteur primaire assisté par coagulation. La coagulation piège les colloïdes et permet de capturer proportionnellement davantage de matière biodégradable que réfractaire (fraction réfractaire : 30 % pour une boue primaire et 20 % pour cette même boue primaire coagulée). Il faut aussi préférer les procédés biologiques à faible âge de boue pour minimiser la production de matière réfractaire (12 % de la DCO biodégradable en aérobie). Cela suppose tout de même de trouver une alternative au traitement de l'azote (Anamox ?).

Enfin, en plus des perspectives industrielles déjà évoquées précédemment (indicateur de qualité de boue ou de fonctionnement de procédés), la méthode ATR-FT-MIR couplée à la CAH ou à l'ACP pourrait aussi constituer un outil de laboratoire utile dans des démarches prospectives pour aider à qualifier les cibles d'un traitement, orienter le traitement et pourquoi pas le doser.

VIII. Références bibliographiques

- Albers, Sonja-Verena, et Benjamin H. Meyer. 2011. « The Archaeal Cell Envelope ». *Nature Reviews Microbiology*. 9, n° 6, 414-426.
- Albrecht R., 2007, « Co-compostage de boues de station d'épuration et de déchets verts : nouvelle méthodologie du suivi des transformations de la matière organique », Thèse, Université de Cézanne, Aix-Marseille III
- Amir, Soumia, Mohamed Hafidi, George Merlina, Hassan Hamdi, et Jean-Claude Revel. 2004. « Elemental Analysis, FTIR and ¹³C-NMR of Humic Acids from Sewage Sludge Composting ». *Agronomie*, 24, n° 1, 13-18.
- Angelidaki, Irini, et Wendy Sanders. 2004. « Assessment of the Anaerobic Biodegradability of Macropollutants ». *Reviews in Environmental Science & Biotechnology*, 3, n° 2, 117-129.
- Appels, Lise, Jan Baeyens, Jan Degreë, et Raf Dewil. 2010. « Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge ». *Progress in Energy and Combustion Science* 34, n° 6 755-781.
- Appels, Lise, Jan Degreë, Bart Van der Bruggen, Jan Van Impe, et Raf Dewil. 2010. « Influence of low temperature thermal pre-treatment on sludge solubilisation, heavy metal release and anaerobic digestion ». *Bioresource Technology* 101, n° 15 5743-5748.
- Araujo, Luiz, Paula FC Catunda et Adrianus C van Haandel. 1998. « Biological sludge stabilisation Part 2: Influence of the composition of waste activated sludge on anaerobic stabilization », *Water SA*, 24 (3), 213-236.
- Astals, S., M. Esteban-Gutiérrez, T. Fernández-Arévalo, E. Aymerich, J. L. García-Heras, et J. Mata-Alvarez. 2013. « Anaerobic digestion of seven different sewage sludges: A biodegradability and modelling study ». *Water Research* 47, n° 16, 6033-6043.
- Bala Subramanian, S, S Yan, R D Tyagi, et R Y Surampalli. 2009. « Extracellular Polymeric Substances (EPS) Producing Bacterial Strains of Municipal Wastewater Sludge: Isolation, Molecular Identification, EPS Characterization and Performance for Sludge Settling and Dewatering ». *Water Research* 44, n° 7 2253-2266.
- Baril, E. 2011 « Quantification de l'influence de l'environnement sur la formation et la thermo-résistance des spores bactériennes ». Thèse.
- Bertrand, Dominique. 2005, « Etalonnage multidimensionnel : application aux données spectrales ». *Techniques de l'ingénieur*.
- Bing Xie, Jidong Gu. 2010. « Surface properties of bacteria from activated sludge in relation to bioflocculation. » *Journal of environmental sciences (China)* 22, n° 12, 1840-5.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., Sanders, W. T. M., Siegrist, H. and Vavilin, V. A. 2002, « Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) » IWA
- Bougrier C., Albasi C.. 2006. « Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability ». *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* n° 8, 711-718.
- Bougrier, C., J. P. Delgenès, et H. Carrère. 2007. « Impacts of thermal pre-treatments on the semi-continuous anaerobic digestion of waste activated sludge ». *Biochemical Engineering Journal* 34, n° 1, 20-27.
- Bougrier, C., J. P. Delgenès, et H. Carrère. 2008. « Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge samples solubilisation, physical properties and anaerobic digestion ». *Chemical Engineering Journal* 139, n° 2, 236-244.
- Bourven, Isabelle, Emmanuel Joussein, et Gilles Guibaud. 2011. « Characterisation of the mineral fraction in extracellular polymeric substances (EPS) from activated sludges extracted by eight different methods ». *Bioresource Technology* 102, n° 14, 7124-7130.
- Box, J. D. 1983. « Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters ». *Water Research* 17, n° 5, 511-525.
- Buffiere P., Loisel D, Bernet N, et Delgenes J. 2006. « Towards New Indicators for the Prediction of Solid Waste Anaerobic Digestion Properties », *Water Science & Technology* 53, n°8, 233-241.

- Buffiere, P., S. Frederic, B.Marty, et J.-P. Delgenes.2008. « A comprehensive method for organic matter characterization in solid wastes in view of assessing their anaerobic biodegradability ». *Water Science & Technology* 58, n° 9 1783-1788.
- Buffière P., Bayard R., Germain P. 2009. « Freins et Développements de la filière biogaz : Les besoins en recherche et Développement ». Rapport RECORD, INSA de Lyon.
- Burgess, J. E., et B. I. Pletschke. 2008. « Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: a mini-review ». *Water SA* 34, n° 3, 343-349.
- Cadore, A., A. Conrad, et J.-C. Block. 2002. « Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges ». *Enzyme and Microbial Technology* 31, n° 1-2, 179-186.
- Camacho, P, P Ginestet, et J-M Audic. 2005. « Understanding the Mechanisms of Thermal Disintegrating Treatment in the Reduction of Sludge Production ». *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 52, n° 10-11, 235-245.
- Carlsson, My, Anders Lagerkvist, et Fernando Morgan-Sagastume. 2012. « The Effects of Substrate Pre-Treatment on Anaerobic Digestion Systems: A Review ». *Waste Management (New York, N.Y.)* 32, n° 9, 1634-1650.
- Carrère, H., C. Dumas, A. Battimelli, D. J. Batstone, J. P. Delgenès, J. P. Steyer, et I. Ferrer. 2010. « Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review ». *Journal of Hazardous Materials* 183, n° 1-3, 1-15.
- Carrere, H., Y. Rafrafi, A. Battimelli, M. Torrijos, J. P. Delgenes, et C. Motte. 2012. « Improving methane production during the codigestion of waste-activated sludge and fatty wastewater: Impact of thermo-alkaline pretreatment on batch and semi-continuous processes ». *Chemical Engineering Journal* 210, 404-409.
- Chadwick, Dara T., Kevin P. McDonnell, Liam P. Brennan, Colette C. Fagan, et Colm D. Everard. 2014. « Evaluation of infrared techniques for the assessment of biomass and biofuel quality parameters and conversion technology processes: A review ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 30, 672-681.
- Chang, V.S., Holtzapple, M.T. 2000. « Fundamentals factors affecting biomass enzymatic reactivity ». *Applied Biochemistry and biotechnology*. 84-86, 5-37.
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J. A. and Booksh, K. 2003. « Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. ». *Environmental Science & Technology* 37 (24), 5701-5710.
- Chu, C. P., et D. J. Lee. 2004. « Structural analysis of sludge flocs ». *Advanced Powder Technology* 15, n° 5, 515-532.
- Compté S., Guibaud G., Baudu M., 2007. « Effect of extraction method on EPS from activated sludge : an HPSEC investigation », *Journal f hazardous materials*, 140, 129-137.
- Cuetos, M J, X Gómez, M Otero, et A Morán. 2010. « Anaerobic Digestion and Co-Digestion of Slaughterhouse Waste (SHW): Influence of Heat and Pressure Pre-Treatment in Biogas Yield ». *Waste Management (New York, N.Y.)* 30, n° 10, 1780-1789.
- Cuetos, María José, Xiomar Gómez, Marta Otero, et Antonio Morán. « Anaerobic Digestion of Solid Slaughterhouse Waste: Study of Biological Stabilization by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Thermogravimetry Combined with Mass Spectrometry ». *Biodegradation* 21, n° 4 (juillet 2010): 543-556. doi:10.1007/s10532-009-9322-7.
- D'Abzac P., Bordas F., Van Hullebusch E., Lens PNL, Guibaud G., 2010, « Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1589-1599
- Dalibart M., Servant L. 2000, « Spectroscopie dans l'infrarouge ». *Techniques de l'ingénieur*.
- Dignac, M. -F., V. Urbain, D. Rybacki, A. Bruchet, D. Snidaro, et P. Scribe.1998. « Chemical description of extracellular polymers: Implication on activated sludge floc structure ». *Water Science and Technology* 38, n° 8-9, 45-53.
- Dignac, M. -F, P Ginestet, D Rybacki, A Bruchet, V Urbain, et P Scribe. 2000. « Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: nature of residual organic matter ». *Water Research* 34, n° 17, 4185-4194.
- Dimock, R., et E. Morgenroth.2006. « The influence of particle size on microbial hydrolysis of protein particles in activated sludge ». *Water Research* 40, n° 10, 2064-2074.

- Dold, P. L., G. A. Ekama, et G. vr. Marais. 1981. « A GENERAL MODEL FOR THE ACTIVATED SLUDGE PROCESS ». *Water Pollution Research and Development*, 47-77.
- Dold, P.L., Ekama, G.A., Marais, G.V., 1980. « A general model for the activated sludge system process ». *Progress in Water Technology* 12, 47-77.
- Dold, Peter L. 2007. « Quantifying Sludge Production in Municipal Treatment Plants ». *Proceedings of the Water Environment Federation* 2007, n° 17, 1522-1549.
- Dreywood, Roman. 1946. « Qualitative Test for Carbohydrate Material ». *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* 18, n° 8, 499-499.
- Dumas, C., S. Perez, E. Paul, et X. Lefebvre. 2010. « Combined thermophilic aerobic process and conventional anaerobic digestion: Effect on sludge biodegradation and methane production ». *Bioresource Technology* 101, n° 8, 2629-2636.
- Ekama, G. A., P. L. Dold, et G. v R. Marais. 1986. « Procedures for Determining Influent COD Fractions and the Maximum Specific Growth Rate of Heterotrophs in Activated Sludge Systems », *Water Science and Technology*, 18, n°6, 91-114.
- Ekama, G. A., S. W. Sötemann, et M. C. Wentzel. 2007. « Biodegradability of activated sludge organics under anaerobic conditions ». *Water Research* 41, n° 1 244-252.
- Ekama, G.A, 2009. « Using bioprocess stoichiometry to build a plant-wide mass balance based steady-state WWTP model ». *Water Research* 43, n° 8 2101-2120.
- Elefsiniotis, Panagiotis, et William K. Oldham. 1994. « Influence of pH on the Acid-Phase Anaerobic Digestion of Primary Sludge ». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 60, n° 1, 89–96.
- Eriksson, Leif, Inga Steen, et Marta Tendaj. 2011. « Evaluation of Sludge Properties at an Activated Sludge Plant », *Water Science and Technology*, 25, n°6, 251-265.
- Eyheraguibel B., 2004. « Caractérisation des substances humiques biomimétiques : Effet sur les végétaux », *Thèse*, INP de Toulouse
- Filip, Z., et H. Claus. 2007. « Biochemical and Biological Characterization: Formation, Utilization, and Transformation of Some Refractory Organic Substances by Aquatic Microorganisms ». In *Refractory Organic Substances in the Environment*, 311–320.
- Flemming, Hans-Curt, et Jost Wingender. 2010. « The Biofilm Matrix ». *Nature Reviews Microbiology* 8, n° 9, 623-633.
- Foladori, P., L. Bruni, S. Tamburini, et G. Ziglio. 2010. « Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry ». *Water Research* 44, n° 13, 3807-3818.
- Francioso, Ornella, Maria Teresa Rodriguez-Estrada, Daniela Montecchio, Cesare Salomoni, Armando Caputo, et Domenico Palenzona. 2010. « Chemical characterization of municipal wastewater sludges produced by two-phase anaerobic digestion for biogas production ». *Journal of Hazardous Materials* 175, n° 1-3, 740-746.
- Frølund, B, T Griebé, et P H Nielsen. 1995. « Enzymatic Activity in the Activated-Sludge Flocc Matrix ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, n° 4, 755-761.
- Frølund, Bo, Rikke Palmgren, Kristian Keiding, et Per Halkjær Nielsen. 1996. « Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin ». *Water Research* 30, n° 8, 1749-1758.
- Gaillard, Stéphane, 2003. « Modélisation de la thermorésistance, de la viabilité et du comportement à la recroissance de *Bacillus cereus* ». *Thèse*.
- García Becerra, Flor Y., Edgar J. Acosta, et D. Grant Allen. 2010. « Alkaline extraction of wastewater activated sludge biosolids ». *Bioresource Technology* 101, n° 18, 6972-6980.
- Garnier, Christophe, Tatiana Görner, Bruno S Lartiges, Sandra Abdelouhab, et Philippe de Donato. 2005, « Characterization of Activated Sludge Exopolymers from Various Origins: A Combined Size-Exclusion Chromatography and Infrared Microscopy Study ». *Water Research* 39, n° 13, 3044-3054.
- Gavala, Hariklia N., Umur Yenal, Ioannis V. Skiadas, Peter Westermann, et Birgitte K. Ahring. 2003. « Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature ». *Water Research* 37, n° 19, 4561-4572.
- Gillot, S., et J.-M. Choubert. 2010. « Biodegradable organic matter in domestic wastewaters: comparison of selected fractionation techniques ». *Water Science and Technology*. 62, n° 3.
- Ginestet P, , Maisonnier A, et Sprandio M. 2002. « Wastewater COD Characterization: Biodegradability of Physico-Chemical Fractions », *Water Science and Technology*. 45, n°6, 89-95.

- Goel, Rajeev, Takashi Mino, Hiroyasu Satoh, et Tomonori Matsuo. 1998. « Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor ». *Water Research* 32, n° 7, 2081-2088.
- Goel R, Mino T, Satoh H, et Matsuo T. 1998. « Comparison of Hydrolytic Enzyme Systems in Pure Culture and Activated Sludge under Different Electron Acceptor Conditions », *Water Science and Technology*, 37, n°4-5, 335-343.
- Görner, Tatiana, Philippe de Donato, Marie Hélène Ameil, Emmanuelle Montarges-Pelletier, et Bruno S Lartiges. 2003. « Activated Sludge Exopolymers: Separation and Identification Using Size Exclusion Chromatography and Infrared Micro-Spectroscopy ». *Water Research* 37, n° 10, 2388-2393.
- Grube, M., J. G. Lin, P. H. Lee, et S. Kokorevicha. 2006. « Evaluation of sewage sludge-based compost by FT-IR spectroscopy ». *Geoderma* 130, n° 3-4, 324-333.
- Guan, Jing, T. David Waite, et Rose Amal. 1998. « Rapid Structure Characterization of Bacterial Aggregates ». *Environmental Science & Technology* 32, n° 23, 3735-3742.
- Guellil, A, M Boualam, H Quiquampoix, P Ginestet, J M Audic, et J C Block. 2001. « Hydrolysis of Wastewater Colloidal Organic Matter by Extracellular Enzymes Extracted from Activated Sludge Flocs ». *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 43, n° 6, 33-40.
- Gujer W., Henze M., Mino T. and van Loosdrecht M.C.M. 1999. « Activated Sludge Model No. 3 ». *Water Science and Technology*, 39(1), 183-193.
- Hall M., Bansal P., Lee J H, Realff M J, Bommarius A.S., 2010. « Cellulose crystallinity – a key predictor of the enzymatic hydrolysis rates », *FEBS Journal*, 277(6), 1571-1582.
- Henze M., Grady C.P.L., Gujer W., Marais G.V., Matsuo T., 1987 « *Activated sludge model No.1* » IAWPRC Scientific Report 1, IWAPRC, London
- Henze, M., 1992, « Characterization of Wastewater for Modelling of Activated Sludge Processes », *Water Science and Technology*, 25(6), 1-15.
- Higgins, Matthew J., et John T. Novak. 1997. « Characterization of Exocellular Protein and Its Role in Bioflocculation ». *Journal of Environmental Engineering* 123, n° 5, 479-485.
- Huang, Man-hong, Yong-mei Li, et Guo-wei Gu. 2010. « Chemical composition of organic matters in domestic wastewater ». *Desalination* 262, n° 1-3, 36-42.
- Jarde, Emilie, Laurence Mansuy, et Pierre Faure. 2003. « Characterization of the macromolecular organic content of sewage sludges by thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography–mass spectrometer (THM-GC/MS) ». *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 68-69, 331-350.
- Jimenez, Julie, Fabien Vedrenne, Cécile Denis, Alexis Mottet, Stephane Délérès, Jean-Philippe Steyer, et Jesús Andrés Cacho Rivero. 2013. « A statistical comparison of protein and carbohydrate characterisation methodology applied on sewage sludge samples ». *Water Research* 47, n° 5, 1751-1762.
- Jimenez, Julie, « Caractérisation de la matière organique par spectrofluorimétrie 3D pour la modélisation de la digestion anaérobie des boues issues de stations d'épuration », Thèse.
- Jones, R, W Parker, Z Khan, S Murthy, et M Rupke. 2008. « Characterization of Sludges for Predicting Anaerobic Digester Performance ». *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 57, n° 5, 721-726.
- Jorand F., F. Zartarian. 1995. « Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs ». *Water Research* n° 7, 1639-1647.
- Kandler, O, et H König. 1998. « Cell Wall Polymers in Archaea (Archaeobacteria) ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 54, n° 4, 305-308.
- Keiding, Kristian, et Per Halkjær Nielsen. 1997. « Desorption of organic macromolecules from activated sludge: Effect of ionic composition ». *Water Research* 31, n° 7, 1665-1672.
- Kögel-Knabner, Ingrid. 2002. « The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter ». *Soil Biology and Biochemistry* 34, n° 2, 139-162.
- Kumar, S, et R Nussinov. 2001. « How Do Thermophilic Proteins Deal with Heat? » *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 58, n° 9, 1216-1233.
- Lambert, S., Thill, A., Ginestet, P., Audic, J. M. and Bottero, J. Y. 2000. Structural interpretations of static light scattering patterns of fractal aggregates: I. Introduction of a mean optical index: numerical simulations. *J. of Colloid and Interface Sci.* 228, 379-385.

- Laspidou, Chrysi S., et Bruce E. Rittmann. 2002. « A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass ». *Water Research* 36, n° 11, 2711-2720.
- Lesteur, M., V. Bellon-Maurel, C. Gonzalez, E. Latrille, J. M. Roger, G. Junqua, et J. P. Steyer. 2010. « Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: A review ». *Process Biochemistry* 45, n° 4, 431-440.
- Lesteur, M., E. Latrille, V. Bellon Maurel, J. M. Roger, C. Gonzalez, G. Junqua, et J. P. Steyer. 2011. « First step towards a fast analytical method for the determination of Biochemical Methane Potential of solid wastes by near infrared spectroscopy ». *Bioresource Technology* 102, n° 3, 2280-2288.
- Levenspiel, Octave. *Chemical Reaction Engineering*. Wiley, 1972.
- Li, Yin, et Ryszard J. Chróst. 2006. « Microbial enzymatic activities in aerobic activated sludge model reactors ». *Enzyme and Microbial Technology* 39, n° 4, 568-572.
- Li, X Y, et S F Yang. 2007. « Influence of Loosely Bound Extracellular Polymeric Substances (EPS) on the Flocculation, Sedimentation and Dewaterability of Activated Sludge ». *Water Research* 41, n° 5, 1022-1030.
- Liss, Steven N., Ian G. Droppo, Derrick T. Flannigan, et Gary G. Leppard. 1966. « Floc Architecture in Wastewater and Natural Riverine Systems ». *Environmental Science & Technology* 30, n° 2, 680-686.
- McSwain, B. S., R. L. Irvine, M. Hausner, et P. A. Wilderer. 2005. « Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge ». *Applied and Environmental Microbiology* 71, n° 2, 1051-1057.
- Mahamid J., Sharir A., Addadi L., Weiner S. 2008. « Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase », *Proceedings of the National Academy of sciences of USA* 105, 35, 12748-12753.
- Mahmood, Talat, et Allan Elliott. 2006. « A Review of Secondary Sludge Reduction Technologies for the Pulp and Paper Industry ». *Water Research* 40, n° 11, 2093-2112.
- Marcato, C.-E., R. Mohtar, J.-C. Revel, P. Pouech, M. Hafidi, et M. Guisresse. 2009. « Impact of anaerobic digestion on organic matter quality in pig slurry ». *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, n° 3, 260-266.
- Martinez, F.O, Lema, J., Méndez, R., Cuervo-Lopez, F., 2004. « The role of exopolymeric protein on the settleability of nitrifying sludges ». *Bioresource and Technology*. 94, 43-48.
- Metcalf & Eddy, Tchobanoglous, George, Franklin L Burton, H. David Stensel, 2003. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*.
- Mikkelsen, L H, et P H Nielsen. 2001. « Quantification of the Bond Energy of Bacteria Attached to Activated Sludge Floc Surfaces ». *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 43, n° 6, 67-75.
- Miyabara, Y, J Suzuki, et S Suzuki. 1994. « Degradations of Urobilin and Stercobilin during Activated Sludge Treatment of Night Soil ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 84, n° 2, 105-109.
- Morgenroth, E, R Kommedal, et P Harremoës. 2002. « Processes and Modeling of Hydrolysis of Particulate Organic Matter in Aerobic Wastewater Treatment--a Review ». *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 45, n° 6, 25-40.
- Mottet, A., E. François, E. Latrille, J. P. Steyer, S. Déléris, F. Vedrenne, et H. Carrère. 2010. « Estimating anaerobic biodegradability indicators for waste activated sludge ». *Chemical Engineering Journal* 160, n° 2, 488-496.
- Mozo I., 2013, «Analyse expérimentale et modélisation d'un procédé à boues activées combiné aux ultrasons pour l'élimination des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HASP)s », *Thèse*, INSA Toulouse.
- Murthy, Sudhir N., et John T. Novak. 1999. « Factors Affecting Floc Properties During Aerobic Digestion: Implications for Dewatering ». *Water Environment Research* 71, n° 2, 197-202.
- Neyens, E., Baeyens, J., Dewil, R. and De heyder, B. 2004. « Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering. *J. of Hazard. Mat.* 106B: 83-92.
- Nguyen, Tan Phong, Nicholas P. Hankins, et Nidal Hilal. 2007. « A comparative study of the flocculation behaviour and final properties of synthetic and activated sludge in wastewater treatment ». *Desalination* 204, n° 1-3, 277-295.

- Nielsen, P. H., B. Frølund, et K. Keiding. 1996. « Changes in the Composition of Extracellular Polymeric Substances in Activated Sludge during Anaerobic Storage ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, n° 6, 823-830.
- Nielsen, Per Halkjær, et Kristian Keiding. 1998. « Disintegration of activated sludge flocs in presence of sulfide ». *Water Research* 32, n° 2, 313-320.
- Nielsen, PH, Jahn, A., 1999. « Extraction of EPS ». *Microbial extracellular polymeric substances: Characterization, structure and function*. Chapitre 3, 49-72.
- Novak, John T, Mary E Sadler, et Sudhir N Murthy. « Mechanisms of Floc Destruction during Anaerobic and Aerobic Digestion and the Effect on Conditioning and Dewatering of Biosolids ». *Water Research* 37, n° 13 (juillet 2003): 3136-3144. doi:10.1016/S0043-1354(03)00171-4.
- Orhon, Derin. 1997. *Modeling of Activated Sludge Systems*.
- Orhon, Derin, et Didem Okutman. 2003. « Respirometric assessment of residual organic matter for domestic sewage ». *Enzyme and Microbial Technology* 32, n° 5, 560-566.
- Ouatmane, A., Provenzano, Hafidi, M.R. M. et Senesi N.. 2000. « Compost Maturity Assessment Using Calorimetry, Spectroscopy and Chemical Analysis ». *Compost Science & Utilization* 8, n° 2, 124-134.
- Park, Chul, John T Novak, Richard F Helm, Young-Ock Ahn, et Asim Esen. 2008. « Evaluation of the Extracellular Proteins in Full-Scale Activated Sludges ». *Water Research* 42, n° 14, 3879-3889.
- Park, Chul, Richard F Helm, et John T Novak. 2008. « Investigating the Fate of Activated Sludge Extracellular Proteins in Sludge Digestion Using Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis ». *Water Environment Research: A Research Publication of the Water Environment Federation* 80, n° 12, 2219-2227.
- Parnaudeau, Virginie, et Marie-France Dignac. 2007. « The organic matter composition of various wastewater sludges and their neutral detergent fractions as revealed by pyrolysis-GC/MS ». *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 78, n° 1, 140-152.
- Paul, E., P. Camacho, M. Sperandio, et P. Ginestet. 2006. « Technical and Economical Evaluation of a Thermal, and Two Oxidative Techniques for the Reduction of Excess Sludge Production ». *Process Safety and Environmental Protection* 84, n° 4, 247-252.
- Paul, E., X. Lefebvre, M. Sperandio, D. Lefebvre, et Y. Liu. 2012. « Characterization of Municipal Wastewater and Sludge ». In *Biological Sludge Minimization and Biomaterials/Bioenergy Recovery Technologies*, 117-154.
- Perez Fabiel, S. 2009. *Etude de la biodégradabilité de boues secondaires soumises à un traitement thermique à 65°C et du couplage digestion anaérobie et digestion thermophile aérobie pour la réduction de boues*. Toulouse, INSA.
- Piccolo, A. 2002. « The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science », In *Advances in Agronomy* 75, 57-134.
- Polak, J., Bartoszek M., Sulkowski W.W., 2009 « Comparison of some spectroscopic and physico-chemical properties of humic acids extracted from sewage sludge and bottom sediments », 924-926, 309-312.
- Pons, Marie-Noëlle, Sébastien Le Bonté, et Olivier Potier. 2004. « Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterisation ». *Journal of Biotechnology* 113, n° 1-3, 211-230.
- Ramdani, A., P. Dold, A. Gadbois, S. Délérís, D. Houweling, et Y. Comeau. 2012. « Biodegradation of the endogenous residue of activated sludge in a membrane bioreactor with continuous or on-off aeration ». *Water Research* 46, n° 9, 2837-2850.
- Ramdani, A., P. Dold, A. Gadbois, S. Délérís, D. Houweling, et Y. Comeau. 2012. « Characterization of the heterotrophic biomass and the endogenous residue of activated sludge ». *Water Research* 46, n° 3, 653-668.
- Ramirez, I., A. Mottet, H. Carrère, S. Délérís, F. Vedrenne, et J.-P. Steyer. 2009. « Modified ADM1 disintegration/hydrolysis structures for modeling batch thermophilic anaerobic digestion of thermally pretreated waste activated sludge ». *Water Research* 43, n° 14, 3479-3492.
- Raposo, F., V. Fernández-Cegrí, M. A. De la Rubia, R. Borja, J. Beltrán, C. Cavinato, M. Clinckspoor, et al. 2010. « Quality improvement in determination of chemical oxygen demand in samples considered difficult to analyze, through participation in proficiency-testing schemes ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29, n° 9, 1082-1091.
- Ras M., 2008 « Analyse structurale et fonctionnelle des substances exopolymériques des bactéries impliquées dans le traitement des eaux usées ». *Thèse, LISBP*

- Ras M., Girbal-Neuhauser E., Paul E., et Lefebvre . 2008. « A high yield multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge ». *Bioresource Technology* 99, n° 16, 7464-7471.
- Réveillé, V., Mansuyb, L., Jardé E., Garnier-Sillama, 200, « Characterisation of sewage sludge-derived organic matter: lipids and humic acids ». *Organic Geochemistry*, 34, 615-627
- Roeleveld, P J, et M C M van Loosdrecht. 2002. « Experience with Guidelines for Wastewater Characterisation in The Netherlands ». *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 45, n° 6, 77-87.
- Salhi, Mostapha. 2003. *Procédés couplés boues activées - ozonation pour la réduction de la production de boues: étude, modélisation et intégration dans la filière de traitement de l'eau*, Thèse, INSA Toulouse.
- Salsabil, M. R., J. Laurent, M. Casellas, et C. Dagot. 2010. « Techno-economic evaluation of thermal treatment, ozonation and sonication for the reduction of wastewater biomass volume before aerobic or anaerobic digestion ». *Journal of Hazardous Materials* 174, n° 1-3, 323-333.
- Shen Q., Zhang T., Zhu M.F., 2008, « A comparison of the surface properties of lignin and sulfonated lignins by spectroscopy and wicking technique ». *Colloids and surfaces*, 320, 57-60
- Sheng, Guo-Ping, Han-Qing Yu, et Xiao-Yan Li. 2010. « Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review ». *Biotechnology Advances* 28, n° 6, 882-894.
- Sheng, Guo-Ping, Han-Qing Yu, et Xiao-Yan Li. 2006. « Stability of Sludge Flocs under Shear Conditions: Roles of Extracellular Polymeric Substances (EPS) ». *Biotechnology and Bioengineering* 93, n° 6, 1095-1102.
- Shon, Ho-Kyong, Seung-Hyun Kim, Laszlo Erdei, et Saravanamuthu Vigneswaran. 2006. « Analytical Methods of Size Distribution for Organic Matter in Water and Wastewater ». *Korean Journal of Chemical Engineering* 23, n° 4, 581-591.
- Smidt, Ena, et Katharina Meissl. 2007. « The applicability of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in waste management ». *Waste Management* 27, n° 2, 268-276.
- Smidt, E., K. Meissl, M. Schwanninger, et P. Lechner. 2008. « Classification of waste materials using Fourier transform infrared spectroscopy and soft independent modeling of class analogy ». *Waste Management* 28, n° 10, 1699-1710.
- Smidt, E., et V. Parravicini. 2009. « Effect of sewage sludge treatment and additional aerobic post-stabilization revealed by infrared spectroscopy and multivariate data analysis ». *Bioresource Technology* 100, n° 5, 1775-1780.
- Sobeck, David C, et Matthew J Higgins. 2002. « Examination of Three Theories for Mechanisms of Cation-Induced Bioflocculation ». *Water Research* 36, n° 3, 527-538.
- Socrates G., 2004. « Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts », 3rd Edition.
- Sophonsiri, Cholatee, et Eberhard Morgenroth. 2004. « Chemical Composition Associated with Different Particle Size Fractions in Municipal, Industrial, and Agricultural Wastewaters ». *Chemosphere* 55, n° 5, 691-703.
- Sötemann, S W, P van Rensburg, N E Ristow, M C Wentzel, R E Loewenthal, et G A Ekama. 2006. « Integrated Chemical, Physical and Biological Processes Modelling of Anaerobic Digestion of Sewage Sludge ». *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 54, n° 5, 109-117.
- Sperandio, M. 1998. « Développement d'une procédure de compartimentation d'une eau résiduaire urbaine et application à la modélisation dynamique de procédés à boues activées. Thèse, INSA de Toulouse.
- Spérandio M., et Paul E. 2000. « Estimation of wastewater biodegradable COD fractions by combining respirometric experiments in various So/Xo ratios ». *Water Research* 34, n° 4, 1233-1246.
- Spérandio, M, V Urbain, P Ginestet, MJ Audic, et E Paul. 2001. « Application of COD fractionation by a new combined technique: comparison of various wastewaters and sources of variability. » *Water Sci Technol* 43, n° 1, 181-190.
- Spérandio, M, M.-A. Labelle, A. Ramdani, A. Gadbois, E. Paul, Y. Comeau, et P. L. Dold. 2013. « Modelling the degradation of endogenous residue and 'unbiodegradable' influent organic suspended solids to predict sludge production ». *Water Science & Technology* 67, n° 4, 789-796.
- Sponza DT, 2002, « Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady and unsteady-state activated sludge systems.». *Process Biochemistry*. 37, n°9, 983-998.
- Stuart B.H., 2004. « Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications ».

- Takács, Imre, et Ernő Fleit. 1995. « Modelling of the micromorphology of the activated sludge floc: Low do, low F/M bulking ». *Water Science and Technology* 31, n° 2, 235-243.
- Van Loosdrecht, M, et Henze M. 1999. « Maintenance, Endogeneous Respiration, Lysis, Decay and Predation », *Water scient and Technology*, 9, n°1, 107-117.
- Vavilin, V. A., S. V. Rytov, et L. Ya. Lokshina. 1996. « A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter ». *Bioresource Technology* 56, n° 2-3, 229-237.
- Vavilin, V. A., B. Fernandez, J. Palatsi, et X. Flotats. 2008. « Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview ». *Waste Management* 28, n° 6, 939-951.
- Wang, Han-Tsung, et Jih-Tay Hsu. 2005. « Optimal protease production condition for *Prevotella ruminicola* 23 and characterization of its extracellular crude protease ». *Anaerobe* 11, n° 3, 155-162.
- Watson, S. D., T. Akhurst, C. G. Whiteley, P. D. Rose, et B. I. Pletschke. 2004. « Primary sludge floc degradation is accelerated under biosulphidogenic conditions: Enzymological aspects ». *Enzyme and Microbial Technology* 34, n° 6, 595-602.
- Wilén, B.-M., Bo J., et Paul L. 2003. « Impacts of structural characteristics on activated sludge floc stability ». *Water Research* 37, n° 15, 3632-3645.
- Wilén, B.-M., Bo J., et Paul L. 2003. « The Influence of Key Chemical Constituents in Activated Sludge on Surface and Flocculating Properties ». *Water Research* 37, n° 9, 2127-2139.
- Wilén, B.-M., D. Lumley, A. Mattsson, et T. Mino. 2008. « Relationship between Floc Composition and Flocculation and Settling Properties Studied at a Full Scale Activated Sludge Plant ». *Water Research* 42, n° 16, 4404-4418.
- Wilén, B.-M., M. Onuki, M. Hermansson, D.Lumley, et T. Mino. 2008. « Microbial Community Structure in Activated Sludge Floc Analysed by Fluorescence in Situ Hybridization and Its Relation to Floc Stability ». *Water Research* 42, n° 8-9, 2300-2308.
- Wilson, Christopher A., et John T. Novak. 2009. « Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment ». *Water Research* 43, n° 18, 4489-4498.
- Wingender J, Neu TR, Flemming HC., 1999. « What are bacterial extracellular polymeric substance ? ». *Microbial extracellular polymeric substances: Characterization, structure and function*. Chapitre 1, 1-18.
- Xu, Feng, Jianming Yu, Tesfaye Tesso, Floyd Dowell, et Donghai Wang. 2013. « Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review ». *Applied Energy* 104, 801-809.
- Yan, Sangtian, Kazuhiko Miyanaga, Xin-Hui Xing, et Yasunori Tanji. 2008. « Succession of bacterial community and enzymatic activities of activated sludge by heat-treatment for reduction of excess sludge ». *Biochemical Engineering Journal* 39, n° 3, 598-603.
- Yu, G.-H., P.-J. He, L.-M. Shao, et D.-J. Lee. 2007. « Enzyme Activities in Activated Sludge Flocs ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, n° 3, 605-612.
- Yu G.i, P. He, L. Shao, et D. Lee. 2008. « Extracellular Enzymes in Sludge Flocs Collected at 14 Full-Scale Wastewater Treatment Plants ». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 83, n° 12, 1717-1725.
- Zeaiter, M., J. -M. Roger, et V. Bellon-Maurel. 2005. « Robustness of models developed by multivariate calibration. Part II: The influence of pre-processing methods ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24, n° 5, 437-445.
- Zeaiter, M., J. -M. Roger, V. Bellon-Maurel, et D. N. Rutledge. 2004. « Robustness of models developed by multivariate calibration. Part I: The assessment of robustness ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 23, n° 2, 157-170.

IX . Annexes

IX.1 ANNEXE 1 : ÉCRITURE DES BILANS MATIÈRE EN RÉGIME PERMANENT

1. Calcul de PX_{OHO}

Pour la croissance cellulaire, les bilans matières pour les fractions X_{OHO} et S_B s'écrivent de la manière suivante :

$$\frac{V * dX_{OHO}}{dt} = V * r_H - PX_{OHO} = 0 \text{ où } r_H = (\mu_H - b_H) * X_{OHO} = \mu_{H,obs} * X_{OHO}$$

$$\frac{V * dS_B}{dt} = V * r_S + Q_{inf} * (1 - f_{US} - f_{UX}) * DCO_{tot,inf} = 0$$

Par définition, $r_H = Y_{H,obs} * r_S$. En régime permanent, le terme d'accumulation vaut zéro. La production de biomasse cellulaire peut donc s'écrire :

$$PX_{OHO} = Y_{H,obs} * Q_{inf} * (1 - f_{US} - f_{UX}) * DCO_{tot,inf} \text{ avec } Y_{H,obs} = \frac{Y_H}{1 + b_H * \theta_{b-AE}}$$

2. Calcul de $PX_{U,E-AE}$

$$\frac{V * dX_{U,E-AE}}{dt} = V * b_H * f_{AE} * X_{OHO} - PX_{U,E-AE}$$

En régime permanent, $\frac{V * dX_{U,E-AE}}{dt} = 0$ et on peut écrire :

$$PX_{U,E-AE} = V * b_H * f_{AE} * X_{OHO}$$

Par définition $\theta_{b-AE} = \frac{V * X_{OHO}}{PX_{OHO}}$, la production de résidu réfractaire endogène peut donc

s'écrire :

$$PX_{U,E-AE} = b_H * f_{AE} * \theta_{b-AE} * Y_{H,obs} * Q_{inf} * (1 - f_{US} - f_{UX}) * DCO_{tot,inf}$$

3. Calcul de $PX_{U,inf}$

$$\frac{V * dX_{U,inf}}{dt} = Q_{inf} * f_{UX} * DCO_{tot,inf} - PX_{U,inf}$$

En régime permanent, $\frac{V * dX_{U,inf}}{dt} = 0$ et on peut écrire :

$$PX_{U,inf} = Q_{inf} * f_{UX} * DCO_{tot,inf}$$

IX.2 ANNEXE 2 : SPECTRE ATR-FT-MIR DE LA BOUE PRIMAIRE PS-A*

Le chapitre 5 a clairement mis en évidence que l'attribution moléculaire des bandes d'absorption identifiées sur une empreinte ATR-FT-MIR est difficilement envisageable dans le cas d'échantillons tels que des particules de boues et/ou de réfractaires. Néanmoins, pour identifier la contribution qualitative de composés d'origine cellulaire à la fraction décantable de l'ERU de la STEP A, l'analyse relative du spectre ATR-FT-MIR de la boue primaire (PS-A*) avec ceux de composés organiques isolés pouvant contribuer à sa composition est ici discutée. La Figure IX.1 présente ainsi les spectres ATR-FT-MIR de la boue PS-A*, des deux boues biologiques, AS-B et AS-E, alimentées avec cette même boue primaire et d'âge de boues respectifs 2 et 5 jours, de la cellulose, la paille (matériau ligno-cellulosique), d'une protéine (BSA) et de la matrice OHO (exclusivement composé de biomasse cellulaire).

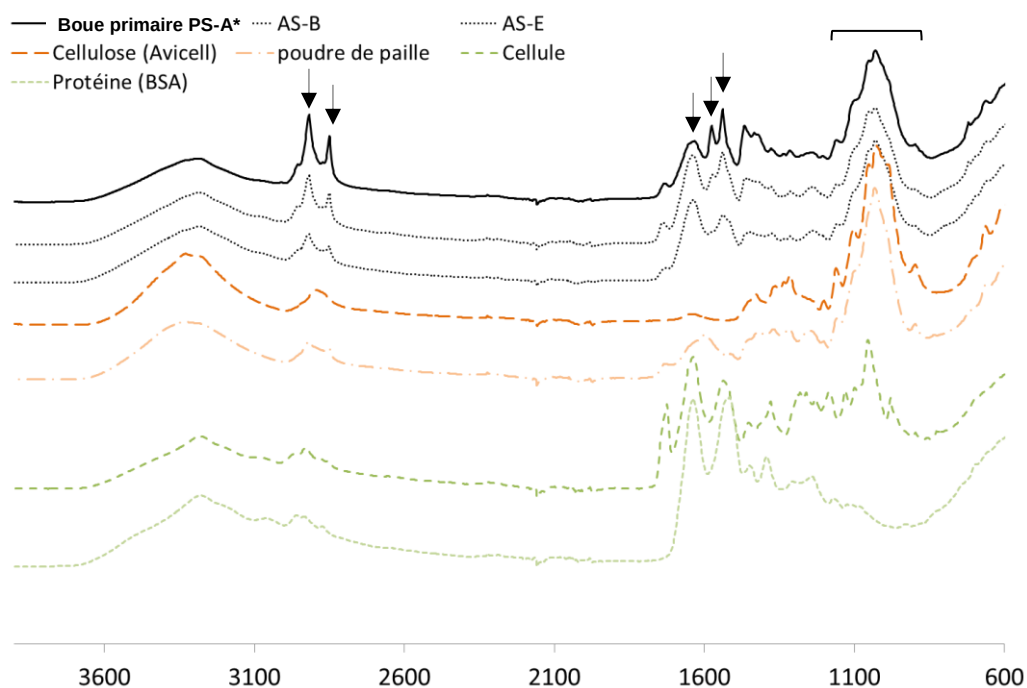


Figure IX.1. Analyse de la composition d'une boue primaire par comparaison de son spectre ATR-FT-MIR à ceux de molécules organiques isolées et de boues biologiques alimentées par cette boue primaire

L'analyse relative de l'empreinte spectrale de la boue primaire avec des composés organiques isolés donne des informations qualitatives cohérentes avec la présence de composés identifiés dans la littérature :

- De fortes intensités d'absorption aux nombres d'onde 2920 et 2850 cm^{-1} , caractéristiques des liaisons C-H aliphatiques, sont mesurées pour la boue primaire. Même si aucune mesure des composés lipidiques n'a été réalisée, leur forte proportion dans la boue se traduit par de fortes

intensités d'absorption de ces deux bandes d'absorption. Ainsi, ces deux pics ne sont pas seulement dus à la contribution des différents composés organiques présents mais bien à la présence de composés graisseux dans une boue primaire. (Metcalf et Eddy, 2003).

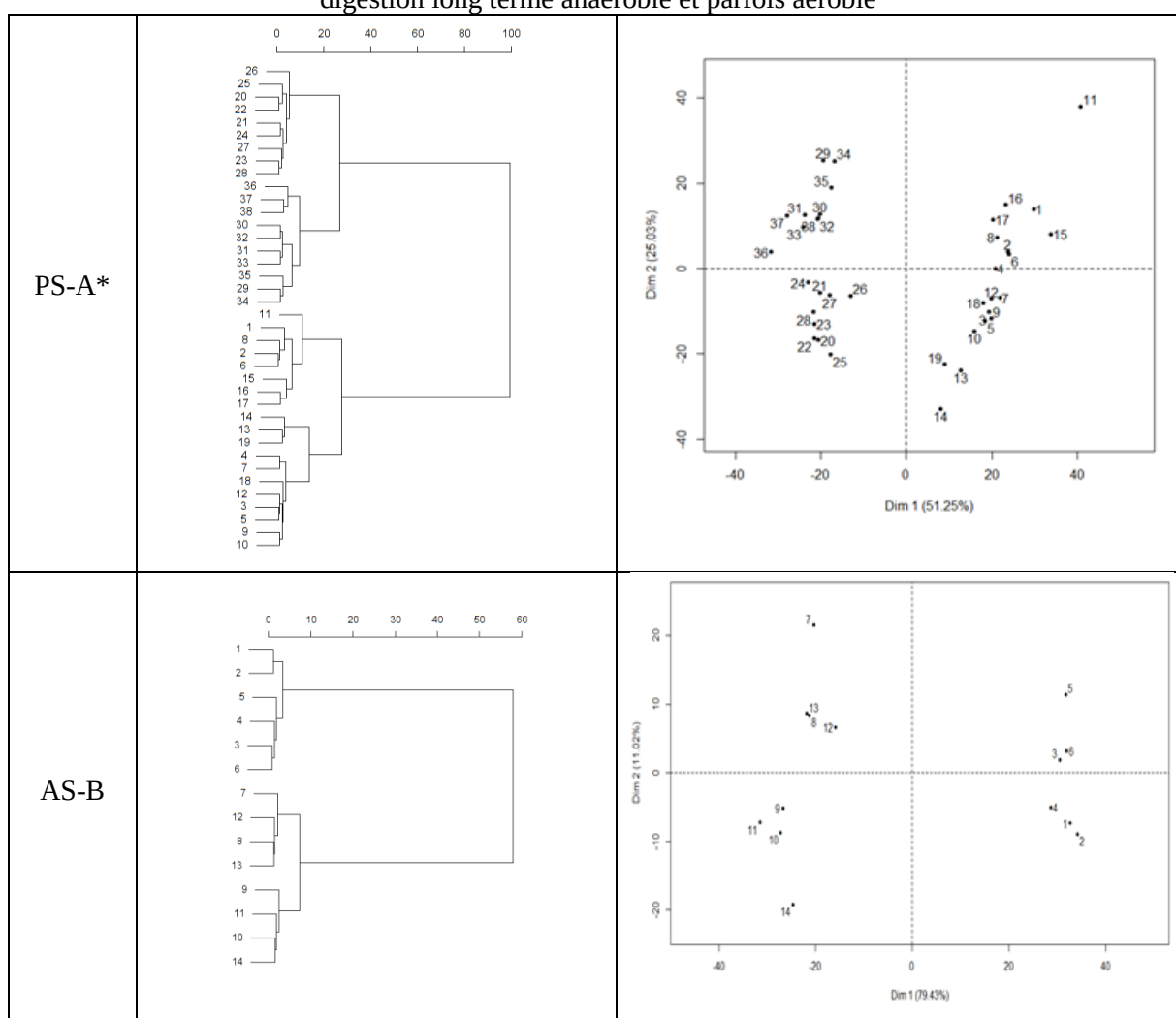
- Le profil de l'empreinte spectrale dans la région allant de 900 à 1200 cm^{-1} (indiqué par l'accolade) est marqué majoritairement par l'absorbance des liaisons chimiques C-O impliquées dans une fonction ester ou alcool. L'analyse relative avec d'autres échantillons montre une nette similitude de l'empreinte infrarouge de la boue primaire avec celle de la cellulose isolée ou associée à d'autres molécules organiques (spectre ATR-FT-MIR de la poudre de paille, matériau ligno-cellulosique). Ce résultat est cohérent avec la forte teneur en fibres caractéristiques de ce type de boue d'épuration (Figure III.6).
- Le spectre présente trois pics intenses dans le domaine spectral allant de 1450 à 1650 cm^{-1} : 1539, 1575, 1632 cm^{-1} . Compte tenu des liaisons susceptibles d'absorber dans cette région, il est fortement probable que ces pics correspondent aux composés protéiques et aromatiques (fibres) contenus dans les composés décantables véhiculés par les eaux usées. Il est intéressant de remarquer que le pic à 1575 cm^{-1} tend à disparaître dans le spectre des boues biologiques alimentées par cette boue primaire alors que celui à 1539 cm^{-1} s'élargit, et ce, de manière croissante avec l'âge de boue : plus l'âge de boue augmente, plus la modification des intensités d'absorption des pics à 1575 et 1539 cm^{-1} s'intensifie. L'échantillon exclusivement composé de biomasse cellulaire (« cellule ») présente deux bandes d'absorptions intenses centrées sur 1630 et 1537 cm^{-1} . Il est possible d'attribuer la modification de l'empreinte de la boue primaire lors de son passage par un traitement biologique (AS-B et AS-E) à la biodégradation des composés biodégradables et/ou à la croissance des microorganismes actifs dont la chimie va alors marquer davantage l'empreinte chimique de la fraction particulaire.

De manière globale, l'analyse ATR-FT-MIR de boue primaire renvoie une empreinte chimique en accord avec les principaux composants de cette matrice biologique. Ainsi, même si l'attribution des différentes bandes d'absorption ne peut être établie avec certitude, cette analyse laisse penser que la chimie de la fraction décantable de l'ERU de la STEP A est significativement impactée par la chimie de résidus ligno-cellulosiques et peu par la chimie de composés cellulaires.

IX.3 ANNEXE 3 : RESULTATS ACP ET CAH AVANT/APRES POUR CHAQUE MATRICE BIOLOGIQUE

Des analyses en composantes principales ont été réalisées pour comparer la nature chimique des particules avant et après digestion anaérobie long terme (BMP > 120 jours). L'objectif est de savoir si les domaines qui permettent la distinction entre la nature chimique d'un substrat de digestion anaérobie et de son résidu réfractaire anaérobie sont équivalents et ce, indépendamment de l'origine des boues. Les résultats des ACP et CAH réalisées pour chaque boue sont présentés dans le Tableau IX.1.

Tableau IX.1. Tableau récapitulatif des résultats de classification ascendante hiérarchique (colonne de droite) et d'analyse en composantes principales (colonne de gauche) de particules avant et après digestion long terme anaérobie et parfois aérobie

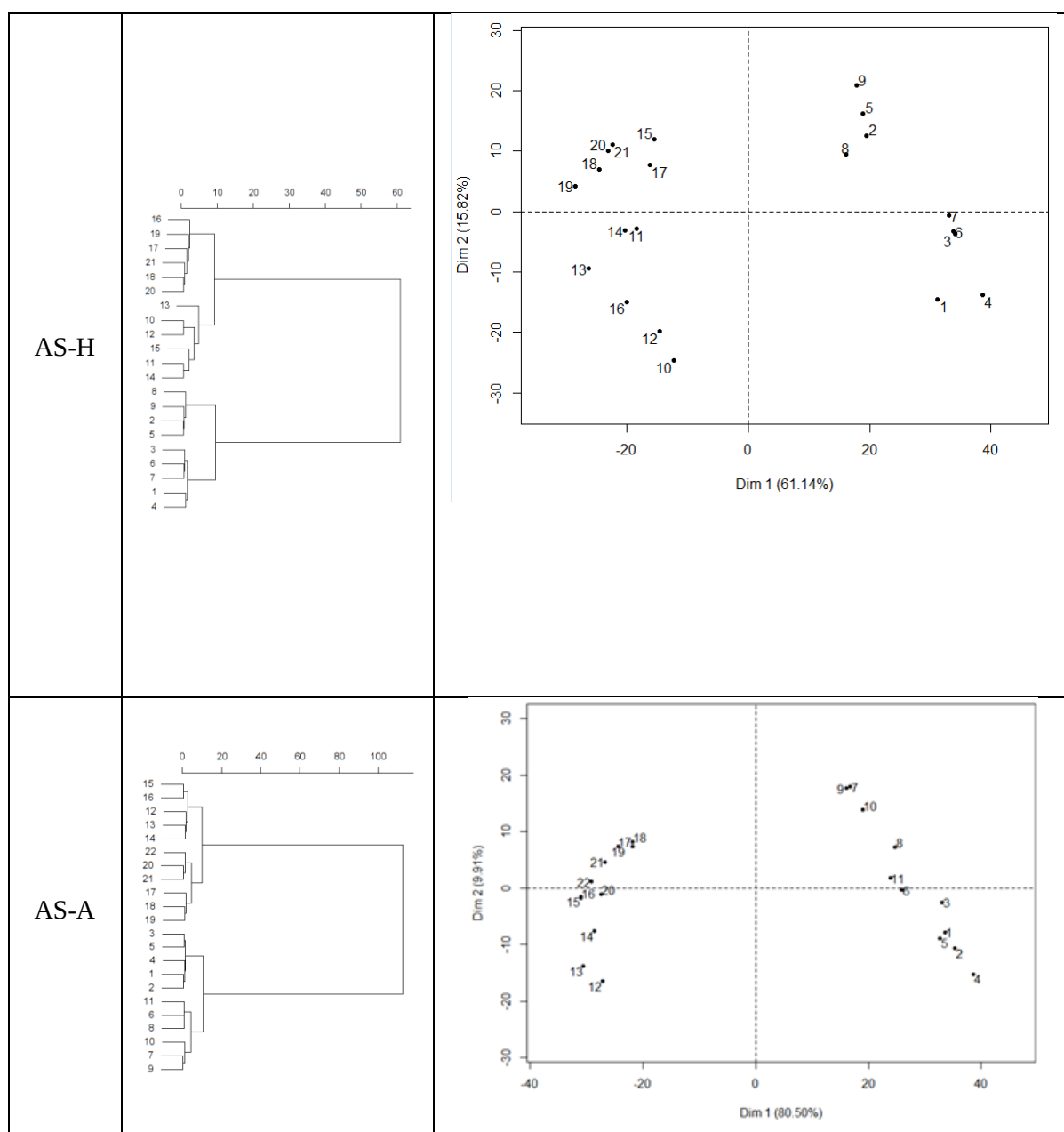


Nomenclature des individus statistiques (empreintes IR) représentés sur les plans factoriels (1 ; 2) :

PS-A* : 1 à 13 : Spectres ATR-FT-MIR de PS-A* et de 14 à 19 d'un autre échantillon de PS-A* décongelé ; 20 à 28 : Spectres ATR-FT-MIR de PS-A*_{U,AN} ; de 29 à 38 : Spectres ATR-FT-MIR de PS-A*_{U,AE}

AS-B : 1 à 6 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-B ; 7 à 14 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-B_{U,AN}

Tableau IX.4. (suite)



Nomenclature des individus statistiques (empreintes IR) représentés sur les plans factoriels (1 ; 2) :

AS-H : 1 à 9 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-H ; 10 à 15 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-H_{U,AE} ; de 16 à 21 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-H_{U,AN}

AS-A : 1 à 11 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-A ; 12 à 16 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-A_{U,AE} ; 17 à 22 : Spectres ATR-FT-MIR de AS-A_{U,AN}.

Le principal résultat est que, quel que soit le type de boue, la chimie des résidus réfractaires est toujours significativement différente de celles des matrices avant biodégradation long terme. L'analyse du cercle de corrélation des variables d'origine (nombre d'onde incident) avec la 1ère composante principale selon laquelle les empreintes chimiques avant et après biodégradation sont le plus différenciées est récapitulée dans le Tableau IX.2.

Tableau IX.2. Tableau récapitulatif de l'analyse du cercle de corrélation entre les variables d'origine (nombre d'onde) et la composante principale Dim1 différenciant l'empreinte chimique de particules avant et après digestion long terme

Boues avant digestion long terme	Zones du spectre ATR-FT-IR	Contribution significative à la composante principale Dim1 (coord>0,7)			
		Dim1 <0 (réfractaires)		Dim>0 (avant digestion)	
		$0,7 < \cos^2 < 0,86$	$0,86 < \cos^2$	$0,7 < \cos^2 < 0,86$	$0,86 < \cos^2$
PS-A	400-900	416-453 752-900	399-415	652-677	
	900-1300	900-955		1271-1282	1284-1300
	1300-1470			1379-1383 1400-1410	1300-1377 1412-1470
	1470-1800			1535-1544 1568-1574 1579-1583	1470-1481 1575-1577
	2750-3200	3022-3068		2827-2831 2943-2960	2833-2940
AS-B	400-900	455-467 742-756		681-704 717-721	582-594 605-679
	900-1300	1022-1045	1068-1097 1117-1140		1153-1300
	1300-1470				1300-1470
	1470-1800	1761-1798		1592-1614 1697-1699	1470-1591 1616-1695 1726-1749
	2750-3200	2805-2815 2983-2993 3039-3118	2752-2804 2995-3038	2944-2964	2840-2942
AS-A	400-900	777-804	399-775	848-870 877-889	
	900-1300			1076-1088 1107-1117 1124-1162	1118-1122 1163-1300
	1300-1470				1300-1470
	1470-1800			1614-1624	1470-1612 1626-1750
	2750-3200	3082-3200		2935-2970	
AS-H	400-900	522-546 576-594 598-605	547-575 596	858-868 897-900	870-895
	900-1300	1003-1037		900-908 1126-1132	1134-1300
	1300-1470			1398-1419 1423-1437	1300-1396 1439-1470
	1470-1800	1757-1800			1470-1708
	2750-3200	2752-2798 2985-3149			

IX.4 ANNEXE 4 : COMPARAISON DES INTENSITES D'ABSORPTION A 2851 ET 2922 CM⁻¹

Les intensités d'absorbance à 2851 et 2922 cm⁻¹ évoluent simultanément. Cette caractéristique est mise en évidence par la conservation du ratio des intensités (I_{2922}/I_{2851}) représentée sur la Figure IX.2 pour l'ensemble des spectres analysés (boues et réfractaires anaérobies). Sa valeur est de $1,35 \pm 0,06$ sur.

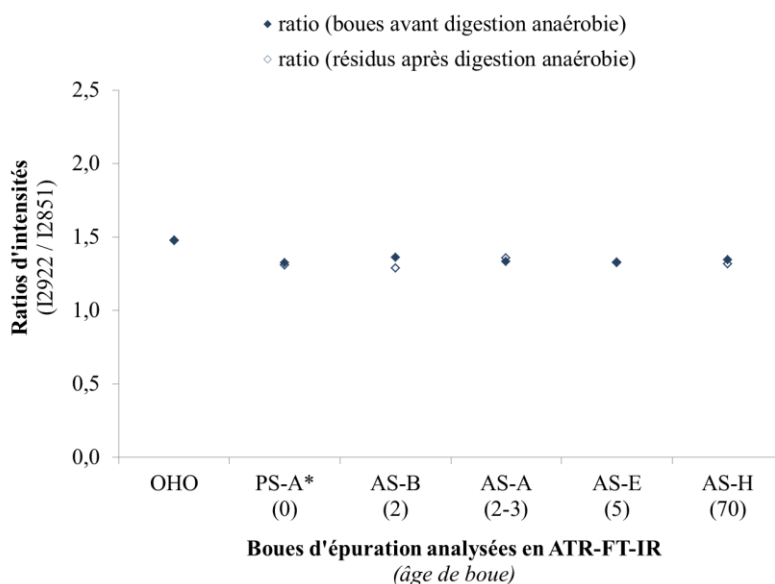


Figure IX.2. Ratios d'intensité d'absorption, I_{2922}/I_{2851} , pour l'ensemble des matrices avant et après digestion anaérobie long terme

IX.5 ANNEXE 5 : SPECTRES PARTICULIERS EN MOYEN INFRAROUGE

IX.5.1 Bandes caractéristiques de la liaison C=O des carbonates accumulés en milieu alcalin

La Figure IX.3 présente les spectres ATR-FT-MIR de l'ensemble des fractions solubilisées et non solubilisées de AS-A_{XU,AN} ainsi que celui du carbonate de sodium. Leur analyse relative permet d'illustrer l'attribution des bandes à **1420 et 880 cm⁻¹** aux ions carbonates, dont la présence est constatée après traitement à la soude.

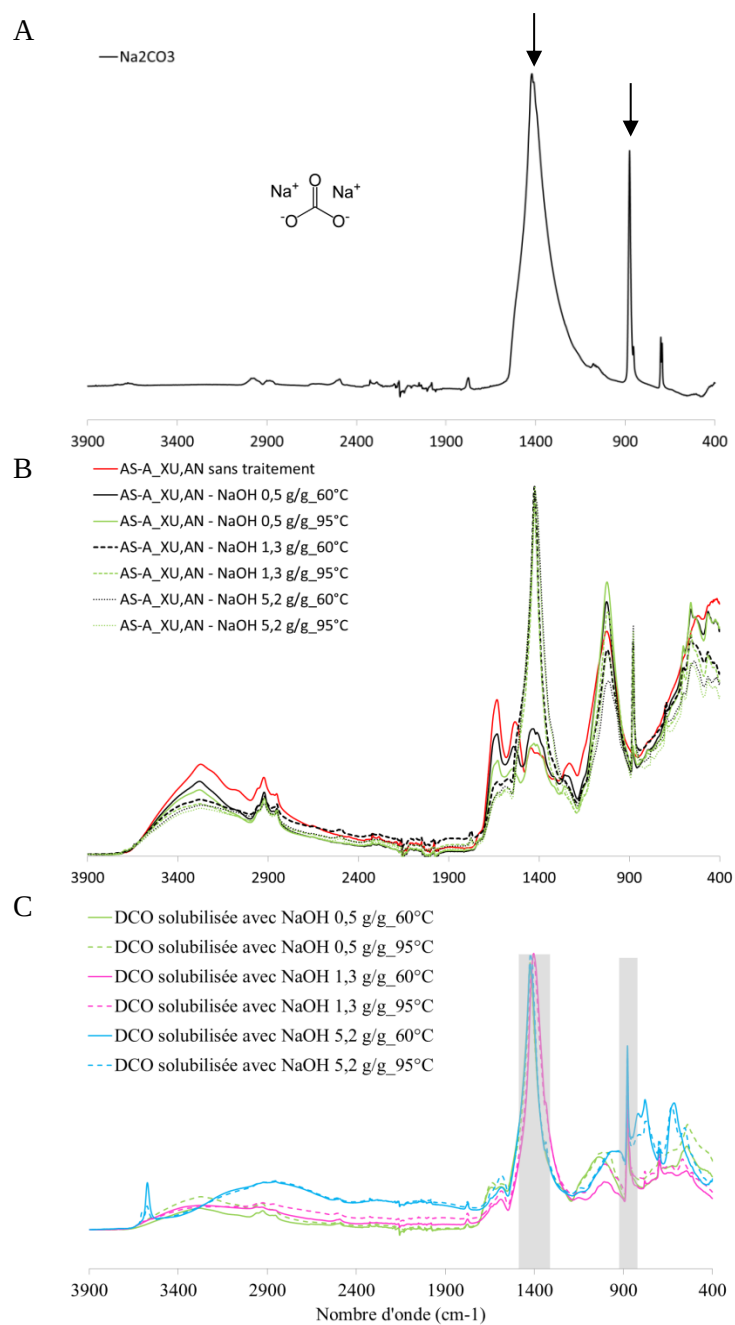


Figure IX.3. Spectres ATR-FT-MIR de Na₂CO₃ (A), des fractions non solubilisées (B) et solubilisées (C) de AS-A_XU,AN après traitement thermo-alcalin.

IX.5.2 Bandes d'absorption à 1030 cm⁻¹

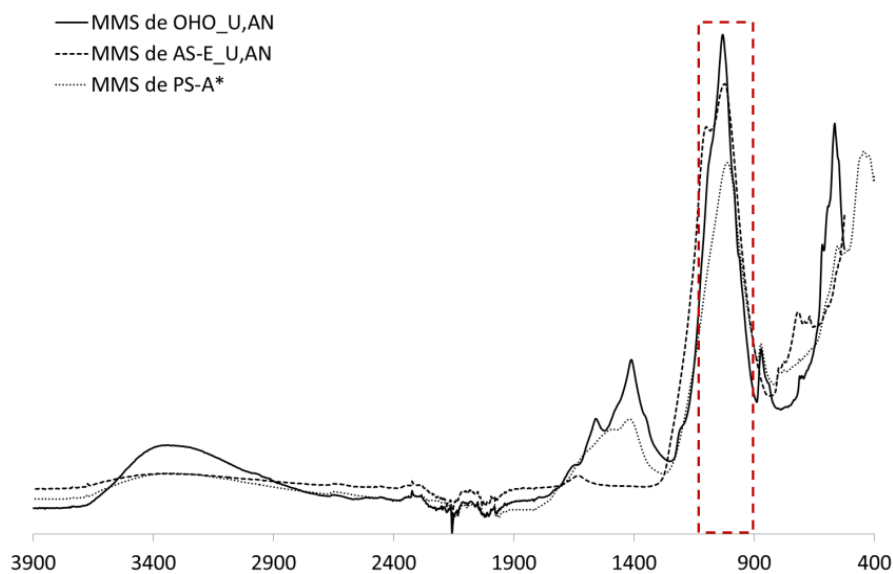


Figure IX.4. Spectres ATR-FT-MIR des matières minérales en suspension (MMS) des résidus réfractaires de OHO_XU,AN, AS-E_XU,AN et de la boue PS-A*

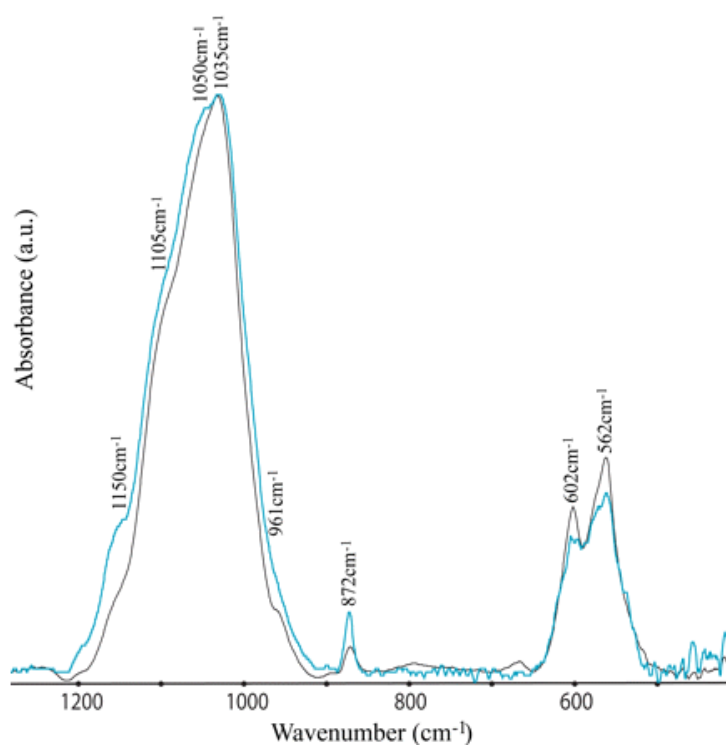


Figure IX.5. Spectre FTIR de phosphate de calcium de 400 à 1300 cm⁻¹ (Mahamid et al., 2008)

IX.5.3 Acides humiques extraits de boues

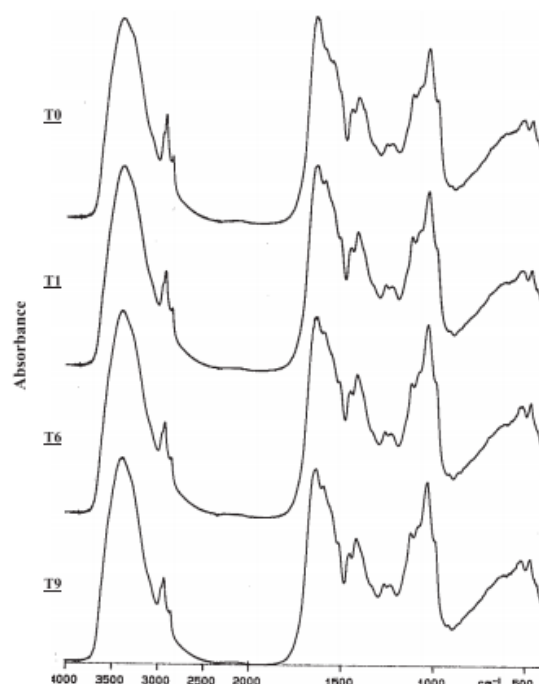


Figure IX.6. Spectres FTIR d'acides humiques extraits de boues à différents stade de compostage (T0 à T9 mois) (Amir et al., 2004)

IX.5.4 Interférence de l'eau

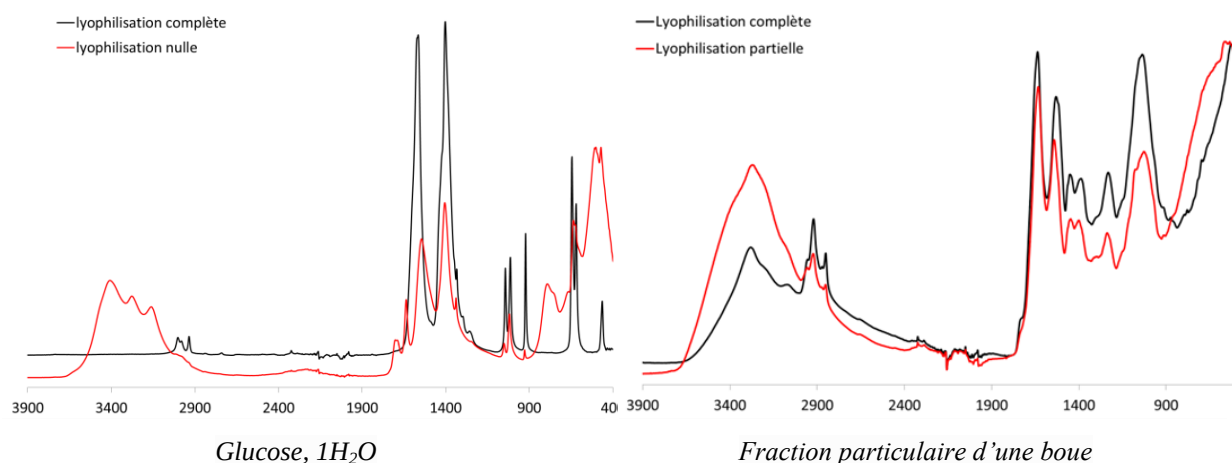


Figure IX.7. Effet de la présence d'eau sur le spectre ATR-FT-MIR d'un échantillon

IX.6 ANNEXE 6 : CARACTERISTIQUES D'UNE CELLULE BACTERIENNE

Le cytoplasme

Le cytoplasme est rempli d'eau et de différents éléments : la machinerie de la transcription et de la traduction, les enzymes du métabolisme, des substances nutritives organiques ou non (ex : glycogène, PHB, S, Fe...), des produits de déchets... Il est assimilé à un hydrogel colloïdal de pH 7 à 7,2

comprenant une phase dispersante (sels minéraux et composés solubles de nature lipoprotéique) et une phase dispersée (nucléoprotéines et lipides).

La membrane cytoplasmique

La membrane plasmique est composée de 30 à 40 % de lipides et de 60 à 70 % de protéines (extrinsèques et intrinsèques). Elle délimite le milieu interne et externe d'une cellule bactérienne et semble contenir plus de protéines que celles des eucaryotes, probablement car elle doit remplir davantage de fonctions qui sont, pour certaines, prises en charge par les membranes d'autres organites internes aux cellules eucaryotes. Les protéines périphériques, dites extrinsèques, sont solubles dans l'eau et correspondent à 20 à 30 % des protéines membranaires totales. Les protéines intégrées, dites intrinsèques, ne sont pas facilement extraites des membranes et sont insolubles dans les solutions aqueuses. Elles sont amphiphiles avec une région hydrophobe enchâssée dans la couche lipidique et des portions hydrophiles qui forment des protubérances à la surface de la membrane. La plupart des lipides membranaires sont aussi amphiphiles avec un côté polaire (éthanolamine + phosphate) qui interagit avec l'eau et un côté apolaire (acides gras longues chaînes reliés par un glycérol).

La paroi bactérienne

La paroi bactérienne est un élément de structure qui constitue un élément de différenciation des bactéries (Figure IX.8). Elle a des fonctions multiples dont le lieu de nombreuses réactions enzymatiques qui se traduisent par la présence de nombreuses protéines.

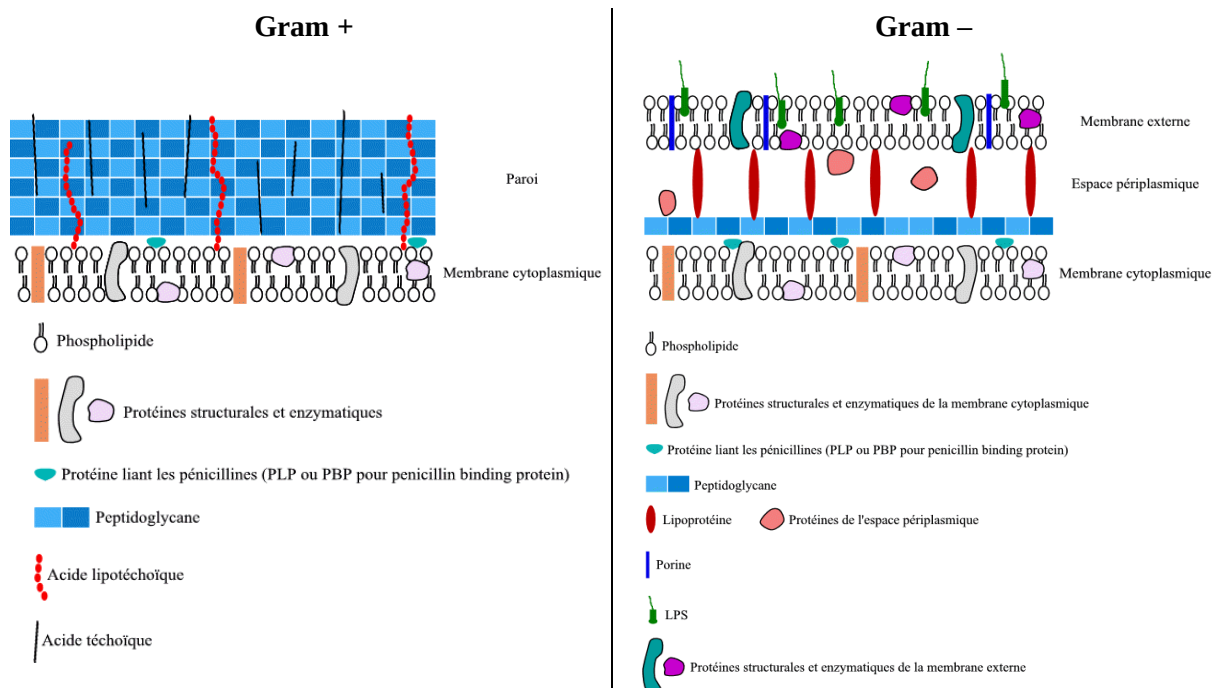


Figure IX.8. Représentation schématique de la paroi des bactéries Gram - et Gram +

Les composés organiques du peptidoglycan, des composés spécifiques aux différents types de bactéries et des éléments inconstants de la paroi sont présentés car ils sont susceptibles d'être immobilisés dans le floc lors de la lyse.

Le peptidoglycan (ou muréine)

Le peptidoglycan est un composé commun aux différents types de bactéries mais qui diffère en quantité et en composition. Il est très abondant dans les bactéries Gram-positif dont il compte pour la moitié de la masse de la paroi cellulaire et est plus mince chez les bactéries Gram-négatif.

De manière générale, le peptidoglycan est un polymère composé de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) reliées par liaison $\beta(1-4)$. Les groupes lactyles ($\text{CH}_3\text{CHOHCO}-$) de l'unité NAM sont substitués avec différents acides aminés qui ne sont pas trouvés dans les protéines (D-Glu, D-Ala, et l'acide méso diaminopimélique ou DAP). Ces acides aminés forment un térapeptide avec une alternance régulière et dont le DAP est en 3^{ème} position. Le squelette de ce composé est conservé chez toutes les bactéries mais sa composition diffère : les Gram-négatif et les gram-positif Bacilli disposent d'un peptidoglycan de type DAP alors que les Gram-positif autres disposent d'un peptidoglycan de type Lys (Figure IX.9).

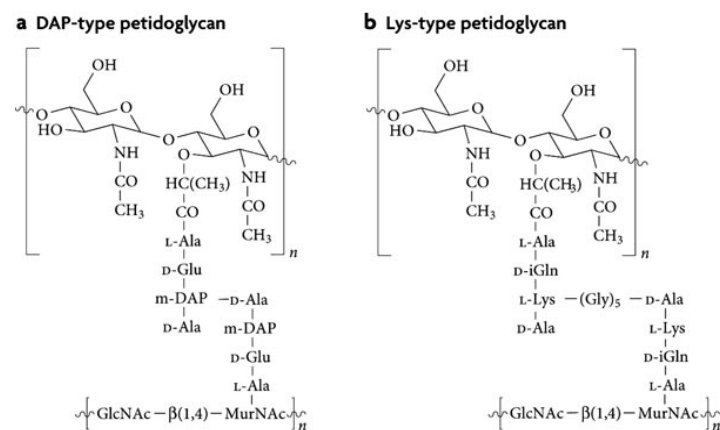


Figure IX.9. Unités constitutives du peptidoglycan

Composés spécifiques de la paroi bactérienne des gram-positif et des gram-négatif

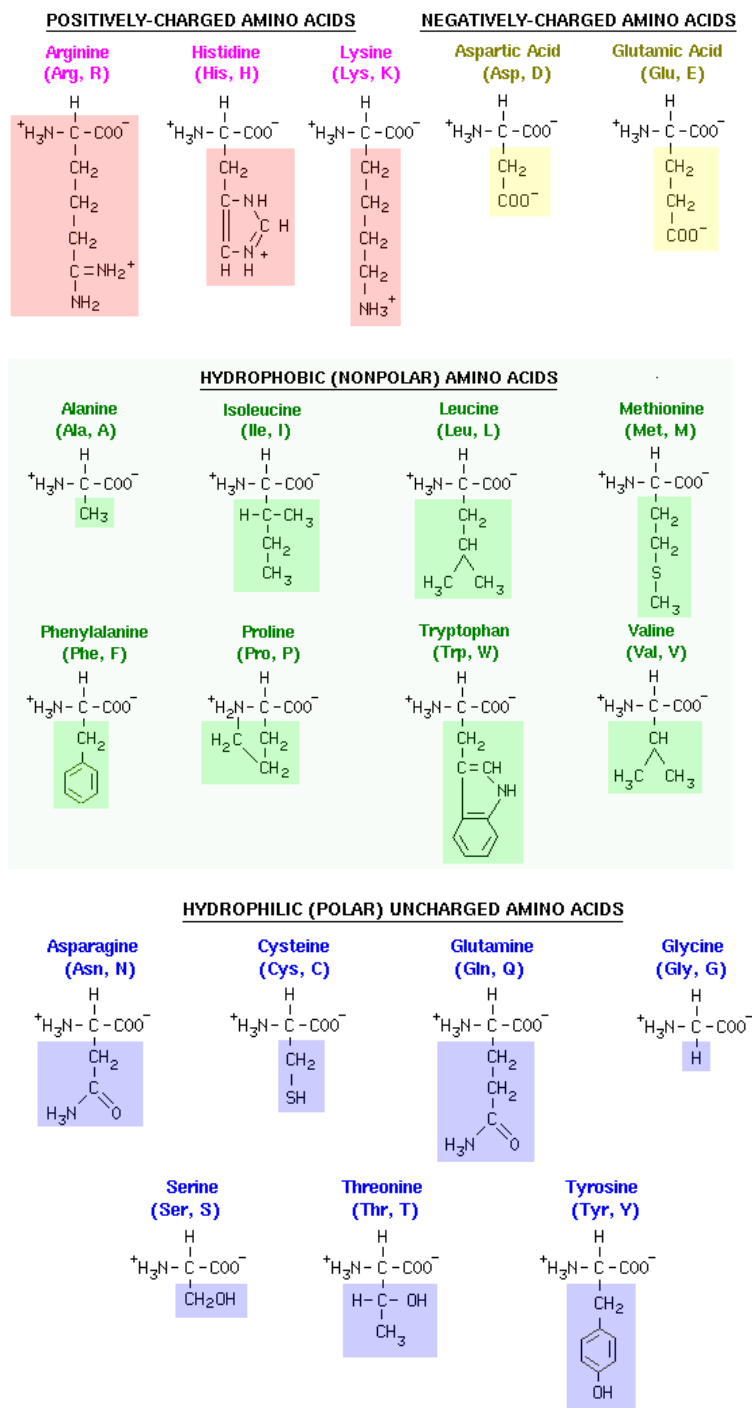
Gram-positif : La paroi des bactéries gram-positif contient une grande quantité d'acide téchoïque connectés soit au peptidoglycan soit aux lipides de la membrane plasmique (lipotéchoïque), de polymères de glycérol ou de ribitol reliés par des phosphates. Des acides aminés tels que la D-alanine ou des sucres comme le glucose sont attachés au glycérol ou au ribitol. Ce sont les acides qui atteignent la surface des bactéries qui leur confèrent une charge apparente négative. Ces acides ne sont pas présents chez les bactéries Gram-négatif.

Gram-négatif : La protéine la plus abondante dans la paroi des bactéries gram-négatif est la lipoprotéine de Braun qui est une petite lipoprotéine enfouie dans la membrane externe par son extrémité hydrophobe et attachée de manière covalente au peptidoglycan sous-jacent. Les éléments particuliers de la membrane externe sont les lipopolysaccharides, LPS, formés de trois parties : le lipide / le polysaccharide central / la chaîne latérale O (du côté du milieu externe qui constituent des antigènes).

Éléments inconstants à la surface des cellules.

Les fimbriae (protéiques), la capsule (polysaccharidiques), les alginates (polysaccharidiques), les lectines (glycoprotéiques) ont déjà été présentés pour leur potentielle implication dans la biofloculation du fait de leurs propriétés adhésives. Les flagelles plutôt impliqués dans la mobilité sont aussi des structures qui peuvent être sécrétées par les bactéries et rester ancrées dans la paroi. Ce sont des composés protéiques rencontrés dans les deux types de bactéries.

IX.7 ANNEXE 7 : ACIDES AMINÉS ET CARACTÉRISTIQUES



IX.8 ANNEXE 8 : FACTEURS DE CONVERSION DES PROTEINES EN DCO

Tableau IX.3. Facteurs de conversion des équivalent-protéines en DCO

g(eq-protéine).gDCO ⁻¹	Démarche calculatoire	Références bibliographiques
1,20	Formule empirique	Morgenroth et al. (2004)
1,5	Formule empirique	Ramdani et al. (2010)
1,3	Mesures	Sergio (2009)
1,26 ± 0,47	formule chimique des différents acides aminés	Ras (2008)

IX.9 ANNEXE 9 : POIDS MOLECULAIRE DE DIFFERENTS COMPOSES PROTEIQUES

Définitions :

La **masse moléculaire** est exprimée en Dalton. L'atome ¹²C a une masse de 12 Daltons. Le dalton a une masse de 1g/N=1g/6,02.10²³ soit 1,663.10⁻²⁴.

Le **poids moléculaire** est défini comme le rapport de la masse de la molécule par le douzième de la masse d'un atome de carbone. (nombre adimensionnel).

La **masse molaire** est exprimée en g/mol et est numériquement identique à une masse molaire exprimée en Dalton.

Tableau IX.4. : Poids moléculaire de différentes protéines

protéine	poids moléculaire
insuline	5 700
ribonucléase	12 600
lysozyme (blanc d'œuf)	13 900
myoglobine	16 900
chymotrypsinogène	23 200
β-lacto-globuline	35 000
hémoglobine	64 500
Sérum-albumine	67 500
hexokinase	102 000
aspartate trans-carbamoylase	310 000
glutamine synthétase	592 000
complexe pyruvate déshydrogénase	7 000 000
virus de la mosaïque tabac	4 0 000 000
micelle de caséine	150 000 000

IX.10 ANNEXE 10 : L'ÉNERGIE D'ACTIVATION : RAPPELS

L'énergie d'activation est la quantité d'énergie qui doit être absorbée pour atteindre un état de transition instable où les liaisons seront plus fragiles et donc plus faciles à briser. L'énergie de transition constitue une barrière énergétique à la réalisation d'une réaction donnée et est indépendante de l'énergie nette dégagée par celle-ci ($E_i - E_f = \Delta G^\circ$, énergie libre de Gibbs). Barrière énergétique essentielle à la dégradation spontanée de macromolécules d'intérêt, il faut que la cellule ait les moyens de les dégrader pour en retirer l'énergie dont elle a besoin. Sans les enzymes, la dégradation de certains composés s'avère alors très lente, voire inexistante.

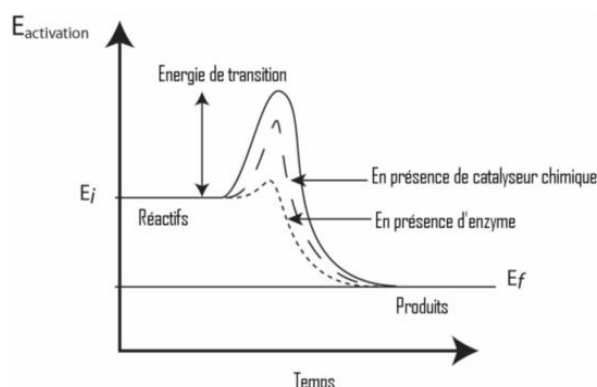
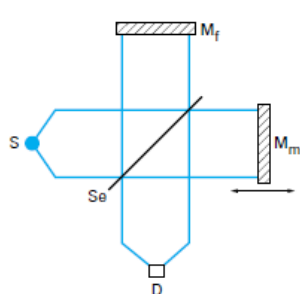


Figure IX.10. Effet d'une enzyme sur l'énergie d'activation d'une réaction

IX.11 ANNEXE 11 : L'INTERFEROMETRE DE MICHELSON



- S : source infrarouge
- M_f : miroir fixe
- M_m : miroir mobile
- Se : lame semi-réfléchissante (séparatrice)

Figure IX.11. Schéma du dispositif optique de l'interféromètre de Michelson

À partir d'une source ponctuelle S , la séparatrice dédouble le faisceau incident en un faisceau transmis avec une intensité IT vers le miroir mobile et en un faisceau réfléchi avec une intensité IR vers le miroir fixe. Ces deux faisceaux sont réfléchis par les miroirs et retournent vers la séparatrice. Chacun d'eux est à nouveau dédouble. Les amplitudes des faisceaux émergents sont égales et peuvent interférer à la sortie de l'instrument. Si les deux miroirs sont à une même distance de la séparatrice, les chemins optiques suivis par les faisceaux sont identiques et émergent en phase. Si le miroir mobile est translaté de x , le chemin optique du premier trajet est augmenté de $2x$ et les deux faisceaux sont plus ou moins déphasés. L'intensité du signal résultant, en fonction du déplacement δ du miroir mobile, porte le nom d'interférogramme.