

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science - Technologie - Santé

Faculté des Sciences et Techniques

Institut des Sciences de la Vie et de la Santé
Unité de Génétique Moléculaire Animale
UMR 1061 INRA/Université de Limoges

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé
Présentée et soutenue publiquement par

Audrey PROROT

Le 15 décembre 2008 à 13h

Approche comparative des effets microbiologiques et chimiques de traitements d'hydrolyse de boues urbaines dans le cadre de la réduction de leur production.

Directeurs de Thèse : **Pr Christophe Dagot** et **Pr Patrick Leprat**

Thèse réalisée en contrat CIFRE avec l'Association pour le Développement des Industries de la
Viande (ADIV, Clermont Ferrand)

Jury

Rapporteurs : **M^{me} Dominique PATUREAU**, Directrice de Recherches - HDR, INRA Narbonne
M. Michel FICK, Professeur, INPL Nancy

Examineurs : **M. Yann HECHARD**, Maître de Conférences – HDR, Université de Poitiers
M. Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de Limoges
M. Christophe DAGOT, Professeur, Université de Limoges
M. Patrick LEPRAT, Professeur, Université de Limoges

Invité : **M. Alain PEYRON**, Directeur ADIV, Clermont Ferrand

« Pour tirer le meilleur parti des connaissances acquises, pour en extraire toute la richesse, il importe de ne pas s'y habituer trop vite, de se laisser le temps de la surprise et de l'étonnement. »

[Hubert Reeves]

« Le véritable enseignement n'est point de te parler mais de te conduire. »

[Antoine de Saint-Exupéry]

Remerciements

Bien que cette page soit la première que vous lirez, elle a été la dernière à être rédigée. Malgré le plaisir que j'ai eu à l'écrire, j'ai repoussé sa rédaction le plus longtemps possible. Deux raisons principales expliquent ma réticence. Tout d'abord, la rédaction des remerciements, symbole de l'accomplissement et de la clôture d'une longue et heureuse aventure humaine et scientifique, est le signal ultime qu'il est temps de tourner la page. Mais surtout, le désir et le devoir de n'oublier aucune des personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce travail, et de le formuler avec les mots les plus justes possibles en font un exercice précis, qui, bien qu'agréable, m'a demandé un certain temps...

De simples remerciements ne sont pas suffisants pour exprimer toute ma reconnaissance envers mes directeurs de thèse : Christophe Dagot (Professeur) et Patrick Leprat (Professeur). A la fierté et à la chance d'avoir été votre thésarde vient maintenant s'ajouter la difficulté d'être à la hauteur de tout ce que vous m'avez apporté, et, croyez-moi, la pression est grande. Merci.

Je tiens à remercier Dominique Paturaud, Directrice de Recherche à l'INRA de Narbonne, et Michel Fick, Professeur à l'INPL de Nancy de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Ces mêmes remerciements s'adressent à Yann Hechard, Maître de Conférence à l'Université de Poitiers, et Abderrahman Maftah, Professeur à l'Université de Limoges, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Merci à l'ensemble de ce jury pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail mais aussi pour avoir fait le déplacement pour m'encourager à le soutenir.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien financier de l'Association pour le Développement des Industries de la Viande (ADIV). Je tiens à remercier tout particulièrement Mr Alain Peyron (Directeur) pour la confiance qu'il m'a accordée, ainsi que Mr Pierre Henry Devillers (Chargé d'Etudes-Pôle Environnement) pour son soutien.

Chantal Jayat Vignole a bien voulu s'intéresser à mes recherches, m'apporter son soutien technique en cytométrie en flux et me faire partager ses intuitions. Je tiens à l'en remercier sincèrement.

Mes remerciements vont également à l'ensemble du personnel de la spécialité Eau et Environnement de l'ENSIL. Je tiens à remercier tout particulièrement Mr Philippe Chazal pour

l'aide qu'il m'a apportée lors de la préparation de la soutenance de ce mémoire ainsi que Corinne Maftah et David Chaisemartin pour le soutien technique indispensable au cours de ces années de doctorat.

Ma rencontre avec Cigdem Eskicioglu (Assistant Professor) et Ronald Droste (Professor) lors de mon stage doctoral à Ottawa m'a profondément marquée. Merci de m'avoir laissé profiter de vos grandes qualités scientifiques et humaines.

Si j'ai pu garder le sourire devant mes boues, parfois odorantes, pendant ces trois années, c'est grâce à la complicité des autres thésards. Un grand merci à vous tous. Un merci plus particulier à Aurély et à Ficus pour votre constante bonne humeur. Même si vos progrès en français n'ont pas réellement été à la hauteur de mes espérances, Didier et Réza, merci pour ces trois années passées en votre compagnie. Finalement, a-t-on réellement besoin de parler la même langue pour s'apprécier et se soutenir ? Je profite également de ces quelques mots pour encourager les nouveaux arrivants, en espérant que, malgré les périodes d'errance qui jalonnent parfois la vie d'un doctorant, vous trouviez le même plaisir que j'ai pu avoir tout au long de ce travail.

Céline, Guillaume, Marie, Marie-Line, Laure, et bien sur les « Wifes » : Carole et Bénédicte, le remerciement de ses amis sonne faux à mon oreille, c'est pourquoi je l'éviterai... sachez simplement que votre amitié m'est précieuse et indispensable.

Finalement, toutes ces longues années d'études n'auraient pu aboutir sans le soutien inconditionnel de ma très chère maman. Merci d'avoir toujours été présente pour moi, même dans les moments les plus difficiles... et surtout merci d'avoir su respecter les décisions que je voulais ou estimais bonnes en gardant le sourire.

Je ne peux terminer cette page sans évoquer les deux premiers hommes de ma vie, mon père et mon frère. Bien que ce travail porte déjà votre nom, laissez moi entièrement vous l'offrir en témoignage du respect et de l'affection que je vous porte.

A mon père, à mon frère

Approche comparative des effets microbiologiques et chimiques de traitements d'hydrolyse de boues urbaines dans le cadre de la réduction de leur production.

Thèse soutenue publiquement le 15 décembre 2008 à l'Université de Limoges

RESUME

Les Procédés de Réduction de Production de Boues (PRPB), basés sur des prétraitements d'hydrolyse, ont pour vocation d'accélérer l'hydrolyse de la matière organique particulaire d'une part et d'amplifier la croissance cryptique d'autre part. Bien que ces procédés soient très étudiés à l'heure actuelle, peu d'informations sont disponibles quant à leur impact réel sur la flore microbienne. L'objectif de ce travail était donc de comparer les effets générés par différents traitements d'hydrolyse non seulement en terme de solubilisation de la matière organique et minérale et en terme de biodégradabilité, mais également de comprendre l'impact réel de ces traitements sur la flore bactérienne. Pour cela, ce travail a consisté, dans un premier temps, à mettre au point des méthodes analytiques capables de rendre compte des effets générés par les procédés d'hydrolyse sur les propriétés chimiques des boues ainsi que sur les microorganismes. Cette méthodologie a ensuite été appliquée à la caractérisation des effets de trois types de traitement : le traitement thermique, la sonication et l'ozonation, afin de les comparer. Les résultats ainsi obtenus montrent que, dans les conditions appliquées, seul un traitement par ozonation, qui conduit à la fois à une solubilisation de la matière organique particulaire extracellulaire et intracellulaire (lyse bactérienne), permet d'augmenter significativement la biodégradabilité des boues. Dans le cas du traitement thermique et de la sonication, les résultats montrent que seule la matière organique extracellulaire (sonication) ou intracellulaire (traitement thermique) est solubilisée, ce qui ne suffit pas pour améliorer la biodégradabilité des boues.

Mots clefs : Réduction de la production de boues, solubilisation, lyse cellulaire, croissance cryptique, biodégradabilité

Comparison in terms of chemical and biological effects of different hydrolysis treatment for excess sludge minimization

ABSTRACT

The processes for the reduction of excess sludge production are used both for particulate organic matter solubilisation and cryptic growth improvement. While these processes are well studied, little information has been obtained on their real impact on the microbial population. The objective of this study was the comparison of the effects of three processes used for the reduction of excess sludge production. This comparison was not only made in terms of solubilisation rate assessment and biodegradability evolution but also in terms of microbiological changes. Firstly this work concerned the development of new analytical methods able to give rise both to chemical and biological modifications induced by the different processes. Afterwards, the characterization and the comparison of three techniques of sludge hydrolysis (thermal treatment, sonication and ozonation) were performed using the previous methodology. The results revealed that the biodegradability of treated sludge was enhanced only after ozonation which allows both extracellular particulate organic matter (extrapolymeric substances) and intracellular materials release (cell lysis). On the contrary, after sonication and heat treatment, the results showed that only the extracellular (after sonication) or the intracellular organic matter (after thermal treatment) was solubilised, which was not sufficient to enhance sludge biodegradability.

Keywords: Sludge production reduction, solubilisation, cell lysis, cryptic growth, biodegradability

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION.....</u>	<u>1</u>
<u>CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....</u>	<u>4</u>
I. LES BOUES D'EPURATION	4
I. 1. ORIGINE ET DEVENIR DES BOUES RESIDUAIRES	4
I. 2. PROCESSUS METABOLIQUES MIS EN JEU DANS LA TRANSFORMATION DE LA MATIERE ORGANIQUE	8
I. 2. a. L'hydrolyse	9
I. 2. b. Oxydation de la matière organique	10
I. 2. c. « Décroissance » cellulaire	11
I. 3. STRUCTURE ET COMPOSITION DES BOUES ACTIVEES	12
I. 3. a. Organisation générale	12
I. 3. b. Les substances polymériques extracellulaires (SPE).....	13
i. Origines.....	13
ii. Composition.....	14
iii. Fonctions.....	15
I. 3. c. Le compartiment biologique	16
I. 4. CONCLUSION.....	17
II. LES PROCEDES DE REDUCTION DE PRODUCTION DE BOUES (PRPB)	19
II. 1. LES DIFFERENTES STRATEGIES	19
II. 1. a. La maintenance cellulaire	19
II. 1. b. Découplage du métabolisme.....	20
II. 1. c. Les agents chimiques découplants.....	20
II. 1. d. Alternance de phases aérobies-anaérobies	21
II. 1. e. Prédation	21
II. 1. f. Les méthodes de désintégration	23
II. 2. LES TRAITEMENTS PAR HYDROLYSE DE LA MATIERE ORGANIQUE PARTICULAIRE.....	23
II. 2. a. Principe général	23
II. 2. b. Les différentes stratégies	25

II. 2. c. Les traitements mécaniques	26
i. La sonication	26
ii. Les autres techniques	30
II. 2. d. Les traitements physiques.....	31
i. Le traitement thermique	31
ii. Les autres techniques	34
II. 2. e. Les traitements chimiques	35
i. L'ozonation	35
ii. Autres techniques.....	39
II. 2. f. Les traitements biologiques.....	41
II. 2. g. Caractérisation des effets générés par les PRPB	43
III. BIOMASSE MICROBIENNE ET METHODOLOGIES D'ANALYSE	49
III. 1. LES METHODES DE REFERENCE.....	49
III. 1. a. Les matières volatiles en suspension (MVS)	49
III. 1. b. Le biovolume	49
III. 1. c. Les techniques culturales.....	51
III. 2. METHODES DE MESURE GLOBALE DE LA BIOMASSE.....	52
III. 2. a. Dosage des constituants cellulaires	52
i. Dosage de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP)	52
ii. Dosage des constituants de la membrane	52
III. 2. b. Estimation de l'activité bactérienne globale	53
III. 3. LES METHODES MOLECULAIRES	54
III. 4. LES METHODES D'ANALYSE DIRECTES VIA DES SUBSTRATS FLUOROGENES	58
III. 4. a. Viabilité bactérienne.....	58
III. 4. b. Les sondes fluorescentes	59
III. 4. c. Les paramètres structuraux :	60
III. 4. d. Les paramètres fonctionnels.....	61
III. 4. e. Les techniques de comptage.....	62
i. Les méthodes microscopiques	62
ii. La cytométrie en flux (CMF).....	63
III. 5. CONCLUSION	64

MATERIEL ET METHODES..... 65

I. ORIGINE ET CARACTERISTIQUES DES BOUES	65
II. LES TRAITEMENTS D'HYDROLYSE	65
II. 1. LE TRAITEMENT THERMIQUE	65
II. 2. LA SONICATION	65
II. 3. L'OZONATION.....	66
III. LES METHODES ANALYTIQUES	69
III. 1. DETERMINATION DE LA QUANTITE DE MATIERE ET DE SA REPARTITION	69
III. 1. a. Matières sèches (MS), matières minérales (MM) et matières organiques (MO) totales	69
III. 1. b. Matières en suspension (MES), matières minérales en suspension (MMS) et matières volatiles en suspension (MVS).....	70
III. 2. CARACTERISATION DE LA SOLUBILISATION DES COMPOSES ORGANIQUES PARTICULAIRES.....	70
III. 2. a. Séparation des phases particulières et solubles	70
III. 2. b. Dosage de la demande chimique en oxygène (DCO)	71
III. 2. c. Dosage des protéines et des substances humiques	72
III. 2. d. Dosage des sucres	73
III. 3. EVALUATION DE LA BIODEGRADABILITE	74
III. 3. a. Biodégradabilité aérobie.....	74
III. 3. b. Biodégradabilité anaérobie.....	74
III. 4. CARACTERISATION DES PARAMETRES MICROBIOLOGIQUES.....	75
III. 4. a. Analyse de la flore microbienne par cytométrie en flux (CMF)	76
i. Principe de la cytométrie en flux (CMF)	76
ii. Analyses cytométriques	77
iii. Le protocole de désagrégation/filtration	78
iv. Les sondes fluorescentes	80
<i>Numération des microorganismes.....</i>	<i>80</i>
<i>L'intégrité membranaire</i>	<i>83</i>
v. Protocole d'analyse retenu	85
III. 4. b. Suivi de l'évolution de la population microbienne au cours du temps	86

i. Suivi de la croissance bactérienne	87
ii. Suivi de l'activité respiratoire.....	87
IV. SYNTHÈSE DES EXPÉRIENCES EFFECTUÉES POUR CHAQUE TRAITEMENT.....	90
<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	<u>91</u>
I. CARACTÉRISATION DES PARAMÈTRES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES BOUES AU COURS D'UN TRAITEMENT THERMIQUE.....	94
I. 1. ETUDE D'UN TRAITEMENT A 80°C PENDANT DIFFÉRENTS TEMPS : 5, 20, 40 ET 60 MINUTES	94
I. 1. a. Effets du traitement thermique sur la répartition de la matière.....	95
I. 1. b. Effets du traitement thermique sur la solubilisation de la matière organique	96
i. Evolution des concentrations en DCO des fractions totales et solubles des boues.	96
ii. Solubilisation des principaux constituants organiques des boues	98
I. 1. c. Effets du traitement thermique sur les microorganismes des boues	100
I. 2. ETUDE D'UN TRAITEMENT THERMIQUE A DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES (50, 65, 80 ET 95°C) PENDANT 20 MINUTES.....	107
I. 2. a. Effets du traitement thermique sur la répartition de la matière.....	107
I. 2. b. Effets du traitement thermique sur la solubilisation de la matière organique	109
i. Evolution des concentrations en DCO des fractions totales et solubles des boues	109
ii. Solubilisation des principaux constituants organiques des boues	110
I. 2. c. Effets du traitement thermique sur les microorganismes des boues	112
I. 2. d. Effets du traitement thermique sur la biodégradabilité des fractions totales et solubles des boues	117
i. Biodégradabilité en conditions aérobies	117
ii. Biodégradabilité en conditions anaérobies	119
I. 2. e. Discussion/conclusion sur les effets induits par le traitement thermique	124
II. CARACTÉRISATION DES PARAMÈTRES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES BOUES AU COURS D'UN TRAITEMENT PAR SONICATION	126
II. 1. EFFETS DE LA SONICATION SUR LA RÉPARTITION DE LA MATIÈRE	127

II. 2. EFFETS DE LA SONICATION SUR LA SOLUBILISATION DE LA MATIERE ORGANIQUE	128
II. 2. a. Evolution des concentrations en DCO des fractions totales et solubles des boues	128
II. 2. b. Solubilisation des principaux constituants organiques des boues	129
II. 3. EFFETS DE LA SONICATION SUR LES MICROORGANISMES DES BOUES ...	132
II. 4. EFFETS DE LA SONICATION SUR LA BIODEGRADABILITE DES FRACTIONS TOTALES ET SOLUBLES DES BOUES	137
i. Biodégradabilité en conditions aérobies	138
ii. Biodégradabilité en conditions anaérobies	140
II. 4. b. Discussion/conclusion sur les effets induits par la sonication.....	144
III. CARACTERISATION DES PARAMETRES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES BOUES AU COURS D'UN TRAITEMENT PAR OZONATION	147
III. 1. EFFETS DE L'OZONATION SUR LA REPARTITION DE LA MATIERE	149
III. 2. EFFETS DE L'OZONATION SUR LA SOLUBILISATION DE LA MATIERE ORGANIQUE	152
III. 2. a. Evolution des concentrations en DCO des fractions totales et solubles des boues	152
III. 2. b. Solubilisation des principaux constituants organiques des boues.....	154
III. 3. EFFETS DE L'OZONATION SUR LES MICROORGANISMES DES BOUES.....	158
III. 4. EFFETS DE L'OZONATION SUR LA BIODEGRADABILITE DES FRACTIONS TOTALES ET SOLUBLES DES BOUES	168
i. Biodégradabilité en conditions aérobies	169
ii. Biodégradabilité en conditions anaérobies	170
III. 4. b. Discussion/conclusion sur les effets induits par l'ozonation	174
<u>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES</u>	<u>177</u>
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	<u>187</u>

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique d'une filière traditionnelle de traitement des eaux usées.	4
Figure 2 : Représentation schématique d'un système de traitement secondaire par boues activées.	6
Figure 3 : Hydrolyse de la matière organique particulaire avant son assimilation par les microorganismes.	10
Figure 4 : Couplage énergétique entre catabolisme, anabolisme, et maintenance cellulaire. ...	11
Figure 5 : Organisation structurale des floes d'une boue activée selon Jorand <i>et al.</i> (1995)...	13
Figure 6 : Représentation schématique des relations entre SPE solubles, SPE liées et biomasse, d'après Raszka <i>et al.</i> , 2006.	14
Figure 7 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des ARNr 16S montrant les différentes espèces bactériennes présentes dans les boues activées. Les cadres blancs font références aux bactéries filamenteuses (d'après Wagner et Loy, 2002).	18
Figure 8 : Chaîne trophique des boues activées (sens prédateur – proie).	22
Figure 9 : Principe général des Procédés de Réduction de Production de Boue (PRPB) par hydrolyse d'après Chauzy <i>et al.</i> (2003).	24
Figure 10 : Emplacements potentiels des PRPB dans une filière de traitement de l'eau couplé à un digesteur anaérobie, d'après Ødegaard, (2004).	25
Figure 11 : Augmentation de la concentration en DCO au cours d'un traitement par sonication en fonction de l'énergie spécifique appliquée et de la concentration en MS, d'après Khanal <i>et al.</i> (2006).	28
Figure 12 : Evolution de la concentration en DCO (A), MS et MVS (B).	37
Figure 13 : Représentation schématique du procédé couplant un système à boues activées conventionnel et un digesteur aérobie thermophile développé par Sakai <i>et al.</i> (2000). ...	42
Figure 14 : Représentation schématique du procédé Biolysis®E (Ondéo Degremont™).	43
Figure 15 : Evolution de la taille des particules et de la concentration en DCO soluble en fonction de l'énergie spécifique appliquée au cours d'un traitement par sonication (d'après Müller <i>et al.</i> , 2004).	45
Figure 16 : Evolution temporelle théorique de la DBO.	47
Figure 17 : Concept de viabilité des microorganismes.	59

Figure 18 : Sites cellulaires cibles des sondes fluorescentes pouvant mettre en évidence des paramètres structuraux et/ou fonctionnels dans une bactérie, d'après Joux et Lebaron (2000).	60
Figure 19 : Représentation schématique du dispositif d'ozonation.	67
Figure 20 : Principe de la cytométrie en flux.	77
Figure 21 : Principe de l'analyse par CMF des microorganismes issus de boues activées.	79
Figure 22 : Concentrations en microorganismes totaux (CMF) et en microorganismes cultivables (techniques culturales) avant et après le protocole de désagrégation/filtration (10 minutes à 24000 rpm).	80
Figure 23 : Exemple de cytogramme obtenu après marquage d'un échantillon de boues avec le « Bacteria Counting Kit ».	81
Figure 24 : Concentration en microorganismes d'échantillons de boues activées suite à un marquage avec le « Bacteria Counting Kit ». La numération a été réalisée sur une série d'échantillons bruts et sur les mêmes échantillons dilués au 1/10.	82
Figure 25 : Histogrammes obtenus après marquage de l'intégrité membranaire avec l'iode de propidium (A) et le SYTOX Green (B) d'échantillons de boues non traitées (témoin positif) et traitées par la chaleur (témoin négatif).	84
Figure 26 : Protocole d'analyse des échantillons de boues activées par cytométrie en flux.	86
Figure 27 : Réduction du XTT en formazan.	87
Figure 28 : Protocole de mesure de l'activité respiratoire.	89
Figure 29 : Synthèse des différents paramètres pris en compte lors de l'analyse des différents traitements.	93
Figure 30 : Effet du traitement thermique sur la répartition de la matière. Evolution des pourcentages de matières organiques et minérales, solubles et particulaires en fonction du temps de traitement.	96
Figure 31 : Evolution de la concentration en DCO des fractions totales et solubles au cours d'un traitement thermique à 80°C en fonction du temps de traitement appliqué.	97
Figure 32 : Taux de solubilisation de la DCO, des protéines et des sucres au cours d'un traitement thermique à 80°C en fonction du temps de traitement appliqué.	98
Figure 33 : Concentrations en protéines et en acides humiques des fractions solubles des boues au cours d'un traitement thermique à 80°C en fonction du temps de traitement appliqué.	99

Figure 34 : Cytogrammes représentant la fluorescence verte (FL1) en fonction d'un paramètre morphologique (FSC) obtenus après marquage d'échantillons avec le SYTOX Green, de boues non traitées (témoin), et soumises à un traitement thermique à 80°C pendant 5, 20, 40 ou 60 minutes.	101
Figure 35 : Evolution de l'activité respiratoire des microorganismes contenus dans les boues activées en fonction du temps de traitement thermique initial à 80°C.	104
Figure 36 : Evolution de la concentration en microorganismes cultivables contenus dans les boues activées en fonction du temps de traitement thermique initial à 80°C.	105
Figure 37 : Effets du traitement thermique sur la répartition de la matière. Evolution des pourcentages de matières organiques et minérales, solubles et particulaires en fonction de la température appliquée.	108
Figure 38 : Evolution de la concentration en DCO des fractions totales et solubles au cours d'un traitement thermique pendant 20 minutes en fonction de la température appliquée.	109
Figure 39 : Taux de solubilisation de la DCO, des protéines et des sucres au cours d'un traitement thermique pendant 20 minutes en fonction de la température appliquée.	110
Figure 40 : Concentrations en protéines et en acides humiques au cours d'un traitement thermique pendant 20 minutes en fonction de la température appliquée.	111
Figure 41 : Cytogrammes représentant la fluorescence verte (FL1) en fonction d'un paramètre morphologique (SSC) obtenus après marquage d'échantillons de boues non traitées, et soumises à un traitement thermique avec le SYTOX Green pendant 20 minutes à différentes températures.	113
Figure 42 : Evolution de l'activité respiratoire des microorganismes contenus dans les boues activées après un traitement thermique de 20 minutes selon différentes températures.	115
Figure 43 : Evolution de la concentration en microorganismes cultivables contenus dans des boues activées après un traitement thermique de 20 minutes à différentes températures.	116
Figure 44 : Evolution du rapport DBO/DCO des fractions totales (A) et solubles (B) de boues non traitées (témoin) et après un traitement thermique à 95°C pendant 20 minutes.	118
Figure 45 : Production (A) et vitesse de production (B) de biogaz en réacteur batch à partir de la fraction totale de boues non traitées (témoin) et traitées thermiquement à 95°C pendant 20 minutes.	120

Figure 46 : Concentrations en matières solubles et particulaires des boues non traitées (témoin, A) et des boues traitées thermiquement (B) avant et après digestion anaérobie en réacteur batch.....	121
Figure 47 : Production de biogaz en réacteur batch à partir de la fraction soluble de boues non traitées (témoin) et traitées thermiquement.....	122
Figure 48 : Concentrations en DCO, sucres, protéines et acides humiques de fractions solubles de boues traitées et non traitées (témoin) avant et après digestion anaérobie en réacteur batch.	123
Figure 49 : Effets de la sonication sur la répartition de la matière. Evolution des pourcentages de matières organiques et minérales, solubles et particulaires, en fonction de l'énergie spécifique appliquée.....	128
Figure 50 : Evolution de la DCO des fractions totales et solubles en fonction de l'énergie spécifique appliquée aux boues.....	129
Figure 51 : Taux de solubilisation de la DCO, des protéines et des sucres au cours de la sonication en fonction de l'énergie spécifique appliquée.	130
Figure 52 : Concentrations en protéines et en acides humiques des fractions solubles des boues au cours d'un traitement par sonication en fonction de l'énergie spécifique appliquée.	131
Figure 53 : Cytogrammes représentant la fluorescence verte émise (FL1) par le SYTOX Green en fonction d'un paramètre morphologique (FSC) obtenus après marquage d'échantillons de boues non traitées, et traitées par sonication selon différentes énergies spécifiques.....	134
Figure 54 : Evolution de l'activité respiratoire des microorganismes d'échantillons de boues activées soniquées au cours du temps en fonction de l'énergie spécifique appliquée. ..	135
Figure 55 : Evolution de la concentration en microorganismes cultivables d'échantillons de boues activées soumises à un traitement par sonication au cours du temps en fonction de l'énergie spécifique appliquée.....	136
Figure 56 : Evolution du rapport DBO/DCO des fractions totales (A) et solubles (B) de boues non traitées (témoin) et après un traitement par sonication (Es=280290J/g MS).....	139
Figure 57 : Production (A) et vitesse de production (B) de biogaz en réacteur batch à partir de la fraction totale de boues non traitées (témoin) et traitées par sonication (Es=280290J/g MS).....	141

Figure 58 : Concentrations en matières solubles et particulaires des boues non traitées (témoin, A) et des boues traitées par sonication ($E_s=280290\text{J/g MS}$, B) avant et après digestion anaérobie en réacteur batch.	142
Figure 59 : Production de biogaz en réacteur batch à partir de la fraction soluble de boues non traitées (témoin) et traitées par sonication ($E_s=280290\text{J/g MS}$).	142
Figure 60 : Concentrations en DCO, sucres, protéines et acides humiques de fractions solubles de boues traitées par sonication et non traitées (témoin) avant et après digestion anaérobie en réacteur batch.	143
Figure 61 : Effets de l'ozone sur la répartition de la matière lors des séries 3.1 (A) et 3.2 (B). Evolution des pourcentages de matières organiques et minérales, solubles et particulaires, en fonction de la dose d'ozone appliquée.....	151
Figure 62 : Evolution de la DCO des fractions totales et solubles en fonction de la dose d'ozone appliquée aux boues lors des séries 3.1 (A) et 3.2 (B).	153
Figure 63 : Taux de solubilisation de la DCO, des protéines et des sucres au cours de l'ozonation en fonction de la dose appliquée lors des séries 3.1 (A) et 3.2 (B).	155
Figure 64 : Concentrations en protéines et en acides humiques des fractions solubles des boues au cours d'un traitement par ozonation en fonction de la dose appliquée lors des séries 3.1 (A) et 3.2 (B).	157
Figure 65 : Cytogrammes représentant la fluorescence verte (FL1) <i>versus</i> FSC obtenus après marquage à l'aide du « Bacteria Counting Kit » d'échantillons de boues non traitées (A) et de boues traitées par ozonation ($32\text{mg O}_3/\text{g MS}$) (B).	160
Figure 66 : Cytogrammes représentant la fluorescence verte émise (FL1) par le SYTOX Green en fonction d'un paramètre morphologique (FSC) obtenus après marquage d'échantillons de boues non traitées, et traitées selon différentes doses d'ozone.....	163
Figure 67 : Evolution de l'activité respiratoire des microorganismes d'échantillons de boues activées soniquées au cours du temps en fonction de la dose d'ozone appliquée initialement.....	164
Figure 68 : Evolution de la concentration en microorganismes cultivables d'échantillons de boues activées soumises à un traitement par ozonation au cours du temps en fonction de la dose d'ozone appliquée.	166
Figure 69 : Taux d'abattement de la population bactérienne déterminé par les techniques culturales en fonction de la dose d'ozone appliquée suite au traitement (T_0).	167

Figure 70 : Evolution du rapport DBO/DCO des fractions totales (A) et solubles (B) de boues non traitées (témoin) et après un traitement par ozonation (28 mg/g MS).	169
Figure 71 : Production (A) et vitesse de production (B) de biogaz en réacteur batch à partir de la fraction totale de boues non traitées (témoin) et traitées par ozonation (28 mg/g MS).	171
Figure 72 : Concentrations en matières solubles et particulières des boues non traitées (témoin, A) et des boues traitées par ozonation (28 mg/g MS, B) avant et après digestion anaérobie en réacteur batch.	172
Figure 73 : Production de biogaz en réacteur batch à partir de la fraction soluble de boues non traitées (témoin) et traitées par ozonation (28 mg/g MS).....	173
Figure 74 : Concentrations en DCO, sucres, protéines et acides humiques de fractions solubles de boues traitées par ozonation (28 mg/g MS) et non traitées (témoin) avant et après digestion anaérobie en réacteur batch.	173
Figure 75 : Bilan du traitement thermique (température maximale).....	184
Figure 76 : Bilan de la sonication (énergie spécifique maximale).....	185
Figure 77 : Bilan du traitement par ozonation (dose maximale).....	186

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Méthodes de désintégration applicables à la réduction de production de boues, d'après Ødegaard, 2004.	25
Tableau 2 : Exemples d'application de la sonication en tant que traitement de désintégration des boues.	29
Tableau 3 : Exemples d'application du traitement thermique à des températures supérieures à 100°C en tant que méthode de désintégration des boues, d'après Bougrier, 2005.	32
Tableau 4 : Exemples d'application de l'ozonation en tant que traitement de désintégration des boues.	38
Tableau 5 : Biovolumes cellulaires et contenus en carbone cellulaire obtenus à partir de différents milieux naturels.	50
Tableau 6 : Fraction de microorganismes cultivables en fonction de leur habitat, d'après Aman <i>et al.</i> , (1995).	51
Tableau 7 : Avantages et inconvénients des principales méthodes moléculaires utilisées pour la caractérisation des procédés de traitement des eaux usées, d'après Sanz et Köchling (2007).	57
Tableau 8 : Protocole de dosage des protéines et des substances humiques.	73
Tableau 9 : Protocole de dosage des sucres.	74
Tableau 10 : Analyses et tests effectués.	90
Tableau 11 : Concentrations en microorganismes totaux déterminées par CMF après différents temps de traitement thermique à 80°C.	102
Tableau 12 : Concentrations en microorganismes totaux déterminées par CMF après un traitement thermique de 20 minutes à différentes températures.	113
Tableau 13 : Caractéristiques des boues avant et après un traitement thermique à 95°C pendant 20 minutes.	117
Tableau 14 : DBO à 5, 7 et 21 jours des fractions totales, solubles et particulières des boues avant et après un traitement thermique à 95°C pendant 20 minutes.	118
Tableau 15 : Concentrations en microorganismes totaux déterminées par CMF au cours d'un traitement par sonication.	133
Tableau 16 : Caractéristiques des boues avant et après un traitement par sonication (Es = 280290 J/g MS).	137

Tableau 17 : DBO à 5, 7 et 21 jours des fractions totales, solubles et particulières des boues avant et après un traitement par sonication ($E_s=280290\text{J/g MS}$).....	138
Tableau 18 : Doses d'ozone appliquées aux différents lots de boues et concentrations en MS et MES de chaque lot.	148
Tableau 19 : Concentrations en microorganismes totaux déterminées par CMF au cours d'un traitement par ozonation (Série 3.1).....	161
Tableau 20 : Concentrations en microorganismes totaux déterminées par CMF au cours d'un traitement par ozonation (Série 3.2).....	161
Tableau 21 : Caractéristiques des boues avant et après un traitement par ozonation (Dose = 28 mg/g MS).....	168
Tableau 22 : DBO à 5, 7 et 21 jours des fractions totales, solubles et particulières des boues avant et après un traitement par ozonation (28g/g MS).	169

PRINCIPALES ABREVIATIONS

ADN(r) : Acide Désoxyribonucléique (Ribosomique)

ADP : Adénosine DiPhosphate

ANC : Actif Non Cultivable

ATP : Adénosine TriPhosphate

ARN(r) : Acide Ribonucléique (Ribosomique)

BAP : produit associé à la biomasse (Biomass Associated Product)

C/P : rapport Carbone/Phosphate

C/N : rapport Carbone/Azote

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DCO : Demande Chimique en Oxygène (mg O₂/L)

DBO : Demande Biologique en Oxygène (mg O₂/L)

ERI : Eaux Résiduaires Industrielles

ERU : Eaux Résiduaires Urbaines

Fg : Fento gramme

FISH : Fluorescence « In Situ » Hybridization

MES : Matières en Suspension

OSA : Oxic-Settling-Anaerobic

PCA : Plate Count Agar

PCR : Polymerisation Chain Reaction

PRPB : Procédés de Réduction de Production de Boues

SPE : Substance Polymérique Extracellulaire

STEP : Station d'Épuration

UAP : produit associé à l'utilisation de la biomasse (Utilization Associated Product)

UFC : Unité Formant Colonie

VNC : Viable Non Cultivable

XTT : 2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

NOTE AUX LECTEURS

Les techniques analytiques mises au point au cours de ce travail de thèse, ainsi que certains résultats qui ont fait l'objet de publications (Annexe C), sont soit non présentés, soit non détaillés dans la suite de ce manuscrit.

INTRODUCTION

L'épuration biologique aérobie, qu'elle s'applique à des eaux urbaines ou à des effluents industriels, consiste à mettre en contact la matière organique contenue dans les eaux usées au contact d'un écosystème actif en présence d'oxygène. Composé essentiellement de bactéries et de protozoaires, celui-ci va se nourrir de la matière organique et l'oxyder. Cette voie de biosynthèse bactérienne a pour conséquence directe la production de matière organique solide qui, mélangée à la matière particulaire minérale et organique non biodégradable, va former ce que l'on appelle classiquement les boues d'épuration.

Le renforcement de la législation sur l'eau [*directive cadre sur l'eau 2000/60/CE (DCE), transposée en droit français le 21 avril 2004*], qui implique une épuration de plus en plus complète ainsi qu'une augmentation du taux de collecte, et l'obligation de l'amélioration de la qualité des traitements des eaux industrielles, se traduisent aujourd'hui par une production accrue de la quantité de boues d'épuration. Il existe en France trois filières d'élimination de ces boues : la valorisation agricole, la mise en centre de stockage et l'incinération avec une production de résidus à éliminer. Or, depuis juillet 2002, seule une boue n'ayant pas d'autre voie d'élimination peut être entreposée dans un centre de stockage, sachant que cette filière sera progressivement réduite pour, à terme, être interdite. La voie de l'incinération, relativement coûteuse, reste réservée à de grandes stations d'épuration et à la présence locale d'un incinérateur. Les filières de valorisation agricole se heurtent à des problèmes socio-économiques (qualité agronomique des boues, engorgement de la filière avec la concurrence d'autres produits à valoriser, disponibilité de surfaces agricoles au regard de la nature et des volumes de boues produits, méfiance du milieu agricole et des consommateurs). La défaillance d'un seul de ces critères peut fragiliser la filière, voire la rendre impossible.

C'est dans ce contexte que de nouvelles technologies, regroupées sous le terme de Procédés de Réduction de Production de Boues (PRPB), voient actuellement le jour. Ces filières alternatives orientent le procédé de dépollution des eaux vers la minimisation de la production de déchets (boues) sans, si possible, altérer la qualité des eaux épurées. Parmi les différentes approches des PRPB, l'une d'entre elles consiste à accélérer l'hydrolyse de la matière particulaire des boues, cette étape étant considérée comme limitante dans la

conversion de la matière organique en biogaz. L'idée consiste à transformer la matière organique particulaire, composée de microorganismes (bactéries viables, actives, ou mortes) et de substances organiques et minérales non biodégradées (Substances Polymériques Extracellulaires (SPE), fibres, cellulose...), en matière organique soluble, facilement assimilable par la biomasse active des boues. Selon les données bibliographiques, cette transformation s'effectuerait, d'une part, par la lyse des bactéries (destruction des bactéries par altération de la paroi peptido-glycanique et libération du contenu cellulaire) et, d'autre part, par la réduction de la taille des molécules par destruction et hydrolyse des floes bactériens. Les PRPB ont donc pour objectif majeur d'augmenter la fraction biodégradable des boues afin d'optimiser la minéralisation globale de la pollution entrante sur la station d'épuration. Cette transformation de la matière organique particulaire peut être de nature biologique (lyse enzymatique), mécanique (sonication, homogénéisateurs à haute pression...), physique (thermique, champs électriques pulsés...) ou chimique (hydrolyse acide ou basique, oxydation par l'ozone...).

Les PRPB étant étroitement liés à l'activité microbiologique des boues et à la conformation structurale et biochimique des bactéries constitutives, leur optimisation nécessite aujourd'hui une meilleure caractérisation des microorganismes qui composent ces boues. La caractérisation de l'activité métabolique des populations microbiennes permet de connaître l'état physiologique des cellules en vue de prévoir et d'optimiser leur comportement au cours des procédés de traitement et/ou de dépollution, et d'y associer un procédé de PRPB le plus efficace possible. Pourtant, bien que ces procédés soient très étudiés à l'heure actuelle, très peu d'informations sont disponibles quant à leur impact réel sur la flore microbienne. Dans la plupart des études, la lyse bactérienne est mise en évidence par l'augmentation de la concentration en matières solubles (Demande Chimique en Oxygène (DCO), protéines, sucres ou ADN). Comme ces composés sont à la fois des constituants des Substances Polymériques Extracellulaires (SPE) et des microorganismes, leur transfert dans la fraction soluble des boues peut traduire soit une déstructuration des SPE soit une lyse des cellules, soit les deux phénomènes, avec des conséquences potentiellement différentes sur la reprise éventuelle d'oxydation de la matière organique.

Le travail présenté a consisté, dans un premier temps, à mettre au point des méthodes analytiques capables de rendre compte des effets générés par les procédés d'hydrolyse sur les

propriétés chimiques des boues ainsi que sur la flore bactérienne. Cette méthodologie a ensuite été appliquée à la caractérisation des effets de trois types de traitement : le traitement thermique, la sonication et l'ozonation, afin de les comparer en terme de répartition de la matière organique et minérale, soluble et particulaire, en terme de solubilisation des principaux constituants organiques des boues, et enfin en terme de lyse bactérienne et de reprise de croissance et d'activité respiratoire des microorganismes.

La première partie du document est consacrée à l'étude bibliographique, dans laquelle sera présenté le fonctionnement général d'une station d'épuration (Chapitre 1), avec en particulier une description des processus métaboliques mis en jeu dans la transformation de la pollution organique ainsi qu'un aperçu de la structure et de la composition des boues activées. Les différentes stratégies de réduction de production de boues seront présentées dans le Chapitre 2. L'exposé bibliographique se terminera ensuite par un état des lieux des différentes méthodes d'étude de la biomasse (Chapitre 3).

La deuxième partie de ce manuscrit répertoriera le matériel utilisé ainsi que la mise au point de la méthodologie analytique employée pour réaliser ce travail. Une attention particulière sera apportée à la mise au point des protocoles analytiques par Cytométrie en Flux (CMF).

Enfin, dans la troisième partie seront successivement présentés et discutés les résultats issus des trois types de traitement (thermique, sonication et ozonation) appliqués aux boues. Pour chaque traitement, les effets générés sur la répartition de la matière, sur les concentrations en DCO des fractions solubles et totales, sur la solubilisation des principaux constituants des boues seront abordés. L'impact de ces différents traitements sur la viabilité cellulaire ainsi que sur la reprise de croissance et d'activité respiratoire sera également précisé.

Une conclusion synthétisera en fin de manuscrit les principaux résultats obtenus et présentera les principales perspectives à ce travail.

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES BOUES D'ÉPURATION

I. 1. Origine et devenir des boues résiduaires

En zone urbaine, les eaux usées issues de l'activité humaine sont collectées par un réseau d'assainissement, acheminées, et traitées en station d'épuration (STEP), avant d'être rejetées dans le milieu naturel. En fonction de leur origine, domestique ou industrielle, elles sont qualifiées respectivement d'eaux résiduaires urbaines (ERU) en association ou non avec les eaux pluviales, et d'eaux résiduaires industrielles (ERI), voire d'eaux mixtes (ERU+ERI). L'épuration de ces eaux usées, qui consiste essentiellement à réduire leur charge organique, conduira à la production de boues résiduaires, considérées légalement comme un déchet résultant d'une activité spécifique épuratoire.

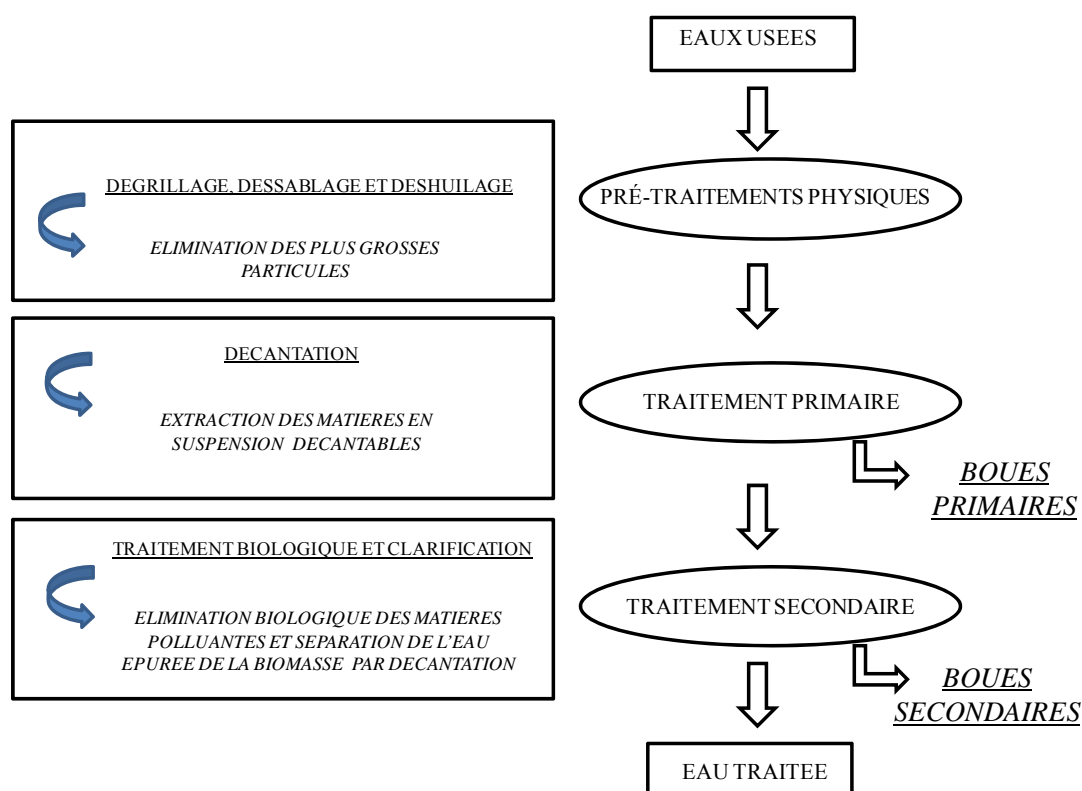


Figure 1 : Représentation schématique d'une filière traditionnelle de traitement des eaux usées.

La dépollution des eaux usées est effectuée au niveau de la station d'épuration par le biais de différents traitements successifs (Figure 1).

- Les pré-traitements physiques ont pour objectif d'éliminer les éléments les plus grossiers susceptibles de perturber les traitements ultérieurs. Trois étapes principales sont mises en œuvre : le dégrillage, le dessablage et le déshuilage. Toutes les matières éliminées au cours de ces pré-traitements sont traitées séparément et les déchets ne rejoignent pas la filière de traitement des boues mais une filière d'évacuation spécifique.

- Le traitement primaire consiste en une séparation physique des matières en suspension (MES) par décantation. Cette étape, visant à alléger les traitements en aval (séparation des matières facilement décantables), permet d'éliminer jusqu'à 60% des matières en suspension (MES). Ces dernières sédimentent au fond du décanteur et sont récupérées par un système de raclage : ce sont les boues dites primaires. Ce traitement primaire ne permet d'obtenir qu'une épuration partielle des eaux usées. C'est pourquoi, il est facultatif et n'est pas présent dans les stations récentes.

- Le traitement secondaire reproduit les phénomènes d'auto-épuration existant dans la nature selon lesquels un milieu aquatique parvient à retrouver sa qualité d'origine après une pollution. Les techniques d'épuration biologique utilisent l'activité des bactéries pour dégrader les matières organiques. En France, aujourd'hui, le procédé par « boues activées » est le plus répandu. Les microorganismes hétérotrophes constituant la biomasse cellulaire dégradent la charge carbonée de l'eau usée pour se développer et consomment une partie des éléments nutritifs nécessaires à leur croissance. La chaîne de traitement d'un procédé à boues activées est composée (Figure 2) :

- ✓ d'un bioréacteur maintenu sous agitation et aération dans lequel l'eau à traiter est mise en contact avec les microorganismes épurateurs,

- ✓ d'un clarificateur permettant la séparation des boues floculées et de l'eau épurée prête à être rejetée dans le milieu naturel,

- ✓ d'une boucle de recyclage des boues afin de conserver une concentration en biomasse constante dans le bioréacteur tout en favorisant les phénomènes de maintenance énergétique.

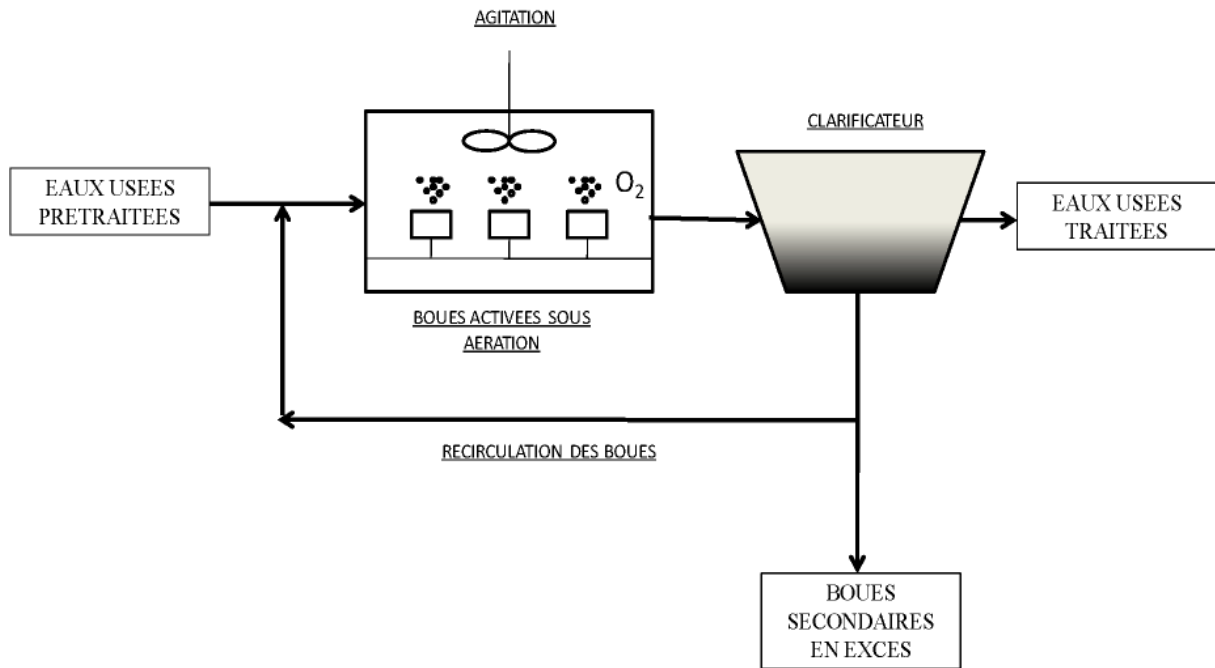


Figure 2 : Représentation schématique d'un système de traitement secondaire par boues activées.

Le traitement des eaux résiduaires demeure incomplet dès lors qu'il n'inclut pas le traitement et la destination finale des boues. L'élimination des boues d'épuration devient alors une question à part entière. Après leur collecte et avant leur élimination, les boues doivent subir différents traitements afin de réduire leur masse, leur pouvoir fermentescible ainsi que les risques sanitaires qui y sont liés. Cette filière de traitement, interne à la station d'épuration, se décompose classiquement en quatre étapes en fonction du niveau de siccité désiré :

- l'**épaississement** par décantation gravitaire ou par flottation afin de concentrer les boues et ainsi réduire leur volume,
- la **stabilisation** qui peut être réalisée par voie chimique (addition de chaux ou d'acide nitrique), biologique (digestion aérobie ou anaérobie, compostage) ou plus rarement physique (séchage thermique). Cette étape permet de réduire le pouvoir fermentescible des boues ainsi que leur nuisance olfactive,
- le **conditionnement** par ajout d'additifs chimiques (sels de fer, chaux ou polymères cationiques), afin de préparer les boues stabilisées à l'étape de déshydratation,

- la **déshydratation** par centrifugation, filtration (filtre à plateaux, centrifugation, tamis d'égouttage) ou séchage (lits de séchage naturel, ou thermiques) afin de réduire à nouveau le volume de boues en éliminant le maximum d'eau.

Après ces différents traitements, trois filières d'élimination peuvent être envisagées : la **valorisation agricole**, la **mise en centre de stockage** ou l'**incinération**. Chacune de ces filières présente des avantages et des inconvénients. Il est nécessaire de tenir compte de l'ensemble des paramètres sanitaires, environnementaux et financiers avant de privilégier l'une d'entre elles.

Depuis Juillet 2002, seules les boues n'ayant pas d'autre voie d'élimination peuvent être entreposées dans un **centre de stockage**, sachant que cette filière sera progressivement réduite pour, à terme, être interdite. Ainsi, seules les boues répondant à la définition d'un déchet ultime : « *déchet, résultant ou non du traitement d'un déchet, n'étant plus susceptible d'être traité dans les conditions techniques et économiques du moment, notamment par extraction de la part valorisable ou par réduction de son caractère polluant ou dangereux* », peuvent être stockées en décharge (OTV, 1997).

La voie de l'**incinération** fait appel à des réactions de combustion qui mettent en œuvre des phénomènes d'oxydation thermique. Les boues sont injectées dans une chambre maintenue en température (de l'ordre de 850°C) pendant un temps assez long pour détruire les molécules organiques et les réduire en éléments radicalaires. L'apport en oxygène doit être suffisant pour oxyder les radicaux formés en composés simples (principalement gaz carbonique et eau). Dans l'objectif d'une valorisation énergétique des déchets, la chaleur produite peut être récupérée sous forme de vapeur pour le fonctionnement du four lui-même, pour le chauffage urbain ou industriel. Les résidus de l'incinération (cendres ou mâchefers lors de co-incinération avec les ordures ménagères) sont valorisables dans le secteur des travaux publics (Werther et Ogada, 1999). Cependant, l'incinération, engendrant des coûts énergétiques et de transport prohibitifs, reste réservée à de grandes stations d'épuration localisées principalement en zone urbaine. De plus, l'évolution de la réglementation sur les rejets gazeux induit des coûts supplémentaires liés au traitement des composés toxiques émis lors de l'incinération (poussières, dioxyde de soufre, acide chlorhydrique, oxydes d'azote et/ou dioxines) (Werther et Ogada, 1999).

La **valorisation agricole** des boues résiduaires peut être considérée, d'après les agences de l'eau, comme le mode de recyclage le plus durable pour la protection de l'environnement et d'un très grand intérêt économique. Au cours de la décennie 1990, en France, environ 60% de la production de boues étaient valorisés en agriculture, alors que 20 à 25% étaient stockés en décharge et 15 à 20% incinérés (OTV, 1997). En effet, de par leur composition (minéraux et matières organiques), les boues d'épuration apportent des éléments fertilisants au sol permettant de couvrir une partie des besoins des cultures en azote, en phosphore, en calcium, en magnésium et en oligo-éléments. Cette voie, économiquement avantageuse, présente néanmoins des inconvénients non négligeables et fait actuellement l'objet de nombreuses polémiques. Ces inconvénients sont liés, d'une part, à la qualité des boues puisque seules les boues présentant un intérêt agronomique et exemptes de micropolluants peuvent être épandues, et d'autre part à l'opinion publique étant donné les risques sanitaires potentiels.

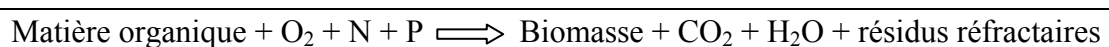
Le traitement biologique à boues activées consiste ainsi en un transfert de la pollution, initialement sous forme soluble et particulaire, d'une phase liquide (les eaux usées) vers une phase solide concentrée (la biomasse des boues) et une phase gazeuse (CO₂ principalement). Cette conversion de la matière organique met en jeu différents processus métaboliques complexes.

I. 2. Processus métaboliques mis en jeu dans la transformation de la matière organique

En fonction de sa nature, la pollution contenue dans les eaux résiduaires va connaître un sort différent. Elle peut être, soit accumulée s'il s'agit de matière organique et minérale réfractaire, soit utilisée en tant que substrat par les microorganismes épurateurs s'il s'agit de matière organique biodégradable. La production de boues secondaires résulte donc de :

- l'accumulation de matière minérale,
- l'accumulation de matière organique réfractaire (non biodégradable),
- la croissance de microorganismes à partir de la matière organique biodégradable

selon la relation :



De nombreuses recherches ont été menées pour définir des modèles cinétiques décrivant les processus d'élimination de la pollution carbonée et azotée. Elles ont abouti à une famille de modèles dont les équations expriment le déroulement des transformations chimiques et biologiques propres aux systèmes de traitement à boues activées (« Activated Sludge Model » ASM 1, 2 et 3) (Henze *et al.*, 1987; Henze *et al.*, 1995; Gujer *et al.*, 1999). Dans ces modèles, toutes les variables sont formalisées en terme de DCO. La DCO, utilisée pour mesurer la concentration de la matière organique, permet de réaliser des bilans d'oxydo-réduction sur la base de l'équivalent oxygène. Selon ces modèles, la DCO totale (DCO_T), représentant l'ensemble de la matière organique et minérale oxydable d'un système, comprend différentes fractions :

- la fraction biodégradable (DCO biodégradable), elle-même divisée en fraction rapidement biodégradable (composés solubles) et fraction lentement biodégradable (molécules de haut poids moléculaire, substrats organiques colloïdaux et particuliers),
 - la fraction non biodégradable (DCO non biodégradable),
 - la biomasse.

La conversion de la matière organique dans les procédés biologiques peut être décomposée en trois étapes : l'hydrolyse de la matière organique lentement biodégradable, l'assimilation et l'oxydation de la matière organique soluble par les bactéries conduisant à la formation de biomasse, et l'autooxydation de la biomasse.

I. 2. a. L'hydrolyse

Les composés lentement biodégradables, particuliers ou solubles, subissent une hydrolyse pour conduire à des substances facilement assimilables par les bactéries. Cette réaction permet de transformer des molécules à hautes masses moléculaires (colloïdes, molécules humiques et composés particuliers) en molécules plus simples pouvant traverser la membrane cellulaire et être assimilées par les micro-organismes (Figure 3). Après adsorption, cette étape fait intervenir plusieurs enzymes extracellulaires : estérases, carbohydrases, lipases et protéases.

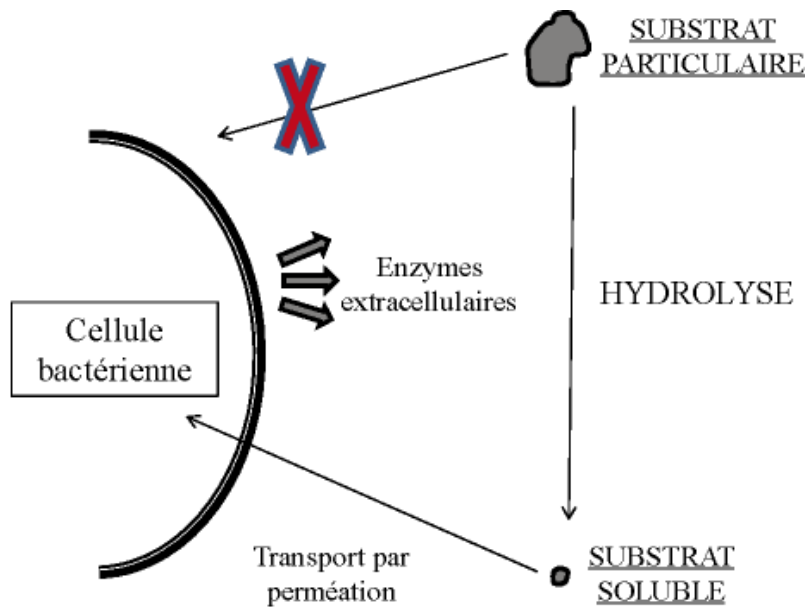


Figure 3 : Hydrolyse de la matière organique particulaire avant son assimilation par les microorganismes.

Les molécules organiques complexes sont alors converties en molécules plus simples qui peuvent pénétrer dans la cellule par perméation. Une boue biologique étant composée d'une grande proportion de microorganismes, les substrats hydrolysables sont totalement adsorbés. Par conséquent, l'hydrolyse est souvent l'étape limitante par rapport à l'adsorption (Massé, 2004).

I. 2. b. Oxydation de la matière organique

La matière organique soluble est directement assimilée par les microorganismes. L'oxydation de ce substrat permet à la cellule d'assurer ses fonctions cataboliques par la production d'énergie sous forme de molécules d'adénosine triphosphate (ATP). En fonction des conditions environnementales, la cellule utilise cette énergie soit pour effectuer divers travaux cellulaires, on parle d'énergie de maintenance, soit pour l'anabolisme de nouvelles cellules, on parle alors de biosynthèse (Figure 4). Les fonctions de maintenance comprennent le travail mécanique impliqué dans les mouvements de la cellule, le travail osmotique lors des transports actifs, ainsi que le travail chimique nécessaire au renouvellement de son matériel cellulaire. Ce sont les fonctions anaboliques de la cellule, assurant sa multiplication, qui seront à l'origine de la production de biomasse et par conséquent de boues.

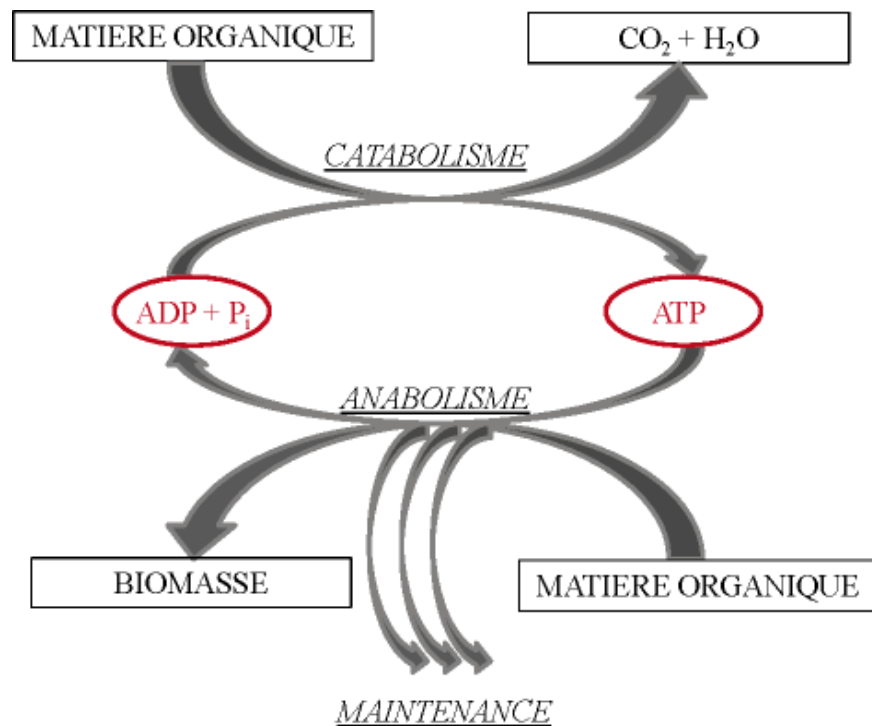
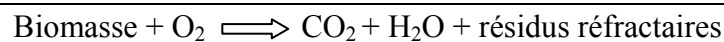


Figure 4 : Couplage énergétique entre catabolisme, anabolisme, et maintenance cellulaire.

I. 2. c. « Décroissance » cellulaire

Cette étape de décroissance cellulaire, également appelée autooxydation ou autodigestion de la biomasse, ne se produit que dans certaines conditions, en particulier lorsqu'il n'y a plus de substrat exogène disponible dans le milieu et/ou dans le cas de cultures bactériennes âgées. Bien que ce phénomène résulte de deux processus bien distincts, la respiration endogène et la croissance cryptique, il se traduit par une oxydation de la biomasse selon la relation :



Selon Dawes et Ribbons (1964), la respiration endogène correspond à l'utilisation par les microorganismes de leurs propres composés intracellulaires (polysaccharides, lipides, protéines) pour leurs besoins énergétiques en l'absence de substrats exogènes. Alors que la croissance cryptique est définie comme la multiplication de cellules à partir de métabolites issus de la lyse d'autres microorganismes. Il s'agit du concept de mort-régénération, également appelé cannibalisme bactérien. Dans le cas de la respiration endogène, le substrat

est de nature intracellulaire alors que lors de la croissance cryptique, le substrat est de nature extracellulaire (Canales *et al.*, 1994, Hamer, 1985).

Maintenance = substrat exogène ou endogène servant à toutes les activités cellulaires autres que celles liées à la multiplication bactérienne.

Respiration endogène = oxydation des polymères de réserves (substrat endogène) pour les besoins de la cellule.

Croissance cryptique = substrat endogène devenu exogène lors de la lyse bactérienne en partie oxydé par les microorganismes (Ødegaard, 2004).

Dans les boues activées, la biomasse peut également être éliminée par prédation. La boue activée est organisée comme une chaîne alimentaire : les bactéries minéralisent la matière organique alors que d'autres organismes, tels que les protozoaires, favorisent leur élimination selon des relations de prédation, participant ainsi au maintien d'une biomasse bactérienne constante.

L'ensemble de ces mécanismes (hydrolyse, catabolisme, anabolisme, mort cellulaire) mène à la production d'un fluide complexe, les boues secondaires, dans lequel on différencie trois fractions : les solides en suspension (flocs bactériens et matériel organique particulaire), les colloïdes (polymères fragmentés, cellules lysées ou produites par le métabolisme) et la matière soluble. La structure et la composition des boues secondaires sont décrites plus précisément dans le paragraphe suivant.

I. 3. Structure et composition des boues activées

I. 3. a. Organisation générale

La boue activée est organisée structurellement sous la forme de flocs. Le floc dont la taille est variable, est une structure réunissant cellules vivantes, cellules mortes, matières organiques et minérales au sein d'un mucilage issu du métabolisme bactérien. Sa formation est un phénomène très complexe résultant de l'interaction de nombreux facteurs physico-chimiques et biochimiques. Jorand *et al.* (1995) décrivent le floc selon trois niveaux d'organisation (Figure 5) : au premier niveau on trouve des particules primaires d'une taille de 2.5 μm reliées entre elles par des SPE pour constituer le deuxième niveau d'une taille de 13

μm : le microfloc. Ces particules sont elles-mêmes reliées entre elles par des SPE pour former le troisième niveau : le macrofloc d'un diamètre de $125 \mu\text{m}$.

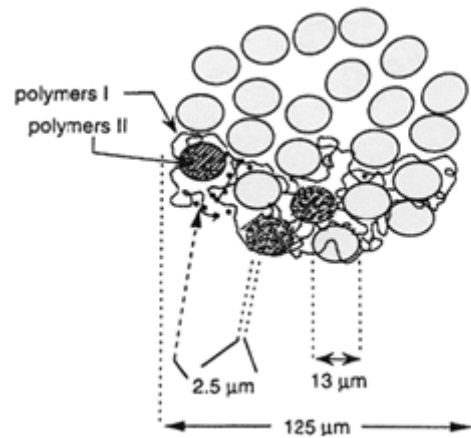


Figure 5 : Organisation structurale des floccs d'une boue activée selon Jorand *et al.* (1995).

I. 3. b. Les substances polymériques extracellulaires (SPE)

Les SPE constituent une grande part de la fraction organique composant les floccs puisque, selon Frølund *et al.* (1996) et Wilén *et al.* (2003), elles peuvent représenter jusqu'à 60% de la fraction organique d'une boue, alors que la biomasse cellulaire ne représenterait, au maximum, que 20% de cette même fraction (Raszka *et al.*, 2006). Frølund *et al.* (1996) décrivent les SPE comme un réseau de chaînes polymériques formant une matrice tridimensionnelle fortement hydratée dans laquelle sont agglomérés les microorganismes.

i. Origines

Les SPE ont deux origines bien distinctes : le métabolisme bactérien (produits microbiens de sécrétion ou issus de la lyse cellulaire) et l'effluent traité (adsorption de molécules organiques).

Selon le modèle développé par Nielsen *et al.* (1997), la production de SPE change considérablement en fonction des conditions environnementales de croissance : type de substrat limitant, rapports C/N et C/P, concentrations limitantes en carbone ou en oxygène.

Dans les boues activées, les SPE se trouvent sous deux formes : les SPE liées à la biomasse des floccs (gainés, capsules de polymères...) et les SPE solubles (macromolécules solubles, colloïdes) (Laspidou et Rittmann, 2002, Raszka *et al.*, 2006).

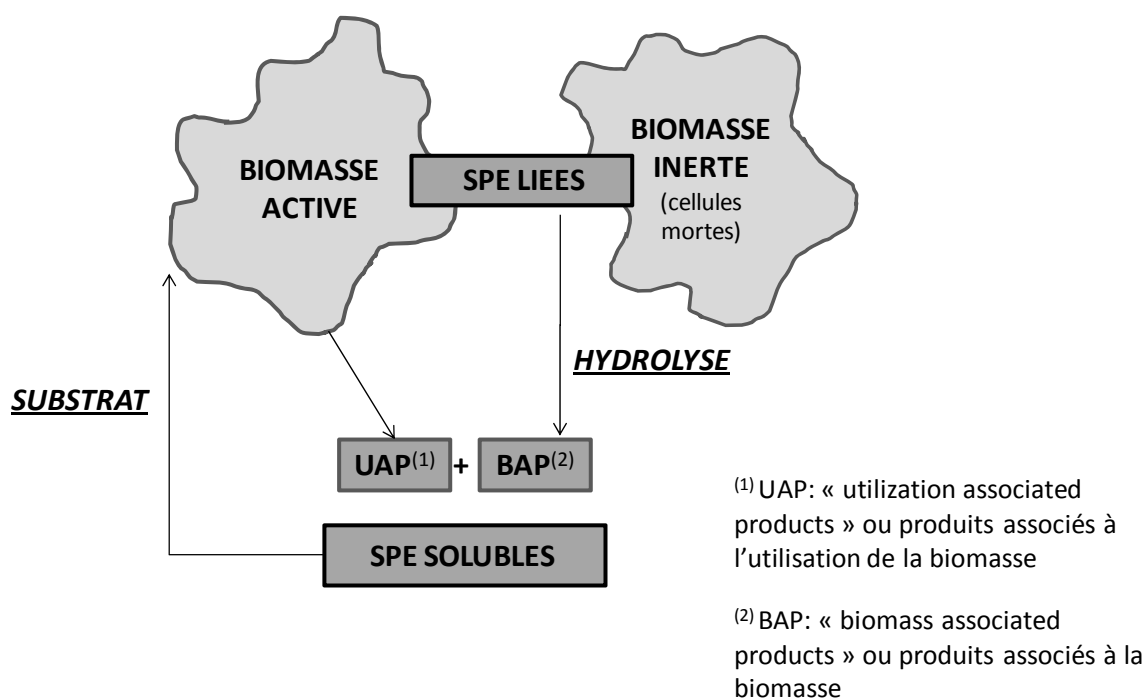


Figure 6 : Représentation schématique des relations entre SPE solubles, SPE liées et biomasse, d'après Raszka et al., 2006.

La classification ainsi que la nature réelle de ces deux classes de SPE sont encore à l'origine de nombreuses controverses. Cependant, Laspidou et Rittmann (2002) proposent une théorie réunissant les différentes hypothèses préalablement émises, selon laquelle les SPE solubles et les SPE liées sont définies par rapport à leur origine (Figure 6). Ainsi, les SPE solubles sont en fait des produits microbiens solubles (PMS) constitués de BAP (« biomass associated products », ou produits associés à la biomasse) et de UAP (« utilization associated products, ou produits associés à l'utilisation de la biomasse). Les SPE liées sont quant à elles attachées à la biomasse inerte et à la biomasse active. Leur formation serait directement liée à la quantité de substrat assimilée par la biomasse active et elles seraient ensuite hydrolysées, en partie, en BAP.

ii. Composition

Bien que d'un point de vue qualitatif la composition des SPE dans les boues activées reste relativement constante, leur composition quantitative varie considérablement d'une boue à l'autre étant donné le lien étroit entre la production des SPE et la qualité de l'effluent traité. Wilén et al. (2003) ont étudié la composition de sept boues activées différant par la nature de l'effluent, et ont conclu que les SPE comprenaient entre 45 et 55% de protéines, 30 et 33%

d'acides humiques et 10% de carbohydrates. Ces résultats, en adéquation avec les travaux de Jorand *et al.* (1995), et de Frølund *et al.* (1996), diffèrent de ceux obtenus par Laspidou et Rittmann (2002) selon lesquels la concentration en carbohydrates serait supérieure à la concentration en acides humiques. Il semble probable que les différences observées soient liées aux protocoles d'extraction des SPE ainsi qu'aux méthodes de dosage employées. Cependant, au vu de ces résultats, il apparaît que les composants majoritaires des SPE des boues sont les protéines, les carbohydrates et les acides humiques.

La prédominance des **protéines** dans les SPE pourrait être due à la présence de grandes quantités d'exoenzymes. Frølund *et al.* (1995) expliquent que les substrats présents dans les eaux usées étant relativement complexes, ils requièrent de grandes quantités d'exoenzymes pour être métabolisés. Ainsi, selon ces auteurs, les exoenzymes constitueraient une partie non négligeable de la matrice des SPE et seraient originaires de l'effluent traité ainsi que de la lyse cellulaire.

En ce qui concerne les carbohydrates, le glucose est le monomère le plus important des **polysaccharides** des SPE contribuant pour plus de 30% aux sucres totaux. En moindre concentration, se trouvent le mannose, le ribose, le galactose et le rhamnose (Dignac *et al.*, 1998).

La littérature rapporte également la présence non négligeable d'**acides humiques**. Ces composés, qui présentent des structures polyphénoliques, seraient vraisemblablement initialement présents dans les eaux usées. D'après Wilén *et al.* (2003), ce seraient les protéines et les composés humiques qui contribueraient le plus significativement à la charge de surface des SPE.

D'autres composés, tels que des acides nucléiques (ADN et ARN) et des acides gras ou des lipides sont également présents dans les SPE mais en quantité moins importante que les protéines, les sucres et les acides humiques (Raszka *et al.*, 2006).

iii. Fonctions

Les SPE forment une couche protectrice autour des cellules bactériennes assurant ainsi leur survie dans un environnement hostile. Grâce à l'absorption de molécules organiques et d'eau dans cette matrice, les SPE constituent également une réserve énergétique. Outre cette fonction protectrice, leur présence est essentielle pour la floculation (Raszka *et al.*, 2006).

Ainsi, les fonctions des SPE dans les boues activées, bien que relativement nombreuses, s'orientent autour de deux rôles principaux : un **rôle structurel** et un **rôle protecteur** des microorganismes.

I. 3. c. Le compartiment biologique

Comme précédemment mentionné (Chapitre I. 2.), une fraction de la DCO particulaire, environ 10%, est constituée de biomasse (Andreottola *et al.*, 2002). La composition de cette biomasse étant caractéristique du fonctionnement d'une station d'épuration, elle varie considérablement d'une installation à l'autre (Canler *et al.*, 1999). Cependant, trois types d'organismes sont spécifiques d'une boue activée :

- les **bactéries**, sous forme dispersée, filamenteuse ou floculée,
- les **protozoaires** (Flagellés, Sarcodines et Ciliés),
- les **métazoaires** (Rotifères et Nématodes).

Entre toutes ces espèces se créent alors des relations complexes de compétition et de prédation, permettant à certaines de se développer au détriment d'autres qui resteront minoritaires ou tendront à disparaître.

Compte tenu de la diversité des nutriments disponibles dans les boues, la diversité bactérienne est elle aussi très importante. Par rapport à leur métabolisme, les bactéries utilisées dans les procédés à boues activées sont classées en deux catégories : les bactéries hétérotrophes, dont la source de carbone est organique, et les bactéries autotrophes utilisant le carbone minéral du milieu. Ainsi, en fonction des conditions environnementales telles que la concentration en substrat disponible, le niveau d'oxygénation, le temps de rétention des boues, la température ou le pH, les espèces bactériennes vont se succéder.

La connaissance de la structure précise de cette communauté bactérienne est un axe de recherche majeur depuis de nombreuses années. Même si la microbiologie conventionnelle a permis une meilleure compréhension de la physiologie microbienne, ce n'est qu'avec le développement de la phylogénie moléculaire qu'une identification précise des microorganismes présents dans les boues activées a pu être effectuée (Wagner *et al.*, 1993, Wagner et Loy, 2002, Amann *et al.*, 1995). L'inventaire réalisé par Wagner et Loy (2002),

basé sur l'utilisation de l'ARNr 16S comme marqueur moléculaire des différentes espèces, montre une importante diversité bactérienne où les phyla prédominants sont les *Proteobacteria* (*alpha*, *beta* et *gamma*), les *Bacteroidetes* et les *Actinobacteria* (Figure 7).

I. 4. Conclusion

Dans cette partie, la complexité des phénomènes à l'origine de la production de boues lors de l'épuration biologique des eaux usées a pu être mise en évidence. Comme cela a été décrit, la dépollution biologique consiste à mettre en contact la matière organique contenue dans les eaux usées avec un écosystème actif en présence d'oxygène. Composé essentiellement de bactéries et de protozoaires, celui-ci va se nourrir de la matière organique et l'oxyder. Cette voie de biosynthèse bactérienne conduit à la production de matière organique solide qui, mélangée à la matière particulaire minérale et organique non biodégradable, va former les boues d'épuration. Cependant, l'accroissement de la quantité de boues ainsi produites, conséquence directe de l'évolution législative et de l'accroissement démographique, couplé aux limites socio-économiques de leurs principales filières de traitement et d'élimination, soulève aujourd'hui le réel problème de la gestion des boues résiduelles. Les systèmes de traitement des boues actuellement utilisés ont pour objectif la réduction du volume de boue produite, principalement par déshydratation, et permettent ainsi une évacuation pérenne. Cependant, ces procédés sont limités par les performances des technologies mises en place, particulièrement en terme d'apports énergétiques. Sur le postulat qu'un déchet non produit est plus économique que le traitement de ce déchet, de nouvelles technologies, regroupées sous le terme de Procédés de Réduction de Production de Boues (PRPB), voient le jour depuis une douzaine d'années ; ces procédés s'attaquent à la réduction de la production intrinsèque de boue. Après avoir présenté dans cette première partie les processus responsables de la production de boues, les différents procédés visant à réduire cette production sont exposés dans la partie suivante.

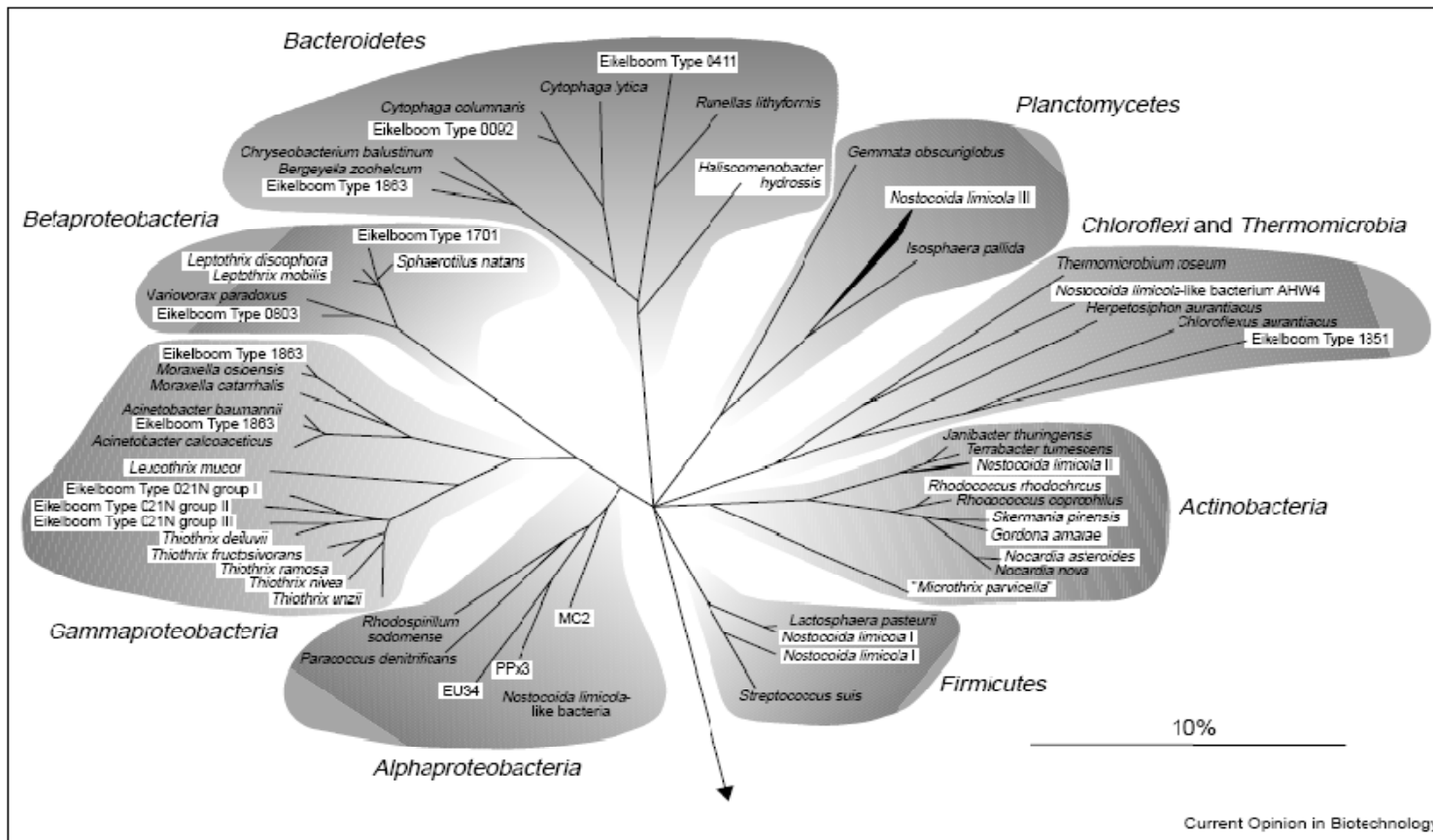


Figure 7 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des ARNr 16S montrant les différentes espèces bactériennes présentes dans les boues activées. Les cadres blancs font références aux bactéries filamenteuses (d'après Wagner et Loy, 2002).

II. LES PROCÉDES DE RÉDUCTION DE PRODUCTION DE BOUES (PRPB)

II. 1. Les différentes stratégies

Comme cela a été décrit dans la partie précédente, à l'heure actuelle les filières traditionnelles de traitement et d'élimination des boues peuvent difficilement absorber les flux produits. Face à ce problème, aussi bien économique qu'environnemental, une solution serait de réduire la quantité de boue produite au cours du traitement de l'eau plutôt que d'envisager des post-traitements sur les boues déjà produites. Ainsi, différentes solutions techniques, applicables au sein même de la station, tant sur la ligne boue que sur la ligne eau, ont été proposées (Pérez-Elvira *et al.*, 2006). L'objectif de cette deuxième partie bibliographique est donc de dresser un état des lieux de ces différentes techniques. Cependant, de par la grande diversité des techniques émergentes, cette étude bibliographique se limitera à un inventaire des procédés applicables au niveau de la ligne « eau ». Dans un premier temps, un aperçu de ces différentes méthodes sera exposé (II. 1). Les procédés de désintégration, objet de ce travail, seront ensuite plus détaillés (II. 2).

II. 1. a. La maintenance cellulaire

Le terme d'énergie de maintenance est employé pour toute forme d'énergie nécessaire à la croissance cellulaire et utilisé de telle manière que cette énergie ne soit pas disponible pour la biosynthèse (I. 2. b.). Dans le cadre des PRPB, ce concept est appliqué afin que les microorganismes consomment la pollution pour leur maintenance plutôt que pour leur multiplication. Dans des conditions « pauvres » en énergie, (faible concentration en substrat, forte concentration en biomasse et/ou âge élevé des boues), les microorganismes dégradent la matière organique, mais utilisent cette faible quantité d'énergie pour leur maintenance cellulaire au détriment de leur multiplication limitant ainsi la production de boues. Ainsi, en augmentant l'âge des boues, Stall et Sherrard (1976) ont montré qu'une augmentation de 2 jours à 18 jours permet de réduire la production de boue finale de 60%. De la même manière, Low and Chase (1999 a) ont mis en évidence une réduction finale de la biomasse de 12% et de 44% lorsque la biomasse initiale était augmentée de 3 à 6 g/L et de 1,7 à 10,3 g/L, respectivement. Cependant, dans un système à boues activées conventionnel, de fortes concentrations en biomasse posent des problèmes de clarification et peuvent être à l'origine de perte de boues dans l'effluent traité (Salhi, 2003). Afin de résoudre ce problème de

clarification, il est possible d'utiliser des bioréacteurs à membranes. En effet, les membranes permettent d'augmenter la concentration en bactéries ainsi que le temps de rétention des boues, tout en gardant une bonne séparation de l'effluent traité (Wagner et Rosenwinkel, 2000).

II. 1. b. Découplage du métabolisme

Les mécanismes d'oxydation biologique conduisent à la formation de composés réduits (NADH et NADPH) qui alimentent les systèmes transporteurs d'électrons aboutissant à la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Ce transfert d'électrons est couplé à celui de protons à travers les membranes bioénergétiques, avec un transfert de l'espace matriciel dans l'espace intermembranaire. La différence de potentiel électrochimique du proton qui en résulte active la phosphorylation de l'Adénosine DiPhosphate (ADP) en Adénosine TriPhosphate (ATP) par l'ATPsynthase. L'ATP étant le principal vecteur d'énergie des cellules, son hydrolyse en ADP et phosphate inorganique (Pi) lors de couplages ultérieurs permet de récupérer cette énergie libre afin de réaliser la plupart des fonctions cellulaires : anabolisme, mobilité cellulaire ou maintenance (I. 2. b.). Ainsi, la biosynthèse et donc la production de biomasse sont directement proportionnelles à la quantité d'énergie produite par l'intermédiaire du catabolisme. Cependant, dans certaines conditions, comme en présence de protonophores organiques, de métaux lourds, une température anormale ou une alternance de cycles anaérobie-aérobie, la respiration cellulaire serait beaucoup plus importante que celle qui pourrait être attribuée à la production d'ATP. En d'autres termes, il y aurait découplage entre catabolisme et anabolisme (Liu et Tay, 2001). Dans le cadre de la réduction de la production de boues, le découplage du métabolisme consiste à stimuler le catabolisme, c'est à dire l'oxydation du substrat tout en limitant les voies de l'anabolisme, c'est à dire la biosynthèse et donc la production de boues. Actuellement, le découplage du métabolisme bactérien peut être favorisé soit par ajout d'agents chimiques découplants, soit par une alternance de phases aérobie-anaérobie (Wei *et al.*, 2003, Pérez-Elvira *et al.*, 2006).

II. 1. c. Les agents chimiques découplants

Les phosphorylations oxydatives peuvent être découplées par l'addition de protonophores organiques qui abolissent la différence de potentiel électrochimique de protons au niveau de la membrane plasmique. L'action d'un découplant affaiblit les couplages au niveau des chaînes de transfert d'électrons et de la translocation des protons, épuise la cellule

en ATP et fait chuter la valeur du rendement de croissance, donc la production de biomasse. Plusieurs agents découplants, tels que le 2,4-dinitrophénol (Mayhew et Stephenson, 1998), le paranitrophénol (Low et Chase., 1998, Low *et al.*, 2000), ou le 2,4,5-trichlorophénol (Strand *et al.*, 1999) ont été testés et ont montré des résultats positifs en terme de diminution de la DCO et de la production de boues. Ainsi, Low *et al.* (2000) ont obtenu une réduction de boue de l'ordre de 50% suite à l'utilisation de paranitrophénol. Cependant, si la possibilité de réduire la production de boue par l'utilisation de découplants chimiques est démontrée, il est important de noter que l'impact de ces agents chimiques à long terme sur l'environnement est encore inconnu. De plus, une acclimatation des microorganismes aux agents découplants à déjà été mise en évidence (Liu, 2003), leur application reste donc conditionnelle.

II. 1. d. Alternance de phases aérobies-anaérobies

Compte tenu du volume considérable des bassins qu'ils nécessitent, les procédés anaérobies sont très rarement mis à profit au niveau de la ligne eau. Pourtant, Chudoba *et al.* (1992) ont montré que l'introduction d'une zone anaérobie dans la boucle de recirculation de la boue permet de réduire la production de boue de 0,28-0,47 g MES / g DCO_{éliminée} à 0,13-0,29 g MES / g DCO_{éliminée} pour un système à boue activée classique. Le système OSA (Oxic-Settling-Anaerobic) est un procédé classique de traitement biologique auquel est ajouté un réacteur anaérobie afin d'exposer les boues alternativement à des phases aérobies et anaérobies (Salhi, 2003). Dans le cas des microorganismes aérobies, l'ATP est produit par l'oxydation de substrats organiques exogènes. Quand les microorganismes sont soumis à des conditions anaérobies sans ajout de substrat, ils ne peuvent plus produire l'énergie et doivent utiliser leurs réserves d'ATP. Ainsi, à l'issue de cette phase anaérobie, l'ATP sera épuisé. Après retour dans des conditions aérobies, en présence de substrat, les microorganismes doivent reconstruire leur stock énergétique. D'après Chudoba *et al.* (1992), c'est cette alternance de cycles aérobies/anaérobies qui serait à l'origine de ce découplage énergétique et donc de la réduction de production de boues.

II. 1. e. Prédation

La boue activée est organisée comme une chaîne alimentaire : les bactéries se multiplient de manière proportionnelle à la charge organique et les autres organismes (protozoaires et métazoaires) établissent des relations de prédation ou de compétition. Les bactéries minéralisent la matière organique alors que les autres organismes favorisent leur

élimination, participant ainsi au maintien d'une biomasse bactérienne constante. Parmi les autres organismes, on distingue les protozoaires (ciliés, flagellés et sarcodines) et les métazoaires (rotifères et nématodes). Dans le cas des boues activées, ces relations de prédation sont représentées sur la Figure 8.

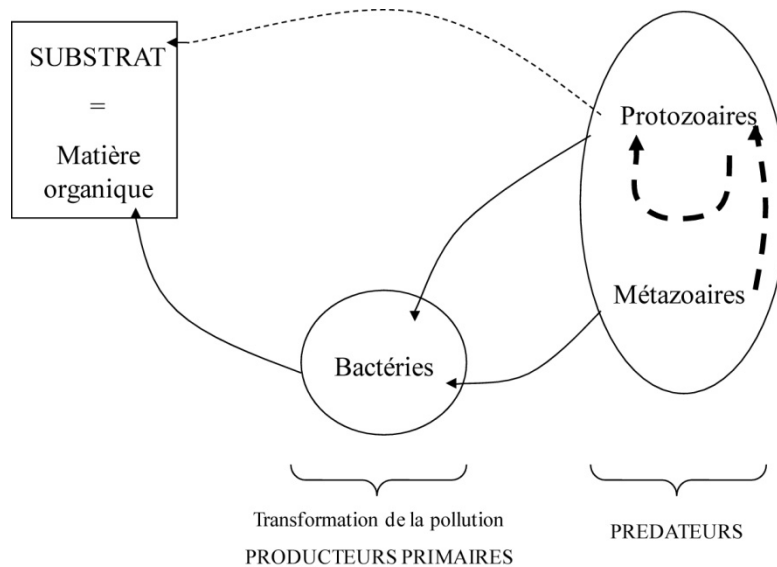


Figure 8 : Chaîne trophique des boues activées (→ sens prédateur – proie).

C'est sur ce principe de prédation que de nouvelles techniques de réduction de boues se sont développées. La principale difficulté est de trouver des conditions (concentration en substrat, âge des boues) favorables à la fois aux bactéries qui dégradent la matière organique, et aux protozoaires ou métazoaires, qui « éliminent » les bactéries (Wei *et al.*, 2003). Par exemple, Liang *et al.* (2006) ont obtenu une réduction de boues de 39 à 65% en utilisant un ver : *A. hemprichi*. Pour amplifier le phénomène de prédation, Ghyoot et Verstraete (2000) proposent un système « bi-étagé » composé d'une première unité d'épuration classique où la croissance bactérienne dispersée est favorisée par un temps de séjour très court, et d'une seconde unité au niveau de laquelle se développent des protozoaires et des métazoaires. Selon Ghyoot et Verstraete (2000), ce système diminuerait la production de boue de 20 à 30% par comparaison à un système à boues activées classique.

II. 1. f. Les méthodes de désintégration

Plutôt que de contrôler le métabolisme bactérien ou les phénomènes de prédation, une autre possibilité pour réduire la production globale de boue est d'amplifier l'hydrolyse de la matière organique particulaire. Comme cela a été décrit dans la partie (I. 2. a.), l'étape limitante lors de la transformation de la matière organique est l'hydrolyse de la matière organique particulaire. Le principe des PRPB basés sur des méthodes de désintégration est donc d'amplifier cette étape. Par ailleurs, la matière organique particulaire étant constituée, entre autre, de bactéries, son hydrolyse favorise la « décroissance » cellulaire par l'amplification de la croissance cryptique. Les traitements de lyse cellulaire, également appelés traitements de désintégration ou d'hydrolyse ont donc pour objectifs de lyser les floccs, réduire la taille des particules et solubiliser le matériel intra et extracellulaire afin d'augmenter la minéralisation globale de la pollution organique (Low et Chase, 1999 b, Wei *et al.*, 2003, Ødegaard, 2004, Pérez-Elvira *et al.*, 2006, Roxburgh *et al.*, 2006). Ce type de traitement peut être biologique, physique, mécanique et/ou chimique. Étant donné qu'une partie des travaux de cette thèse de doctorat consistait à comparer trois types de traitement de désintégration (chimique, mécanique et physique), la deuxième partie de ce chapitre s'attachera à décrire plus précisément les mécanismes mis en jeu avec ces différents traitements au travers d'exemples issus de la littérature.

II. 2. Les traitements par hydrolyse de la matière organique particulaire

II. 2. a. Principe général

Dans les boues activées, une grande partie de la matière organique se trouve compartimentée à l'intérieur des cellules bactériennes (I. 3). Or, de par leur structure, les cellules microbiennes constituent un substrat difficilement biodégradable. Les cellules bactériennes sont entourées d'une membrane cytoplasmique et d'une paroi externe, essentiellement composée de peptidoglycanes, leur conférant une protection contre les agents extérieurs et leur permettant de maintenir une pression osmotique intracellulaire élevée (Harrison, 1991). C'est la lyse de cette paroi peptido-glycanique, et donc la libération subséquente du contenu intracellulaire, qui constitue l'étape limitante dans les traitements biologiques conventionnels (Wei *et al.*, 2003). Les traitements par hydrolyse de la matière organique particulaire ont donc pour vocation l'augmentation de la fraction biodégradable des boues en facilitant la transformation de la matière organique particulaire en matière organique

soluble facilement assimilable par la biomasse (Figure 9). Cette transformation de la matière organique particulaire doit avoir lieu à deux niveaux : l'hydrolyse des molécules de haut poids moléculaire d'une part, et la lyse cellulaire d'autre part.

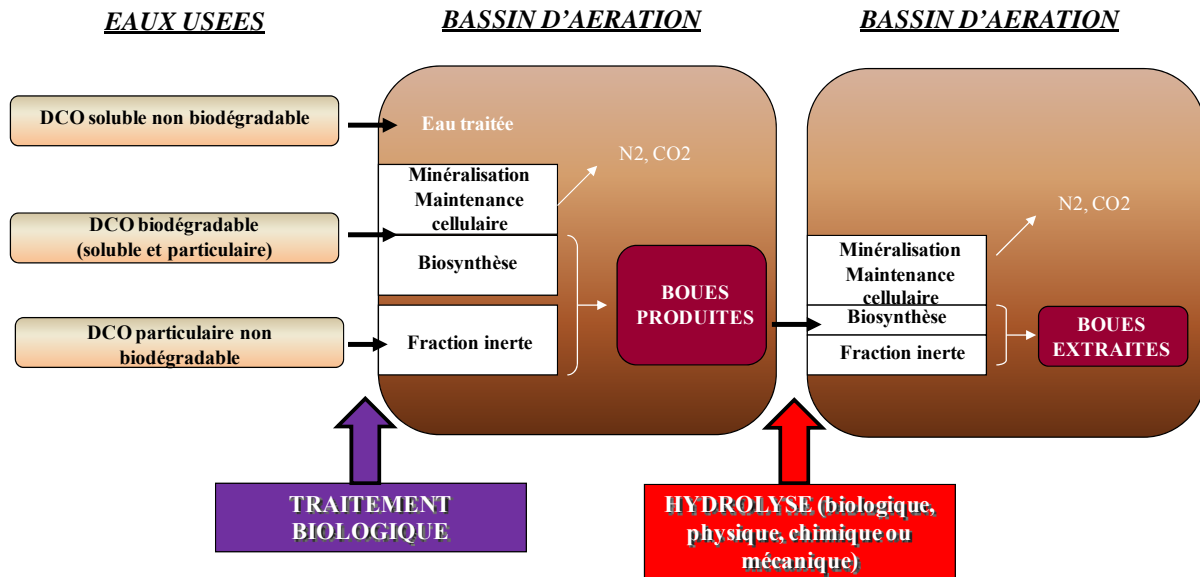


Figure 9 : Principe général des Procédés de Réduction de Production de Boue (PRPB) par hydrolyse d'après Chauzy *et al.* (2003).

Contrairement aux procédés précédemment décrits (II. 1), les traitements d'hydrolyse sont applicables aussi bien sur la ligne « eau » afin d'améliorer la digestion aérobie, que sur la ligne « boue » afin d'améliorer la digestion anaérobie (Ødegaard, 2004). Il s'agit de deux stratégies bien distinctes mais pouvant, l'une comme l'autre, améliorer le traitement d'hydrolyse (Bougrier, 2005). La Figure 10 illustre les différents emplacements au niveau desquels un PRPB peut être implanté.

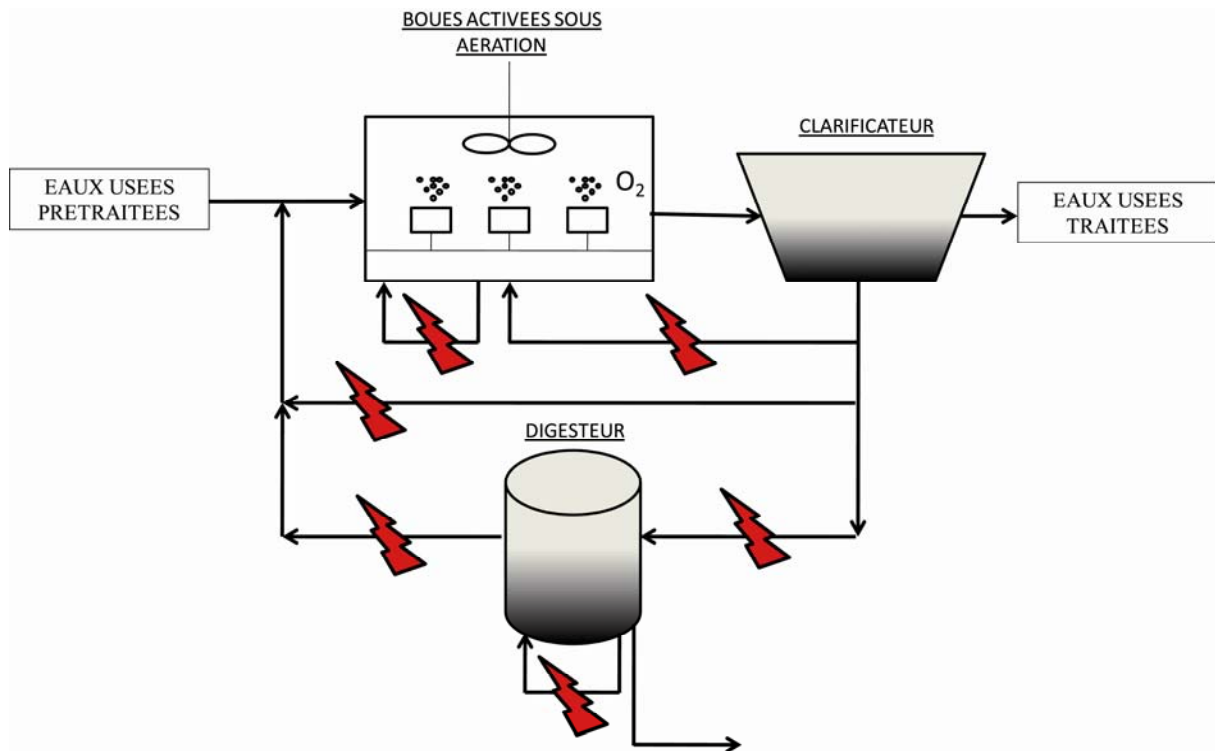


Figure 10 : Emplacements potentiels des PRPB dans une filière de traitement de l'eau couplé à un digesteur anaérobie, d'après Ødegaard, (2004).

II. 2. b. Les différentes stratégies

Afin de réduire la production de boues par hydrolyse, plusieurs méthodes de désintégration sont envisageables. Elles sont basées sur un traitement physique, mécanique, chimique, biologique, ou sur la combinaison de ces différents traitements (Tableau 1).

Tableau 1 : Méthodes de désintégration applicables à la réduction de production de boues, d'après Ødegaard, 2004.

<i>Biologique</i>	<i>Mécanique</i>	<i>Physique</i>	<i>Chimique</i>
Lyse enzymatique	Homogénéisateurs à haute pression	Champs électriques pulsés	Hydrolyse acide ou basique
Auto-lyse	Ultrasons	Traitement thermique	Oxydation par l'ozone
	Broyeurs à billes	Pression osmotique	Oxydation par le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)
	Centrifugation lytique	Congélation	

II. 2. c. Les traitements mécaniques

La désintégration mécanique des boues repose généralement sur la génération de contraintes de cisaillement importantes sur les floccs afin de réduire la taille des particules et d'augmenter la surface de contact microorganismes/matière organique. Parmi les différentes méthodes existantes, la sonication est l'une des plus étudiées.

i. La sonication

La désintégration par ultrasons est une méthode classiquement utilisée pour induire la lyse microbienne et le relargage du matériel intracellulaire (Harrison, 1991). Les ultrasons sont des ondes se propageant à une fréquence comprise entre 20 kHz et 10 MHz. Leur propagation s'effectue par vibration des molécules constituant le milieu de propagation (air, eau ou solide) en exerçant une série de compressions et de dilatations à l'origine d'importantes forces de cisaillement. A des fréquences ne dépassant pas 1 MHz et dans un milieu liquide, cette propagation génère la formation de bulles de cavitation. Ce sont des bulles de gaz qui se forment lors des phases de dilatation. Ces gaz n'étant pas entièrement expulsés lors des phases de compression, elles grossissent jusqu'à atteindre un rayon critique à partir duquel elles implosent (Khanal *et al.*, 2007). Cette implosion est caractérisée par une augmentation de la température et de la pression pouvant atteindre localement 5000°C et 180 MPa respectivement. Ces conditions extrêmes conduisent à la destruction thermique de certains composés et à la génération de radicaux libres (OH•, HO₂•, H•) très réactifs et de peroxyde d'hydrogène (Thiem *et al.*, 2001). Selon Wang *et al.* (2005), cette augmentation considérable de la température et de la pression, localisée, serait à l'origine de la déstructuration des lipides composant la membrane plasmique des cellules et donc de la lyse bactérienne.

Selon Khanal *et al.* (2007), les deux paramètres principaux susceptibles d'influencer l'efficacité de la sonication sont les conditions de traitement ainsi que la nature des boues à traiter. En ce qui concerne les conditions de traitement, de très nombreux paramètres interviennent : le temps, l'intensité, la densité, la température, le pH, la fréquence, l'amplitude ainsi que la puissance appliquée. Selon les auteurs, l'énergie appliquée lors de la sonication est exprimée soit en terme de dose, soit en terme d'énergie spécifique. La dose de sonication correspond à l'énergie appliquée par unité de volume traité (Ws/L). L'énergie spécifique, qui

présente l'avantage de tenir compte de la concentration en MS de l'échantillon, peut être déterminée selon l'équation (1) :

$$(1) \quad E_s = \frac{\Psi \times t_{US}}{MS \times V_{ech}}$$

Avec :

E_s : énergie spécifique ($J.g^{-1}MS$),

Ψ : puissance fournie (W),

t_{US} : temps de sonication (s),

MS : concentration en matière sèche ($g.L^{-1}$),

V_{ech} : volume de l'échantillon (L).

La fréquence utilisée peut également influencer l'efficacité du traitement. Selon Tiehm *et al.* (2001), le taux de solubilisation de la DCO diminue avec l'augmentation de la fréquence. De même, selon Chu *et al.* (2001), le phénomène de cavitation est favorisé pour une fréquence de l'ordre de 20-40 kHz. Dans le cas de la sonication appliquée à la solubilisation des boues, les phénomènes de rupture physique semblent prépondérants par rapport aux réactions chimiques. Ainsi, lorsque la fréquence des ultrasons est faible, le diamètre des bulles de cavitation est plus grand, ce qui entraîne des phénomènes de cisaillement et de turbulence plus marqués conduisant à une dissociation plus importante des floes (Bougrier, 2005).

La température est un autre facteur important qu'il est nécessaire de prendre en considération. Chu *et al.* (2001) ont montré que l'utilisation d'une sonde à ultrasons dans un bécher de 250 mL ($0,33 W.mL^{-1}$; 20 kHz), pendant 2 minutes, entraîne une augmentation de la température de 20°C à 50°C. Dans les mêmes conditions, si les tests sont réalisés à une température fixe de 15°C, le taux de solubilisation de la DCO est de 7% pour un temps de réaction de 120 min, contre 21% si la température n'est pas fixée. Chu *et al.* (2001) ont montré que la température, à elle seule, n'expliquait pas ce résultat, mais que les effets de la sonication sont amplifiés par la température (Rivard et Nagle, 1996, Grönroos *et al.*, 2005).

De la même manière, la concentration et la composition des boues ont un effet sur les performances de la désintégration. Dans une étude, Khanal *et al.* (2006) montrent que le taux

de solubilisation de la DCO est plus élevé pour des boues concentrées lorsqu'une même énergie spécifique est fournie (Figure 11). Ces résultats sont confirmés par les travaux de Lehne *et al.* (2001). Les auteurs montrent que pour un traitement à 200 kHz, pour une énergie spécifique fournie de 7 000 kJ/kg MS, le taux de désintégration est de 20% pour des boues dont la concentration est de 7,4 g MS/L, tandis qu'il atteint la valeur de 60% pour des boues dont la concentration est de 45,3 g MS/L. Grönroos *et al.* (2005) expliquent ces résultats par une plus forte probabilité de rencontre entre les particules et les bulles de cavitation créées par les ultrasons, lorsque la concentration en MS du milieu augmente. De plus, il semble que les performances de désintégration des molécules par ultrasons diffèrent en fonction de la nature des boues à traiter. Ainsi, des boues primaires non biologiques sont plus faciles à dégrader que des boues riches en microorganismes. Au contraire, dans certains cas, des boues issues d'effluents industriels ont un taux de solubilisation limité. Gonze *et al.* (2003) expliquent que cette inhibition de la dégradation peut être liée à l'accumulation de composés dans les bulles de cavitation, entraînant une diminution de la température lors de la rupture des bulles, et donc une production moindre de radicaux libres.

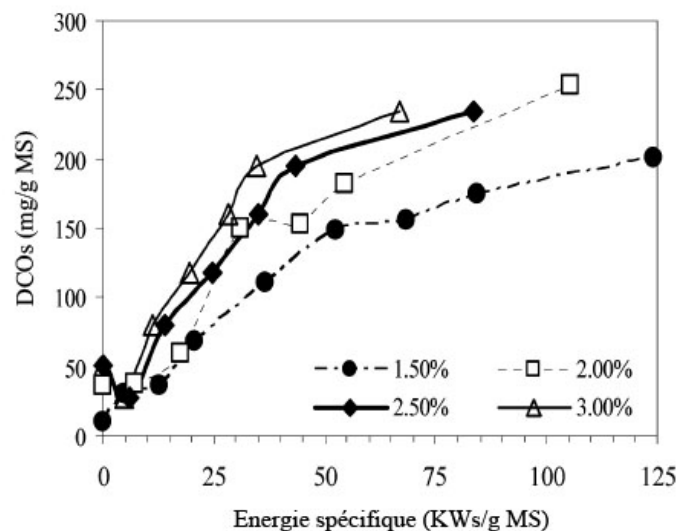


Figure 11 : Augmentation de la concentration en DCOs au cours d'un traitement par sonication en fonction de l'énergie spécifique appliquée et de la concentration en MS, d'après Khanal *et al.* (2006).

Quelques exemples d'application de traitements de boues par sonication sont présentés dans le Tableau 2, où l'on constate une grande variabilité des énergies spécifiques appliquées avec des degrés de solubilisation comparables.

Tableau 2 : Exemples d'application de la sonication en tant que traitement de désintégration des boues.

Type de boues	Puissance (W)	Fréquence (kHz)	Energie Spécifique (kJ/kg MS)	SOLUBILISATION			Références
				DCO _s (mg/L)	DD _{DCO} (%)	DCOS/DCOT (%)	
Boues activées concentrées (MS : 3%)	1500	20	0	1542	nd	4,2	Khanal <i>et al.</i> (2006)
			11000	2412		5,7	
			19600	3540		8,7	
			28200	4824		12,3	
			34600	5846		13,7	
			66800	7022		16,2	
Boues activées concentrées (MS : 1,85%)	750	20	0	nd	nd	5,8	Bougrier <i>et al.</i> (2005)
			660			10,5	
			1355			16,1	
			2700			22,3	
			6951			33,1	
Boues d'entrée de digesteur (MS : 2,45%)	nd	27	0	1300	nd	nd	Grönroos <i>et al.</i> (2005)
			3000	2600			
			14900	4050			
Boues activées (MS : 0,48%)	500	nd	8000	nd	4,2	nd	Rai <i>et al.</i> (2004)
			24000		8		
			40000		10		
			64000		25		
Boues activées concentrées (MS : 2%)	750	20	0	nd	nd	5,8	Bougrier <i>et al.</i> (2004)
			1355			16,1	
			2707			22,3	
			6951			33,1	
			14547			41,6	
Boues d'entrée de digesteur (MS : 2,59%)	nd	41	5000	nd	5,5	nd	Thiem <i>et al.</i> (2001)
			10000		10		
			25000		22		
			40000		35		
			60000		40		

nd : non disponible

En conclusion, d'après la littérature, la sonication apparaît comme une méthode tout à fait appropriée à la réduction de la production de boues. De par leurs capacités à désagréger les floccs et ainsi solubiliser la matière, les ultrasons conduisent à une amélioration de la dégradation aérobie et anaérobie des boues en excès. De plus, malgré des coûts énergétiques relativement importants, selon Khanal *et al.* (2006), un tel investissement pourrait être compensé par des économies liées à la réduction de la taille des digesteurs et à la réduction de la quantité de boues finales à éliminer. Cependant, il est important de noter que malgré le grand nombre de travaux réalisés sur la sonication, certains mécanismes restent encore méconnus, et les données bibliographiques sont encore assez discordantes. Ces divergences peuvent être attribuées, en partie, aux manques de données techniques sur les sonicateurs utilisés et sur les conditions de traitement. Comme nous l'avons décrit dans cette partie, de très nombreux paramètres influencent l'efficacité de la désintégration. Il est donc primordial de connaître précisément les conditions de traitement employées afin d'être à même d'interpréter comparativement les résultats obtenus.

ii. Les autres techniques

D'autres méthodes mécaniques sont utilisées en tant que traitement de désintégration des boues. Tout comme la sonication, le but de ces traitements est de générer des contraintes de cisaillement et de forts gradients ponctuels de pression afin de désintégrer les floccs et les cellules et ainsi solubiliser la matière. Parmi ces techniques, l'**homogénéisateur à haute pression** permet d'hydrolyser des composés particuliers. Lors d'une homogénéisation à haute pression, les boues sont comprimées jusqu'à une pression pouvant atteindre 1 000 bars. Elles passent ensuite au travers de la valve d'homogénéisation où elles subissent une détente liée au rétrécissement de la section de passage (Ødegaard, 2004). Selon Müller et Pelletier (1998), cités par Bougrier (2005), l'homogénéisation à haute pression permet d'améliorer la dégradation de la matière organique, et ce d'autant plus que l'âge de boues activées est faible. Cette hydrolyse de la matière organique favoriserait alors la digestion anaérobie subséquente. Un autre traitement mécanique capable de désintégrer la matière particulaire de la boue est la **centrifugation lytique**. Les centrifugeuses agissant selon ce principe sont pourvues d'une extension lytique. Ces extensions font partie intégrantes des centrifugeuses/épaississeurs déjà présentes dans la filière de traitement des boues. Elles utilisent l'énergie cinétique dissipée par celles-ci pour fonctionner. L'épaississement et la réduction des boues sont donc simultanés. Les boues sont soumises à des forces de cisaillement causées par des lames fixes rattachées à

la chambre de désintégration et des lames mobiles rattachées au rotor ainsi qu'à des chocs causés par la forte diminution de l'énergie cinétique en sortie de centrifugeuse. Selon Dohanyos *et al.* (1997), cité par Bougrier (2005), la production de biogaz est augmentée de 84% lors de la digestion anaérobie de boues activées. Harrison (1991) a également décrit le fonctionnement de **broyeurs à billes**. Dans cet appareil, des billes (en verre, céramique ou acier) sont mises en mouvement rapide, ce qui crée d'importantes forces de cisaillement capables de désintégrer les boues.

II. 2. d. Les traitements physiques

Différentes méthodes basées sur des procédés physiques ont été appliquées à la réduction de production de boues (Tableau 1). Parmi ces techniques, l'hydrolyse thermique a fait l'objet de nombreuses études et semble être aujourd'hui la méthode privilégiée.

i. Le traitement thermique

Initialement, de par sa capacité à rompre la structure en gel de la boue et ainsi libérer l'eau liée intracellulaire, le traitement thermique des boues est utilisé pour améliorer la déshydratabilité de boues digérées ou brutes (Neyens et Baeyens, 2004). Aujourd'hui, l'hydrolyse thermique devient intéressante en tant que traitement dans le cadre de la réduction de production de boues, en plus de sa capacité à hygiéniser les boues (Wei *et al.*, 2003). Selon Chauzy *et al.* (2003), le traitement thermique permet de lyser les cellules, de solubiliser certains composés particuliers et de simplifier les molécules organiques complexes, améliorant ainsi la biodégradabilité ultérieure des boues.

Dans le cas de l'hydrolyse thermique, deux gammes de température peuvent être considérées (Ødegaard, 2004) : les températures inférieures à 100°C (« basses températures ») et les températures supérieures à 100°C (« hautes températures »). Dans le premier cas, le traitement ne nécessite pas d'augmentation de pression, alors que pour des températures supérieures à 100°C, il est nécessaire de travailler dans des conditions de pression plus élevées. Au vu des données bibliographiques, il semble que des températures comprises entre 100 et 170°C soient préconisées (Li and Noike, 1992). Selon ces auteurs, le taux de solubilisation des boues, l'abattement de la matière organique ainsi que la biodégradabilité augmentent avec la température de traitement. Les principaux résultats issus de la littérature, concernant les températures supérieures à 100°C, sont synthétisés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Exemples d'application du traitement thermique à des températures supérieures à 100°C en tant que méthode de désintégration des boues, d'après Bougrier, 2005.

Références bibliographiques	Type de boues	Conditions de traitement	Résultats
(Haug <i>et al.</i> , 1978)	boues activées	175°C, 30 min	- Solubilisation de la DCO de 40% - Augmentation de l'abattement de la matière organique de 26% à 48% - Augmentation de la production de méthane de 115 à 186 mL.g-1 DCO _{in} ^(*)
	boues primaires	175°C, 30 min	- Solubilisation de la DCO de 20% - Pas d'influence sur la production de biogaz ni sur la réduction de matière
	boues mixtes	175°C, 30 min	- Augmentation de l'abattement de la matière organique de 46% à 54,5% - Augmentation de la production de méthane de 205 à 234 mL.g-1 DCO _{in}
(Li et Noike, 1992)	boues activées 15 g DCO.L ⁻¹	170°C, 1 h TSH = 5 j	- Augmentation d'abattement de la DCO de 30% à 60% - Augmentation d'abattement de la matière organique de 30% à 60% - Augmentation de la production de biogaz de 100%
(Tanaka <i>et al.</i> , 1997)	boues activées 8,4 g.L ⁻¹ origine industrielle	180°C, 60 min	- Solubilisation de la matière organique de 30% - Augmentation de la production de biogaz de 90%
(Carballa <i>et al.</i> , 2004)	boues mixtes 70% primaires 30% secondaires	130°C, 60 min TSH = 20 j	- Solubilisation de la DCO de 60% - Augmentation de l'abattement de la matière organique de 58% à 66%
(Valo <i>et al.</i> , 2004)	boues activées 17 g.L ⁻¹	170°C, 60 min	- Solubilisation de la DCO de 57% - Augmentation de la production de biogaz de 45% (digestion batch) - Augmentation de la production de biogaz de 54% (digestion continue) - Augmentation de l'abattement en matière organique de 27% à 59%

(*) L'indice « in » se réfère à la quantité introduite et non consommée.

Cependant, même si l'application de températures supérieures à 100°C conduit à de meilleurs rendements de solubilisation et de biodégradabilité, Müller *et al.* (2004) précisent que des traitements à fortes températures induisent la formation de composés potentiellement inhibiteurs de la digestion anaérobie. La production de ces composés réfractaires s'explique, en partie, par la réaction de Maillard au cours de laquelle les sucres réduits et les acides aminés réagissent pour former des composés similaires aux acides humiques.

De plus, des travaux réalisés dans des conditions basses températures (inférieures à 100°C) ont montré que la réduction de production de boues pouvait également être significative dans cette gamme de traitement. Ainsi, Canales *et al.* (1994) ont soumis à la thermolyse une culture pure de *Pseudomonas fluorescens* alimentée par une eau synthétique de composition semblable à celle d'une eau usée urbaine. Dans ces conditions, un traitement à 90°C et à pression atmosphérique pendant trois heures entraîne une diminution du rendement de croissance de près de 60% avec un maintien des capacités épuratoires du système. Camacho *et al.* (2004) ont étudié la possibilité de réduire la production de boues par un traitement thermique à 95°C couplé à un traitement biologique classique (boues activées). Ils ont mis en évidence des taux de solubilisation assez faibles, comparativement aux traitements thermiques à hautes températures. Cependant, l'application de ce traitement thermique en continu au niveau du système « boues activées » a permis de réduire la production de boues d'environ 60%. Selon Paul *et al.* (2006), un traitement thermique à basses températures permet d'augmenter la vitesse de dégradation de la matière organique biodégradable suite à une désorption de molécules organiques liée à la déstructuration des floes. En revanche, ce type de traitement n'augmenterait pas la biodégradabilité intrinsèque des boues.

A la différence de la température de traitement, le temps de contact a peu d'influence sur la solubilisation et la biodégradabilité. Par exemple, Barlindhaug et Odegaard (1996) ont montré que le temps d'application du traitement thermique a peu d'effet sur la solubilisation quelle que soit la gamme de température appliquée. Ainsi, pour une température de 160°C, un traitement de 15 minutes entraîne une solubilisation de 23,8% alors qu'un traitement de 50 minutes entraîne une solubilisation de 26%. A 200°C, le taux de DCO solubilisée est le même pour une durée de traitement de 15 minutes ou de 50 minutes.

Par contre, la nature des boues a une influence non négligeable sur les effets du traitement thermique. Ainsi, les boues primaires étant déjà, naturellement, facilement biodégradables, le traitement thermique a peu d'effets additifs sur le caractère biodégradable de ces boues. Par contre, pour les boues activées, difficilement biodégradables, le traitement thermique est plus efficace (Haug *et al.*, 1978). D'après Pinnekamp (1989), plus la concentration initiale en matière organique est faible, plus l'augmentation de la production de biogaz est importante. Ainsi, les boues ayant une forte concentration en matière organique ont déjà un rendement méthane important qui ne peut être que faiblement amélioré par le traitement thermique (Bougrier, 2005).

En conclusion, le traitement thermique constitue une technologie de solubilisation des boues efficace puisque de nombreuses études ont montré qu'il est possible de solubiliser plus de 50% des boues. Cependant, après un traitement thermique à hautes températures, une fraction potentiellement significative est non biodégradable. Dans le cas de traitement à basses températures, la formation de composés réfractaires est moindre. En revanche, les taux maximums de réduction de production de boues obtenus en couplant un traitement thermique à un système boues activées ne sont pas supérieurs à ceux qui peuvent être obtenus par voie biologique après digestion anaérobie. Ce couplage présente néanmoins l'avantage de réduire la production de boues au niveau de la ligne eau, donc directement au niveau du bassin d'aération.

ii. Les autres techniques

D'autres méthodes physiques, telles que la congélation/décongélation, la décompression, les irradiations γ ou les champs électriques pulsés peuvent être envisagées dans le cadre de la désintégration des boues. La **congélation/décongélation** utilise les propriétés physiques de l'eau qui, lorsqu'elle passe sous la forme solide, augmente de volume. Lors de la congélation des boues, l'eau emprisonnée dans les floccs augmente de volume et les détruit. Leur contenu est alors dissous dans la suspension lors de la décongélation (Chu *et al.*, 1999). Même si une meilleure déshydratabilité a été constatée après traitement, cette méthode induit un coût énergétique très important. Le principe de la **décompression** est basé sur la mise en contact des boues avec du CO₂ supercritique. Le CO₂ se présente sous sa forme supercritique à des températures supérieures à 31°C et des pressions supérieures à 74 bars. Sous cette forme, il se comporte comme un liquide mais possède les propriétés d'un gaz. Il

diffuse alors dans les cellules et lorsque la pression est réduite, il repasse en phase gazeuse détruisant alors les membranes cellulaires (Rivard et Nagle, 1998). Le principe **des irradiations γ** consiste à irradier des boues en utilisant, en général, comme source du Cobalt 60. Ce type de traitement, initialement développé pour la pasteurisation, présente l'avantage de « décontaminer » les boues (Pérez-Elvira *et al.*, 2006). En revanche, aucune augmentation dans la production de biogaz n'a été mise en évidence suite à une irradiation γ des boues. Les **champs électriques pulsés** peuvent également être utilisés en tant que méthode physique de désintégration. Par cette technique, des impulsions électriques sont générées au sein même du flux de boues pour y créer des ondes de chocs. Lorsqu'un champ électrique très intense (de l'ordre de 10kV/cm) est appliqué à des cellules, le potentiel transmembranaire induit atteint une valeur critique, conduisant à la formation irréversible de pores dans les membranes cellulaires. Appliqué à la réduction de production de boues, ce type de traitement conduit à l'hydrolyse de la matière organique particulaire. Ainsi, Kopplow *et al.* (2004) ont utilisé les champs électriques pulsés sur des boues mixtes concentrées (40-50 g MS.L-1). Ce traitement (8 000 kJ.kg⁻¹ MS) a permis d'augmenter le taux de dégradation de la matière organique de 8% et d'augmenter la production de biogaz de 19%.

II. 2. e. Les traitements chimiques

L'hydrolyse de la matière organique, à savoir la réduction de la taille des chaînes moléculaires, peut également être réalisée par traitement chimique. Deux voies peuvent être envisagées : l'ajout de réactifs chimiques, basiques ou acides, ou l'oxydation des boues par l'ozone, le chlore ou le peroxyde d'hydrogène. Faisant l'objet d'une partie des travaux de cette thèse, le principe et les performances de l'ozonation seront tout d'abord détaillés. Les autres traitements chimiques seront ensuite plus brièvement décrits dans une seconde partie.

i. L'ozonation

L'ozone est une forme allotropique de l'oxygène. C'est une molécule formée de trois atomes d'oxygène dont le symbole est O₃. Dans les conditions usuelles d'utilisation, il est à l'état gazeux et soluble dans l'eau. C'est un oxydant puissant et donc chimiquement instable dans les mélanges gazeux et liquides. Ainsi, de nombreuses substances ou molécules provoquent sa dissociation en oxygène. L'effet chimique de l'ozone dissous sur de la matière organique en phase liquide dépend essentiellement de deux réactions distinctes qui

contribuent simultanément à l'oxydation de substances dissoutes, dont l'importance relative dépend des conditions du milieu :

- une **réaction directe** de la molécule d'ozone dissoute : de par ses formes de résonance, l'ozone peut agir comme un dipôle, un agent électrophile, et plus rarement comme un agent nucléophile. Ces réactions directes d'oxydation sont lentes et très sélectives : seules certaines structures chimiques (liaisons insaturées, cycles aromatiques, molécules azotées) peuvent réagir avec l'ozone moléculaire (Doré, 1989). Cette voie réactionnelle est favorisée par les pH acides et la présence de pièges à radicaux, comme les carbonates et les bicarbonates,

- une **réaction indirecte** : en solution aqueuse, l'ozone peut se décomposer en espèces radicalaires ($\text{OH}\cdot$, $\text{HO}_2\cdot$, $\cdot\text{O}_3^-$, $\cdot\text{O}_2^-$) en fonction des propriétés du liquide. Cette voie réactionnelle est favorisée par un milieu alcalin, par la présence de solutés difficilement oxydables et par la présence d'initiateurs de radicaux (UV, cations métalliques, ou peroxyde d'hydrogène).

La vocation des PRPB basés sur une hydrolyse de la matière particulaire est de désintégrer les boues afin de faciliter leur dégradation par les microorganismes épurateurs. Or, dans le cas de l'ozonation, cet oxydant puissant va d'une part solubiliser la matière particulaire (Bougrier *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2007), mais peut également, dans certains cas, conduire à une minéralisation de la matière (Déléris *et al.*, 2001, Zhao *et al.*, 2007). Les Figure 12.A et 12.B, issues des travaux publiés par Bougrier *et al.* (2007) et Zhao *et al.* (2007), illustrant ces deux phénomènes, sont données ici à titre d'exemples. En effet, en fonction des conditions de traitement, les taux de solubilisation et/ou de minéralisation varient fortement. Les boues étant des milieux hautement chargés en composés organiques, il est par conséquent très difficile de prévoir l'effet de l'ozone sur une matrice aussi complexe.

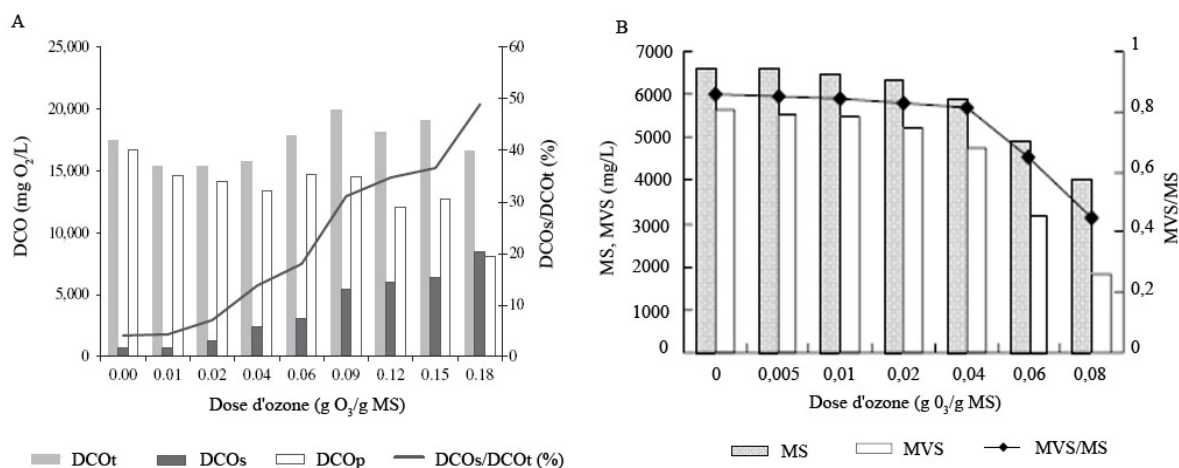


Figure 12 : Evolution de la concentration en DCO (A), MS et MVS (B).
 A : Suivi des différentes fractions de la DCO (DCOt, DCOp et DCOs) en fonction de la dose d'ozone appliquée, d'après Bougrier *et al.*, (2007) ; B : Suivi de la concentration en MS et MVS en fonction de la dose d'ozone appliquée, d'après Zhao *et al.* (2007).

Selon Paul et Debellefontaine (2007), les principaux facteurs ayant une influence sur les performances d'un traitement par ozonation sont le pH, la composition et la concentration de la boue à traiter, ainsi que la dose d'ozone appliquée. En effet, en fonction du pH, les mécanismes de l'ozonation sont susceptibles de différer, et la voie directe ou la voie indirecte sera privilégiée. Par rapport à la dose d'ozone à appliquer, les résultats issus de la littérature sont assez contradictoires. Cependant, selon Pérez-Elvira (2006), dans le cas du traitement des boues au niveau de la ligne eau (boues activées), des doses variant de 0,01 à 0,05 g O₃/g MS semblent préconisées. Dans le cas du traitement de boues au niveau de la ligne boues (en amont de la digestion anaérobie), des doses d'ozone plus importantes, comprises entre 0,05 et 0,5 g O₃/g MS, semblent plus appropriées. La dose d'ozone à appliquer est donc fonction de la concentration en MS des boues à traiter.

Des exemples des performances de l'ozonation, en terme de solubilisation et de minéralisation, sur des boues non concentrées sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Exemples d'application de l'ozonation en tant que traitement de désintégration des boues.

Type de boues	Dose (g O ₃ /g MS)	SOLUBILISATION		Minéralisation (%)	Références
		DCO _s (mg/L)	DCO _s /DCO _T (%)		
Liqueur mixte (MS = 4 g/L)	0,1	nd	10	nd	Ahn <i>et al.</i> (2002)
	0,2		18	5 ^(a)	
	0,5		25	20 ^(a)	
	1		30		
Boues activées (MES = 2,6 g/L)	0	20	0,65	-	Dogruel <i>et al.</i> (2007)
	0,0029	45	1,49	1,95 ^(a)	
	0,0043	80	2,73	5 ^(a)	
	0,0072	110	3,93	8,8 ^a	
	0,0086	185	6,95	13,35 ^(a)	
Liqueur mixte (MS = 6 g/L)	0,03	200	nd	aucune	Zhao <i>et al.</i> (2007)
	0,05	250			
	0,1	700			
	0,14	950			
	0,21	1100			
	0,28	1200			
Boues activées (MES = 2,6 g/L)	0	55	nd	-	Sievers et Schaefer (2007)
	0,0015	30		13,07 ^(b)	
	0,0025	50		13,07 ^(b)	
	0,0037	90		20,38 ^(b)	

nd : non déterminé

(a) Déterminé à partir du rapport entre la DCO_T finale et la DCO_T initiale

(b) Déterminé à partir des concentrations initiale et finale en MS

Un autre avantage de l'ozone, dans le cadre de son application aux boues, réside dans le fait que, de par son caractère oxydant relativement puissant, ce traitement permet de réduire la concentration de certains composés toxiques. Bernal (2005) a montré que l'ozonation des boues digérées permet d'éliminer environ 30% des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les boues d'épuration lorsqu'une dose d'ozone égale à 0,12 gO₃/gMS est appliquée.

Paul et Debellefontaine (2007) soulignent également le fait que la compétition entre la matière organique réfractaire et la matière organique biodégradable, la présence d'antioxydants « piègeurs » solubles, ainsi que les propriétés de transfert de l'ozone dans les boues sont d'autres facteurs clés de l'efficacité du traitement des boues par ozonation. De plus, selon Egemen *et al.* (2001), l'action de l'ozone serait plus importante sur la matière particulaire que sur la fraction soluble. Cependant, Sievers et Schaefer (2007) ont démontré

que lors de l'ozonation de boues non concentrées (2,6 g MS/L), la fraction soluble serait minéralisée avant que la fraction particulaire ne soit solubilisée pour une dose d'ozone inférieure à 0,0015 g O₃/g MS. Cette observation est particulièrement importante dans le sens où l'objectif des PRPB est de solubiliser la matière en vue d'une biodégradation ultérieure aérobie ou anaérobie. Il est par conséquent primordial de trouver les conditions optimales de traitement permettant de solubiliser au maximum la matière particulaire tout en évitant la minéralisation de la fraction soluble.

Par rapport à la biodégradabilité, Paul *et al.* (2007) ont montré, après ozonation de boues (1,5 g DCO/L) à une dose de 70 mg O₃ et 300 mg O₃, que la totalité de la DCO solubilisée suite au traitement était biodégradable (rapport de la DCO biodégradée sur la DCO solubilisée égal à 1) en conditions aérobies. Bougrier *et al.* (2007) ont observé une relation linéaire entre la dose d'ozone appliquée et la production de biogaz en conditions anaérobies, après traitement d'une boue à 16,1g MS/L pour des doses comprises entre 0,06 g O₃/g MS et 0,015 g O₃/g MS. Au-delà de cette dose, il semblerait que la production de biogaz ainsi que le taux d'élimination de la matière sèche diminuent en raison, probablement, de la formation de composés réfractaires au dessus d'une certaine dose d'ozone. En conditions aérobies, Dogruel *et al.* (2007) ont observé le meilleur taux de biodégradabilité, en terme de taux d'élimination des MS en fonction de la dose fournie, pour une dose de 0,004 g O₃/g MS appliquée à des boues activées dont la concentration en MS initiale était de 3,2 g/L.

Ces données bibliographiques ont permis de démontrer les capacités de l'ozone à solubiliser la matière organique particulaire et de répertorier les principaux mécanismes mis en jeu. Cependant, tout comme dans le cas de la sonication et du traitement thermique, les différents résultats publiés sont difficilement comparables étant donné le nombre important de facteurs influençant les performances du traitement.

ii. Autres techniques

D'autres méthodes sont envisageables dans le cadre de la réduction de production de boues par voie chimique : l'ajout de réactifs acides ou basiques, ou l'oxydation *via* des composés autres que l'ozone.

L'une des principales limites de l'ozonation (et d'autres techniques mécaniques ou physiques) est liée à son importante consommation énergétique et donc à son coût. Or, les

méthodes chimiques, basées sur l'**ajout de réactifs acides ou basiques**, demandent un investissement moindre. Parmi ces méthodes, même si l'hydrolyse acide (Smith et Göransson, 1992) a montré un fort potentiel en terme de solubilisation de la matière organique (de l'ordre de 50% de la fraction particulaire), elle est peu compatible avec un traitement biologique subséquent. Aussi, l'hydrolyse basique des boues apparaît comme une technologie plus appropriée. Kim *et al.* (2003) ont testé différents agents alcalins et ont conclu que l'emploi de la soude (NaOH) conduit au meilleur taux de solubilisation (environ 40% sur des boues activées dont la concentration en MS est de 38 g/L), en comparaison avec KOH, Mg (OH)₂ et Ca(OH)₂. Dans la plupart des résultats publiés, l'hydrolyse alcaline est associée à un traitement thermique, permettant ainsi d'augmenter significativement le taux de désintégration des boues (Neyens *et al.*, 2003). Cependant, Pérez-Elvira *et al.* (2006) soulignent que ce type de traitement, bien que financièrement avantageux, peut conduire à des modifications de la composition de la boue, générer des problèmes de corrosion et des mauvaises odeurs, ainsi qu'une mauvaise qualité de l'effluent final en raison de la formation de substances non biodégradables.

Les principaux oxydants autres que l'ozone, potentiellement applicables à la réduction de production de boues, sont le **chlore** et le **peroxyde d'hydrogène**. Par rapport à l'ozone, ces deux alternatives présentent l'intérêt d'être peu coûteuses. Peu de travaux sont publiés sur l'utilisation du chlore sur les boues, cependant, une réduction de la production de boues de l'ordre de 60% a été mise en évidence suite à un traitement réalisé sur boues activées (au niveau de la ligne eau) à une dose de 0,066g Cl₂/g MVS (Chen *et al.*, 2001). Mais selon Pérez-Elvira *et al.* (2006), la chloration des boues peut conduire à la formation de trihalométhanes et de chloramines, à la diminution de la décantabilité des boues ainsi qu'à une augmentation significative de la DCO de l'effluent. L'autre alternative consiste à oxyder les boues avec du peroxyde d'hydrogène (Murillo Murillo, 2004). Le peroxyde d'hydrogène présente généralement deux types de réactivité : une directe ou moléculaire et une indirecte ou radicalaire. Par la voie moléculaire, le peroxyde d'hydrogène réagit avec les substances polluantes par simples réactions d'oxydo-réduction. Cette voie est privilégiée par un pH basique et une forte température. Cependant, en milieu acide, le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec des molécules ayant un caractère nucléophile fort comme, par exemple, les acides ou les cétones (Murillo Murillo, 2004). Par la voie radicalaire, le pont peroxyde (O – O) peut, après rupture, conduire à la formation de radicaux libres OH• et HO₂•, plus réactifs que la

molécule de peroxyde d'hydrogène (Murillo Murillo, 2004). Cette voie réactionnelle est privilégiée par un pH acide et par la présence de composés difficilement oxydables ou de cations métalliques. De récents travaux mettent en évidence une solubilisation importante des boues, variable en fonction de la quantité de peroxyde d'hydrogène. Cependant, dans la plupart de ces travaux, le peroxyde d'hydrogène est utilisé en combinaison avec un traitement thermique, soit classique (Murillo Murillo, 2004, Camacho *et al.*, 2002), soit par micro-ondes (Wong *et al.* 2006, Yin *et al.*, 2007, Eskicioglu *et al.*, 2008). Par rapport à la solubilisation, Eskicioglu *et al.* (2008) rapportent que les concentrations en DCO, sucres, protéines et acides humiques dans la phase soluble sont plus importantes lorsque le traitement thermique est réalisé en présence de peroxyde d'hydrogène que lors du traitement thermique seul. En revanche, cette plus forte solubilisation, liée à la présence de peroxyde d'hydrogène, ne s'accompagne pas d'une augmentation de la production de biogaz. Selon ces auteurs, cette diminution de la biodégradabilité, contrastant avec l'augmentation du taux de solubilisation, s'expliquerait par la formation de composés réfractaires.

II. 2. f. Les traitements biologiques

Ces méthodes reposent sur l'utilisation d'enzymes spécifiques (hydrolases) capables d'hydrolyser la matière organique. Ces enzymes sont soit ajoutées directement dans le milieu (système de lyse bactérienne), soit produites par le système *via* l'ajout de souches microbiennes spécifiques (système d'autolyse).

La stratégie d'autolyse a été utilisée par Parmar *et al.* (2001). L'ajout d'un mélange de cellulases, protéases et lipases a permis de solubiliser 50% des MES et d'améliorer la décantabilité des boues. Selon eux, l'utilisation d'un mélange enzymatique est à privilégier puisqu'il permettrait une solubilisation plus importante que l'ajout d'une seule enzyme. De plus, plus la quantité d'enzymes est importante, et plus les effets de solubilisation sont notables.

Sakai *et al.* (2000) ont utilisé un système à boues activées conventionnel couplé à un digesteur aérobie thermophile appelé réacteur S-TE (Figure 13). Au cours de ce couplage, les boues en excès issues du système boues activées sont renvoyées au niveau du réacteur S-TE dans lequel elles sont solubilisées grâce à la présence de bactéries thermophiles aérobies (*Bacillus sp.*) et minéralisées par les bactéries mésophiles. La boue solubilisée retourne

ensuite dans le système « boues activées ». Sakai *et al.* (2000) ont montré une augmentation du taux d'élimination des MVS de l'ordre de 40% suite à ce traitement.

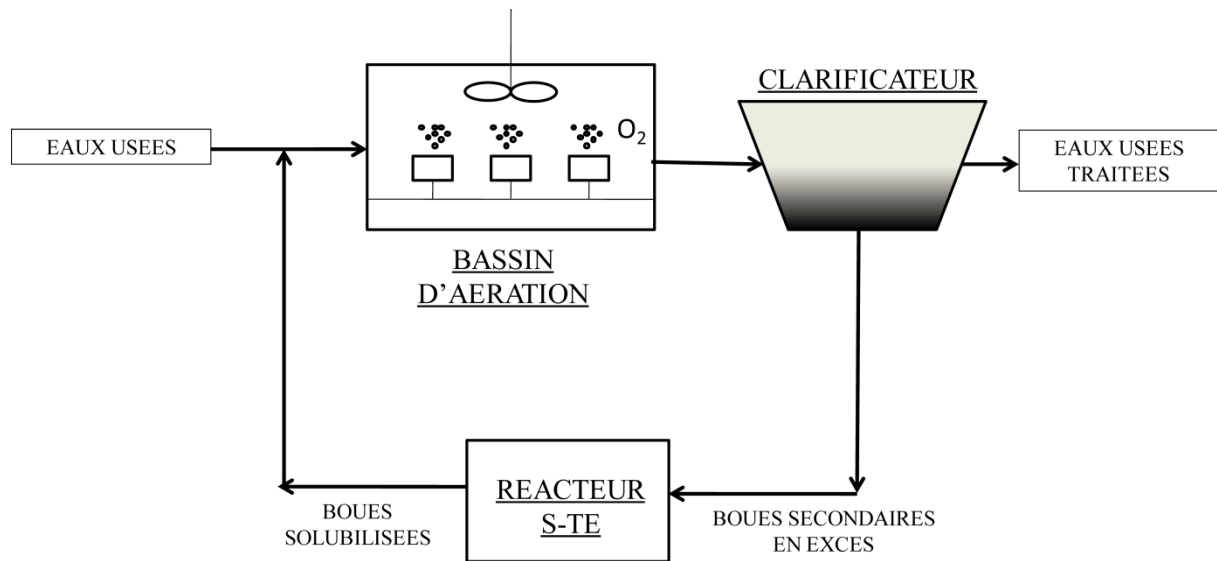


Figure 13 : Représentation schématique du procédé couplant un système à boues activées conventionnel et un digesteur aérobie thermophile développé par Sakai *et al.* (2000).

Le fort potentiel de l'hydrolyse enzymatique pour réduire la production de boues a été confirmé par le développement du système Biolysis[®]E par la société Shinko Pantec[™] (Japon). Ce système, aujourd'hui commercialisé par la société Ondéo Degrémont[™], met à profit l'activité hydrolytique thermophile de la souche bactérienne *Bacillus stearothermophilus* pour réduire la quantité de boues produite directement au niveau de la ligne eau (Figure 14). Dans ce procédé, les boues sont extraites du bassin biologique pour être épaissies avant leur introduction dans un réacteur thermophile enzymatique à 60°C en conditions microaérophiles. Dans de telles conditions, le développement de *Bacillus stearothermophilus* étant favorisé, aucun ajout d'enzymes supplémentaires n'est nécessaire. En fonction de la quantité de boues à traiter, ce système permet une réduction de la production de boues comprise entre 30% et 80% (Pérez-Elvira *et al.*, 2006).

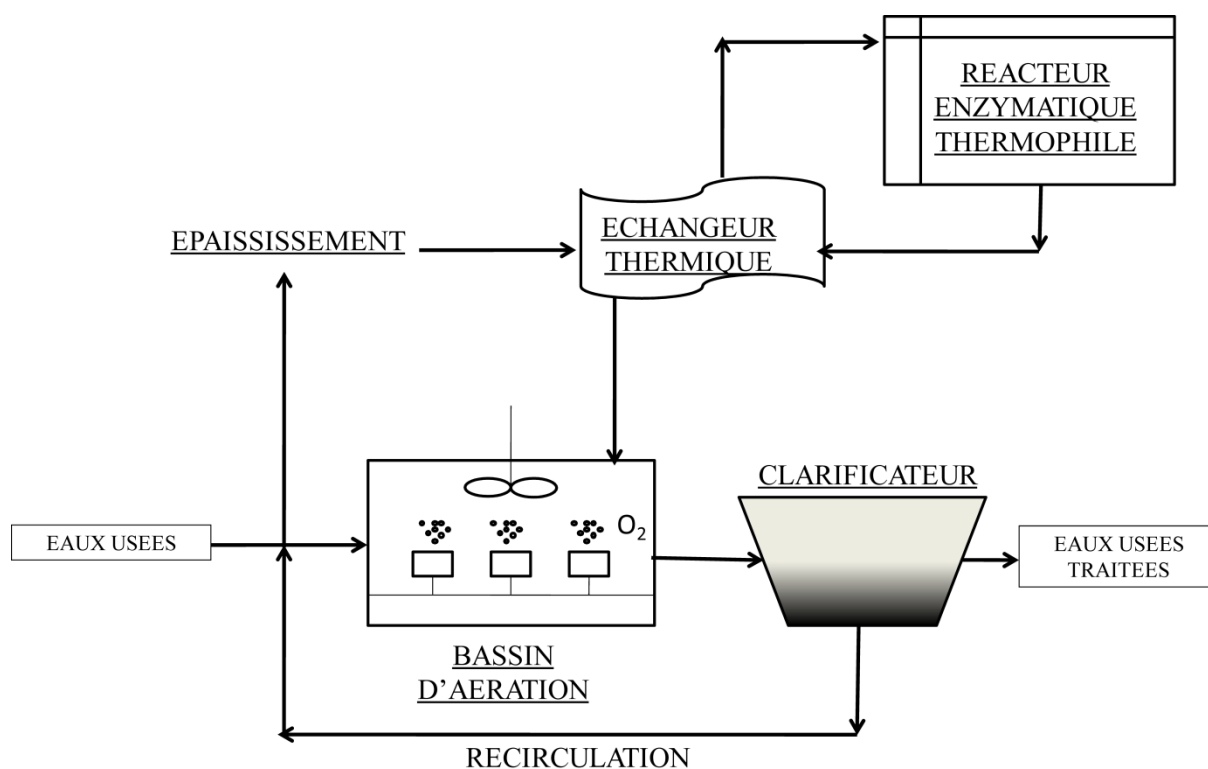


Figure 14 : Représentation schématique du procédé Biolysis®E (Ondéo Degrémont™).

Ainsi, l'hydrolyse biologique des boues a montré son fort potentiel autour de la problématique de la réduction de production de boues. Contrairement aux méthodes basées sur des procédés physiques ou mécaniques, sa mise en œuvre est peu coûteuse d'un point de vue énergétique. De plus, selon Pérez-Elvira *et al.* (2006), elle diminue la croissance des microorganismes filamenteux, conférant ainsi une meilleure décantabilité des boues. Cependant, ces mêmes auteurs soulignent une faible augmentation des concentrations en MS et DCO de l'effluent traité.

II. 2. g. Caractérisation des effets générés par les PRPB

Qu'elles soient fondées sur des principes physiques, mécaniques, biologiques ou chimiques, les méthodes de réduction de production globale de boues basées sur des procédés d'hydrolyse visent à désintégrer les boues biologiques afin de favoriser leur biodégradation. Comme cela a déjà été décrit dans la partie II. 2. a. , suite à ces traitements, les propriétés à la fois physiques, chimiques et biologiques des boues vont être modifiées. Selon Müller *et al.* (2004), ces modifications, plus ou moins importantes en fonction de la nature du traitement appliqué et de son intensité, sont liées à :

- une déstructuration des floccs et des cellules bactériennes (lyse cellulaire),
- un transfert de la matière particulaire vers la phase soluble,
- des conversions biochimiques ayant un impact direct sur la biodégradabilité des boues (aérobie et anaérobie).

L'impact de ces traitements de désintégration sur les boues doit donc être évalué selon ces différents critères.

Classiquement, le transfert de matière de la phase particulaire vers la phase soluble est caractérisé par le pourcentage de solubilisation S_{DCO} selon l'équation (2):

$$(2) \quad S_{DCO} = \frac{DCO_S}{DCO_T} \times 100$$

Avec : DCO_S : la DCO soluble de l'échantillon traité à t,
 DCO_T : la DCO totale de l'échantillon traité à t.

Même si cette méthode de calcul du pourcentage de solubilisation est utilisée par la grande majorité des auteurs, elle ne tient pas compte de la concentration en DCO soluble initiale (DCO_{S0}). C'est pourquoi le taux de solubilisation (TS_{DCO}), reflétant directement le transfert de matière de la phase particulaire vers la phase soluble, a été introduit (Bougrier, 2005) (équation 3).

$$(3) \quad TS_{DCO} = \frac{DCO_S - DCO_{S0}}{DCO_{P0}}$$

Avec : DCO_S : la DCO soluble de l'échantillon traité à t,
 DCO_{S0} : la DCO soluble de l'échantillon non traité (à t_0 ou t_1),
 DCO_{P0} : la DCO particulaire de l'échantillon non traité (à t_0 ou t_1).

Par ailleurs, Bougrier (2005) précise que cette formule s'applique de manière similaire aux autres composants (matière organique, azote, protéines, sucres) pour le calcul de leur taux de solubilisation.

Le niveau de solubilisation de la matière organique d'une boue, suite à un traitement donné, peut également être évalué par la détermination du degré de désintégration (DD_{DCO}) (Thiem *et al.*, 2001). Ce paramètre est basé sur la mesure de la DCO soluble de l'échantillon

avant et après traitement mais il prend également en compte la DCO soluble d'un échantillon traité à la soude dont la désintégration est supposée totale (DCO_{SNaOH}) selon l'équation (4):

$$(4) \quad DD_{DCO} = \frac{DCO_S - DCO_{SO}}{DCO_{SNaOH} - DCO_{SO}}$$

Avec : DCO_S : la DCO soluble de l'échantillon traité à t,
 DCO_{SO} : la DCO soluble de l'échantillon non traité (à t_0 ou t_{-1}),
 DCO_{SNaOH} : la DCO soluble de l'échantillon traité à la soude.

Parallèlement au suivi de la solubilisation en terme de DCO, la déstructuration des floccs peut être estimée par une analyse des particules de la boue (Gonze *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2003, Bougrier *et al.*, 2006), dont la taille est inversement proportionnelle à la concentration en matière soluble, comme le montrent Müller *et al.* (2004) (Figure 15). Cependant, la diversité des méthodes d'évaluation de la solubilisation d'une boue rend très difficile la comparaison des résultats issus de la bibliographie.

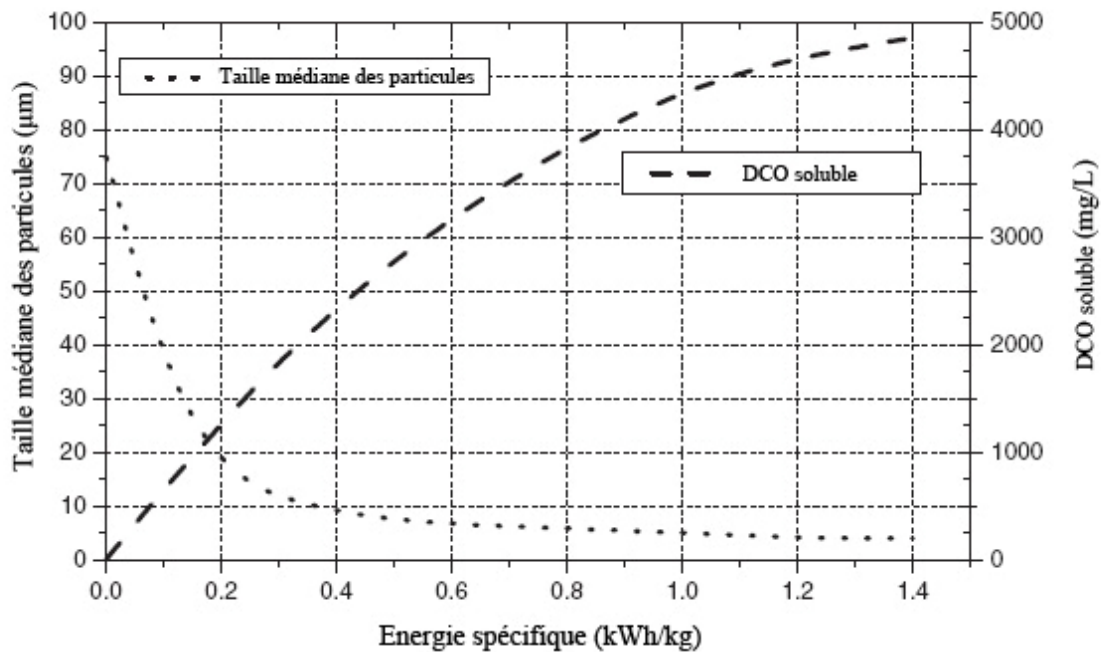


Figure 15 : Evolution de la taille des particules et de la concentration en DCO soluble en fonction de l'énergie spécifique appliquée au cours d'un traitement par sonication (d'après Müller *et al.*, 2004).

La réduction globale du volume de boue extraite étant l'association d'un procédé de dégradation et d'un processus de métabolisation, la biodégradabilité constitue un autre critère permettant d'évaluer l'impact des PRPB sur les boues. Selon Müller *et al.* (2004), au cours d'un traitement par désintégration, deux réactions contraires ont lieu : une diminution de la taille des molécules avec comme conséquence une augmentation de la biodégradabilité à laquelle s'oppose la formation de composés difficilement biodégradables et potentiellement toxiques pour les microorganismes (cas de la réaction de Maillard) conduisant à une diminution de la biodégradabilité des boues traitées. L'impact de ces traitements sur la biodégradabilité des boues est donc un facteur clé. La biodégradabilité d'un composé caractérise son aptitude à être dégradé par des microorganismes en sous-produits de structure différente. Ainsi, la biodégradation désigne la transformation biologique de substances organiques sous une autre forme. La complexité des phénomènes en jeu entraîne la formation de sous-produits divers dont certains sont biodégradables et de ce fait, facilement assimilés au cours d'un processus biologique. La biodégradation sera dite totale lorsque les molécules organiques seront totalement minéralisées sous la forme de composés dont la nature et la proportion dépendent du métabolisme suivi : CO_2 , CH_4 , NH_4^+ , H_2O , S_2^- dans le cas de la dégradation anaérobie et CO_2 , H_2O , NO_3^- , SO_4^{2-} dans le cas de la dégradation aérobie. D'autres composés, par contre, ne sont pas dégradés ou sont même toxiques vis-à-vis de la biomasse responsable du traitement biologique.

En conditions anaérobies, des tests de biodégradabilité peuvent être effectués en évaluant le Potentiel de Bio-Méthanisation (PBM) des échantillons (Eskicioglu *et al.*, 2006) dans des réacteurs de type batch. L'objectif de ces tests est de déterminer le potentiel de production de biogaz (CO_2 et CH_4) en cours d'incubation anaérobie et d'en déduire le taux de conversion du carbone.

En conditions aérobies, la biodégradabilité peut être estimée par la Demande Biologique en Oxygène (DBO). Le but de la DBO, exprimée en $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$, est de mesurer la quantité de matière organique (carbonée et azote organique dans le cas des boues) pouvant être consommée par la biomasse dans un échantillon. Le principe est de mesurer la quantité d'oxygène à apporter par litre d'échantillon pour dégrader par voie biochimique la pollution initiale. La réaction se déroule pendant 5 jours à 20 °C et à l'obscurité pour la DBO_5 . Cette valeur donne accès à la partie rapidement biodégradable de la matière organique carbonée. En

continuant la mesure au-delà de 5 jours, la partie lentement biodégradable de la matière organique va être prise en compte à son tour (Figure 16).

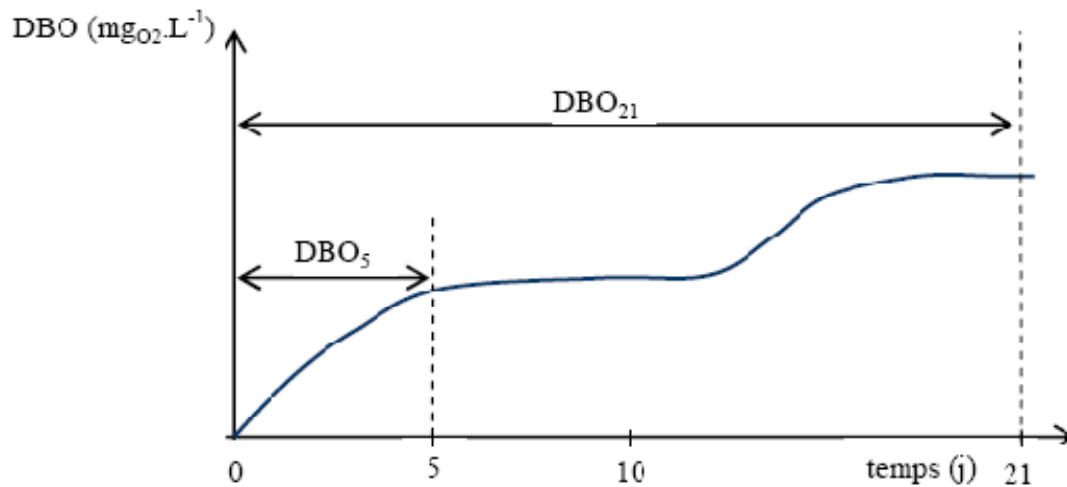


Figure 16 : Evolution temporelle théorique de la DBO.

On considère que la mesure obtenue au 21^{ème} jour prend en compte la totalité de la pollution accessible biologiquement présente dans l'échantillon. La méthode normalisée (AFNOR, NF T 90-103), établie en 1975, prévoit l'introduction, dans une eau de dilution saturée en oxygène, d'un volume d'échantillon tel que la consommation en oxygène au bout de cinq jours (à l'obscurité et à 20 °C) soit de l'ordre de 50 % de la teneur initiale. La DBO₅ est alors calculée à partir de la différence des concentrations initiale et finale et du facteur de dilution. Par son principe et son mode opératoire, de nombreuses critiques ont été émises sur cette méthode du fait de l'impossibilité de suivre au cours du temps la concentration en oxygène, mais aussi de sa mauvaise reproductibilité analytique (imprécision du résultat). Cependant, en raison de l'importance de l'information apportée par cette mesure, plusieurs méthodes alternatives ont vu le jour, notamment au travers des techniques respirométriques, pour être utilisées aussi bien dans un cadre industriel qu'en recherche. Des appareils ont ainsi été spécialement conçus pour la mesure de la DBO : ils mesurent l'évolution de la pression à l'intérieur d'un flacon contenant l'échantillon, cette évolution étant directement liée à la diminution de la concentration en oxygène. Des biocapteurs commencent également à être développés (Rastogi *et al.*, 2003, Kwok *et al.*, 2005) mais les inconvénients associés (coût, entretien, faible durée de vie) limitent leur utilisation.

Ainsi, même s'il est difficile de comparer les résultats issus de la littérature en raison de la diversité des conditions de traitement appliquées et des méthodes de caractérisation employées par les auteurs, les modifications chimiques et physiques induites par les PRPB sont de mieux en mieux documentées et connues. En revanche, les connaissances sur les effets biologiques des traitements de désintégration restent relativement imprécis en raison, essentiellement, de l'absence d'outils méthodologiques. Comme cela a été décrit dans le paragraphe II. 1. f. , l'objectif des PRPB est de solubiliser et de libérer le matériel intra et extracellulaire afin de favoriser la dépollution organique par les microorganismes. La lyse cellulaire conduit à une « fuite » du contenu intracellulaire qui pourra ensuite être réutilisé en tant que substrat carboné par la population microbienne (croissance cryptique) (Wei *et al.*, 2003, Ødegaard, 2004, Pérez-Elvira *et al.*, 2006). Il est donc essentiel d'évaluer les effets biologiques provoqués par les PRPB. Pour cela, dans la plupart des études, la lyse bactérienne est mise en évidence par l'augmentation de la concentration en matières solubles : DCO (Thiem *et al.*, 2001, Show *et al.*, 2007), protéines, sucres ou ADN (Wang *et al.*, 2006, Zhang, *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2007). Or, il est important de rappeler que, de par la composition des SPE (cf I. 3. b.), l'augmentation de la concentration en DCO, protéines, sucres et ADN dans la phase soluble peut être issue des SPE et/ou des cellules. En effet, cette seule mesure ne permet pas de déterminer précisément l'origine de la matière organique solubilisée, et donc de déterminer s'il s'agit de matériel intracellulaire issu de la lyse bactérienne et/ou de matériel extracellulaire issu d'une déstructuration des SPE. Les effets biologiques des PRPB peuvent également être évalués par une énumération des microorganismes par techniques culturales avant et après traitement. Par cette méthode, Chu *et al.* (2001) ont étudié les effets de la sonication sur la population bactérienne. Le suivi de l'activité biologique après un traitement peut aussi être réalisé *via* l'analyse en continu de la vitesse de consommation de l'oxygène (OUR, « Oxygen Uptake Rate »). Fondée sur une mesure globale d'activité (cf III. 2. b.), cette méthode est, actuellement, la plus utilisée pour caractériser les modifications de l'activité biologique induites par les PRPB (Dziurla *et al.*, 2005, Sears *et al.*, 2005, Khanal *et al.*, 2007, Paul et Debellefontaine, 2007), d'autant plus que les techniques culturales ne permettent pas d'énumérer les microorganismes viables non cultivables dont la présence est fréquente dans des milieux tels que les boues activées. Ceci est d'autant plus vrai lorsque la population microbienne est soumise à un stress (cf III. 1. c.).

III. BIOMASSE MICROBIENNE ET MÉTHODOLOGIES D'ANALYSE

Les phénomènes biologiques impliqués dans l'épuration des effluents font appel à des systèmes microbiens complexes, qu'il est nécessaire de caractériser tout autant que les paramètres environnementaux qui conditionnent leur activité biologique. En vue de mieux comprendre et ainsi de mieux prévoir le comportement des microorganismes présents dans les divers écosystèmes, de nouvelles approches basées soit sur une analyse globale, soit sur une analyse « individuelle » des microorganismes se développent. Cette troisième partie a donc pour objectif de dresser un aperçu des différentes méthodes existantes, des plus standards aux plus abouties, utilisées pour estimer la biomasse.

III. 1. Les méthodes de référence

III. 1. a. Les matières volatiles en suspension (MVS)

Très souvent, dans le traitement des eaux usées, la biomasse d'un système est assimilée aux matières volatiles en suspension (MVS). La biomasse est alors séparée du milieu de culture par centrifugation ou filtration puis pesée après déshydratation à 550°C de l'échantillon. Cette mesure comprend l'intégralité des microorganismes, mais également une fraction de matière organique non microbienne. Bien que sa détermination soit très facile et rapide à mettre en œuvre, la concentration en MVS ne donne qu'une valeur approximative de la concentration de la biomasse (Madrid et Felice, 2002).

III. 1. b. Le biovolume

La biomasse peut également être estimée à partir de l'abondance bactérienne et du contenu cellulaire bactérien en carbone ; on parle alors de biovolume. Dans ce cas, la biomasse bactérienne est exprimée en terme de DCO selon l'équation (5), d'après Münch et Pollard, (1997) :

$$(5) \text{ Biomasse}_{(DCO)} = C_{\text{cellules}} \times i_{\text{DCO/cellule}}$$

Avec :

$$C_{\text{cellules}} = \text{Nombre de cellules totales}$$

$$i_{\text{DCO/cellule}} = \text{DCO (mg) contenue par cellule}$$

La corrélation entre ces deux paramètres (analyses quantitative et qualitative des microorganismes et DCO) a suscité et justifie encore de nombreuses études. La conversion des concentrations bactériennes en biomasse bactérienne (DCO) nécessite de connaître, d'une part, la concentration totale en microorganismes et, d'autre part, la DCO contenue dans une cellule. La DCO contenue dans une cellule est estimée théoriquement à partir du volume cellulaire et du contenu en carbone d'une bactérie, soit 53,1% de son poids sec total si l'on considère que sa composition est $C_5H_7NO_2$.

Les estimations du contenu cellulaire bactérien diffèrent selon les auteurs et les résultats paraissent encore assez contradictoires. Les mesures de biovolume varient fortement selon les données bibliographiques (Tableau 5). Ces divergences peuvent être liées d'une part aux difficultés méthodologiques et d'autre part à des variations naturelles du contenu en carbone en fonction de l'espèce bactérienne et de son état nutritionnel (Vrede *et al.*, 2002).

Tableau 5 : Biovolumes cellulaires et contenus en carbone cellulaire obtenus à partir de différents milieux naturels.

Références bibliographiques	Facteur de conversion (fg C μm^{-3})	Volume cellulaire (μm^3)	Milieu
	Moyenne (gamme)	Moyenne (gamme)	
Björnsen P.K. (1986)	354 (180-730)	0.195 (0.08-0.338)	Planctonique
Björnsen P.K. et Kuparinen (1991)	400	0.120 (0.076-0.165)	Planctonique
Bloem J. <i>et al.</i> (1995)	196 (139-287)	(0.25-0.41)	Sol
Borsheim K.Y. <i>et al.</i> (1990)	300	0.084	Planctonique
Kroer N. (1994)	720	(0.001-2.379)	Planctonique
Lee et Fuhrman (1987)	380 (210-600)	0.056 (0.036-0.073)	Planctonique
Simon et Azam (1989)	(20-150)	(0.026-0.40)	Planctonique
Andreottola <i>et al.</i> (2002)	310	0.43 (0.35-0.50)	Boues activées
Vollersten <i>et al.</i> (2001)	0.37 g DCO (ml cell ⁻¹)	0.321	Eaux usées
Munch et Pollard (1997)	196	0.39	Eaux usées

III. 1. c. Les techniques culturales

Le dénombrement des microorganismes sur milieux de culture est basé sur leur capacité à se multiplier sur un milieu synthétique, dans des conditions nutritionnelles et physiques adaptées. Cette approche de la microbiologie dite « classique », mise au point par Robert Koch (1843-1910), a fondé les bases de nos connaissances actuelles sur la microbiologie. Cependant, avec l'émergence des méthodes moléculaires, les limites des techniques culturales sont très vite apparues. En effet, des écarts de concentrations bactériennes importants ont été observés entre le dénombrement des microorganismes au microscope et par culture (Aman *et al.*, 1995, Wallner *et al.*, 1995, Wagner *et al.*, 1993). Les données actuelles fournies par la biologie moléculaire permettent d'estimer que la fraction cultivable ne représente que de 0,001 à 15% de la population totale (Tableau 6).

Tableau 6 : Fraction de microorganismes cultivables en fonction de leur habitat, d'après Aman *et al.*, (1995).

<i>Habitats</i>	<i>Cultivabilité (%)^a</i>
Eau de mer	0,001-0,1
Eau douce	0,25
Lac mésotrophique	0,1-1
Eaux d'estuaires non polluées	0,1-3
Boues activées	1-15
Sédiments	0,25
Sols	0,3

^a Pourcentage d'Unités Formant des Colonies (UFC) (cellules cultivables) par rapport au nombre total de cellules dénombrées par comptage direct au microscope.

Les différences observées varient en fonction de l'écosystème étudié et peuvent être attribuées à 2 facteurs principaux :

- les difficultés à reproduire les conditions de milieu appropriées, notamment la difficulté à reproduire les relations syntrophiques qui peuvent exister et l'ensemble des paramètres environnementaux,
- une dormance ou un état viable mais non cultivable (Roszak and Colwell, 1987), qui concerne des cellules bactériennes ayant perdu leur capacité à se multiplier mais présentant toujours une activité cellulaire potentielle.

III. 2. Méthodes de mesure globale de la biomasse

La biomasse d'un système peut également être quantifiée par la mesure de composés spécifiques de la cellule bactérienne : soit des composants cellulaires, soit des activités enzymatiques. Ces méthodes n'étant pas fondées sur une analyse individuelle des cellules, on parle alors de mesure globale de la biomasse.

III. 2. a. Dosage des constituants cellulaires

Ces méthodes ont pour objectif de doser un type de constituant cellulaire afin d'extrapoler cette quantification en biomasse bactérienne. Cependant, pour que ce type de méthode soit applicable, il est nécessaire que le constituant en question soit en quantité suffisante pour permettre un dosage précis et qu'il soit rapidement dégradé après la mort de la cellule afin de ne témoigner que de la biomasse vivante (Madrid et Felice, 2002).

i. Dosage de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP)

L'ATP est un intermédiaire énergétique majeur qui présente l'avantage d'être hydrolysé rapidement à la mort des cellules. De plus, de par son rôle biochimique, il est présent chez tous les microorganismes, ce qui laisse à penser qu'il constitue un bon traducteur de la biomasse vivante. Il est dosé par la bioluminescence résultant de l'action enzymatique de la luciférase sur un substrat, la luciférine, après son activation par l'ATP. L'émission lumineuse, mesurable par photométrie, est ainsi proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans l'échantillon (Hodson *et al.*, 1996). Cependant, selon Madrid et Felice (2005), il semblerait que la teneur en ATP soit variable en fonction de l'espèce bactérienne considérée et en fonction de l'état physiologique des microorganismes. Le dosage des nucléosides tels que l'ATP, l'ADP ou l'AMP semblerait donc plus approprié. Ces auteurs soulignent également le fait que la présence d'ATPases ou de kinases libres pourrait fausser les résultats par une hydrolyse de l'ATP.

ii. Dosage des constituants de la membrane

L'acide muramique est un constituant spécifique des parois bactériennes qui peut être dosé, après extraction, par chromatographie en phase gazeuse-liquide (Moriarty, 1977). Cependant, la quantité d'acide muramique est très variable d'une espèce bactérienne à l'autre, particulièrement entre les bactéries à Gram+ et les bactéries à Gram-. Cette méthode ne semble donc pas réellement adaptée à l'étude des microorganismes présents dans les boues

activées étant donné la diversité bactérienne de ce milieu. De même, les phospholipides, constituants majoritaires des membranes bactériennes, peuvent être utilisés en tant que « biomarqueurs » en écologie microbienne (Frostegard *et al.*, 1996). Mais, tout comme l'acide muramique, leur concentration varie considérablement selon l'espèce bactérienne considérée.

III. 2. b. Estimation de l'activité bactérienne globale

Dans les écosystèmes liquides, la majeure partie de la matière organique est présente sous forme de molécules à haut poids moléculaire qui ne peuvent être directement assimilées par les bactéries (I. 2. a.). De fait, l'hydrolyse de ces substrats à l'extérieur des cellules est nécessaire. Pour cela, les bactéries possèdent à leur surface des exoenzymes. Il est donc possible, par la mesure de ces activités enzymatiques, d'estimer la quantité globale de biomasse active (Laurent et Servais, 1995). On parle alors de mesure de **l'activité exoprotéolytique potentielle** (AEP). Elle peut être mesurée par l'utilisation de substrats synthétiques spécifiques de ces activités (peptidase, glucosidase, lipase ou phosphatase). La coloration ou la fluorescence issue de l'hydrolyse de ces substrats peut ensuite être mesurée en spectrophotométrie ou fluorométrie, respectivement (Li et Chrost, 2006).

La biomasse peut également être estimée par le suivi de l'**activité respiratoire** d'un échantillon. Les microorganismes de la boue activée obtiennent de l'énergie pour leur croissance et leur maintien à partir de l'oxydation du substrat. Dans ce processus de «respiration», les électrons issus du substrat entrent dans la chaîne de transport d'électrons vers un accepteur final d'électrons. Dans un environnement aérobie, l'accepteur final est l'oxygène moléculaire. Par conséquent, la consommation d'oxygène est directement liée à la croissance de la biomasse et à l'élimination du substrat. Le niveau de respiration peut être mis en évidence par différentes méthodes (Lebonté, 2003). Il peut être suivi *via* l'incorporation de sels de tétrazolium. Ces composés, accepteurs artificiels d'électrons, permettent un suivi des systèmes enzymatiques oxydatifs puisqu'ils sont réduits en formazan par la chaîne respiratoire des microorganismes lorsque celle-ci est active. Le formazan produit peut ensuite être mis en évidence soit par spectrophotométrie dans le cas du 2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide (XTT) (Bensaid *et al.*, 2000, Meletiadis *et al.*, 2001) ou du 2,3,5-Triphenyl-tétrazolium chloride (TTC) (Wang *et al.*, 2008), soit par analyse de la fluorescence dans le cas du 5-cyano-2,3-tolyl-tétrazolium chloride (CTC) (Nielsen *et al.*, 2003).

La respiration cellulaire peut également être mesurée par respirométrie. Les respiromètres sont divisés en deux catégories :

- les respiromètres manométriques : ils sont principalement conçus pour déterminer la Demande Biochimique en Oxygène (DBO) de l'eau usée et d'autres milieux même si certains sont capables de mesurer la vitesse de respiration telle quelle (Hales *et al.*, 1996),
- les respiromètres avec sonde de mesure d'oxygène : ils mesurent la concentration en oxygène dissous. La vitesse de respiration est alors calculée à partir d'une dérivation du signal et/ou du bilan de consommation de l'oxygène (Gernaey *et al.*, 2001).

Les techniques précédemment décrites pour caractériser la biomasse d'un échantillon ne donnent qu'une vue restreinte de la diversité et de l'activité microbienne. En effet, étudier les bactéries dans un milieu naturel nécessite non seulement de les quantifier et d'estimer leur activité globale mais aussi de les caractériser grâce à leurs propriétés morphologiques, physiologiques et/ou taxonomiques. C'est pour permettre cette analyse à l'échelle cellulaire que de nouveaux outils méthodologiques ont été proposés à partir de la fin des années 1980. Ces méthodes sont fondées, non plus sur une analyse globale de la biomasse, mais sur une approche à l'échelle cellulaire couplée à des techniques de comptage direct des microorganismes.

III. 3. Les méthodes moléculaires

L'identification des microorganismes par les méthodes moléculaires est apparue dans les années 1960-1970 suite au développement des outils de biologie moléculaire et aux progrès effectués en phylogénie moléculaire (Zuckerland et Pauling, 1965). Ces nouvelles méthodes ont alors permis d'avoir accès aux gènes et à leur séquence nucléotidique, notamment par l'amplification ciblée d'ADN *in vitro* par PCR (Polymerisation Chain Reaction). Les approches moléculaires se sont ainsi imposées car elles permettent non seulement d'identifier rapidement une bactérie déjà connue, mais aussi de reconnaître aisément une nouvelle bactérie, ou également de décrire la diversité microbienne d'un échantillon sans passer par une étape de culture. L'amplification de séquences génétiques par PCR, l'utilisation de l'ARNr 16S comme marqueur moléculaire d'une espèce bactérienne

donnée, ainsi que l'enrichissement croissant des bases de données par le séquençage des microorganismes ont permis de dresser des inventaires moléculaires des populations bactériennes des écosystèmes. Outre l'enrichissement de nos connaissances sur les écosystèmes microbiens jusqu'alors limitées, ces inventaires moléculaires ont permis le développement d'outils moléculaires de suivi de la dynamique des communautés microbiennes. De nombreuses méthodes de biologie moléculaire utilisées en écologie microbienne ont été décrites dans la littérature. Cependant, dans ce paragraphe, nous ne présenterons que les méthodes déjà appliquées au traitement biologique des eaux usées. Parmi elles, les plus employées sont le **clonage et le séquençage des ADN ribosomiques** (ADNr), la **DGGE** (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et l'**hybridation *in situ*** (Fluorescence « *In Situ* » Hybridization ou FISH).

Le clonage et le séquençage des ARNr font partie des premières méthodes à avoir été employées pour s'affranchir de toute étape de culture. Elles consistent à extraire l'ADN ou l'ARN total de l'échantillon, à amplifier spécifiquement les gènes codant pour l'ARNr, puis à cloner le produit d'amplification et enfin, à séquencer et à analyser les clones de la banque. Le choix de travailler sur l'ARNr, et particulièrement l'ARNr 16S, est motivé par le fait que sa présence est abondante et universelle et que cette molécule contient des régions hautement conservées. A titre d'exemple, on peut citer Egli *et al.* (2003) qui ont étudié les communautés microbiennes présentes dans un procédé à disque rotatif, dans le cadre du traitement d'eaux usées contaminées par l'ammonium, par clonage et séquençage des différents ARNr 16S. Chen *et al.* (2004) ont mis en évidence, par l'approche du clonage également, les différents microorganismes impliqués dans la dégradation du polyéthylène téréphtalate dans un réacteur hybride en conditions anaérobies et thermophiles. Ces exemples de travaux, mettant en évidence des changements significatifs de la communauté bactérienne suite à différents stress, illustrent parfaitement la sensibilité de cette méthode.

Le clonage, le séquençage et la construction de banques d'ARNr 16S ont également conduit au développement d'outils moléculaires supplémentaires dans le but de suivre plus précisément les écosystèmes microbiens dans leur dynamique structurale. Parmi ces méthodes, on distingue celles basées sur l'hybridation de sondes nucléiques (FISH) et celles basées sur l'analyse de fragments d'ADN telle que la DGGE.

A la différence des techniques d'analyse par extraction et séquençage de l'ARNr 16S, l'utilisation des sondes nucléiques permet d'accéder individuellement à chaque cellule. Cette technique, qui implique la formation d'un duplex entre une sonde nucléique et l'ARNr cible, est réalisée aussi bien sur de l'ADN fixé sur membrane (Dot Plot), que sur des colonies isolées ou des échantillons naturels (hybridation *in situ*). Pour marquer la sonde, on utilise soit des radioéléments, soit des marqueurs fluorescents (FISH). A la différence des hybridations sur colonie ou sur membrane, les hybridations *in situ* permettent d'accéder directement à l'ARNr sans endommager la structure pariétale de la cellule et donc d'accéder, en plus du caractère phylogénétique spécifique à la sonde, à un caractère métabolique (Sanz et Köchling, 2007, Aman *et al.*, 1990). Ainsi, de par ses nombreuses applications, la découverte de la méthode FISH a constitué une véritable révolution dans le domaine de l'exploration du traitement des eaux usées. Par exemple, cette méthode a permis une meilleure compréhension de certains dysfonctionnements biologiques lors de l'épuration des eaux usées, tel que le « bulking » et le moussage, grâce à la caractérisation des bactéries filamenteuses qui en sont à l'origine (De los Reyes *et al.*, 1998, Van der Waarde *et al.*, 1998). De même, cette approche a permis de mieux comprendre le rôle de certaines espèces bactériennes telles que *Nitrosococcus* (oxydant l'azote en nitrites) et *Nitrospira* (oxydant les nitrites en nitrates) dans les procédés de nitrification (Daims *et al.*, 2001).

D'autres techniques permettent de réaliser rapidement, par électrophorèse de fragments d'ADNr préalablement amplifiés par PCR, une empreinte moléculaire des communautés microbiennes présentes dans un écosystème. Parmi celles-ci, une des plus utilisées dans le traitement des eaux usées est la DGGE. Le principe de cette méthode est fondé sur la séparation d'un double brin d'ADN sous l'action d'un dénaturant. Lors de l'électrophorèse, les fragments d'ADN double brin migrent tout d'abord en fonction de leur taille jusqu'à des conditions suffisamment dénaturantes, où leur migration est ralentie. L'identification est réalisée par découpage et séquençage des bandes obtenues ou par hybridation sur le gel d'électrophorèse à l'aide de sondes spécifiques. Récemment, Xing *et al.* (2005) ont suivi, par cette approche, la communauté microbienne impliquée dans la production d'hydrogène. Ils ont mis en évidence des interactions de type mutualisme entre différentes espèces bactériennes dont le rôle est prédominant dans la production d'hydrogène.

Tableau 7 : Avantages et inconvénients des principales méthodes moléculaires utilisées pour la caractérisation des procédés de traitement des eaux usées, d'après Sanz et Köchling (2007).

<u>Méthodes</u>	<u>Principaux avantages</u>	<u>Principaux inconvénients</u>
Clonage Séquençage	<p>Permet des études taxonomiques et phylogénétiques très précises.</p> <p>Permet l'élaboration ultérieure de sondes spécifiques.</p> <p>Identification de la plupart des microorganismes présents dans l'écosystème (même si l'espèce est minoritaire, et si elle n'a pas encore été identifiée).</p>	<p>Très longue et fastidieuse donc inapplicable dans le cas d'échantillons multiples.</p> <p>L'extraction de la totalité de l'ADN peut être difficile dans certains milieux (sol, sédiments) .</p> <p>Non quantitative.</p>
FISH	<p>Simple et rapide si les sondes spécifiques sont disponibles.</p> <p>Visualisation directe des microorganismes non cultivables.</p> <p>Quantification possible.</p> <p>Corrélable à l'activité enzymatique dans certaines conditions.</p> <p>Application en routine possible.</p>	<p>Connaissance préalable des microorganismes à étudier.</p> <p>L'élaboration de sondes spécifiques de certains microorganismes n'est pas toujours possible.</p> <p>Dans certains cas la quantification est longue et fastidieuse.</p> <p>Visualisation difficile et peu précise dans le cas d'agrégats cellulaires.</p>
DGGE	<p>Méthode très sensible.</p> <p>En routine, la mise en œuvre est simple et ne requière pas l'emploi de radioéléments.</p> <p>Les fragments de PCR, après migration peuvent être récupérés et séquencés.</p>	<p>La phase de mise au point peut être longue.</p> <p>L'extraction de l'ADN peut être délicate.</p> <p>Un appareillage spécifique et coûteux est préconisé.</p> <p>Le séquençage est limité à 400 pb.</p> <p>Certaines séquences sont difficilement analysables (régions riches en bases G-C).</p>

Quelques exemples démontrent le potentiel des techniques moléculaires par rapport aux méthodes de référence ou de mesure globale de la biomasse (Tableau 7). Cependant, comme toute technique, elles peuvent présenter des biais liés aux limitations méthodologiques. De plus, même si la détection d'ADN ou d'ARN spécifique d'une espèce bactérienne peut être utilisée en tant qu'indicateur biologique, il ne s'agit que d'une méthode indirecte. L'ADN et l'ARN pouvant persister longtemps dans un milieu en fonction des

conditions environnementales, il est très difficile de corrélérer la présence d'acides nucléiques avec une quelconque activité (Keer et Birch, 2003).

III. 4. Les méthodes d'analyse directes *via* des substrats fluorogènes

Parallèlement à l'émergence des outils moléculaires de nouvelles méthodes, basées sur l'utilisation de fluorochromes spécifiques d'activités métaboliques sont apparues (Veal *et al.*, 2000, Joux et Lebaron, 2000, Nebe von Caron *et al.*, 2000). L'utilisation de sondes fluorescentes employées en combinaison avec des techniques de comptage appropriées permet aujourd'hui une meilleure compréhension des activités métaboliques impliquées dans divers processus biologiques. Le but de cette partie est de présenter ces différents substrats fluorogènes ainsi que les méthodes de comptage associées. Ces substrats sont utilisés en tant que marqueurs de viabilité et/ou d'activité. Le concept de viabilité cellulaire étant difficile à appréhender, la première partie de ce chapitre s'attachera à définir cette notion.

III. 4. a. Viabilité bactérienne

La définition stricte d'une cellule viable est aujourd'hui encore très controversée, pour des raisons à la fois sémantiques, philosophiques et méthodologiques. Suite à un changement de ses conditions de vie, un microorganisme se défend. Bien qu'un stress trop important entraîne la mort de la cellule, entre l'état non stressé et la mort, un certain nombre d'états physiologiques différents peuvent naître. Le passage d'un état physiologique à un autre est conditionné par le degré de stress imposé par les conditions environnementales. Pendant longtemps, la définition de la viabilité s'est limitée à l'aptitude des bactéries à se multiplier jusqu'à ce que l'état Viable Non Cultivable (VNC) soit clairement établi (Xu *et al.*, 1982). Depuis, le débat sur la viabilité cellulaire perdure. En 1998, Kell *et al.* résumant les différents états de vie d'une cellule bactérienne. Selon eux, il est possible de distinguer les états physiologiques suivants : viable cultivable, en dormance, Actif mais Non Cultivable (ANC) et mort. Ainsi, une cellule VNC n'est pas une cellule en dormance. Une cellule en état VNC est métaboliquement active, mais non cultivable. Au contraire, une cellule dormante donne une réponse négative aux essais vitaux mais est pourtant capable d'être « potentiellement » cultivée. Le cœur du problème est essentiellement méthodologique, dans le sens où le « retour à la vie » des bactéries, c'est à dire le recouvrement de la division cellulaire, reste hypothétique et ne peut, pour l'instant, être mis en évidence. En l'absence d'outils méthodologiques, le débat scientifique devient alors philosophique... En 2000, Nebe von

Caron *et al.* apportent des précisions supplémentaires et s'appuient sur l'intégrité membranaire en tant que critère de viabilité. En effet, dans la mesure où la perte de l'intégrité des membranes aboutit à l'effondrement des mécanismes énergétiques et des transports actifs, cette perte d'intégrité signifie la mort de la cellule. Au contraire, une cellule dont l'intégrité membranaire est intacte peut être considérée comme une cellule viable, ce qui englobe les états actifs (présence d'activités métaboliques) et inactifs (absence d'activités enzymatiques ou métaboliques décelables).

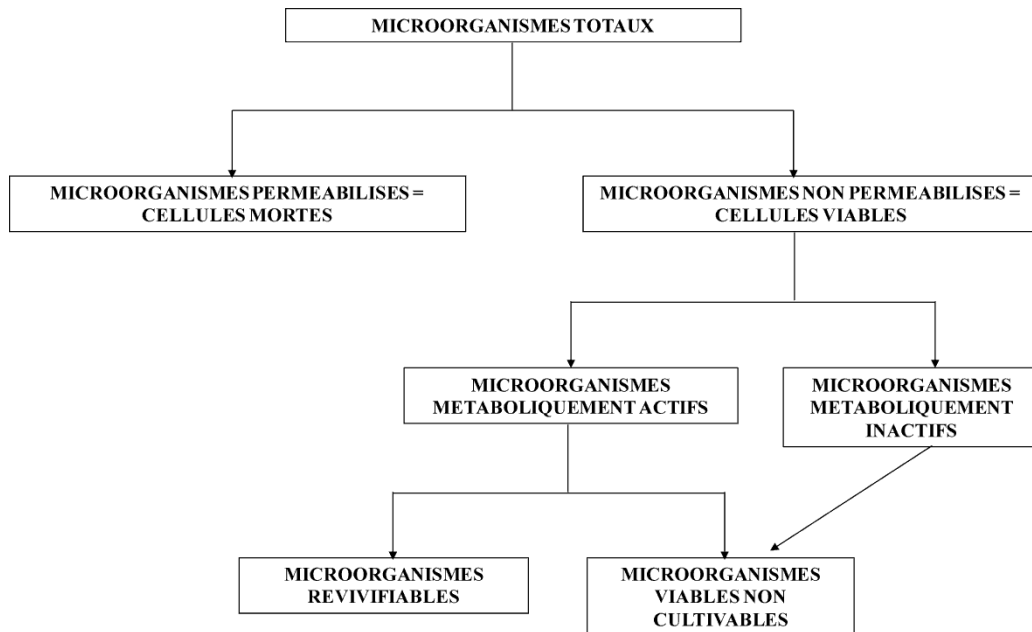


Figure 17 : Concept de viabilité des microorganismes.

Ainsi, dans la suite de ce manuscrit, une cellule présentant une membrane intègre sera considérée comme viable, alors qu'une cellule perméabilisée sera assimilée à une cellule morte. Au sein de la population viable, on distinguera les cellules métaboliquement actives et inactives, ainsi que les cellules cultivables et non cultivables (Figure 17).

III. 4. b. Les sondes fluorescentes

A la différence des méthodes fondées sur une estimation globale de la biomasse, l'utilisation de sondes fluorescentes permet une analyse potentiellement multiparamétrique à l'échelle cellulaire. De nombreux fluorochromes permettant d'accéder aux différents états physiologiques des microorganismes sont décrits dans la littérature ; ils conduisent à la détection de paramètres structuraux et/ou fonctionnels (Figure 18).

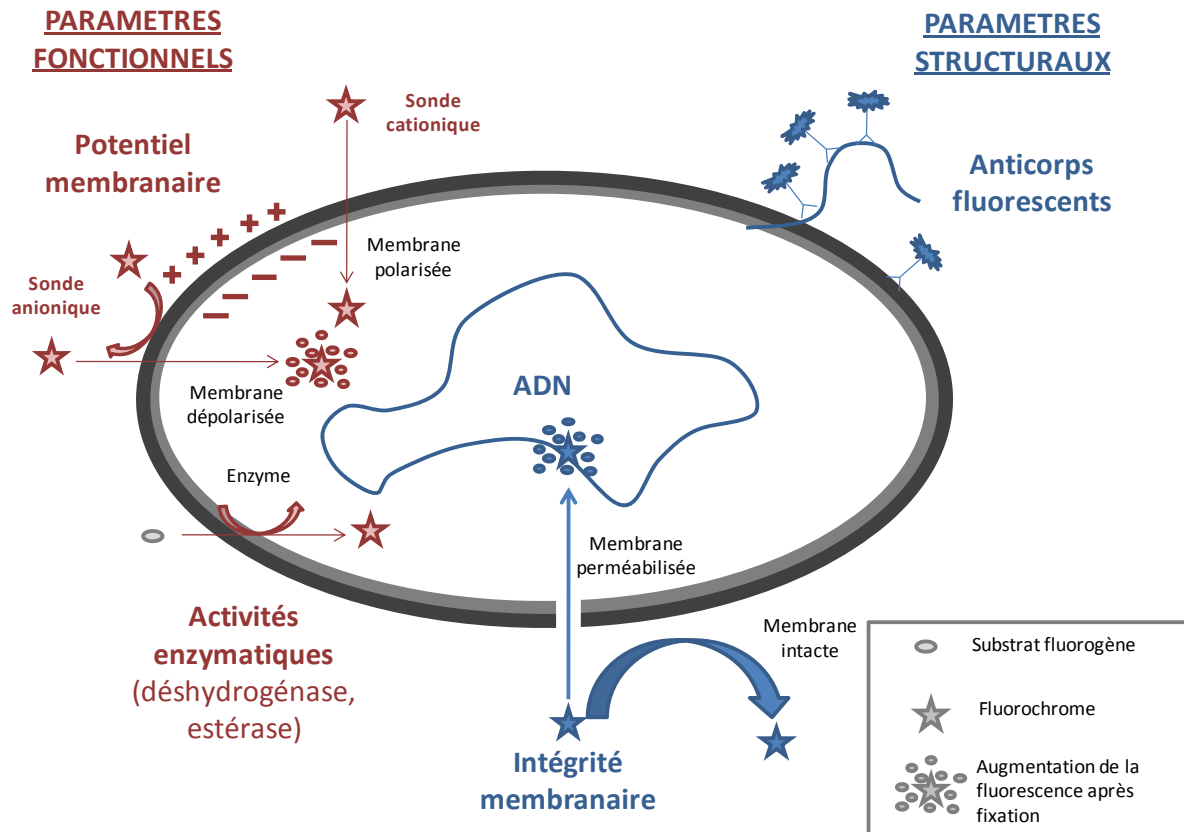


Figure 18 : Sites cellulaires cibles des sondes fluorescentes pouvant mettre en évidence des paramètres structurels et/ou fonctionnels dans une bactérie, d'après Joux et Lebaron (2000).

III. 4. c. Les paramètres structureux :

Certains paramètres structureux peuvent être analysés *via* l'utilisation de fluorochromes spécifiques soit des acides nucléiques, soit d'antigènes membranaires.

Dans le cas des antigènes membranaires, on parle d'immunofluorescence. Cette méthode permet d'analyser une espèce bactérienne, indépendamment de son aptitude à être cultivée, et dans des conditions non destructives. Cependant, même si cette méthode peut être appliquée à l'étude d'échantillons environnementaux (Völsch *et al.*, 1990), elle nécessite la culture préalable des espèces bactériennes cibles à partir desquelles les anticorps auront été produits. De plus, l'utilisation de cette méthode sur des matrices complexes telles que les boues activées est problématique en raison de la présence de nombreux composés extracellulaires (Vives-Rego *et al.*, 2000).

Dans le cas des acides nucléiques, on distingue trois types de marquage :

- marquage de l'ADN *via* un fluorochrome non spécifique capable de pénétrer dans toutes les cellules. Ce type de marquage est utilisé dans le cas de la numération des microorganismes totaux, ou lors d'une analyse multiparamétrique avec des activités fonctionnelles. De nombreux fluorochromes sont décrits dans la littérature. Parmi eux, on peut citer les fluorochromes appartenant à la famille des SYTO (Troussellier *et al.*, 1999) ou des Hoechst (Monger et Landry, 1993),
- marquage de l'ADN *via* un marqueur d'intégrité membranaire : ces fluorochromes spécifiques des acides nucléiques présentent la caractéristique de ne pénétrer que dans les cellules dont la membrane est endommagée. L'Iodure de Propidium et le SYTOX Green figurent parmi les exemples les plus documentés en microbiologie environnementale (Mortimer *et al.*, 2000, Burnett and Beuchat, 2002),
- un marquage avec des sondes fluorescentes, comportant une séquence nucléique spécifique d'une espèce bactérienne donnée, comme cela a déjà été décrit dans la partie précédente (III. 3) (Vives Rego *et al.*, 2000). Le but de ces marquages est de visualiser une espèce bactérienne spécifique.

III. 4. d. Les paramètres fonctionnels

Tout comme les sondes fluorescentes caractéristiques de paramètres structuraux, des fluorochromes ou des substrats fluorogènes, spécifiques d'activités métaboliques, initialement développés chez les cellules eucaryotes, ont pu être appliqués à la microbiologie. Grâce au développement de ces outils analytiques, il est désormais possible de suivre, en temps réel, l'évolution physiologique d'une population bactérienne. Le suivi de paramètres tels que le potentiel de membrane, l'activité respiratoire ou les activités estérases, inabordable par les techniques de microbiologie classique ou moléculaires, présente donc un intérêt majeur dans les domaines des bioprocédés et particulièrement pour le contrôle des processus d'épuration (Vives-Rego *et al.*, 2000, Biggerstaff *et al.*, 2006).

Le potentiel membranaire représente la différence de potentiel électrique entre l'extérieur et l'intérieur de la bactérie. Il se manifeste par un excès de charges négatives sur la face interne de la paroi. Pour le mesurer, des sondes cationiques comme le 3,3'-

dihexyloxacarbo-cyanine iodide (DiOC₆) ou la rhodamine, dont le niveau de captation est proportionnel au potentiel transmembranaire, sont utilisées (Diaper *et al.*, 1992).

Les activités estérasiques peuvent être mises en évidence en employant des substrats fluorogènes (Fluorescéine DiAcétate ou FDA, Carboxyfluorescéine DiAcétate ou CFDA), capables de pénétrer à l'intérieur des cellules. L'hydrolyse de cette famille de substrat par les estérases actives conduit à une émission de fluorescence à l'intérieur de la cellule, rendant cette dernière détectable (Diaper *et al.*, 1992).

L'activité respiratoire fait intervenir des déshydrogénases, enzymes catalysant des réactions d'oxydo-réduction au niveau de la chaîne de transport d'électrons. Pour mettre en évidence cette activité, on emploie, par exemple, le CTC qui est réduit par les déshydrogénases bactériennes en CTC-formazan lorsque celles-ci sont actives (Bhupathiraju *et al.*, 1999). Par cette méthode, Lopez-Amoros *et al.* (2000) ont étudié la biodégradation de l'alkylbenzène sulfonate par des bactéries en milieu marin suite à un double marquage. Une numération des microorganismes totaux a été effectuée avec un fluorochrome spécifique des acides nucléiques, le SYTO 13. Au sein de cette population totale, l'utilisation en parallèle du CTC leur a permis de quantifier la fraction microbienne présentant une activité respiratoire.

Ainsi, il existe une grande diversité de fluorochromes disponibles rendant le choix parfois difficile pour l'utilisateur. Ce choix devra tenir compte non seulement du/des paramètre(s) d'intérêt (structuraux ou fonctionnels) mais également des propriétés intrinsèques des fluorochromes (spectre d'absorption et d'émission, rendement quantique, coefficient d'absorption...).

III. 4. e. Les techniques de comptage

Les méthodes d'analyse précédemment décrites sont basées sur la propriété des fluorochromes qui, lorsqu'ils sont excités à une longueur d'onde spécifique, réémettent de l'énergie sous forme de fluorescence à une longueur d'onde supérieure. La visualisation de cette fluorescence peut être effectuée soit par microscopie à épifluorescence, soit par CMF.

i. Les méthodes microscopiques

La microscopie en épifluorescence, procédé récent et performant d'estimation de la biomasse, est devenue une méthode de référence pour le comptage de cellules après

marquages fluorescents. Elle connaît de multiples applications, que ce soit dans le cadre d'analyse de souches pures ou d'échantillons issus d'écosystèmes complexes (Kepner et Pratt, 1994), bien que son utilisation soit souvent longue et fastidieuse. Des tentatives d'automatisation des comptages ont été entreprises pour faciliter certaines études comparatives. L'analyse d'image assistée par ordinateur permet de reconnaître différents paramètres morphométriques (longueur, largeur, surface, périmètre), de quantifier les cellules et de déterminer le biovolume cellulaire (Joux et Lebaron, 2000). Mise au point sur des cultures pures, l'automatisation de cette technique reste difficilement applicable pour le comptage d'échantillons environnementaux en raison de la diversité des morphotypes, de la taille des cellules ainsi que du bruit de fond important lié aux particules non biologiques (matière organique).

ii. La cytométrie en flux (CMF)

La visualisation de la fluorescence peut également être effectuée par CMF. Initialement appliquée à l'analyse des cellules du sang, naturellement en suspension, la CMF a connu un développement très important dans les années 80. Son principe repose sur l'analyse, une à une, de cellules en suspension défilant dans une gaine liquide devant un faisceau laser. Diverses mesures optiques peuvent être réalisées : absorption, réfraction ou fluorescence.

L'amélioration constante de la sensibilité de mesure, de la puissance des lasers, de l'écoulement du flux des appareils permet aujourd'hui de détecter des éléments plus petits comme des cellules procaryotes (bactéries), des levures, des champignons, des spores et même des virus marins. Les premiers travaux concernant l'application de la CMF à l'étude des procaryotes ont été décrits pour l'analyse de microorganismes marins qui sont naturellement en suspension dans leur milieu et qui renferment des pigments photosynthétiques fluorescents (Gregory, 2001). Récemment, l'application de la CMF à l'étude des microorganismes présents dans les boues activées a été proposée par Ziglio *et al.* (2002). Cependant, en raison de la présence de cellules agrégées en microflocs, l'étude de la flore microbienne des boues activées par CMF nécessite une préparation préalable des échantillons qui consiste à désagréger au maximum les microflocs et ainsi permettre une analyse individuelle des cellules.

Une partie de ce travail a consisté à expertiser les potentialités d'application de la CMF à l'étude des microorganismes présents dans les boues activées. Le principe de cette technique ainsi que son application à l'exploration de la flore microbienne des boues seront détaillés dans la partie Matériel et méthodes (III. 4. a.). L'application de cette méthode d'analyse au suivi de l'état physiologique des microorganismes présents dans les boues activées au cours d'un traitement thermique a fait l'objet d'une publication présentée dans l'Annexe C. Par ailleurs, un document reprenant le principe général de la CMF ainsi que les principales applications de cette méthode est présenté dans l'Annexe B.

III. 5. Conclusion

Le grand nombre de méthodes proposées afin d'étudier les microorganismes dans des milieux environnementaux complexes, tels que les boues activées, indique clairement qu'aucune technique n'est totalement satisfaisante pour être appliquée de manière systématique. Selon le milieu considéré, la diversité microbienne ainsi que les niveaux d'activité de la microflore, les différentes estimations de biomasse peuvent être correctement, médiocrement ou pas du tout corrélées entre elles. Le choix de la méthode doit, par conséquent, être pris en fonction des conditions d'expérimentation et du but recherché.

MATERIEL ET METHODES

I. ORIGINE ET CARACTÉRISTIQUES DES BOUES

Les boues utilisées lors de cette étude sont issues du bassin d'aération de la station d'épuration (STEP) municipale de Limoges. Cette station, dont la capacité est de 285 000 équivalent-habitants, traite essentiellement des effluents de nature domestique (moins de 10% d'effluents d'industries agroalimentaires).

Le prélèvement des échantillons a été effectué au niveau du même bassin d'aération. Les boues ont été prélevées juste avant leur utilisation expérimentale pour s'affranchir d'un effet potentiel d'évolution de leurs caractéristiques (lyse cellulaire, par exemple).

II. LES TRAITEMENTS D'HYDROLYSE

II. 1. Le traitement thermique

Le traitement thermique est réalisé dans un bain thermostaté (ISOTEMP 120). 300 ml de boues activées contenues dans des béchers de 500 ml sont plongées dans le bain-marie et sont agitées manuellement de manière temporelle tout au long du traitement. Dans un premier temps, l'effet du temps de traitement a été suivi. La température est maintenue constante à 95°C et le temps de traitement varie de 20 à 60 minutes. Dans un second temps, l'effet de la température a été suivi. La gamme de température choisie est comprise entre 50 et 95°C. Pour chaque température, le temps de traitement reste constant. Il est de 20 minutes, temps de montée en température compris. Durant le traitement, la température des boues est contrôlée.

II. 2. La sonication

La sonication est réalisée avec un générateur à ultrasons Sonoplus (Bandelin, HD 2200) d'une puissance maximale de 200 W. Le générateur ultrasonique convertit la tension du secteur (50/60 Hz) jusqu'à une fréquence ultrasonore de 20 kHz. La sonde utilisée est une sonotrode de 13 mm de diamètre. Le volume des échantillons soumis à la sonication est de 500 mL. Durant la sonication l'échantillon est maintenu dans de la glace pour éviter son

échauffement. Ainsi, au cours de la sonication, la température de l'échantillon est systématiquement inférieure à 20°C.

Le traitement par sonication est caractérisé par l'énergie spécifique fournie (E_s) qui est fonction de l'énergie fournie, de la concentration en matières et du volume de l'échantillon, selon l'équation (1) :

$$(1) E_s = \frac{\Psi \times t_{US}}{MS \times V_{ech}}$$

Avec :

E_s : énergie spécifique ($J \cdot g^{-1}MS$)

Ψ : puissance fournie (W)

t_{US} : temps de sonication (s)

MS : concentration en matière sèche ($g \cdot L^{-1}$)

V_{ech} : volume de l'échantillon (L)

II. 3. L'ozonation

Le dispositif d'ozonation utilisé lors de ce travail est représenté sur la Figure 19. Il comprend un générateur d'ozone, un flacon laveur contenant les boues à traiter, un compteur d'expérience pour contrôler le débit gazeux ainsi qu'un dispositif de dosage de l'ozone résiduel.

Le générateur d'ozone utilisé est un modèle de laboratoire de type 5LO de Trailigaz Ozone SAS. L'ozone est produit par décharge électrique dans de l'air comprimé. L'oxygène séché passe entre deux électrodes séparées par un diélectrique d'épaisseur uniforme où il est soumis à un champ électrique alternatif à haute tension. Un circuit de refroidissement assure l'absorption de l'excès de chaleur produite.

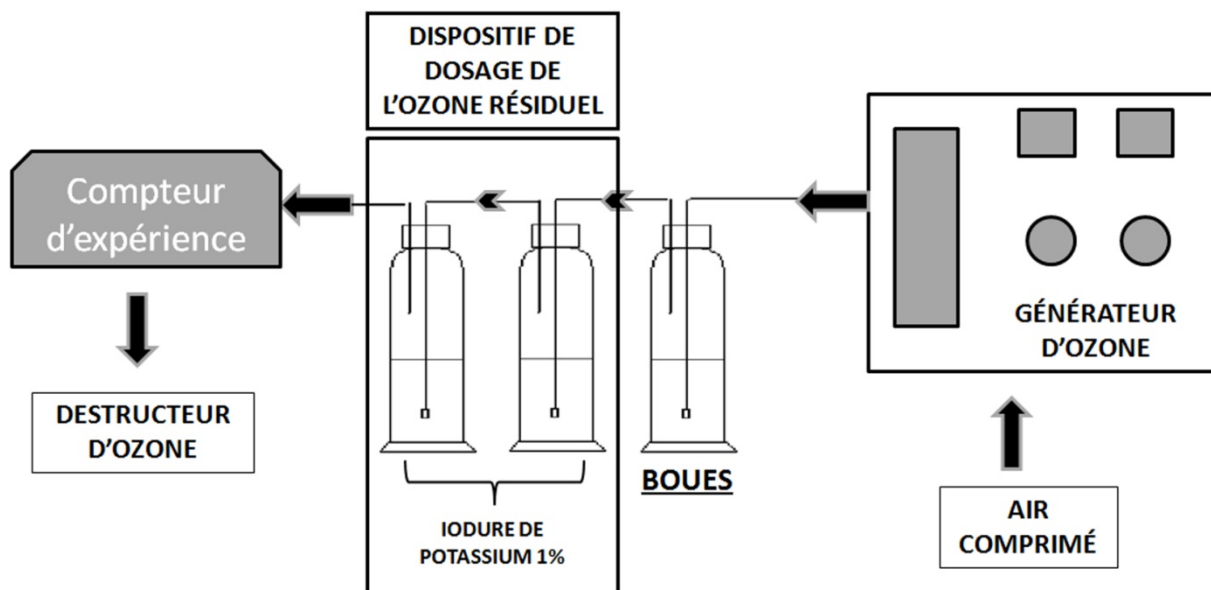


Figure 19 : Représentation schématique du dispositif d'ozonation.

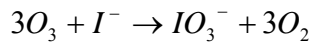
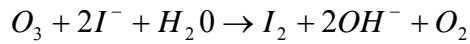
Le réacteur dans lequel sont ozonés les échantillons de boues est un flacon laveur en verre d'une contenance maximale de 2L. Le traitement des boues par ozonation est effectué sur des échantillons d'un volume égal à 600 mL. Afin de favoriser le transfert de l'ozone dans les boues et d'éviter un moussage trop important, le flacon laveur est maintenu sous agitation continue au cours du traitement.

Le débit entrant d'ozone est identique pour tous les essais (700NL/h) et est réglé au niveau du générateur. Le débit sortant est mesuré à l'aide du compteur d'expérience placé en sortie du dispositif.

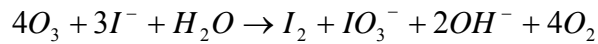
La concentration massique en ozone appliquée aux boues est déterminée par méthode iodométrique selon la méthode 070035D (Trailigaz Ozone SAS). L'ozone libère l'iode d'une solution d'iodure de potassium et l'iode libéré est titré par du thiosulfate de sodium. L'ozone à analyser barbote dans une série de deux flacons laveurs remplis d'une solution d'iodure de potassium (KI) à 1% et tamponnée à pH=7. Après l'essai, la solution d'iode, de volume V_{SOL} , est récupérée, acidifiée et dosée à l'aide d'une solution de thiosulfate de sodium à 0,05 M.

Les réactions chimiques mises en jeu lors de ce dosage sont les suivantes :

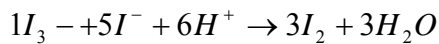
- lors du barbotage :



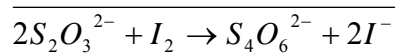
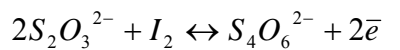
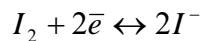
Soit globalement :



- lors de l'acidification



- lors du dosage iodométrique :



La masse d'ozone produite, m_{O_3} , est alors déduite de l'équation (6) :

$$(6) m_{O_3} = \frac{V_{SOL} \times N_{THIO} \times V_{THIO} \times M_{O_3}}{2}$$

Avec :

m_{O_3} : la masse d'ozone (m)

V_{SOL} : le volume de la solution utilisé pour l'absorption (L)

N_{THIO} : le titre de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour le dosage

V_{THIO} : le volume de thiosulfate de sodium ajouté (L)

M_{O_3} : la masse molaire de l'ozone (g/mol)

Une série de 2 flacons laveurs est utilisée pour doser l'ozone résiduel en aval du flacon où sont ozonées les boues (O_3 NON CONSOMMEE). Le dosage de l'ozone produit (O_3 PRODUIT) par le générateur est dosé avec le même dispositif (Figure 19) mais en absence du flacon

contenant les boues. La différence entre ces deux valeurs correspond donc à la dose d'ozone consommée par les boues (O_3 CONSOMMEE).

III. LES METHODES ANALYTIQUES

III. 1. Détermination de la quantité de matière et de sa répartition

Afin de déterminer la répartition de la matière organique et minérale des boues et de suivre son évolution au cours des différents traitements, les concentrations en matière sèche (MS), matière minérale (MM) et matière organique (MO) ont été déterminées sur la fraction totale des boues (MS, MM et MO) ainsi que sur la fraction particulière [matières en suspension (MES), matières minérales en suspension (MMS) et matières volatiles en suspension (MVS)]. Lors de ces analyses, ces fractions (totales et particulières) ont été séparées par centrifugation à 6000 g pendant 20 minutes.

III. 1. a. Matières sèches (MS), matières minérales (MM) et matières organiques (MO) totales

La détermination des différentes fractions de la matière est réalisée par pesées et séchages des boues, selon la méthode normalisée NF T 90 105. Pour déterminer la teneur en matière sèche totale (MS) ou en matière organique (MO), un volume connu de boues est introduit dans un creuset en porcelaine, préalablement séché, de masse connue. Le creuset est mis à l'étuve à 105°C pendant 24 heures de sorte que l'eau soit entièrement évaporée. Le creuset est pesé après refroidissement dans un dessiccateur. La différence de masses correspond donc à la matière sèche contenue dans les boues. En considérant le volume de boues introduit, le résultat est alors exprimé en g/L et il correspond à la concentration en matière sèche contenue dans l'échantillon.

Le creuset est ensuite mis au four à 550°C pendant deux heures. Après refroidissement, le creuset est de nouveau pesé : il ne reste plus que la matière minérale. La masse de la matière organique est obtenue par différence entre la masse de matière sèche et la masse de matière minérale. La matière organique est assimilée à la matière volatile à 550°C.

III. 1. b. Matières en suspension (MES), matières minérales en suspension (MMS) et matières volatiles en suspension (MVS)

Les matières en suspension (MES), les matières minérales en suspension (MMS) et les matières volatiles en suspension (MVS) sont déterminées de la même façon, sur le culot de centrifugation. Au lieu d'introduire un volume de boues totales, c'est le culot de centrifugation (assimilé à la fraction particulaire dans ce cas) qui est introduit dans le creuset. Le volume d'échantillon considéré est alors le volume de boues avant centrifugation.

III. 2. Caractérisation de la solubilisation des composés organiques particuliers

III. 2. a. Séparation des phases particulières et solubles

Lors de ces analyses, la séparation de la fraction soluble et de la fraction particulaire des boues activées est réalisée par une centrifugation suivie d'une filtration du surnageant. Les échantillons sont centrifugés à 6000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est ensuite récupéré et filtré sous vide sur une membrane en cellulose de 0,45 μm . Ainsi, lors de l'analyse de la solubilisation des composés organiques des boues (DCO, protéines, acides humiques et sucres), le seuil de coupure entre composés solubles et composés particuliers est fixé arbitrairement à 0,45 μm .

Les protocoles de séparation lors de l'analyse des MS et des MES et lors de l'analyse de la solubilisation des composés organiques ont été différents. En effet, la détermination de la concentration en MM par chauffage des creusets à 550°C n'est pas compatible avec l'utilisation d'une membrane en cellulose de 0,45 μm . Les fractions solubles et particulières ont donc été séparées seulement par centrifugation (6000 g pendant 20 minutes).

Dans la suite de ce manuscrit lorsque le terme « solubilisation » sera employé en référence à la matière organique ou minérale (MES, MVS), il sera sous entendu que les fractions solubles et particulières ont été séparées par centrifugation (et donc sans seuil de coupure précis). En revanche, lorsque ce même terme sera employé par référence aux composés organiques (DCO, protéines, acides humiques et sucres), la fraction dite soluble comprendra les composés dont la taille est inférieure à 0,45 μm et la fraction dite particulaire comprendra les composés dont la taille est supérieure à 0,45 μm .

Comme précédemment décrit (Contexte bibliographique, II. 2. g.), la solubilisation de la matière organique consiste en un transfert de celle-ci de la phase particulaire vers la phase soluble. Les effets générés par les traitements d'hydrolyse sur les boues activées en terme de solubilisation ont donc été évalués par une analyse quantitative de la demande chimique en oxygène, des protéines et des sucres (composants organiques majoritaires des boues), dans les phases solubles et particulaires, avant et après traitement. Ce transfert de matière de la fraction particulaire vers la fraction soluble, suite aux traitements, sera exprimé par le taux de solubilisation (S_{DCO}) déterminé selon l'équation (3) (Bougrier, 2005) :

$$(3) \quad S_{DCO} = \frac{DCOs - DCO_{S0}}{DCOp_0} \times 100 \%$$

Avec :

- DCOs : la DCO soluble de l'échantillon traité ($\text{g O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$),
- DCO_{S0} : la DCO soluble de l'échantillon non traité ($\text{g O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$)
- DCO_{p0} : la DCO particulaire de l'échantillon non traité ($\text{g O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$).

Cette même formule sera appliquée aux autres paramètres étudiés : les protéines et les sucres.

Avant et après traitement, les concentrations en protéines, sucres et DCO seront déterminées à partir de la fraction totale et de la fraction soluble des boues. Les concentrations associées à la fraction particulaire seront obtenues par différence.

III. 2. b. Dosage de la demande chimique en oxygène (DCO)

La DCO correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder chimiquement les substances réductrices contenues dans une solution. L'oxydant utilisé est le bichromate de potassium. Pour effectuer le dosage, la méthode HACH (1996-2000) a été utilisée : 2 mL d'échantillons sont introduits dans le tube contenant les réactifs. Le blanc est réalisé de manière identique, mais l'échantillon est remplacé par de l'eau distillée. Les tubes sont ensuite chauffés à 150°C pendant 2 heures puis laissés à refroidir pendant environ 20 minutes. La valeur de l'absorbance de l'échantillon est lue au spectrophotomètre après avoir fait le zéro avec le blanc (gamme de concentration de 0 mg/L à 1500 mg/L) à la longueur d'onde de 620 nm.

III. 2. c. Dosage des protéines et des substances humiques

Les protéines sont dosées suivant la méthode de Lowry modifiée par Frolund (1995). Ce dosage colorimétrique est fondé sur la résultante de 2 réactions colorées simultanées : une réaction de type Biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. La réaction de type Biuret conduit à la formation d'un complexe pourpre entre le biuret ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$) et deux liens peptidiques consécutifs en présence de cuivre en milieu alcalin. Parallèlement, le réactif de Folin-Ciocalteu, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret.

Néanmoins, lors de l'utilisation de cette méthode, Davis (1988) met en évidence des interférences lors de la lecture au spectrophotomètre dues aux substances humiques. Frølund *et al.* (1995) ont modifié la méthode établie par Lowry afin de tenir compte des substances humiques dans la mesure des protéines. Cette méthode est basée sur la mesure de la coloration en présence et en l'absence de CuSO_4 . En présence de CuSO_4 , aussi bien les protéines que les substances humiques sont dosées. En l'absence de CuSO_4 , la coloration est due aux composés humiques et aux acides aminés chromogènes, alors que la coloration développée par les protéines est réduite de 20% (Frolund *et al.* 1995). A partir des absorbances lues, il est alors possible de déterminer l'absorbance des protéines et des substances humiques :

$$A_{total} = A_{protéines} + A_{humiques}$$

$$A_{blanc} = 0.2 A_{protéines} + A_{humiques}$$

$$A_{protéines} = 1.25 (A_{total} - A_{blanc})$$

$$A_{humiques} = A_{blanc} - 0.2 A_{protéines}$$

$$A_{total} = \text{absorbance totale avec } \text{CuSO}_4$$

$$A_{blanc} = \text{absorbance totale sans } \text{CuSO}_4$$

$$A_{protéines} = \text{absorbance due aux protéines}$$

$$A_{humiques} = \text{absorbance due aux composés humiques}$$

Le protocole de dosage des protéines et des substances humiques est donné dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Protocole de dosage des protéines et des substances humiques.

<u>Solutions</u>	<u>Avec CuSO4 (B1)</u>	<u>Sans CuSO4 (B1)</u>
C1 (ml)	2,5	0
C2 (ml)	0	2,5
Echantillon (ml)	0,5	0,5
	<i>Agitation au vortex et repos à température ambiante pendant 10 minutes</i>	
Folin (ml)	0,25	0,25
	<i>Agitation au vortex et repos à température ambiante pendant 30 minutes</i>	
	<i>Mesure de l'absorbance à 750 nm contre un blanc réactif</i>	

Avec

- A : 20g de Na₂CO₃ dans 1000ml de NaOH 0.1N
- B1 : 0.25g CuSO₄ dans 50ml d'ED
- B2 : 0.5g Tartrate K, Na dans 50 ml d'ED
- C1 : 48 ml de A+1ml B1 +1ml B2
- C2 : 48 ml de A+1ml ED +1ml B2

Les concentrations en protéines et en acides humiques sont ensuite déterminées à partir de gammes étalons réalisées avec une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) et une solution d'acides humiques respectivement. Les résultats sont exprimés en mg éq BSA/L et en mg éq acides humiques/L.

III. 2. d. Dosage des sucres

La méthode utilisée pour doser les sucres est celle proposée par Dubois (1956) car elle possède une très grande spécificité et permet d'obtenir des colorations d'une même intensité quel que soit le sucre dosé (Brown et Lester, 1980).

L'échantillon est chauffé en présence d'acide sulfurique et de phénol. Les saccharides sont hydrolysés, durant le chauffage, par l'acide sulfurique puis les monosaccharides sont déshydratés par le phénol (coloration orange). Le protocole opératoire de dosage des sucres est décrit dans le Tableau 9 .

Les concentrations en sucres sont ensuite déterminées à partir d'une gamme étalon réalisée avec une solution de glucose. Les résultats sont exprimés en mg éq Glucose/L.

Tableau 9 : Protocole de dosage des sucres.

<i>Dosage des sucres</i>	
Phénol 5% m/V (ml)	1
Echantillon (ml)	1
	<i>Agitation au vortex et repos 10 minutes à température ambiante</i>
H ₂ SO ₄ concentré (ml)	5
	<i>Bain thermostaté à 30°C pendant 20 minutes</i>
	<i>Mesure de l'absorbance à 490 nm contre un blanc réactif</i>

III. 3. Evaluation de la biodégradabilité

III. 3. a. Biodégradabilité aérobie

La biodégradabilité, en condition aérobie, de la matière organique contenue dans les fractions totales et particulières des boues, avant et après les différents traitements, a été estimée par un suivi de la Demande Biologique en Oxygène (DBO). La méthode choisie pour mesurer la DBO est basée sur l'utilisation d'Oxytop (WTW®). Afin d'obtenir un résultat le plus précis possible, la plage de mesure est préalablement choisie en fonction du résultat attendu (estimé à 80 % de la valeur de la DCO). Cette plage détermine le volume d'échantillon à placer dans la bouteille de mesure et évite ainsi des dilutions de l'échantillon initial à posteriori. Le résultat final est alors obtenu en multipliant la valeur affichée par l'oxytop par le facteur correspondant au volume introduit initialement.

Pour chaque échantillon analysé, la DBO est estimée sur la fraction totale et la fraction soluble des boues. La DBO de la fraction particulière est obtenue par différence entre la valeur de la DBO de la fraction totale et la valeur de la DBO de la fraction soluble des boues. Chaque essai étant réalisé en duplicat, les valeurs présentées correspondent à la moyenne des deux résultats obtenus.

III. 3. b. Biodégradabilité anaérobie

La biodégradabilité anaérobie de la matière organique contenue dans les fractions totales et solubles des boues, avant et après les différents traitements, est estimée par des tests d'évaluation du Potentiel de Bio-Méthanisation (PBM). Comme leur dénomination l'indique,

l'objectif de ces tests est de déterminer la quantité de gaz produit (CO_2 et CH_4) en cours d'incubation en conditions anaérobies ainsi que les taux d'élimination de la matière organique.

Les essais de mesure du potentiel bio-méthanogène sont réalisés dans des fioles à pénicilline (volume 120 mL) hermétiquement fermés, après un bullage à l'azote, par des bouchons en butyle sertis par des bagues en aluminium pour garantir une parfaite étanchéité aux gaz. Lors de ces essais, les échantillons à analyser sont incubés avec des boues de digesteur de la STEP de Limoges selon un ratio échantillon/inoculum égal à 4 (v/v) (Eskicioglu *et al.*, 2006). Pour s'assurer du bon déroulement de la fermentation méthanique l'alcalinité du milieu est ajustée à environ 3g/L par ajout de 0,28g de Na_2CO_3 . Les échantillons sont ensuite maintenus à 35°C sous agitation (120 RPM). Le volume total du biogaz produit est mesuré régulièrement à l'aide un manomètre de type « tube en U » relié à une aiguille. L'aiguille est piquée dans le septum de la fiole, et par différence de pression, le biogaz produit déplace le niveau de liquide contenu dans le manomètre. Le liquide de garde du manomètre est une solution acide (pH=2) saturée en sel (NaCl 20%) afin de réduire au maximum la dissolution du CO_2 .

Pour un même échantillon, le test comprend une série de batchs : (1) le témoin (inoculum seul), (2) l'essai sur la fraction totale de la boue (inoculum+fraction totale) et (3) l'essai sur la fraction soluble de la boue (inoculum+fraction soluble). Chaque batch est dédoublé et les résultats sont moyennés sur les deux mesures expérimentales. Les résultats de production de biogaz total sont exprimés sous la forme de volume cumulé de biogaz produit par rapport à la teneur initiale en MV.

III. 4. Caractérisation des paramètres microbiologiques

Trois paramètres ont été étudiés : la perméabilité membranaire (lyse cellulaire), l'activité respiratoire des microorganismes et la croissance cellulaire. L'impact des traitements sur l'intégrité membranaire est analysé par CMF à la fin de chaque traitement. L'activité respiratoire des microorganismes et la croissance bactérienne sont également analysés immédiatement après traitement, mais leur évolution est ensuite suivie en post-traitement au cours du temps. Pour cela, 200 ml d'échantillons de boues soumises ou non (témoin) aux différents traitements sont placés sous agitation à température ambiante pendant 72 heures. L'évolution de la population bactérienne des boues au cours du temps est évaluée

par un suivi de l'aptitude à la revivification des microorganismes par techniques culturales classiques, d'une part, et par un suivi de l'activité respiratoire par méthode spectrophotométrique, d'autre part.

III. 4. a. Analyse de la flore microbienne par cytométrie en flux (CMF)

L'utilisation de la CMF sur des milieux complexes, et tout particulièrement sur des boues activées, nécessite au préalable une préparation des échantillons. En effet, dans les boues activées, une fraction importante des microorganismes est agrégée au sein de floccs, ce qui peut considérablement fausser le comptage individuel des microorganismes par CMF. Il est donc nécessaire de traiter les échantillons afin de désagréger au maximum les floccs puis de les filtrer afin d'éviter l'obstruction de la gaine liquide du cytomètre. De plus, en fonction du ou des paramètre(s) biologique(s) d'intérêt, différents fluorochromes peuvent être utilisés. Dans cette partie seront présentés, tout d'abord, le principe général de la CMF, puis les essais menés en vue de l'optimisation du protocole de désagréation/filtration. Enfin, le protocole d'analyse des échantillons de boues activées par CMF retenu dans cette étude sera détaillé.

i. Principe de la cytométrie en flux (CMF)

La CMF permet, au même titre que la microscopie en épifluorescence, l'analyse des marquages fluorescents, cellule par cellule. Apparue dans les années 1980 pour détecter des anomalies dans les cellules animales, en particulier du cycle cellulaire, cette méthode est dorénavant utilisée en microbiologie. La CMF, dont le principe est basé sur une analyse de cellules isolées entraînées par un flux liquide, est une technique relativement puissante par sa rapidité (environ 1000 évènements par seconde), sa précision et sa sensibilité d'analyse. Les cellules en suspension défilent, une à une, dans une gaine liquide traversée par un faisceau laser (Figure 20). Les cellules émettent alors des informations lumineuses séparées par un réseau optique et dirigées vers des photomultiplicateurs qui les amplifient et les transforment en signaux électroniques. Plusieurs paramètres peuvent être pris en compte simultanément. Il s'agit, d'une part, des paramètres de diffusion de la lumière par les cellules dans l'axe - Forward Scatter (FSC) - ou à angle droit - Side Scatter (SSC) qui sont fonction des caractéristiques morphologiques de la souche analysée, et d'autre part, de paramètres de fluorescence via l'utilisation de fluorochromes spécifiques d'une structure ou d'une fonction cellulaire. Les signaux lumineux émis par les cellules (fluorescence ou diffusion) sont traités

et quantifiés sous forme d'unités arbitraires et proportionnelles à l'activité de la fonction étudiée ou de l'importance du paramètre structural exploré.

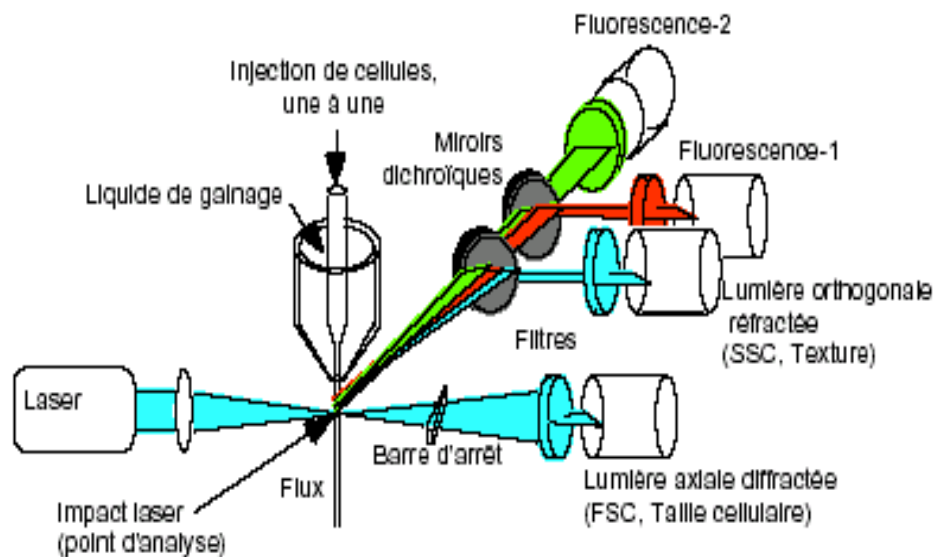


Figure 20 : Principe de la cytométrie en flux.

ii. Analyses cytométriques

L'appareil utilisé est un analyseur-trieur FACS-Vantage (Becton-Dickinson, USA) équipé d'un laser argon (488 nm) d'une puissance de 50 mW ; 488 nm correspondant à la longueur d'onde d'excitation des fluorochromes utilisés (SYTOX Green, SYTO BC, iode de propidium et CFDA). La fluorescence verte, émise par les bactéries qui ont intégré le SYTO BC ou le SYTOX Green, est collectée à l'aide d'un filtre passe-bande de 530 (\pm 30) nm. La fluorescence rouge, émise par les bactéries marquées avec l'iodure de propidium, est recueillie à l'aide d'un filtre passe-haut de 610 (\pm 30) nm. Les différents paramètres étudiés au cours de ce travail sont les suivants :

- ✓ FSC (Forward Scatter), corrélé à la taille des cellules,
- ✓ SSC (Side Scatter), corrélé à la structure des cellules (contenu cellulaire),

- ✓ la fluorescence verte (FL1), issue du marquage avec le SYTO BC ou issue de l'évaluation de l'intégrité membranaire avec le SYTOX Green,
- ✓ la fluorescence rouge (FL3), issue de l'évaluation de l'intégrité membranaire avec l'iodure de propidium.

Avant analyse de la fluorescence, une acquisition conditionnelle est réalisée de façon systématique sur un cytogramme FSC/SSC pour éliminer au maximum de l'analyse les débris et agrégats cellulaires. FSC, FL1 et FL3 sont visualisés sur une échelle logarithmique divisée en 4 décades et SSC sur une échelle linéaire. Le voltage du photomultiplicateur (PMT) est choisi de façon à ce que la population témoin (échantillon non marqué) n'émette pas de fluorescence (verte dans le cas du SYTOX Green, du SYTO BC et du CFDA ou rouge dans le cas de l'iodure de propidium) avant la première décade. Les analyses sont réalisées sur un minimum de 10000 cellules à la vitesse d'environ 500 cellules par seconde. Le traitement des données est réalisée avec le logiciel WinMDI (version 2.9).

iii. Le protocole de désagrégation/filtration

Dans un milieu tel que les boues activées, une fraction importante des microorganismes est agrégée sous la forme de floccs, il est donc nécessaire de traiter les échantillons afin de déstructurer, au maximum, les floccs (Figure 21). Puisque la CMF est une technique de caractérisation individuelle de cellules en suspension, les microorganismes contenus dans les floccs doivent être individualisés (Figure 21, B) avant analyse. En effet, les signaux optiques ou physiques qui seraient émis par les agrégats (Figure 21, A) résulteraient de plusieurs microorganismes dont le nombre et les espèces par agrégat peuvent considérablement varier d'un microfloc à un autre.

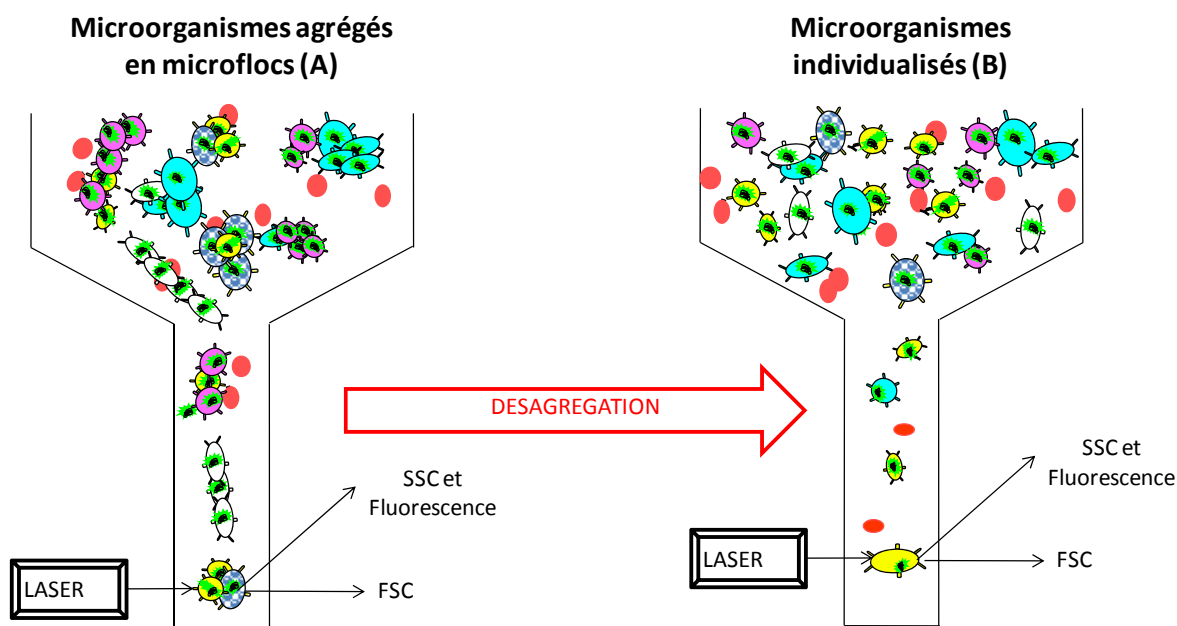


Figure 21 : Principe de l'analyse par CMF des microorganismes issus de boues activées

Les échantillons doivent ensuite être filtrés pour éliminer les agrégats résiduels et ainsi éviter l'obturation du cytomètre.

La désagrégation des échantillons est effectuée mécaniquement avec un homogénéisateur IKA-Turrax-T25 (IKA Labortechnik, Allemagne), comme préconisé par Ziglio *et al.* (2002). Les échantillons sont ensuite filtrés sur une membrane dont le seuil de coupure est de 48 μm .

L'objectif de ce pré-traitement est de désagréger au maximum les flocs en vue de leur analyse par CMF, tout en conservant les caractéristiques morphologiques et physiologiques des microorganismes intacts. Afin de s'assurer que ce pré-traitement n'a pas d'effets létaux sur la flore microbienne, la concentration en microorganismes cultivables, avant et après désagrégation, a été déterminée par techniques culturales en parallèle de la numération des microorganismes par CMF *via* l'utilisation du « Bacteria Counting Kit ». Une dissociation maximale des microorganismes a été obtenue après 10 minutes de traitement à puissance maximale (24 000 rpm). En effet, la concentration en microorganismes totaux et la

concentration en microorganismes cultivables sont maximums dans de telles conditions de désagrégation (seuls ces résultats sont montrés Figure 22).

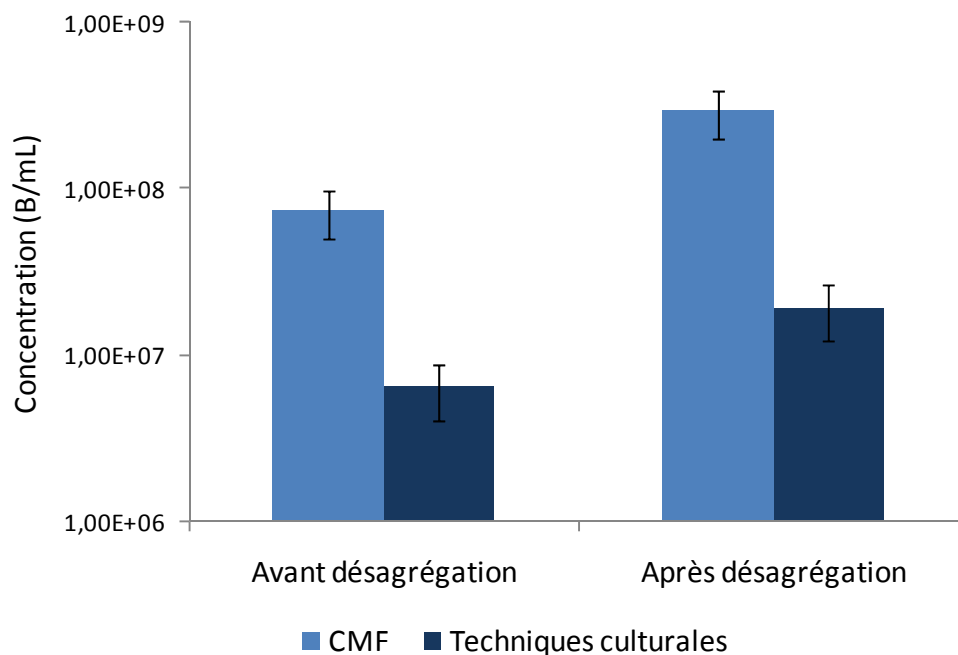


Figure 22 : Concentrations en microorganismes totaux (CMF) et en microorganismes cultivables (techniques culturales) avant et après le protocole de désagrégation/filtration (10 minutes à 24000 rpm).

La concentration en microorganismes déterminée par CMF augmente de $7,35E+07$ B/mL avant désagrégation à $2,94E+08$ B/mL après désagrégation, soit d'un facteur 4, ce qui traduit une individualisation non négligeable de cellules préalablement agrégées suite à ce pré-traitement (Figure 22).

L'augmentation de la concentration en microorganismes revivifiables, également proche de 4, montre que l'impact délétère potentiel de la désagrégation sur la flore microbienne est négligeable.

iv. Les sondes fluorescentes

Numération des microorganismes

La concentration en microorganismes est déterminée à l'aide du « Bacteria Counting Kit » (Invitrogen, France). Ce kit est composé :

- d'un marqueur de l'ADN, le SYTO BC ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$), qui pénètre aussi bien dans les bactéries à Gram positif que dans les bactéries à Gram négatif, et dont la complexation avec l'ADN des cellules conduit à une émission de fluorescence verte (représentée par FL1 sur les cytogrammes),
- d'une suspension de microbilles calibrées dont la concentration est connue (10^8 microbilles/mL).

Selon les indications du fabricant, 1 mL de chaque échantillon à analyser est mis en présence de 1 μL de SYTO BC puis incubé à 37°C pendant 5 minutes. Juste avant leur analyse par CMF, 10 μL de la suspension de microbilles sont ajoutés à chaque échantillon.

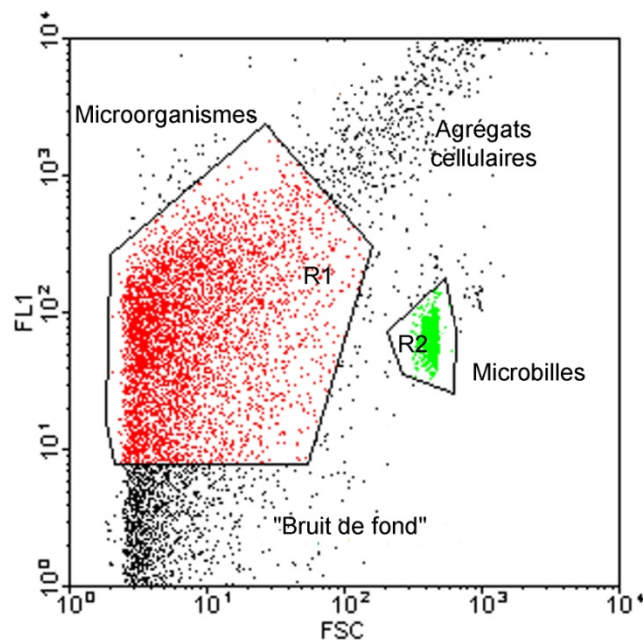


Figure 23 : Exemple de cytogramme obtenu après marquage d'un échantillon de boues avec le « Bacteria Counting Kit ».

Les cytogrammes issus de l'analyse par CMF représentent la fluorescence verte émise suite à la fixation du SYTO BC à l'ADN *versus* FCS, qui lui est corrélé à la taille des cellules. Ces cytogrammes mettent en évidence quatre populations :

- les microorganismes, avec une taille et un contenu en ADN typiques d'une population bactérienne hétérogène (R1),

- les microbilles (R2),
- le bruit de fond lié à la présence de particules de matière organique auto-fluorescente et/ou de débris cellulaires ayant fixé le fluorochrome (fixation non spécifique),
- les agrégats cellulaires correspondant aux évènements dont les caractéristiques en FL1 et FSC sont élevées.

Après analyse des échantillons par CMF, la concentration en microorganismes totaux (N) de l'échantillon est déterminée selon la relation :

$$N = (\% \text{ Microorganismes} / \% \text{ Microbilles}) * C_m$$

Avec C_m : la concentration finale en microbilles présente dans l'échantillon, soit 10^6 microbilles/mL.

Afin de valider ce protocole de numération par CMF, des essais ont été réalisés sur 5 lots de boues différents. Le comptage des cellules *via* ce protocole a été effectué sur une série d'échantillons dont la concentration en microorganismes est de l'ordre de 10^7 B/mL, et sur la même série d'échantillons dilués 10 fois (Figure 24).

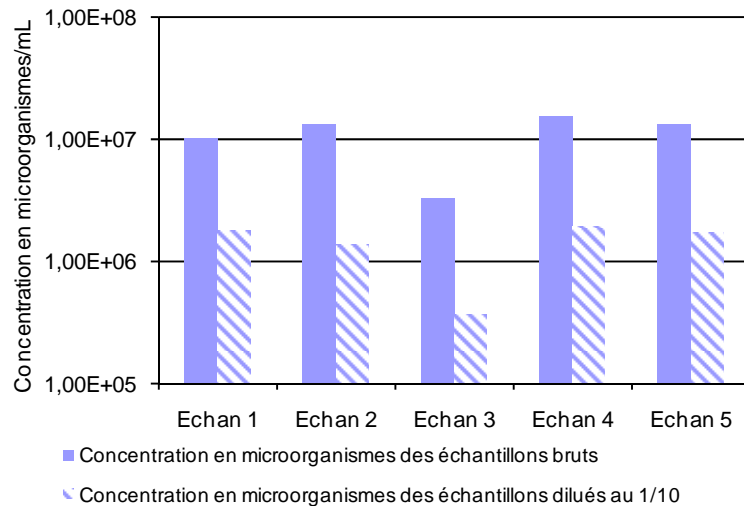


Figure 24 : Concentrations en microorganismes d'échantillons de boues activées suite à un marquage avec le « Bacteria Counting Kit ». La numération a été réalisée sur une série d'échantillons bruts et sur les mêmes échantillons dilués au 1/10.

Pour les 5 lots de boues, les résultats montrent que la concentration en microorganismes est 10 fois plus importante dans l'échantillon brut que dans l'échantillon dilué au 1/10^e (Figure 24) ; ce qui témoigne de la validité du protocole de numération par CMF à l'aide du « Bacteria Counting Kit ».

L'intégrité membranaire

Pour caractériser la perméabilité membranaire des microorganismes présents dans les boues activées, deux fluorochromes ont été utilisés et comparés : le SYTOX Green (Invitrogen, France) et l'iodure de propidium (Sigma, France). Ces deux composés sont des marqueurs de viabilité puisqu'ils ne pénètrent que dans les cellules dont la membrane est endommagée, donc dans les cellules qui sont non viables.

L'iodure de propidium est un agent intercalant appartenant à la famille des phenanthridinium, dont la complexation avec l'ADN conduit à une émission de fluorescence rouge ($\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$). Il se fixe au niveau de l'ADN en s'intercalant entre les bases, sans affinité particulière pour des séquences spécifiques, et avec une stoechiométrie de fixation d'une molécule d'iodure de propidium pour 4 à 5 paires de base.

Lors de ces essais, l'iodure de propidium est préparé sous forme d'une solution « stock » à 0,5 mg/mL dans de l'eau distillée conservée à 4°C. 25µL de cette solution sont ajoutés extemporanément à 475 µL de chaque échantillon avant analyse par CMF.

Comme l'iodure de propidium, le SYTOX Green est un marqueur d'intégrité membranaire. De par sa structure chimique (cyanine asymétrique cationique), ce fluorochrome ne peut pénétrer que dans les cellules dont la membrane est endommagée où il émet une fluorescence verte suite à sa complexation avec l'ADN.

La solution commerciale de SYTOX Green à 5 mM est conservée à -20°C. Cette solution mère est utilisée à la concentration finale de 5 µM et incubée 5 minutes à température ambiante en présence de l'échantillon de boue avant analyse par CMF, selon les recommandations du fabricant.

Afin d'évaluer le fluorochrome le mieux adapté à la mise en évidence des cellules perméabilisées, les deux marqueurs ont été utilisés en parallèle sur les mêmes échantillons : un échantillon de boues non traitées et un échantillon de boues traitées à 80°C pendant 60

minutes (témoin négatif dans lequel une fraction importante de cellules est supposée être perméabilisée).

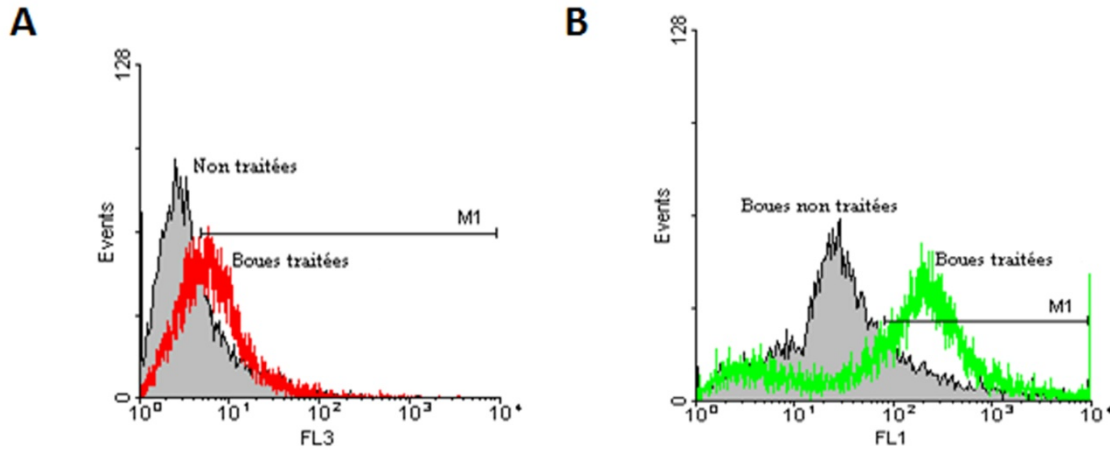


Figure 25 : Histogrammes obtenus après marquage de l'intégrité membranaire avec l'iodure de propidium (A) et le SYTOX Green (B) d'échantillons de boues non traitées (témoin positif) et traitées par la chaleur (témoin négatif).

L'échantillon de boues traitées incubé avec l'iodure de propidium émet une fluorescence rouge très proche de celle de l'échantillon non traité (Figure 25, A). La superposition des deux histogrammes ne permet pas une différenciation précise de la population viable et de la population non viable. On remarque cependant qu'il y a une augmentation globale de l'intensité de fluorescence rouge (FL3) de la population traitée ; ce qui montre bien que le traitement thermique a généré des effets délétères sur une partie de la population cellulaire.

En revanche, lorsque les boues traitées sont incubées avec le SYTOX Green, l'augmentation de la fluorescence verte, issue de la complexation du fluorochrome avec l'ADN des cellules endommagées, est nette par rapport au témoin (boues non traitées) (Figure 25, B). Dans ce cas, la différenciation cellules viables/non viables, est beaucoup plus nette.

Les différences d'intensité de fluorescence entre les deux marqueurs de viabilité sont probablement liées à leurs caractéristiques spectrales, et plus particulièrement à leur rendement quantique et à leur coefficient d'extinction molaire. Le rendement quantique, défini par le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis et le nombre de photons

absorbés par la molécule, du SYTOX Green ($\approx 0,5$) est supérieur à celui de l'iodure de propidium ($\approx 0,2$). De même, le coefficient d'extinction molaire qui relie la quantité de lumière absorbée, pour une longueur d'onde donnée, à la concentration du fluorophore en solution, est largement supérieur dans le cas du SYTOX Green ($\approx 73000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) par rapport à l'iodure de propidium ($\approx 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Rothe et col., 1997). Les caractéristiques spectrales du SYTOX Green semblent conduire à une estimation plus nette de la fluorescence émise par les cellules perméabilisées ; ce qui est particulièrement important pour l'analyse de microorganismes de petite taille ou à faible contenu en ADN. C'est pourquoi le SYTOX Green a été choisi en tant que marqueur de viabilité dans la suite de ces travaux.

v. Protocole d'analyse retenu

A partir de ces différents essais préliminaires, le protocole d'analyse par CMF retenu, pour étudier et comparer les effets générés par les différents traitements d'hydrolyse, comprend une étape de désagrégation/filtration, une dilution des échantillons afin d'obtenir une concentration en microorganismes proche de 10^6 B/mL , une numération des microorganismes à l'aide du « Bacteria Counting Kit », et une analyse de l'intégrité membranaire des microorganismes suite à un marquage avec le SYTOX Green (Figure 26).

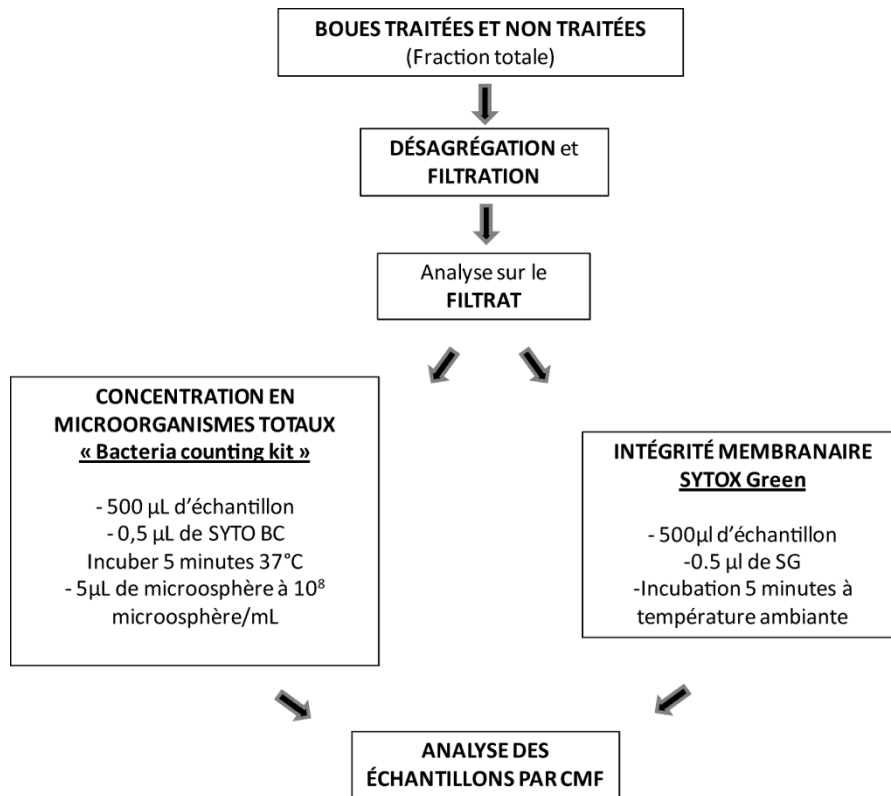


Figure 26 : Protocole d'analyse des échantillons de boues activées par cytométrie en flux.

Parallèlement aux analyses par CMF effectuées suite aux différents traitements d'hydrolyse (traitement thermique, sonication et ozonation), l'évolution de la flore microbienne est suivie au cours du temps dès la fin de l'application des traitements, en terme d'aptitude à la revivification par les techniques culturales, et en terme d'activité respiratoire par une méthode spectrophotométrique.

III. 4. b. Suivi de l'évolution de la population microbienne au cours du temps

L'impact des traitements d'hydrolyse sur l'activité respiratoire des microorganismes et sur la croissance bactérienne est également analysé dès la fin de chaque traitement. Par contre, l'évolution de ces deux paramètres est également suivie en post-traitement au cours du temps. Pour cela, 200 ml d'échantillons de boues soumises ou non (témoin) aux différents traitements sont placés sous agitation à température ambiante pendant 72 heures. L'évolution de la population bactérienne des boues au cours du temps est évaluée par un suivi de l'aptitude à la revivification des microorganismes par techniques culturales classiques, d'une part, et par un suivi de l'activité respiratoire par méthode spectrophotométrique, d'autre part.

i. Suivi de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne est évaluée par la méthode des dilutions/étalements qui permet de quantifier l'aptitude des bactéries à se revivifier sur un milieu nutritif gélosé. Cette analyse est effectuée à partir des échantillons de boues traitées et non traitées (contrôle) maintenus sous agitation. Elle est réalisée juste après traitement (T0), puis elle est réitérée toutes les 24 heures pendant 72 heures. 100 µL de dilutions décimales successives de ces différents échantillons sontensemencés sur géloses nutritives PCA (Plate Count Agar). Après incubation pendant 24 heures à 37°C, les microorganismes capables de se revivifier ou UFC (Unités Formant des Colonies) sont dénombrés.

ii. Suivi de l'activité respiratoire

L'activité respiratoire, étroitement liée au pouvoir de minéralisation de la matière organique par les microorganismes, peut être mesurée par divers composés rentrant dans la chaîne réactionnelle du métabolisme d'oxydation biologique (substrats, accepteurs finaux, enzymes, produits intermédiaires ou d'excrétion). Dans cette étude, l'activité respiratoire est évaluée *via* l'utilisation d'un sel de tétrazolium : le 2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide (XTT). Ce composé, accepteur artificiel d'électrons du système enzymatique oxydatif est réduit en formazan par la chaîne respiratoire des microorganismes lorsque celle-ci est active (Figure 27). La réduction du XTT en formazan de couleur rouge peut ensuite être mesurée par spectrophotométrie (Bensaid *et al.*, 2000).

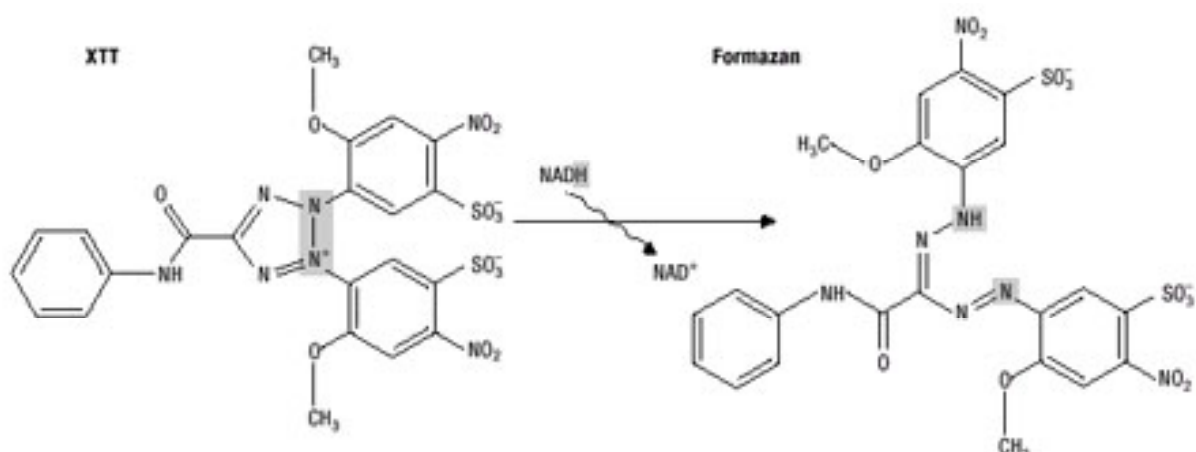


Figure 27 : Réduction du XTT en formazan.

Les échantillons de boues traitées et non traitées sont mis en présence de XTT et d'un agent découplant, la ménadione. Ce composé permet de découpler la chaîne respiratoire des microorganismes en abolissant la différence de potentiel électrochimique des protons. Pour compenser cette chute de potentiel, les oxydoréductases de la chaîne respiratoire augmentent leur pompage de protons, et donc les oxydations couplées, ce qui entraîne une augmentation de la respiration cellulaire des microorganismes.

Après incubation avec le substrat et l'agent découplant, la réaction enzymatique est stoppée, les échantillons sont centrifugés, et l'absorbance du surnageant est mesurée à 470 nm par spectrophotométrie (Figure 28).

Le XTT est un substrat des déshydrogénases, or ces enzymes sont également présentes au niveau des floccs. Pour s'affranchir de cette activité enzymatique extracellulaire, des essais sont réalisés en parallèle sur des boues filtrées à 0,22 μm . L'absorbance mesurée dans ces échantillons exempts de bactéries, donc liée à l'activité extracellulaire, est retranchée de l'absorbance mesurée sur la fraction totale des boues.

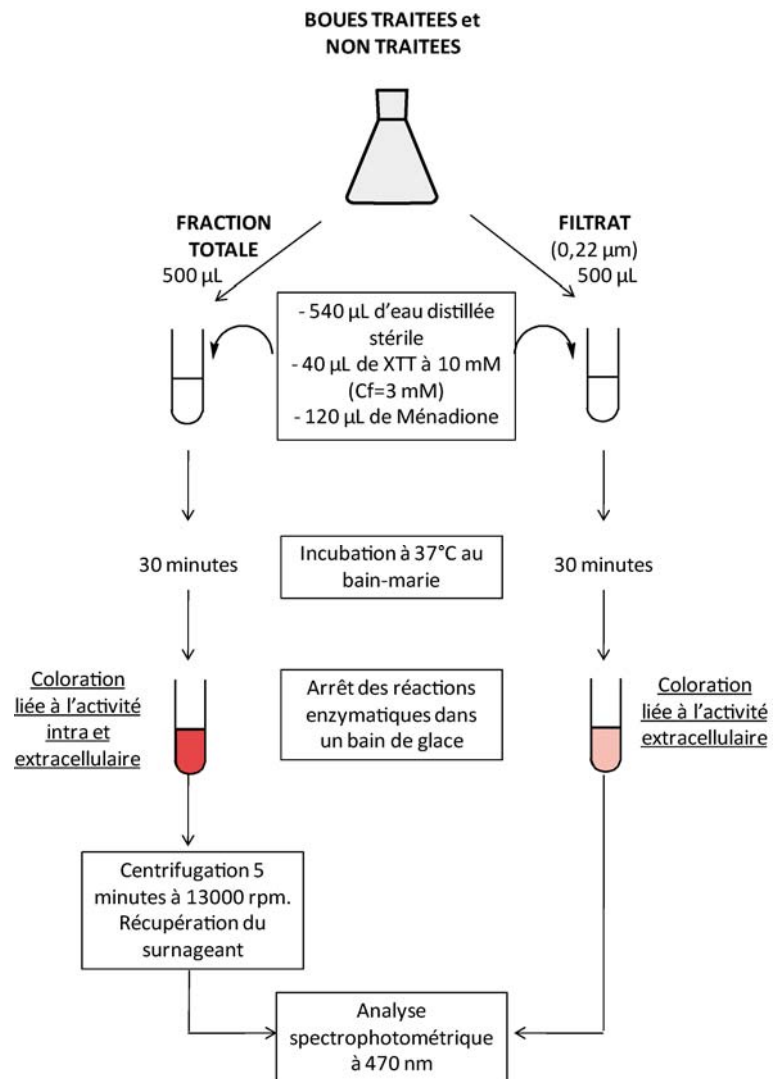


Figure 28 : Protocole de mesure de l'activité respiratoire.

IV. SYNTHÈSE DES EXPÉRIENCES EFFECTUÉES POUR CHAQUE TRAITEMENT

L'ensemble des essais présentés dans ce manuscrit sont indiqués dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Analyses et tests effectués

Type de traitement	Séries de traitement	Analyses effectuées
Traitement thermique ⁽¹⁾	1.a.1	Répartition de la matière Solubilisation des principaux constituants des boues : DCO, sucres, protéines et acides humiques CMF : numération bactérienne et évaluation de l'intégrité membranaire
	1.a.2	Reprise de la croissance bactérienne Reprise de l'activité respiratoire des microorganismes
Traitement thermique ⁽²⁾	1.b.1	Répartition de la matière Solubilisation des principaux constituants des boues : DCO, sucres, protéines et acides humiques CMF : numération bactérienne et évaluation de l'intégrité membranaire
	1.b.2	Reprise de la croissance bactérienne Reprise de l'activité respiratoire des microorganismes
	3.4	Biodégradabilité (conditions aérobie et anaérobie)
Sonication	2.1	Répartition de la matière Solubilisation des principaux constituants des boues : DCO, sucres, protéines et acides humiques CMF : numération bactérienne et évaluation de l'intégrité membranaire
	2.2	Reprise de la croissance bactérienne Reprise de l'activité respiratoire des microorganismes
	3.4	Biodégradabilité (conditions aérobie et anaérobie)
Ozonation	3.1 et 3.2	Répartition de la matière Solubilisation des principaux constituants des boues : DCO, sucres, protéines et acides humiques CMF : numération bactérienne et évaluation de l'intégrité membranaire
	3.3	Reprise de la croissance bactérienne Reprise de l'activité respiratoire des microorganismes
	3.4	Biodégradabilité (conditions aérobie et anaérobie)

⁽¹⁾ Effets du temps de traitement (traitement à 80°C pendant 5, 20, 40 et 60 minutes)

⁽²⁾ Effets de la température de traitement (traitement pendant 20 minutes à 50, 65, 80 et 95°C)

RESULTATS ET DISCUSSION

La production de boues lors de l'épuration des eaux usées est liée à plusieurs processus métaboliques relativement complexes. La production de biomasse engendrée par la réduction de la teneur en matières polluantes d'une eau usée peut se résumer en trois étapes :

- l'hydrolyse de la matière organique particulaire et colloïdale en matière organique soluble afin de favoriser son assimilation par les bactéries,

- l'oxydation de la matière organique soluble par les microorganismes : les bactéries utiliseront cette énergie pour assurer diverses fonctions biologiques (mobilité, renouvellement de leur matériel intracellulaire...) ainsi que pour leur multiplication (anabolisme) qui conduira à la production de biomasse,

- la mort cellulaire : le matériel intracellulaire des microorganismes étant biodégradable, il pourra servir à son tour de substrat à la biomasse métaboliquement active ; c'est la croissance cryptique. Sa libération dans le milieu extracellulaire suite à la lyse bactérienne, favorisera sa dégradation et par conséquent la réduction de boues.

Comme précédemment décrit, les PRPB basés sur des traitements d'hydrolyse ont pour vocation d'accélérer l'hydrolyse de la matière organique particulaire, d'une part, et/ou d'amplifier la croissance cryptique, d'autre part. En effet, ces étapes étant considérées comme limitantes dans la conversion de la matière organique, il semble judicieux d'appliquer un traitement (thermique, chimique ou mécanique) afin de réduire la taille des particules, et ainsi augmenter leur biodégradation. Cependant, très peu d'informations sont disponibles quant aux impacts réels de ces traitements sur la population bactérienne. Il est pourtant essentiel de comprendre le devenir de la population bactérienne soumise à ces traitements étant donné son rôle prépondérant dans la production de boues. La boue activée est une structure complexe réunissant cellules vivantes, cellules mortes, matières organiques et minérales au sein d'un mucilage issu du métabolisme bactérien : le floc. Les traitements d'hydrolyse que l'on applique dans le cadre des PRPB conduiront à une « déstructuration » de cette organisation plus ou moins importante en fonction du type de traitement et de son intensité. Un des

objectifs de ce travail étant justement de caractériser cette « déstructuration », il est important d'évaluer de niveau de solubilisation de la matière organique particulaire et de le corrélérer avec des analyses microbiologiques. En effet, cette solubilisation de la fraction particulaire des boues est-elle liée à une hydrolyse de la matière organique extracellulaire et/ou à une lyse cellulaire qui conduirait à une libération de polymères intracellulaires dans le milieu ? Quelles sont les conséquences de ces différents traitements sur l'activité métabolique des microorganismes ? Conduisent-ils à une croissance cryptique ? Existe-t-il une corrélation entre les effets produits sur la population bactérienne et la biodégradabilité subséquente des boues ?

Dans ce chapitre seront successivement présentés et discutés les résultats issus de trois types de traitement d'hydrolyse des boues : le traitement thermique, la sonication et l'ozonation, afin d'apporter des éléments de réponses à ces différentes interrogations. L'impact de ces traitements sur les propriétés à la fois chimiques et biologiques des boues seront répertoriés. Pour chaque traitement, les effets générés sur la répartition de la matière, sur les concentrations en DCO des fractions solubles et totales, sur la solubilisation des principaux constituants des boues seront abordés. L'impact de ces différents traitements sur la viabilité cellulaire ainsi que sur la reprise de croissance et d'activité respiratoire sera également précisé. Cette étude se propose donc de comparer les effets de trois types de traitement : physique (thermique), mécanique (sonication) et chimique (ozonation) en vue de leur comparaison selon la méthodologie décrite Figure 29.

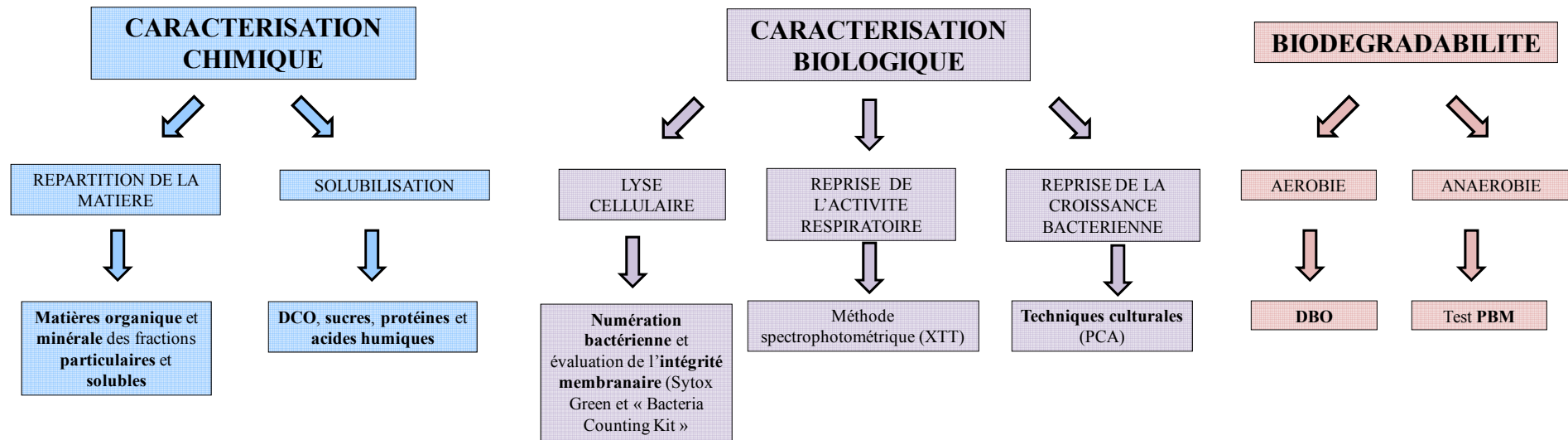


Figure 29 : Synthèse des différents paramètres pris en compte lors de l'analyse des différents traitements.

I. CARACTERISATION DES PARAMETRES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES BOUES AU COURS D'UN TRAITEMENT THERMIQUE

Comme précédemment décrit dans la partie bibliographique, le traitement thermique est considéré comme une technologie d'intérêt pour la solubilisation des boues et de nombreuses études ont montré que ce traitement peut solubiliser plus de 50% des boues. Cependant, après un traitement thermique à hautes températures (au-delà de 100°C), une fraction significative des boues est non biodégradable. Au contraire, dans le cas de traitement à basses températures (inférieures à 100°C), la formation de composés réfractaires est moindre. De plus, même si les taux maximums de réduction de la production de boues en couplant un traitement thermique à un système boues activées ne sont pas supérieurs à ceux qui peuvent être obtenus par voie biologique après digestion anaérobie, ce couplage présente néanmoins l'avantage de réduire la production de boues directement au niveau du bassin d'aération. Pour cette raison, le traitement thermique à basses températures a été choisi dans cette étude. Dans une première partie, les effets générés par un traitement thermique à 80°C pendant différents temps de traitement seront présentés. Dans la seconde partie, sur la base des conditions optimales déterminées en terme de temps de traitement, les effets du traitement thermique sur les caractéristiques chimiques et biologiques des boues seront présentés en fonction de la température appliquée.

I. 1. Etude d'un traitement à 80°C pendant différents temps : 5, 20, 40 et 60 minutes

Les résultats présentés dans cette partie, obtenus à partir de 3 séries de traitement, sont issus de 3 lots distincts de boues activées. Lors de la première série de traitement (Série 1.1), les analyses liées à l'évaluation de l'impact du traitement thermique sur les boues ont porté sur la répartition de la matière organique et minérale, sur la concentration en DCO, protéines, sucres et acides humiques des fractions solubles et totales des boues, ainsi que sur la lyse cellulaire par CMF. Au cours de la deuxième série de traitement (Série 1.2), nous avons étudié l'impact du traitement thermique sur les caractéristiques microbiologiques des boues par des techniques culturales et par le suivi de l'activité respiratoire des microorganismes. Les essais de biodégradabilité en conditions aérobie et anaérobie ont été effectués lors d'une troisième série de traitement (Série 1.3).

I. 1. a. Effets du traitement thermique sur la répartition de la matière

Les concentrations totales en matières organiques et minérales n'évoluent quasiment pas au cours du traitement thermique puisqu'elles sont respectivement de 2,19 g/L et de 1,22 g/L pour les boues non traitées et de 2,18 g/L et de 1,08 g/L pour les boues traitées à 80°C pendant 20 minutes.

En revanche, la répartition globale de la matière évolue au cours du traitement thermique (Figure 30). Ainsi, la concentration en matière organique soluble, quasiment nulle pour les boues non traitées, représente 9,5 % de la matière totale après 60 minutes de traitement thermique. La solubilisation de la matière organique survient au cours des 20 premières minutes de traitement. Au-delà de ce temps, la solubilisation de la matière organique atteint un plateau et le taux de solubilisation de la matière organique soluble reste constant, que le traitement thermique soit appliqué pendant 20, 40 ou 60 minutes.

Par contre, aucun transfert de matière minérale de la phase particulaire vers la phase soluble n'est constaté. Dans le cas des boues non traitées, la matière minérale soluble représente 9,85% de la matière totale. Ce pourcentage, constant au cours du traitement thermique est de 8,5% après 60 minutes de chauffage à 80°C. Dans les conditions de traitement appliquées, le traitement conduit donc à une solubilisation de la matière de nature essentiellement organique.

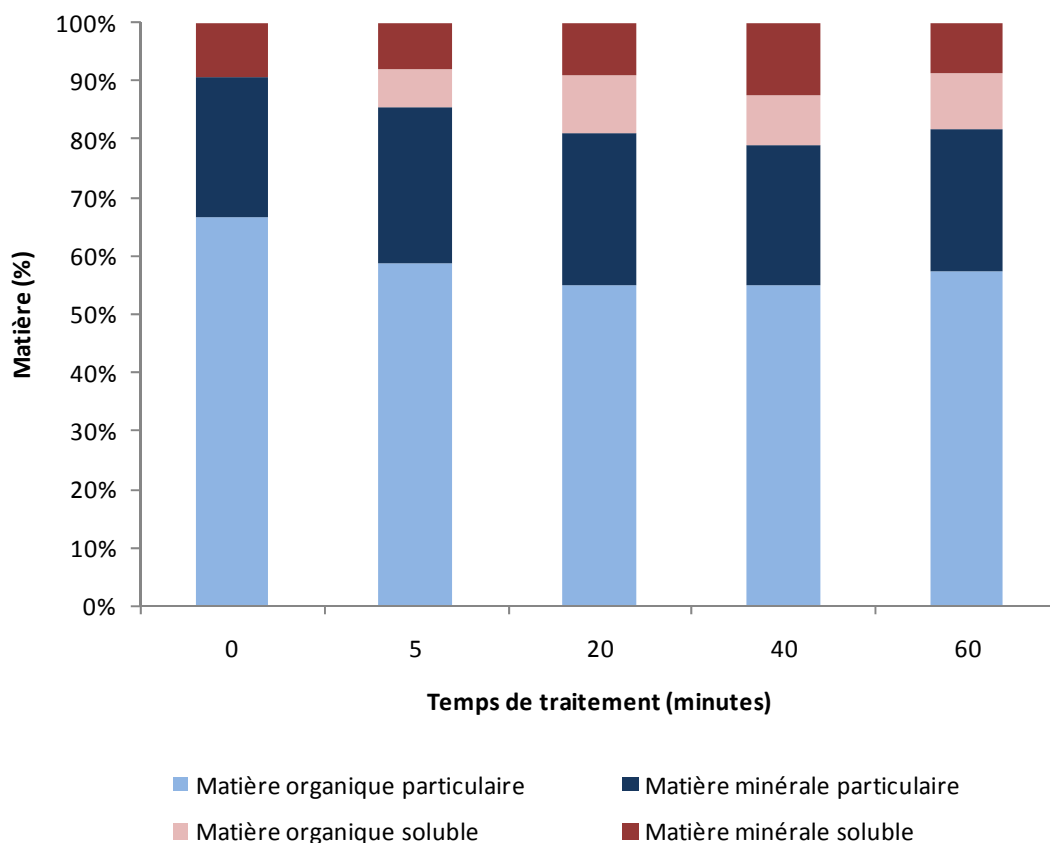


Figure 30 : Effets du traitement thermique sur la répartition de la matière. Evolution des pourcentages de matières organiques et minérales, solubles et particulaires en fonction du temps de traitement.

I. 1. b. Effets du traitement thermique sur la solubilisation de la matière organique

Les effets du traitement thermique sur la solubilisation globale de la matière organique ont d'abord été évalués en terme de DCO (Figure 31). Afin d'évaluer plus précisément la composition de la matière organique solubilisée, les taux de solubilisation de la DCO, des sucres et des protéines, composants majoritaires des boues activées, ont également été déterminés (Figure 32). Les concentrations en protéines et acides humiques des fractions solubles des boues avant et après traitement, déterminées par la méthode de Lowry modifiée par Frolund (1995), sont présentées sur la Figure 33.

i. Evolution des concentrations en DCO des fractions totales et solubles des boues

La concentration en DCO totale n'évolue pas au cours du traitement thermique dans les conditions testées. En effet, la DCO totale des boues non traitées est de 4415 (± 232) mg/L, et celle des boues traitées à 80°C pendant 60 minutes est de 4455 (± 234) mg/L.

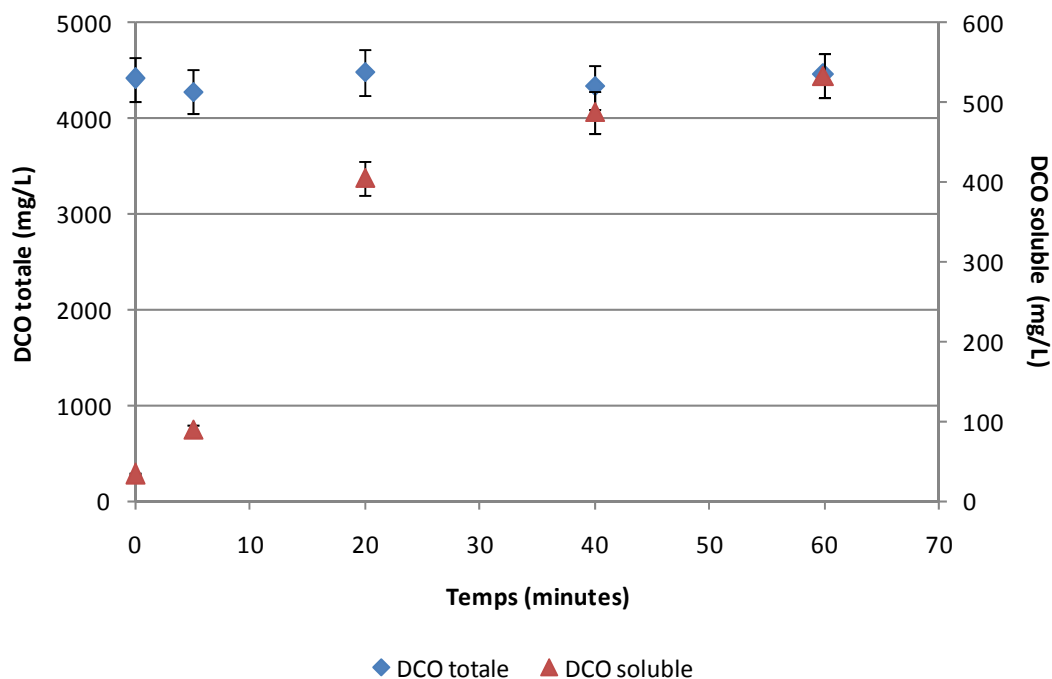


Figure 31 : Evolution de la concentration en DCO des fractions totales et solubles au cours d'un traitement thermique à 80°C en fonction du temps de traitement appliqué.

En revanche, nous constatons une très nette augmentation de la DCO soluble après 60 minutes de traitement puisqu'elle atteint 534 ($\pm 25,71$) mg/L alors qu'elle n'est que de 34 ($\pm 1,79$) mg/L dans la fraction soluble des boues non traitées. Cette augmentation de la DCO soluble, alors que la DCO totale reste constante, met clairement en évidence une modification de la répartition matière soluble/matière particulaire au cours du traitement thermique (Résultats, I. 1. a.). Ces résultats sont en accord avec les données obtenues précédemment sur la répartition de la matière. Peu d'effets sur la concentration en DCO soluble sont mis en évidence après 10 minutes de traitement, temps après lequel la répartition de la matière est peu modifiée (Figure 30). Au contraire, à partir de 20 minutes de traitement, la concentration en DCO soluble (406 ($\pm 21,38$) mg/L) augmente nettement, par comparaison à l'échantillon de boues non traitées (34 ($\pm 1,8$) mg/L), puis se stabilise au-delà de ce temps de traitement. Par conséquent, la répartition de la matière est modifiée à partir de 20 minutes de traitement thermique, puis se stabilise.

ii. Solubilisation des principaux constituants organiques des boues

Les effets du traitement thermique sur la solubilisation des principaux composants des boues sont présentés sur les Figure 32 et Figure 33.

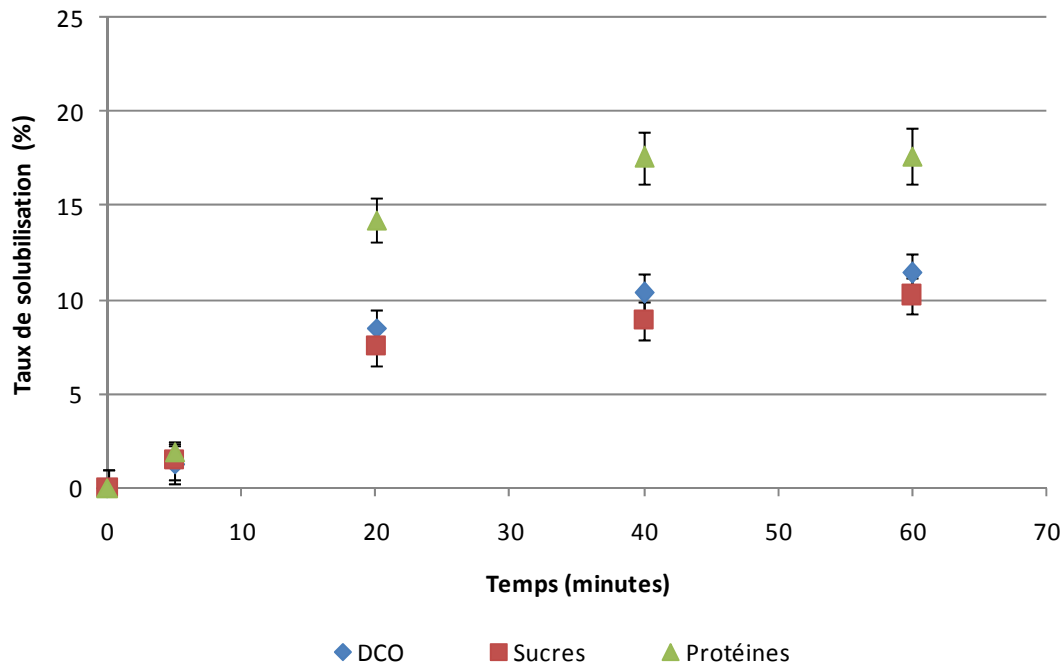


Figure 32 : Taux de solubilisation de la DCO, des protéines et des sucres au cours d'un traitement thermique à 80°C en fonction du temps de traitement appliqué.

Les taux de solubilisation des sucres et des protéines suivent la même tendance que celui de la DCO, c'est-à-dire qu'ils augmentent avec le temps de traitement. Après 5 minutes de traitement thermique à 80°C, les taux de solubilisation de la DCO, des protéines et des sucres sont faibles, mais sensiblement identiques puisqu'ils sont respectivement de 1,3 ($\pm 0,2$)%, 1,9 ($\pm 0,4$)% et 1,5 ($\pm 0,4$)%. Comme attendu par rapport aux résultats précédents (répartition de la matière et concentration en DCO des différentes fractions de la boue), à partir de 20 minutes de traitement, les taux de solubilisation de la DCO, des protéines et des sucres augmentent très nettement pour atteindre 8,5 ($\pm 0,9$)%, 14,2 ($\pm 1,08$)% et 7,5 ($\pm 1,9$)%. Au-delà de ce temps de traitement, les taux de solubilisation n'augmentent que très faiblement. Cependant, à partir de 20 minutes de traitement, il est important de noter que le taux de solubilisation des protéines est supérieur à celui des sucres et de la DCO. Il est clair que la mesure de la DCO prend en compte (intrinsèquement) les protéines, les sucres et les acides humiques, mais il est constaté une modification de leur répartition en fonction du

temps de chauffage, certainement dû à une sensibilité différente à la température. Cette tendance se confirme après 40 et 60 minutes de traitement. De plus, les résultats présentés sur la Figure 33 montrent d'importantes différences dans l'évolution des concentrations en protéines et en acides humiques de la fraction soluble des boues au cours du traitement thermique. Dans le cas des boues non traitées, la concentration en protéines de la fraction soluble est nulle alors qu'après 60 minutes de traitement thermique, elle atteint 141 ($\pm 7,23$) mg/L, soit un taux de solubilisation de 17 ($\pm 1,7$)% si l'on tient compte de la concentration initiale en protéines des fractions solubles et particulières des boues non traitées (Matériel et Méthodes, III. 2). La concentration en acides humiques de ces mêmes fractions n'augmente que de 8,4 ($\pm 0,3$) mg/L (boues non traitées) à 58,4 ($\pm 2,7$) mg/L (60 minutes de traitement), soit un taux de solubilisation de seulement 12,7 ($\pm 1,3$)%.

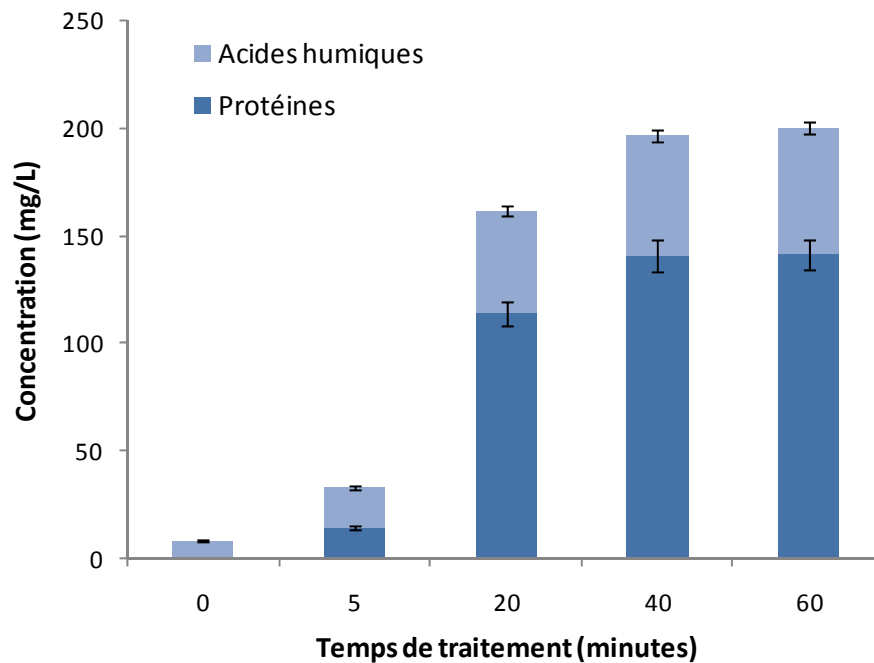


Figure 33 : Concentrations en protéines et en acides humiques des fractions solubles des boues au cours d'un traitement thermique à 80°C en fonction du temps de traitement appliqué.

Les essais menés sur la solubilisation de la matière au cours du traitement thermique, à température constante (80°C), permettent de montrer qu'un temps de traitement supérieur à 20 minutes a peu d'effets complémentaires sur la solubilisation de la fraction particulaire des boues. En effet, même si le traitement thermique conduit à des modifications importantes au niveau de la répartition de la matière, ces effets atteignent un plateau au-delà de 20 minutes de

traitement. La concentration en matière organique soluble, proche de zéro pour les boues non traitées, représente 9,5 % de la matière totale après 60 minutes de traitement thermique à 80°C alors que ce taux était déjà de 9,9% après 20 minutes de traitement. Par ailleurs, alors que la concentration en DCO totale n'évolue pas au cours du traitement thermique, la concentration en DCO soluble augmente jusqu'à 20 minutes de traitement. Cette augmentation de la DCO soluble est liée à une solubilisation des principaux constituants des boues : les protéines, les sucres et les acides humiques. Cependant, les résultats obtenus montrent que ce sont les protéines qui sont majoritairement solubilisées à partir de 20 minutes de traitement.

I. 1. c. Effets du traitement thermique sur les microorganismes des boues

Même si les précédents résultats mettent en évidence une solubilisation de la matière particulaire suite au traitement thermique, ces données ne permettent pas de déterminer précisément la nature de la matière solubilisée (intra ou extracellulaire), ni les conséquences de ce traitement en terme d'activité bactérienne. C'est pourquoi une caractérisation microbiologique des différents échantillons a été réalisée. L'étude des effets du traitement thermique sur la flore microbienne a porté sur la concentration en microorganismes totaux (Tableau 11), l'intégrité membranaire des cellules (Figure 34), le suivi de l'activité respiratoire des microorganismes (Figure 35) et la croissance bactérienne (Figure 36). L'impact du traitement thermique sur l'intégrité membranaire est analysé dès la fin de son application. L'activité respiratoire des microorganismes ainsi que la croissance bactérienne sont suivis au cours du temps dès la fin de l'application du traitement thermique. Les résultats présentés dans cette partie, obtenus à partir de 2 séries de traitement, sont issus de 2 lots distincts de boues activées. La caractérisation des effets thermiques sur l'intégrité membranaire des cellules a été effectuée sur la série 1a.1. Au cours de la deuxième série de traitement (Série 1a.2), l'impact du traitement thermique sur les caractéristiques microbiologiques des boues a été étudié par les techniques culturales et par le suivi de l'activité respiratoire des microorganismes.

Les effets du traitement thermique sur la lyse bactérienne ont été évalués suite à un marquage des échantillons avec un fluorochrome spécifique de l'intégrité membranaire, le SYTOX Green dont la fluorescence résulte de sa capacité à se fixer spécifiquement sur l'ADN cellulaire. La fluorescence des différents échantillons a ensuite été analysée par CMF.

Les résultats obtenus sont représentés ici sous forme de cytogrammes de type «density plot» où la fluorescence verte issue du marquage avec le SYTOX Green est représentée en fonction de FSC qui est corrélé avec la taille des cellules. L'intensité de fluorescence verte moyenne (IF) des échantillons est indiquée sur chaque cytogramme (Figure 34). Cette intensité de fluorescence a été déterminée après traitement des données statistiques issues des histogrammes (Annexe A). Parallèlement, le nombre de microorganismes totaux est déterminé pour chaque échantillon afin de s'assurer que les traitements n'entraînent pas une lyse importante ou totale des cellules, auquel cas ces microorganismes, réduits à l'état de débris cellulaires ne seraient plus pris en compte dans l'analyse de la fluorescence. La concentration en microorganismes totaux est déterminée à l'aide du « Bacteria Counting Kit » (Tableau 11).

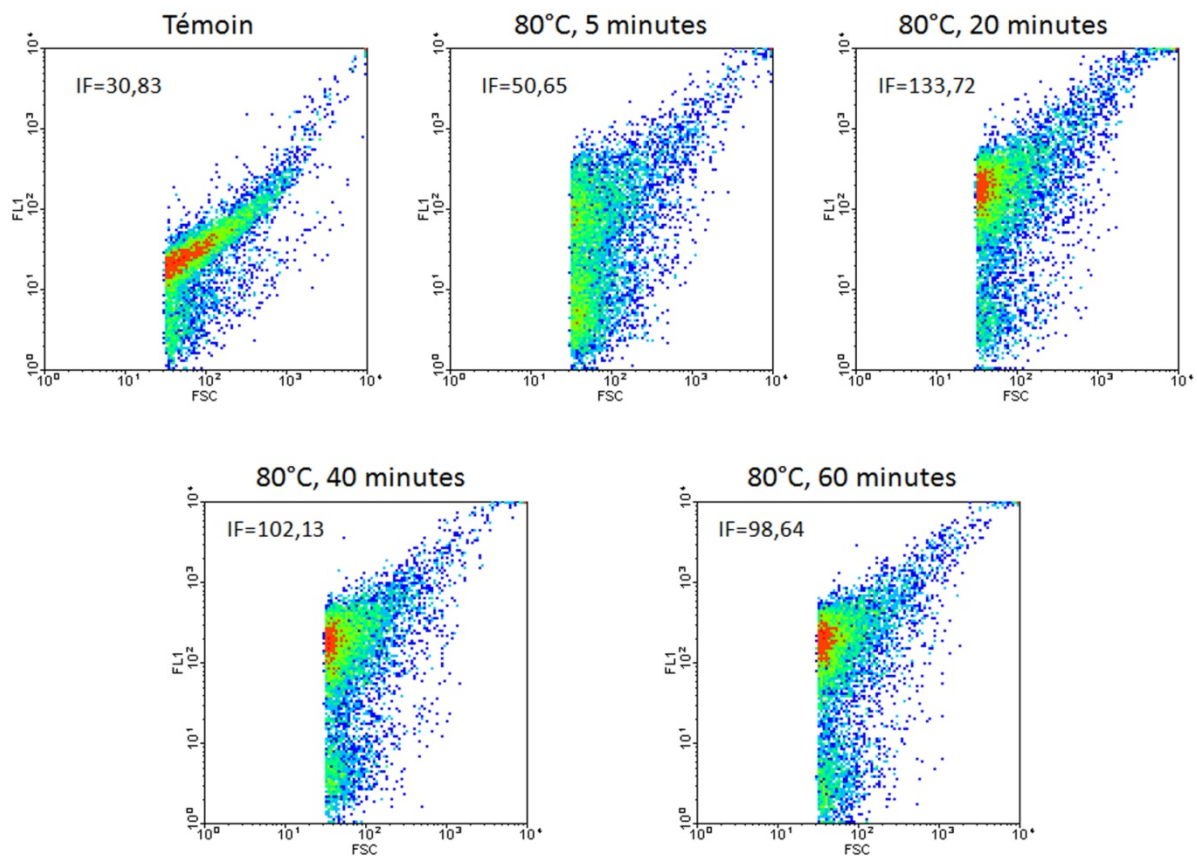


Figure 34 : Cytogrammes représentant la fluorescence verte (FL1) en fonction d'un paramètre morphologique (FSC) obtenus après marquage d'échantillons avec le SYTOX Green, de boues non traitées (témoïn), et soumises à un traitement thermique à 80°C pendant 5, 20, 40 ou 60 minutes.

Tableau 11 : Concentrations en microorganismes totaux déterminées par CMF après différents temps de traitement thermique à 80°C.

Echantillons	Non traitées	5 minutes	20 minutes	40 minutes	60 minutes
Concentration en microorganismes totaux (Bactéries/mL)	1,1E+08	1,28E+08	1,52E+08	2,06E+08	2,02E+08

Les résultats obtenus suite au marquage avec le SYTOX Green mettent en évidence une augmentation significative de l'intensité de fluorescence après 5 minutes de traitement à 80°C. En effet, à partir de ce temps de traitement l'intensité de fluorescence atteint 50,65 alors qu'elle n'est que de 30,83 dans l'échantillon de boues non traitées (témoin). L'intensité de fluorescence du SYTOX Green, en relation avec le degré de perméabilisation des cellules, augmente encore lorsque le temps de traitement atteint 20 minutes (IF=133,72). Par contre, au-delà de cette température, l'intensité de fluorescence commence à diminuer. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le fait qu'il y ait apparemment moins de cellules lysées après un traitement de 40 minutes qu'après un traitement de 20 minutes. Tout d'abord, il est possible que l'augmentation du temps de traitement conduise à une lyse totale des cellules préalablement perméabilisées. Dans ce cas, ces cellules ne seraient plus prises en compte dans les données statistiques avec comme conséquence une diminution globale de l'intensité de fluorescence. Cette hypothèse semble peu probable car la concentration en microorganismes totaux ne diminue pas à partir de 40 minutes de traitement (Tableau 11). La deuxième hypothèse que nous pouvons émettre serait qu'au-delà de 20 minutes de traitement, il y ait une désagrégation des microflocs résiduels avec libération de cellules individualisées peu, ou pas, endommagées par le traitement thermique. La troisième hypothèse serait liée à un problème de fixation du marqueur d'intégrité membranaire. Le SYTOX Green est une molécule qui se fixe spécifiquement au niveau de l'ADN après pénétration à l'intérieur des cellules perméabilisées. A partir de 40 minutes de traitement, l'ADN des cellules pourrait être soit partiellement ou totalement déstructuré. Ainsi, le SYTOX Green pénétrerait à l'intérieur des cellules dont la membrane est perméabilisée, mais ne pourrait plus se fixer sur l'ADN. Ces cellules, bien que perméabilisées, n'émettraient pas d'intensité de fluorescence, ce qui aurait pour conséquence une diminution de l'intensité de fluorescence.

Quoi qu'il en soit, d'après ces résultats, il apparaît que 20 minutes de traitement thermique à 80°C suffisent pour déstabiliser les membranes cellulaires, ce qui conduira ultérieurement à leur lyse.

Une légère augmentation de la concentration totale en microorganismes est observée au cours du traitement thermique (Tableau 11). Cette augmentation, pas réellement significative compte tenu du nombre total de cellules, est observée lors de tous les essais et s'explique probablement par une désagrégation accrue des floccs suite au traitement thermique. Il est en effet probable que tous les microflocs ne soient pas entièrement dissociés après l'étape de désagrégation préalable à l'analyse des échantillons par CMF. Il est alors logique que le traitement thermique, qui modifie significativement les caractéristiques des boues, conduise à une modification de la structure des microflocs. Par voie de conséquence, la diminution d'intensité de fluorescence verte de la population microbienne, observée après marquage avec le SYTOX Green, des boues traitées après 40 et 60 minutes, pourrait résulter de l'addition de deux phénomènes :

- la désagrégation, temps dépendante, de floccs résiduels au cours du temps de traitement entraînant une individualisation de cellules qui étaient alors mieux protégées (et donc moins endommagées) contre les effets thermiques à l'intérieur des floccs,
- la dénaturation thermique de l'ADN d'une fraction des cellules initialement bien individualisées.

Les résultats obtenus sur la lyse cellulaire suite au traitement thermique laissent présager des répercussions sur l'activité et la croissance des microorganismes. Afin de les évaluer, des essais ont été réalisés afin de mettre en évidence une éventuelle reprise d'activité et/ou de croissance bactérienne ; ces deux paramètres étant étroitement liés aux capacités épuratoires des microorganismes.

L'activité respiratoire des microorganismes a été mesurée avec le XTT sur des échantillons de boues traitées et non traitées (témoin). Cette analyse débute en fin de traitement thermique (T_0) et elle est suivie sur une période de 72h. En fin de traitement initial, les échantillons sont maintenus sous agitation orbitale à température ambiante.

A T_0 , les microorganismes des échantillons traités à 80°C pendant 5 minutes présentent une activité respiratoire comparable à celle des cellules de l'échantillon témoin. En revanche, à partir de 20 minutes de traitement à 80°C, les cellules ne présentent plus aucune activité respiratoire, l'absorbance à 470 nm étant nulle. Après 24h sous agitation, une reprise d'activité respiratoire est observée dans les échantillons traités thermiquement pendant au moins 20 minutes. Les cellules traitées à 80°C pendant 60 minutes présentent même une activité supérieure à celle du témoin. Au contraire, les échantillons traités pendant seulement 5 minutes montrent une activité respiratoire inférieure à celle du témoin. Cette tendance se poursuit jusqu'à 48h d'incubation. Après 56h, alors que l'activité respiratoire des microorganismes de l'échantillon témoin et de l'échantillon traité pendant 5 minutes est quasiment nulle, celle des microorganismes traités thermiquement pendant 20, 40 et 60 minutes ne cesse d'augmenter.

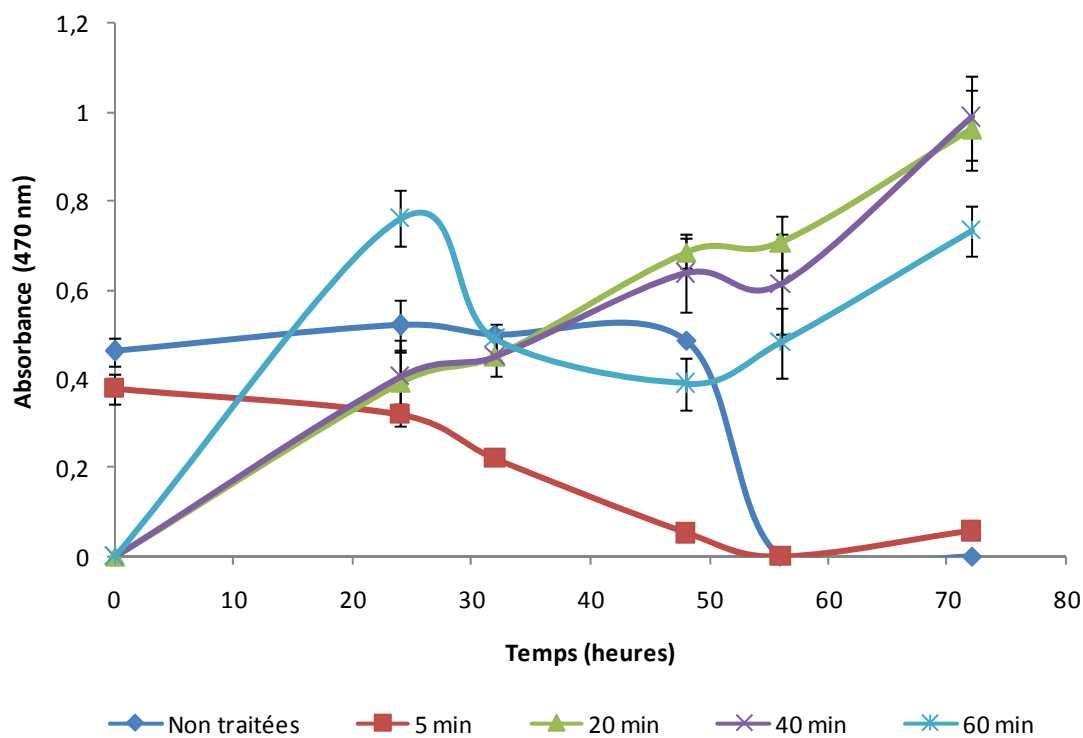


Figure 35 : Evolution de l'activité respiratoire des microorganismes contenus dans les boues activées en fonction du temps de traitement thermique initial à 80°C.

En parallèle de l'analyse de l'activité respiratoire, la croissance cellulaire des microorganismes de ces mêmes échantillons a été estimée à T_0 , à T_{0+24h} et à T_{0+48h} .

Les résultats obtenus par les techniques culturales mettent en évidence une importante diminution de la concentration en microorganismes cultivables à partir de 20 minutes de traitement (Figure 36). Au-delà de ce temps, ces concentrations restent relativement similaires. Même si les résultats liés à la mesure de l'activité respiratoire des microorganismes ne peuvent pas être directement corrélés avec les résultats de revivification sur milieu solide, la même tendance existe. En effet, juste après le traitement thermique, on observe une diminution de la concentration en microorganismes cultivables dans les échantillons traités pendant plus de 20 minutes (Figure 36). Cette diminution coïncide avec la chute de l'activité respiratoire des cellules (Figure 35).

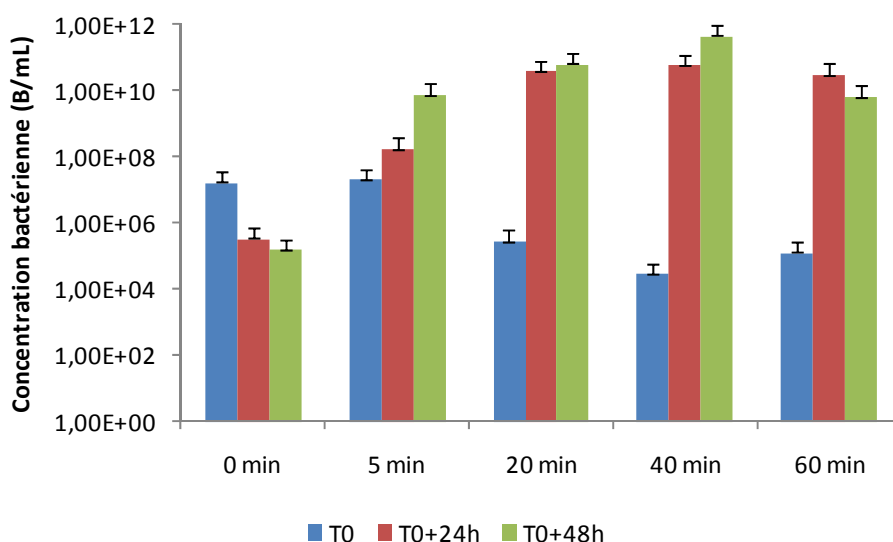


Figure 36 : Evolution de la concentration en microorganismes cultivables contenus dans les boues activées en fonction du temps de traitement thermique initial à 80°C.

De plus, après seulement 24h d'incubation des échantillons sous agitation, une reprise de croissance des bactéries dans les échantillons traités pendant au moins 20 minutes est clairement constatée. Cette reprise de croissance se poursuit 48h après le traitement. De la même manière, une reprise de l'activité respiratoire de ces cellules est constatée 48h après le traitement (Figure 35). En revanche, la reprise de croissance des microorganismes de

l'échantillon traité pendant 5 minutes paraît atypique étant donné que l'activité respiratoire estimée dans cet échantillon reste inférieure à celle de l'échantillon témoin.

Les analyses avec le SYTOX Green permettent de mettre en évidence une perméabilisation des membranes des microorganismes à partir de 5 minutes de traitement à 80°C. Ce phénomène, précurseur de la lyse cellulaire, augmente avec le temps de traitement. Ces résultats semblent être confirmés par ceux obtenus à T_0 par les techniques culturales (Figure 36). Une importante diminution du nombre de microorganismes cultivables est observée après 20 minutes de traitement. Au-delà de 20 minutes, les concentrations en microorganismes à T_0 restent très similaires. Les résultats relatifs à l'activité respiratoire des microorganismes suivent la même tendance que ceux obtenus par les techniques culturales (T_{0+24h} et T_{0+48h}) puisque dans les deux cas, la reprise d'activité est clairement marquée dans les échantillons traités pendant au moins 20 minutes. Cette reprise d'activité (augmentation de l'activité respiratoire et multiplication cellulaire après 24 et 48h d'incubation des échantillons traités thermiquement pendant au moins 20 minutes) peut être mise en relation avec le phénomène de croissance cryptique (utilisation à des fins métaboliques de substrats issus de cellules lysées). D'un point de vue méthodologique, la croissance cryptique est très difficile à mettre en évidence. Après lyse cellulaire, le matériel intracellulaire est libéré dans le milieu extracellulaire ; il est ensuite difficile de déterminer si les substrats utilisés par une cellule pour se multiplier sont issus de microorganismes lysés ou des autres nutriments présents dans le milieu. Par ailleurs, il est probable qu'une fraction des microorganismes non cultivables à T_0 , en raison du stress provoqué par le traitement thermique, soit à même d'être revivifiable à T_{0+24h} . Cependant, lors des essais, nous constatons une reprise de la croissance cellulaire et de l'activité respiratoire seulement dans les échantillons où une lyse cellulaire a été mise en évidence suite au traitement (échantillons traités pendant 20, 40 et 60 minutes). Il paraît donc plausible que cette reprise de croissance, qui n'a lieu que dans les échantillons où des cellules sont lysées suite au traitement, soit majoritairement liée à de la croissance cryptique.

I. 2. Etude d'un traitement thermique à différentes températures (50, 65, 80 et 95°C) pendant 20 minutes

Les résultats présentés dans la partie précédente ont montré qu'au-delà de 20 minutes de traitement à 80°C, l'impact du traitement thermique est limité que ce soit par rapport propriétés chimiques (solubilisation de la matière organique) ou par rapport aux modifications biologiques des boues (lyse cellulaire). Dans cette partie, ce sont les effets de la température sur les propriétés chimiques et biologiques des boues qui sont présentés. Le temps de traitement optimum déterminé précédemment (20 minutes) reste fixe et la température varie de 50 à 95°C.

Les résultats présentés dans cette partie, obtenus à partir de 3 séries de traitement, sont issus de 3 lots de boues activées distincts. Lors de la première série de traitement (Série 1b.1), nous avons analysé l'impact du traitement thermique sur la répartition de la matière organique et minérale, sur la concentration en DCO, protéines, sucres et acides humiques des fractions solubles et totales des boues, ainsi que sur la lyse cellulaire par CMF. Au cours de la deuxième série de traitement (Série 1b.2), nous avons étudié l'impact du traitement thermique sur les caractéristiques microbiologiques des boues par les techniques culturales et par le suivi de l'activité respiratoire des microorganismes. Les essais de biodégradabilité en conditions aérobies et anaérobies ont été effectués lors d'une troisième série de traitement (Série 1.3).

I. 2. a. Effets du traitement thermique sur la répartition de la matière

Les concentrations en MS demeurent constantes au cours du traitement (4,06 g/L pour les boues non traitées et 4,27 g/L après 20 minutes de traitement à 95°C). De la même façon, les concentrations totales en matières organiques et minérales n'évoluent quasiment pas au cours du traitement thermique puisqu'elles sont de 2,85 g/L et de 1,2 g/L respectivement pour les boues non traitées et de 3,03 g/L et de 1,24 g/L pour les boues traitées à 95°C pendant 20 minutes, ce qui permet d'affirmer qu'aucun phénomène de minéralisation n'est mis en jeu dans les conditions appliquées.

Comme précédemment, le traitement thermique conduit à des modifications importantes au niveau de la répartition de la matière (Figure 37). La concentration en matière organique soluble, nulle pour les boues non traitées représente 18,4% de la matière totale après 20 minutes de traitement à 95°C. En revanche, la répartition de la matière organique

soluble/particulaire évolue linéairement avec la température appliquée, à la différence des résultats obtenus précédemment qui mettent en évidence une solubilisation de la matière organique jusqu'à 20 minutes de traitement puis une stabilisation au-delà de ce temps.

L'augmentation de la température jusqu'à 95°C n'a aucun effet sur la solubilisation de la matière minérale étant donné que sa concentration dans les fractions particulaires et solubles des boues reste constante quelle que soit la température appliquée. Dans le cas des boues non traitées, la matière minérale soluble représente 8,9% de la matière totale. Après 20 minutes de traitement à 95°C pendant 20 minutes, ce pourcentage reste similaire au témoin puisqu'il est de 9,2%.

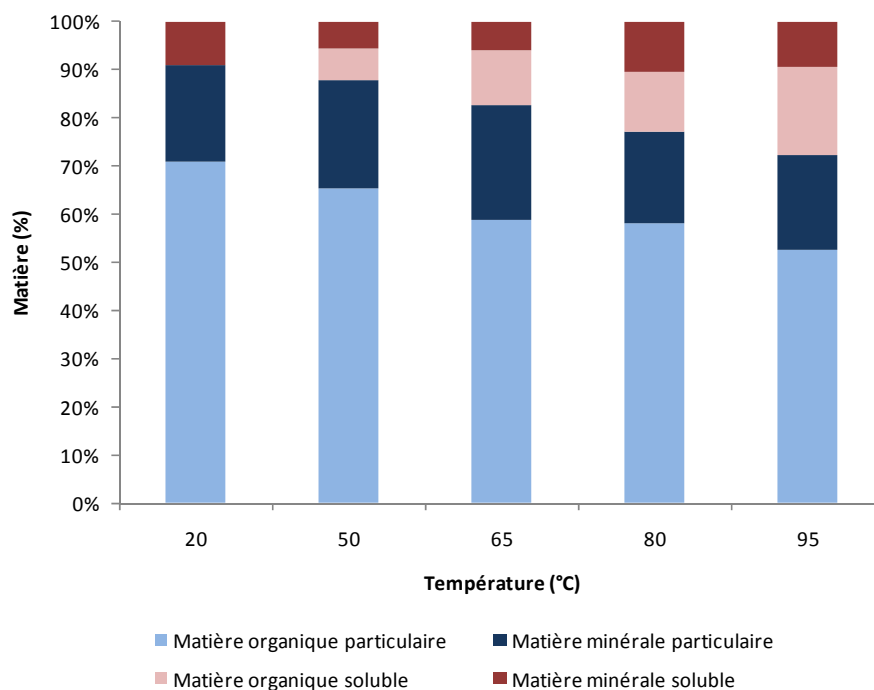


Figure 37 : Effets du traitement thermique sur la répartition de la matière. Evolution des pourcentages de matières organiques et minérales, solubles et particulaires en fonction de la température appliquée.

I. 2. b. Effets du traitement thermique sur la solubilisation de la matière organique

i. Evolution des concentrations en DCO des fractions totales et solubles des boues

La concentration en DCO totale n'évolue pas au cours du traitement thermique dans les conditions testées. La DCO totale des boues non traitées est de 3260 (± 171) mg/L, et celle des boues traitées à la température maximale (95°C) est de 3345 (± 176) mg/L. En revanche, nous constatons une augmentation de la DCO soluble dès 50°C puisqu'elle est de 68,9 ($\pm 3,6$) mg/L alors qu'elle n'est que de 17,3 ($\pm 0,9$) mg/L dans la fraction soluble des boues non traitées (Figure 38). Lorsque la température maximale est appliquée, soit 95°C, la concentration en DCO soluble atteint 418,2 (± 22) mg/L. Si l'on compare ces résultats avec les données obtenues précédemment, les concentrations en DCO soluble sont légèrement inférieures dans la série 2. Lors de la série 1, après un traitement à 80°C pendant 20 minutes, la concentration en DCO soluble est de 534 ($\pm 25,71$) mg/L (Figure 31), alors que lors de la série 2, la concentration en DCO soluble n'est que de 371,9 ($\pm 19,6$) mg/L (Figure 38). Cependant, les taux de solubilisation de la DCO pour les séries 1 et 2 sont relativement semblables puisqu'ils sont respectivement de 8,4 ($\pm 0,6$)% et de 9,1 ($\pm 0,6$)%.

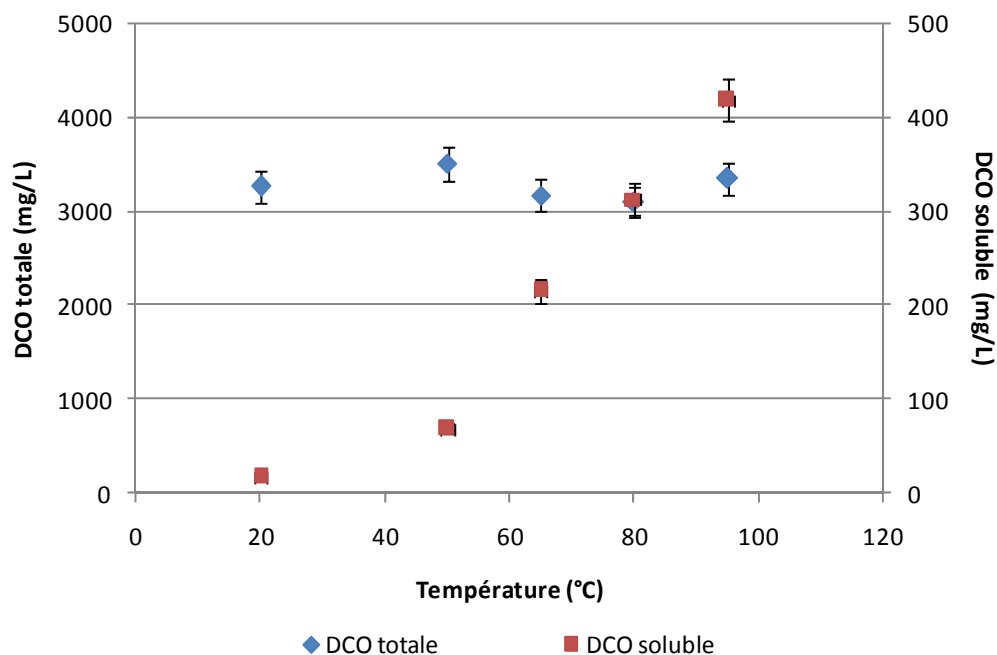


Figure 38 : Evolution de la concentration en DCO des fractions totales et solubles au cours d'un traitement thermique pendant 20 minutes en fonction de la température appliquée.

ii. Solubilisation des principaux constituants organiques des boues

Les effets du traitement thermique sur la solubilisation des principaux composants des boues sont représentés sur les Figure 39 et Figure 40.

Les taux de solubilisation des sucres et des protéines suivent la même tendance que celui de la DCO, c'est-à-dire qu'ils augmentent avec la température de traitement (Figure 39). Dès 50°C, on constate une augmentation des taux de solubilisation de la DCO, des sucres et des protéines, même s'ils sont très faibles (1,59 ($\pm 0,2$)%, 0,96 ($\pm 0,2$)% et 1,48 ($\pm 0,2$)%, respectivement). Au-delà de cette température, ces taux de solubilisation augmentent de façon quasiment proportionnelle avec la température appliquée, jusqu'au traitement maximal (95°C). A 95°C, les taux de solubilisation de la DCO, des sucres et des protéines atteignent 12,36 ($\pm 1,3$)%, 7,44 ($\pm 1,9$)% et 18,60 ($\pm 1,8$)%. Comme précédemment (I. 1. b. ii.), on constate qu'au-delà de 20 minutes de traitement à 80°C le taux de solubilisation des protéines est supérieur à celui de la DCO et à celui des sucres.

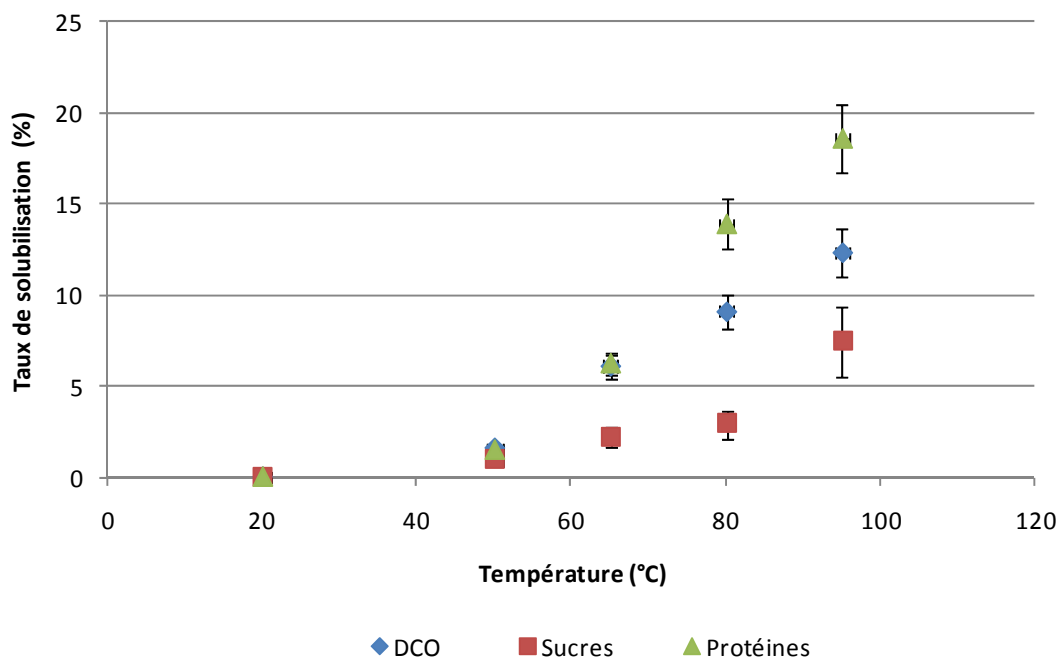


Figure 39 : Taux de solubilisation de la DCO, des protéines et des sucres au cours d'un traitement thermique pendant 20 minutes en fonction de la température appliquée.

De plus, les résultats obtenus montrent d'importantes différences dans l'évolution des concentrations en protéines et en acides humiques de la fraction soluble des boues au cours du traitement thermique (Figure 40). Dans le cas des boues non traitées, la concentration en protéines de la fraction soluble est proche de zéro, alors qu'après 20 minutes de traitement à 95°C elle atteint 163,05 ($\pm 8,35$) mg/L, soit un taux de solubilisation de 18,6 ($\pm 1,8$)% si l'on tient compte de la concentration initiale en protéines des fractions solubles et particulaires des boues non traitées (Matériel et méthodes, III. 2). La concentration en acides humiques de ces mêmes fractions augmente de 5,24 ($\pm 0,2$) mg/L (boues non traitées) à 38,80 ($\pm 1,8$) mg/L, soit un taux de solubilisation de seulement 9,6 (± 1)%. De plus, à partir d'un traitement à 65°C, la concentration en protéines dans la fraction soluble ne cesse d'augmenter, alors que la concentration en substances humiques est similaire à 65°C, 80°C et 95°C.

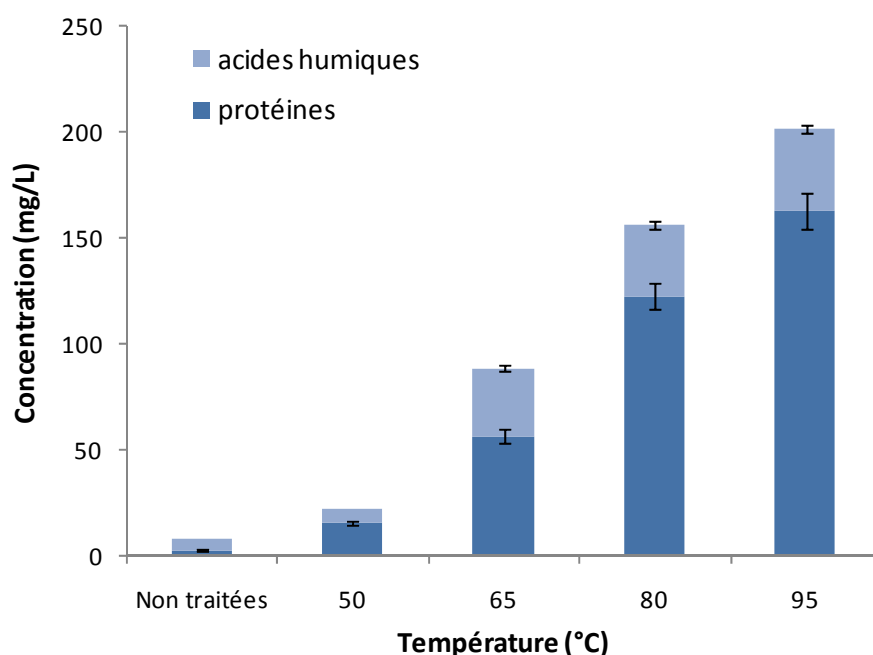


Figure 40 : Concentrations en protéines et en acides humiques au cours d'un traitement thermique pendant 20 minutes en fonction de la température appliquée.

Les essais menés sur la solubilisation de la matière au cours du traitement thermique, à temps de traitement constant, montrent que la température de traitement est un paramètre majeur pour la solubilisation de la fraction particulaire des boues. En effet, le traitement thermique conduit à des modifications importantes au niveau de la répartition de la matière.

La concentration en matière organique soluble, proche de zéro pour les boues non traitées représente 18,4% de la matière totale après 20 minutes de traitement à 95°C. De plus, la répartition de la matière organique soluble/particulaire évolue linéairement avec la température appliquée. Par ailleurs, alors que la concentration en DCO totale n'évolue pas au cours du traitement thermique, la concentration en DCO soluble augmente en fonction de la température appliquée. Cette augmentation de la DCO soluble est liée à une solubilisation des principaux constituants des boues : les protéines, les sucres et les acides humiques. Cependant, les résultats obtenus montrent que les protéines sont le plus solubilisées à partir d'un traitement à 80°C.

I. 2. c. Effets du traitement thermique sur les microorganismes des boues

Afin de connaître plus précisément l'origine de la matière solubilisée au cours du traitement thermique et d'estimer les conséquences que ce type de traitement peut avoir en terme d'activité et de croissance bactérienne, la caractérisation des différents paramètres microbiologiques a été effectuée. L'étude du traitement thermique sur la flore microbienne a porté sur la concentration en microorganismes totaux (Tableau 12), l'intégrité membranaire des cellules (Figure 41), le suivi de l'activité respiratoire des microorganismes (Figure 42) et la croissance bactérienne (Figure 43). L'impact du traitement thermique sur l'intégrité membranaire est analysé dès la fin de leur application. L'activité respiratoire des microorganismes ainsi que la croissance bactérienne sont suivis au cours du temps dès la fin de l'application du traitement thermique. Les résultats présentés dans cette partie, obtenus à partir de 2 séries de traitement, sont issus de 2 lots distincts de boues activées. La caractérisation des effets thermiques sur l'intégrité membranaire des cellules a été effectuée lors de la série 1b.1. Au cours de la deuxième série de traitement (Série 1b.2), l'impact du traitement thermique sur les caractéristiques microbiologiques des boues a été étudié par les techniques culturales et par le suivi de l'activité respiratoire des microorganismes.

Comme précédemment, les effets du traitement thermique sur la lyse bactérienne ont été évalués suite à un marquage des échantillons avec un fluorochrome spécifique de l'intégrité membranaire, le SYTOX Green. La fluorescence des différents échantillons a ensuite été analysée par CMF. Les résultats obtenus sont représentés ici sous la forme de cytogrammes de type « density plot » où la fluorescence verte issue du marquage avec le SYTOX Green est représentée en fonction de FSC qui est corrélé avec la taille des cellules.

L'intensité de fluorescence (IF) verte moyenne de l'échantillon est indiquée en dessous des cytogrammes (Figure 41). Cette intensité de fluorescence a été déterminée après traitement des données statistiques issues des histogrammes (Annexe A). Parallèlement, le nombre de microorganismes totaux est déterminé pour chaque échantillon, grâce à l'utilisation du « Bacteria Counting Kit » (Tableau 12).

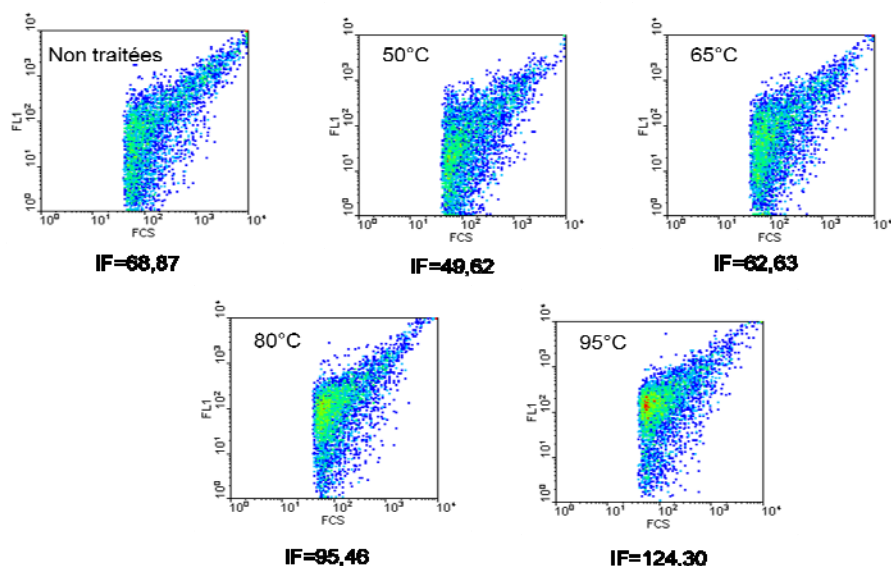


Figure 41 : Cytogrammes représentant la fluorescence verte (FL1) en fonction d'un paramètre morphologique (SSC) obtenus après marquage d'échantillons de boues non traitées, et soumises à un traitement thermique avec le SYTOX Green pendant 20 minutes à différentes températures.

Tableau 12 : Concentrations en microorganismes totaux déterminées par CMF après un traitement thermique de 20 minutes à différentes températures.

Echantillons	Non traitées	50°C	65°C	80°C	95°C
Concentration en microorganismes totaux (Bactéries/mL)	1,17E+08	2E+08	2,21E+08	3,80E+08	2,56E+08

Les résultats obtenus suite au marquage avec le SYTOX Green mettent en évidence une augmentation significative de l'intensité de fluorescence à partir d'un traitement à 80°C. A partir de cette température l'intensité de fluorescence atteint 95,46 alors qu'elle n'est que de 68,87 dans l'échantillon de boues non traitées. L'intensité de fluorescence, mettant en évidence une perméabilisation des cellules à partir de cette température, augmente encore

lorsque la température atteint 95°C (IF=124,30). Au vu de ces résultats, il apparaît donc que 20 minutes de traitement thermique à 80°C suffisent pour déstabiliser les membranes des cellules, ce qui conduira ultérieurement à une lyse de ces dernières.

La concentration cellulaire augmente légèrement, voire peu significativement, au cours du traitement thermique (Tableau 12). Cette augmentation de la concentration en microorganismes totaux pourrait s'expliquer par une désagrégation des floccs suite au traitement thermique. Malgré l'étape de désagrégation préalable à l'analyse des échantillons par CMF, il est probable que tous les microflocs ne soient pas entièrement dissociés. Il est logique que le traitement thermique, qui modifie significativement la structure des boues, conduise à une modification de la structure des microflocs. Ceci expliquerait aussi la diminution de l'intensité de fluorescence observée dans l'échantillon traité à 50°C. En effet, l'intensité de fluorescence étant déterminée statistiquement à partir du nombre total d'évènements, des cellules associées en agrégat peuvent donner une intensité de fluorescence supérieure à celle obtenue par un échantillon où le nombre de cellules individualisées est plus important. L'intensité de fluorescence de notre échantillon témoin est donc vraisemblablement surestimée. L'échantillon traité à 50°C dans lequel les cellules sont plus désagrégées que dans l'échantillon témoin et qui présente une intensité de fluorescence plus faible serait par conséquent notre « vrai » témoin. A partir de 65°C, la concentration en microorganismes totaux augmente encore, mais l'intensité de fluorescence aussi. Ce qui signifie qu'à partir de cette température, les cellules continuent à être désagrégées, mais elles commencent à être perméabilisées puisque le SYTOX Green pénètre à l'intérieur des cellules. Cette observation constitue donc une des limites de la CMF dans l'analyse des effets générés par les PRPB sur la population bactérienne. C'est pourquoi, lors de ces essais, seule une analyse qualitative, basée sur la comparaison de l'intensité de fluorescence des échantillons, a été réalisée. En effet, l'augmentation de la concentration en microorganismes totaux suite au traitement ne rend pas possible une analyse quantitative.

L'analyse des effets générés par la température sur la population bactérienne a été complétée par un suivi de l'activité respiratoire et de la croissance bactérienne au cours du temps dès la fin du traitement. La solubilisation de la matière organique particulière ainsi que la lyse cellulaire, précédemment mises en évidence suite au traitement thermique, conduisent à une augmentation de la concentration en composés facilement assimilables par les

microorganismes dans le milieu, et donc influent sur l'activité bactérienne et la croissance cellulaire. Afin d'évaluer les répercussions de ce traitement sur la reprise d'activité des microorganismes, un suivi de l'activité respiratoire et de la croissance bactérienne a été réalisé. L'activité respiratoire des microorganismes a été mesurée avec le XTT sur des échantillons de boues traitées et non traitées (témoin). Cette analyse est effectuée juste après le traitement (T₀) et est réitérée régulièrement pendant 72h. Les échantillons sont maintenus sous agitation orbitale à température ambiante.

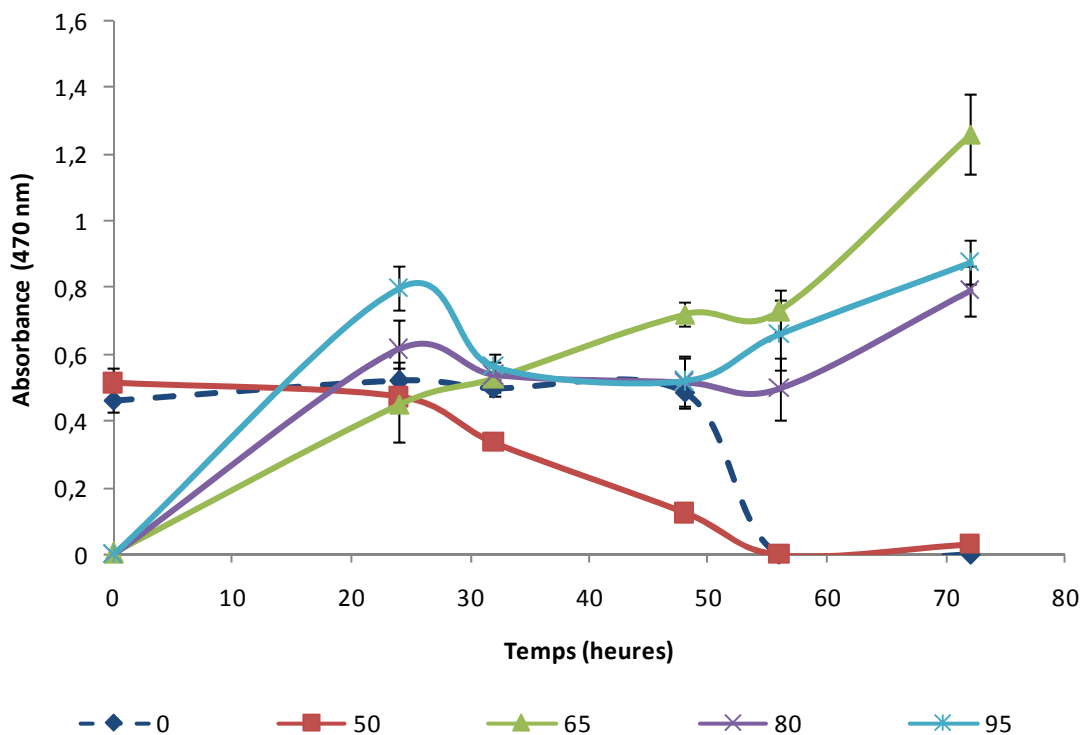


Figure 42 : Evolution de l'activité respiratoire des microorganismes contenus dans les boues activées après un traitement thermique de 20 minutes selon différentes températures.

Nous constatons tout d'abord qu'à T₀, les microorganismes des échantillons traités à 50°C présentent une activité respiratoire comparable à celle des cellules de l'échantillon témoin. En revanche, les cellules des échantillons traités à une température égale ou supérieure à 65°C ne présentent plus aucune activité respiratoire, l'absorbance à 470 nm étant nulle. Après 24h sous agitation, les microorganismes de ces échantillons retrouvent une activité respiratoire normale par rapport au témoin. Les cellules traitées à 80 et à 95°C présentent même une activité supérieure à celle du témoin. Après 32h, l'activité des cellules traitées à 50°C chute par rapport à l'échantillon témoin. Les autres échantillons traités à 65,

80 et 95°C maintiennent une activité semblable à celle du témoin. A partir de 48h, alors que les microorganismes des échantillons non traités et traités à 50°C ne présentent quasiment plus d'activité, les cellules des échantillons traités à des températures plus importantes montrent une très nette reprise d'activité respiratoire.

En parallèle de l'analyse de l'activité respiratoire, l'aptitude à la revivification des microorganismes de ces mêmes échantillons a été estimée à T_0 , à T_{0+24h} et à T_{0+48h} .

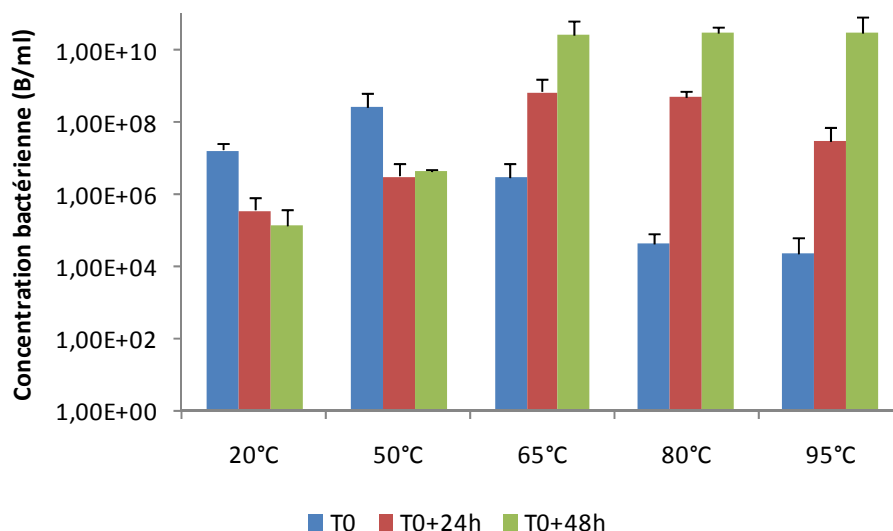


Figure 43 : Evolution de la concentration en microorganismes cultivables contenus dans des boues activées après un traitement thermique de 20 minutes à différentes températures.

Juste après le traitement thermique, une diminution de la concentration en microorganismes cultivables dans les échantillons traités à plus de 65°C est observée (Figure 43). Même si les résultats liés à l'activité respiratoire des microorganismes ne peuvent pas être directement corrélés avec les résultats de revivification sur milieux solides, une même tendance apparaît. Ces résultats sont en accord avec la chute de l'activité respiratoire des cellules qui apparaît pour les températures les plus élevées. Après 24h d'incubation des échantillons sous agitation, une reprise de la croissance bactérienne dans les échantillons traités à une température égale ou supérieure à 65°C est clairement constatée. Cette reprise de croissance se poursuit 48h après le traitement. De la même manière, une reprise de l'activité respiratoire de ces cellules est constatée 48h après le traitement (Figure 42).

Les analyses microbiologiques ont permis de montrer qu'une partie de la population microbienne perdait son intégrité membranaire dès 65°C. Ce phénomène, conduisant à la lyse cellulaire, augmente avec la température appliquée. Immédiatement après le traitement (T₀), les microorganismes des échantillons traités à des températures supérieures à 65°C présentent une chute de l'activité respiratoire ainsi qu'une perte de l'aptitude à la revivification ; perte en relation avec la fraction de cellules perméabilisées et l'induction d'un stress thermique sur une autre fraction qui la rend non cultivable dès la fin du traitement. En revanche, dans ces mêmes échantillons, une reprise de l'activité respiratoire et de la croissance cellulaire est observée respectivement 24h et 48h après le traitement. Ainsi, comme précédemment, même si la croissance cryptique ne peut pas être clairement mise en évidence, elle paraît vraisemblable puisque la reprise de croissance et de l'activité respiratoire est uniquement observée dans les échantillons où une fraction des microorganismes a été lysée.

I. 2. d. Effets du traitement thermique sur la biodégradabilité des fractions totales et solubles des boues

L'impact du traitement thermique sur la biodégradabilité des boues a été étudié en conditions aérobies et anaérobies. Ces essais ont été menés sur les fractions totales des boues ainsi que sur les fractions solubles afin d'étudier précisément les effets du traitement thermique sur chacune de ces fractions. Lors de cette série, seules les boues traitées à 95°C pendant 20 minutes (traitement correspondant au plus grand taux de solubilisation de la DCO) ont été caractérisées. Les caractéristiques des boues avant et après le traitement thermique sont présentées dans le Tableau 13. Les essais de biodégradabilité en conditions aérobies et anaérobies ont été menés en parallèle à partir des mêmes échantillons.

Tableau 13 : Caractéristiques des boues avant et après un traitement thermique à 95°C pendant 20 minutes.

Traitement	MS (g/L)	MES (g/L)	Taux de solubilisation (%)			
			DCO	Sucres	Protéines	A. Humiques
Témoin	3,43±0,15	3,33±0,15	-	-	-	-
Traitement thermique	3,27±0,15	1,87±0,12	14,03±0,76	10,30±2,95	34,00±3,64	18,62±2,95

i. Biodégradabilité en conditions aérobies

L'effet du traitement thermique sur la biodégradabilité en conditions aérobies des boues a été étudié par un suivi de la DBO des fractions totales et solubles avant et après traitement (Tableau 14).

Tableau 14 : DBO à 5, 7 et 21 jours des fractions totales, solubles et particulaires des boues avant et après un traitement thermique à 95°C pendant 20 minutes.

Traitement	Fractions	DBO ₅ (mg O ₂ /L)	DBO ₇ (mg O ₂ /L)	DBO ₂₁ (mg O ₂ /L)
Témoin	Totale	900±180	900±180	1400±280
	Soluble	10±2	10±2,2	19±3,8
	Particulaire ^(*)	890±178	890±179	1381±276
Thermique	Totale	800±160	900±180	1500±300
	Soluble	280±56	300±60	460±92
	Particulaire ^(*)	520±104	600±120	1040±208

(*) : valeurs obtenues par différence entre la fraction totale et soluble.

Tandis que les valeurs de la DBO totale du témoin et de l'échantillon traité sont relativement similaires, les valeurs de la DBO soluble sont très supérieures après le traitement thermique. Cependant, cette augmentation de la DBO soluble, qui s'explique par une plus forte concentration en matière organique soluble (Tableau 13), ne nous renseigne pas quant à la biodégradabilité intrinsèque des différentes fractions. L'évolution du rapport DBO/DCO pour chaque fraction (totale et soluble) a donc été suivie au cours du temps (21 jours) (Figure 44).

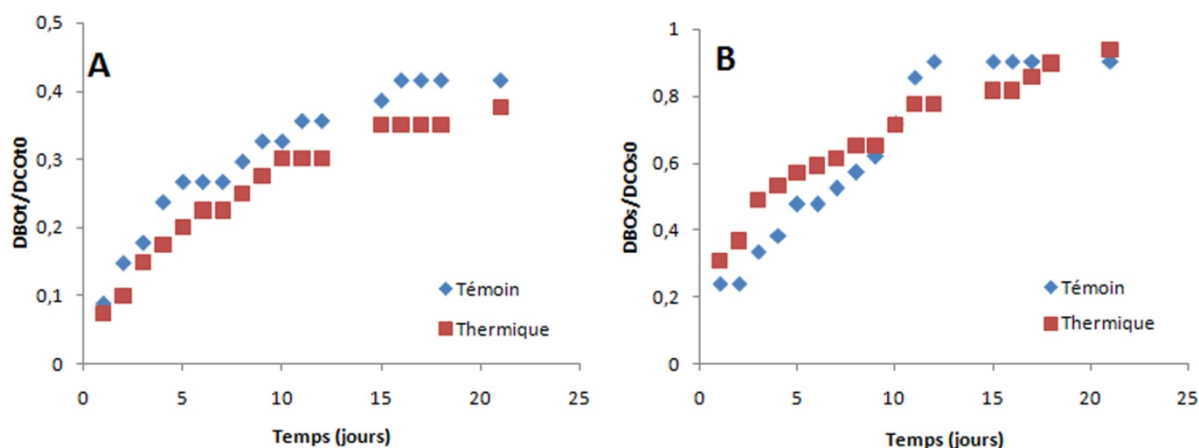


Figure 44 : Evolution du rapport DBO/DCO des fractions totales (A) et solubles (B) de boues non traitées (témoin) et après un traitement thermique à 95°C pendant 20 minutes.

Après 21 jours d'incubation, le rapport DBO/DCO de la fraction totale des boues non traitées et après traitement thermique atteint 0,41 et 0,37 respectivement (Figure 44, A). Ces valeurs, relativement similaires, semblent indiquer que le traitement thermique a peu

d'influence sur la biodégradabilité des boues totales. L'allure générale des courbes semble même indiquer que les boues non traitées sont légèrement plus biodégradables que les boues traitées. Au niveau de la fraction soluble, là encore, aucune différence significative n'est mise en évidence avant et après le traitement thermique (Figure 44, B). En effet, le rapport DBO/DCO est de 0,90 dans le cas du témoin et de 0,93 dans le cas des boues traitées après 21 jours d'incubation. Ce rapport, proche de 1, montre que la quasi-totalité de la fraction soluble est biodégradable, en conditions aérobies, que les boues soient traitées thermiquement ou non. Ainsi, en conditions aérobies, (1) le traitement thermique, dans les conditions testées, n'augmente pas la biodégradabilité intrinsèque des boues, malgré la solubilisation de la fraction particulaire, (2) la fraction soluble des boues après traitement thermique n'est pas moins biodégradable que la fraction soluble des boues non traitées.

ii. Biodégradabilité en conditions anaérobies

Comme dans le cas de l'étude de la biodégradabilité des échantillons de boues traitées et non traitées en conditions aérobies, l'impact du traitement thermique sur la biodégradabilité des boues en conditions anaérobies a été étudié sur les fractions totales et solubles des boues, en parallèle. Ainsi, pour un même échantillon, le test comprend une série de batchs : le témoin (inoculum seul), l'essai sur la fraction totale de la boue (inoculum+fraction totale) et l'essai sur la fraction soluble de la boue (inoculum+fraction soluble). Lors de la détermination du volume de biogaz produit pour chaque échantillon (fractions totales et solubles), le volume de biogaz produit par le témoin (inoculum seul) a été retranché.

Au niveau de la fraction totale des boues, le traitement thermique ne semble pas améliorer la production de biogaz puisque après 23 jours en réacteur batch, le volume total de biogaz produit (CO_2 et CH_4) de l'échantillon traité est similaire à celui du témoin (Figure 45, A). Par contre, la vitesse de production du biogaz dans l'échantillon traité est légèrement supérieure à celle du témoin, particulièrement au début de la digestion (Figure 45, B). Ceci s'explique probablement par une plus grande concentration en matière rapidement biodégradable (DCOs) suite à la solubilisation de la fraction particulaire après le traitement thermique (Tableau 13). Ainsi, après 5 jours de digestion anaérobie, 51,01(\pm 2,02) mL/g MV de biogaz sont produits par l'échantillon traité, alors que ce même volume de biogaz est produit en 9 jours par l'échantillon non traité. En revanche, après 23 jours de digestion, le volume total de biogaz produit est identique dans les 2 échantillons. Ces résultats semblent

indiquer que le traitement thermique, dans les conditions appliquées (95°C pendant 20 minutes) n'augmente pas la production de biogaz lors de la digestion anaérobie des boues. Cependant, l'hydrolyse de la matière particulaire provoquée par la chaleur augmente la concentration en matières rapidement biodégradables dans l'échantillon traité. Cette hydrolyse a pour conséquence une augmentation de la vitesse de production de biogaz.

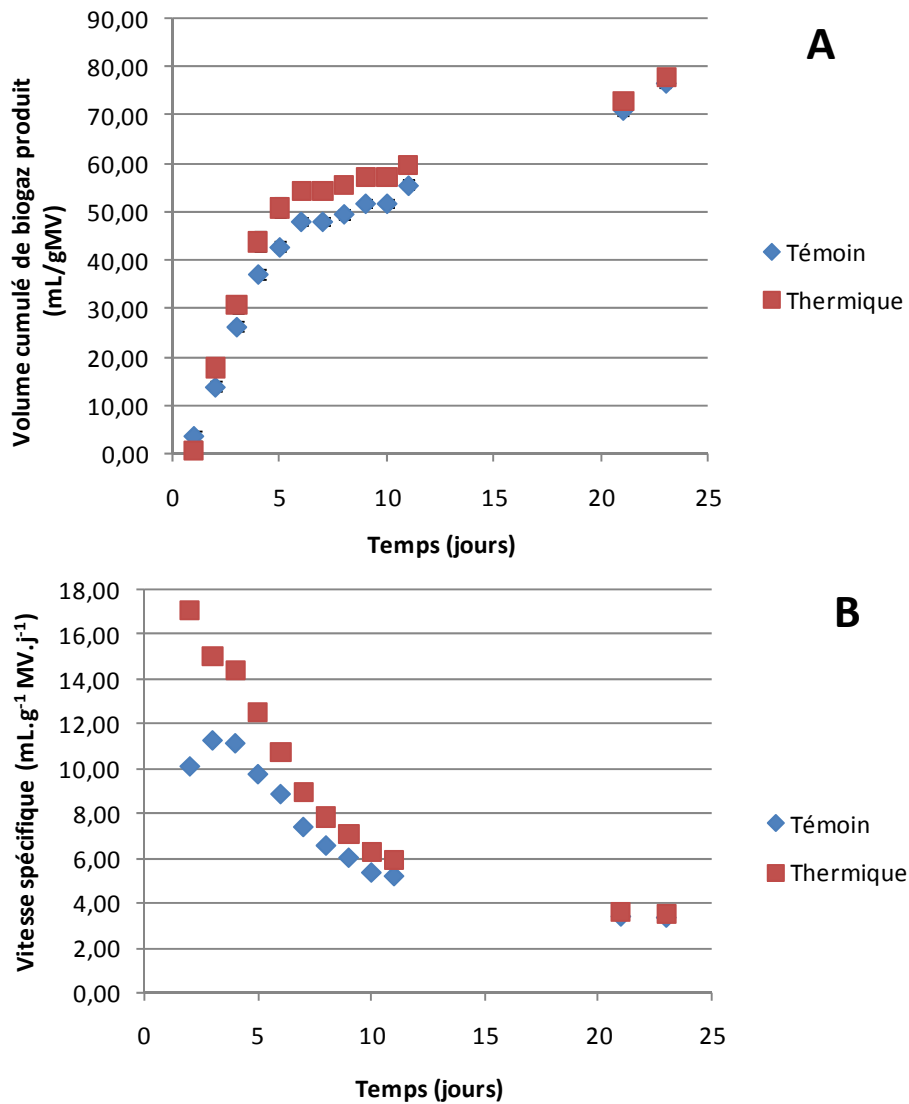


Figure 45 : Production (A) et vitesse de production (B) de biogaz en réacteur batch à partir de la fraction totale de boues non traitées (témoin) et traitées thermiquement à 95°C pendant 20 minutes.

Ces données sont confirmées par les résultats sur l'élimination de la matière suite à la digestion anaérobie (Figure 46). Dans le cas des boues non traitées, 35,5% de la matière totale

sont éliminés après 23 jours de digestion anaérobie : la concentration en MS diminue de $3,42 \pm 0,15$ g/L avant digestion à $2,2 \pm 0,1$ g/L après digestion. Dans le cas des boues traitées thermiquement, la concentration en MS diminue de $3,26 \pm 0,15$ g/L à $2,2 \pm 0,1$ g/L, soit une élimination de la matière égale à 31%. Cette valeur, très similaire à celle obtenue après digestion des boues non traitées, ne met pas en évidence une amélioration de la digestion anaérobie, en terme de taux d'élimination de la matière, suite au traitement thermique. Cependant, l'élimination de la matière organique est plus rapide dans le cas de l'échantillon traité compte tenu de la vitesse de production du biogaz en fonction du temps (Figure 45, B).

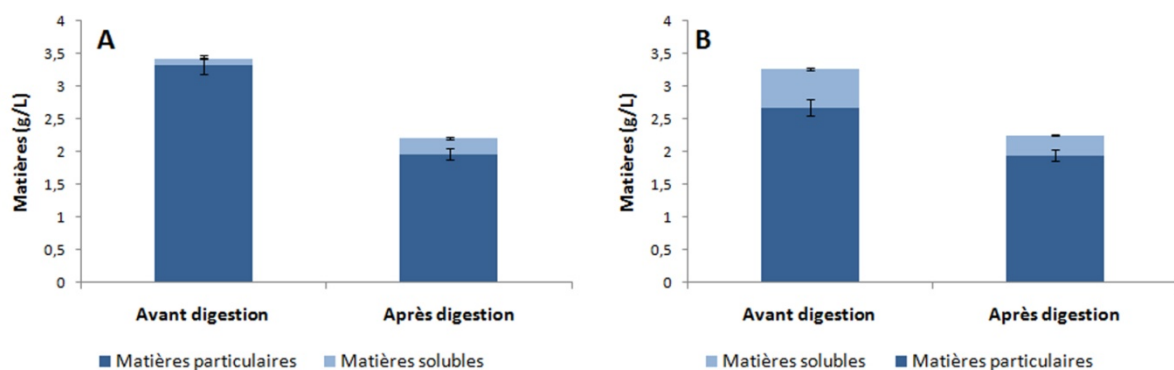


Figure 46 : Concentrations en matières solubles et particulaires des boues non traitées (témoin, A) et des boues traitées thermiquement (B) avant et après digestion anaérobie en réacteur batch.

Comme en conditions aérobies, la biodégradabilité des fractions solubles des boues a été évaluée en conditions anaérobies. La production de biogaz à partir de la fraction soluble des boues augmente lorsque les boues ont subi un traitement thermique (Figure 47) en raison de l'augmentation de la concentration en composés organiques solubles suite au traitement. Après 11 jours de digestion anaérobie en réacteur batch, la production de biogaz à partir de la fraction soluble des échantillons traités thermiquement est de $11,7 \pm 0,1$ mL, alors qu'elle n'est que de $6,4 \pm 0,3$ mL à partir du témoin, soit une augmentation d'environ 45%. De plus, la détermination des concentrations en DCO, sucres, protéines et acides humiques, avant et après les tests PBM, montre que la quasi-totalité des composés solubilisés, suite au traitement thermique, est biodégradable (Figure 48). En effet, suite au traitement, les concentrations en DCO, sucres, protéines et acides humiques augmentent dans la fraction soluble. Après digestion, l'ensemble de ces composés a été dégradé puisque leur concentration est

équivalente à celle du témoin (boues non traitées). Ces résultats laissent donc supposer que le traitement thermique, dans les conditions appliquées (95°C pendant 20 minutes) n'induit pas (ou peu) la formation de composés solubles réfractaires (« DCO dure »).

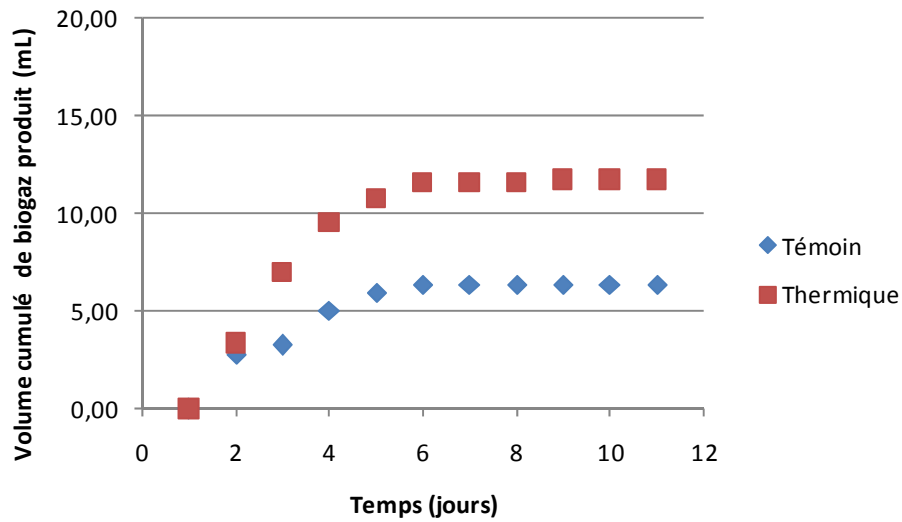


Figure 47 : Production de biogaz en réacteur batch à partir de la fraction soluble de boues non traitées (témoin) et traitées thermiquement.

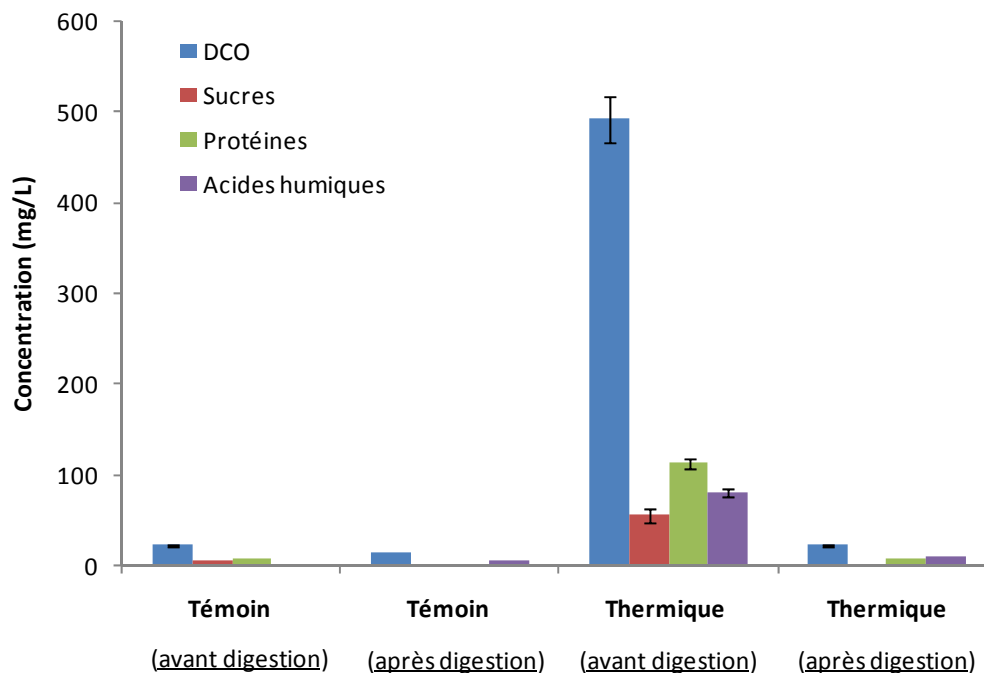


Figure 48 : Concentrations en DCO, sucres, protéines et acides humiques de fractions solubles de boues traitées et non traitées (témoin) avant et après digestion anaérobie en réacteur batch.

Que les essais aient été réalisés en conditions aérobies (DBO) ou anaérobies (tests PBM), aucune augmentation de la biodégradabilité intrinsèque des boues suite au traitement thermique n'a été mise en évidence. En conditions aérobies, les rapports DBO/DCO des fractions totales sont quasiment identiques que les boues aient été traitées ou non. De la même façon, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les rapports DBO/DCO des fractions solubles issues de boues traitées thermiquement et du témoin. En conditions anaérobies, les résultats suivent la même tendance, à savoir qu'aucune augmentation de la production de biogaz n'est constatée à partir des fractions totales des échantillons de boues traitées, par comparaison au témoin. Ainsi, d'après les tests PBM, les taux d'élimination de la matière organique sont identiques que les boues soient traitées ou non. Néanmoins, la solubilisation de la matière organique particulière engendrée par le traitement thermique conduit à une augmentation de la concentration en matières rapidement biodégradables, ce qui a pour conséquence une augmentation de la vitesse de production de biogaz. De plus, les essais menés à partir des fractions solubles des boues montrent que le traitement thermique, dans les conditions appliquées, n'induit pas la formation de composés solubles réfractaires.

I. 2. e. Discussion/conclusion sur les effets induits par le traitement thermique

Les essais menés sur la solubilisation de la matière au cours du traitement thermique, à température constante (80°C), ont permis de montrer que le temps de traitement a peu d'effet sur la solubilisation de la fraction particulaire des boues. Par contre, d'après les résultats obtenus lors de la deuxième série de traitement, la solubilisation des boues est d'autant plus forte que la température appliquée est importante. Peu d'études portent sur le traitement thermique à basses températures en tant que PRPB, il est donc difficile de comparer les résultats obtenus avec la littérature. Cependant, des résultats similaires ont été obtenus dans des gammes de traitement hautes températures. Par exemple, Barlindhaug et Odegaard (1996) ont montré que le temps de traitement a peu d'effet sur la solubilisation quelle que soit la gamme de température appliquée. Valo *et al.* (2004) ont travaillé dans une gamme de températures comprises entre 130°C et 170°C, et ont abouti aux mêmes conclusions.

Les essais menés sur la solubilisation des principaux constituants des boues, c'est-à-dire sur les protéines, les sucres et les acides humiques, ont permis de mettre en évidence un taux de solubilisation des protéines largement supérieur à celui des autres composés au-delà de 80°C (Série 1a.1) ou lorsque le temps de traitement dépasse 20 minutes à cette même température (Série 1b.1).

Les essais menés en parallèle sur la population microbienne des boues par CMF montrent que, dans ces mêmes conditions, cette solubilisation des protéines s'accompagne d'une perméabilisation des cellules. Dans le cas du traitement thermique, il semble donc qu'il y ait une corrélation entre le taux de solubilisation des protéines et la lyse cellulaire. Ces résultats nous permettent donc de conclure qu'une partie de la matière solubilisée durant le traitement thermique est de nature intracellulaire. De plus, les essais menés sur la respiration et la croissance cellulaire nous laissent supposer qu'une reprise de croissance serait favorisée dans les échantillons où une lyse cellulaire a été mise en évidence suite au traitement. Comme cela a déjà été évoqué précédemment, la croissance des microorganismes à partir de produits intracellulaires libérés suite à la lyse des cellules, ou croissance cryptique. Cette constatation est cependant délicate à confirmer, dans le sens où il est difficile de savoir si le substrat utilisé par une cellule pour se multiplier est issu de microorganismes lysés ou de nutriments initialement présents dans le milieu. Malgré cela, la reprise de croissance et de l'activité respiratoire des microorganismes, uniquement observée dans les échantillons où une lyse

cellulaire a été mise en évidence, laisse présager un phénomène de croissance cryptique suite au traitement thermique.

En revanche, malgré la lyse cellulaire engendrée par le traitement thermique, la biodégradabilité intrinsèque des boues n'est pas améliorée, que ce soit en conditions aérobies ou anaérobies. Par contre, une augmentation de la vitesse de production du biogaz suite au traitement thermique est observée. Selon Paul (2006), cette gamme de traitement basses températures permet seulement d'augmenter la vitesse de dégradation de la matière organique biodégradable suite à une désorption de molécules organiques liée à la déstructuration des floes. Un inconvénient majeur de l'utilisation du traitement thermique en tant que PRPB, souvent cité par les auteurs, est lié à la formation de composés potentiellement inhibiteurs de la digestion anaérobie (réaction de Maillard) [Müller *et al.* (2004), Bougrier *et al.* (2006)]. D'après nos résultats, le traitement thermique basses températures présente l'avantage d'éviter la formation de composés réfractaires, puisqu'aucune diminution de la biodégradabilité n'a été observée au niveau des fractions solubles des boues traitées, que ce soit en conditions aérobies ou anaérobies.

II. CARACTERISATION DES PARAMETRES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES BOUES AU COURS D'UN TRAITEMENT PAR SONICATION

Un sonicateur est une barre émettrice d'ultrasons. Un générateur de hautes fréquences délivre une puissance qui est transformée en ondes acoustiques par le biais d'une céramique piézo-électrique. Les ultrasons sont des ondes se propageant à une fréquence comprise entre 20 kHz et 10 MHz. Leur propagation s'effectue par vibration des molécules constituant le milieu de propagation (air, eau ou solide) en exerçant une série de compressions et de dilatations à l'origine d'importantes forces de cisaillement. Ces ultrasons induisent un phénomène de cavitation dans le liquide. De par leurs capacités à désagréger les floccs et ainsi solubiliser la matière, les ultrasons sont décrits dans la littérature comme une méthode appropriée à la réduction de la production de boues. Cependant, malgré le grand nombre de travaux réalisés sur la sonication, certains mécanismes restent encore méconnus, et les données bibliographiques sont encore assez discordantes du fait, en partie, du manque de précision dans la description du matériel et des conditions de traitement nuisant à la comparaison objective des résultats. Par ailleurs, si les effets des ultrasons sur la solubilisation de la matière particulaire des boues sont relativement connus et bien documentés, leurs impacts sur les microorganismes restent controversés. L'objectif de cette partie est donc de caractériser l'impact de la sonication sur les paramètres à la fois chimiques et biologiques des boues soumises au traitement.

La gamme d'énergie spécifique choisie pour cette étude est assez large, elle est comprise entre 0 et environ 280000kJ/kg MS. Plusieurs séries d'essais ont été menées en parallèle. Les temps de sonication appliqués sont identiques (10, 20, 30 et 40 minutes) pour chaque série, ainsi que le volume de boues traité (500ml). Cependant, l'énergie spécifique fournie étant aussi fonction de la concentration en matières sèches des boues (Bougrier, 2005), les énergies spécifiques réellement appliquées peuvent varier d'une série d'essais à une autre. Les résultats présentés dans cette partie, obtenus à partir de 3 séries de traitement, sont issus de 3 lots distincts de boues activées. Lors de la première série de traitement (Série 2.1), l'impact de la sonication a été étudié sur la répartition de la matière organique et minérale, sur la solubilisation des principaux constituants des boues ainsi que sur la concentration bactérienne et sur l'intégrité membranaire des microorganismes. Au cours de la deuxième

série de traitement (Série 2.2), l'impact du traitement par ultrasons sur les caractéristiques microbiologiques des boues a été étudié par les techniques culturales et par le suivi de l'activité respiratoire des microorganismes. Les essais de biodégradabilité en conditions aérobies et anaérobies ont été effectués lors d'une troisième série de traitement (Série 1.3).

II. 1. Effets de la sonication sur la répartition de la matière

Les concentrations en MS restent constantes au cours du traitement puisqu'elles sont égales à 3,42 ($\pm 0,15$) g/L pour les boues non traitées et à 3,40 ($\pm 0,15$) g/L après le traitement maximal (210 000 J/g MS). De la même façon, les concentrations en matières organique et minérale de la fraction totale n'évoluent quasiment pas au cours de la sonication puisqu'elles sont de 2,19 ($\pm 0,1$) g/L et de 1,22 ($\pm 0,06$) g/L respectivement pour les boues non traitées et de 2,11 ($\pm 0,1$) g/L et de 1,29 ($\pm 0,06$) g/L pour les boues traitées avec une énergie spécifique égale à 210 000 J/g MS, ce qui permet d'affirmer qu'aucun phénomène de minéralisation n'est mis en jeu dans les conditions appliquées.

La sonication conduit à des modifications importantes au niveau de la répartition de la matière (Figure 49). La concentration en matière organique soluble, proche de zéro pour les boues non traitées, représente 21,2% lorsque l'énergie spécifique maximale est appliquée. De plus, on constate que ce phénomène de solubilisation augmente proportionnellement avec l'énergie spécifique appliquée dans la gamme de traitement étudiée.

En ce qui concerne la matière minérale, l'augmentation de l'énergie spécifique a peu d'effet sur sa solubilisation puisque sa concentration dans les fractions solubles des boues augmente faiblement au cours du traitement. Dans le cas des boues non traitées, la matière minérale soluble représente 8,9% de la matière totale. Lorsque l'énergie spécifique appliquée atteint 210 000 J/g MS, la matière minérale soluble représente 12,54% de la matière totale. Ainsi, même si une solubilisation de la matière minérale au cours de la sonication est constatée, elle reste faible.

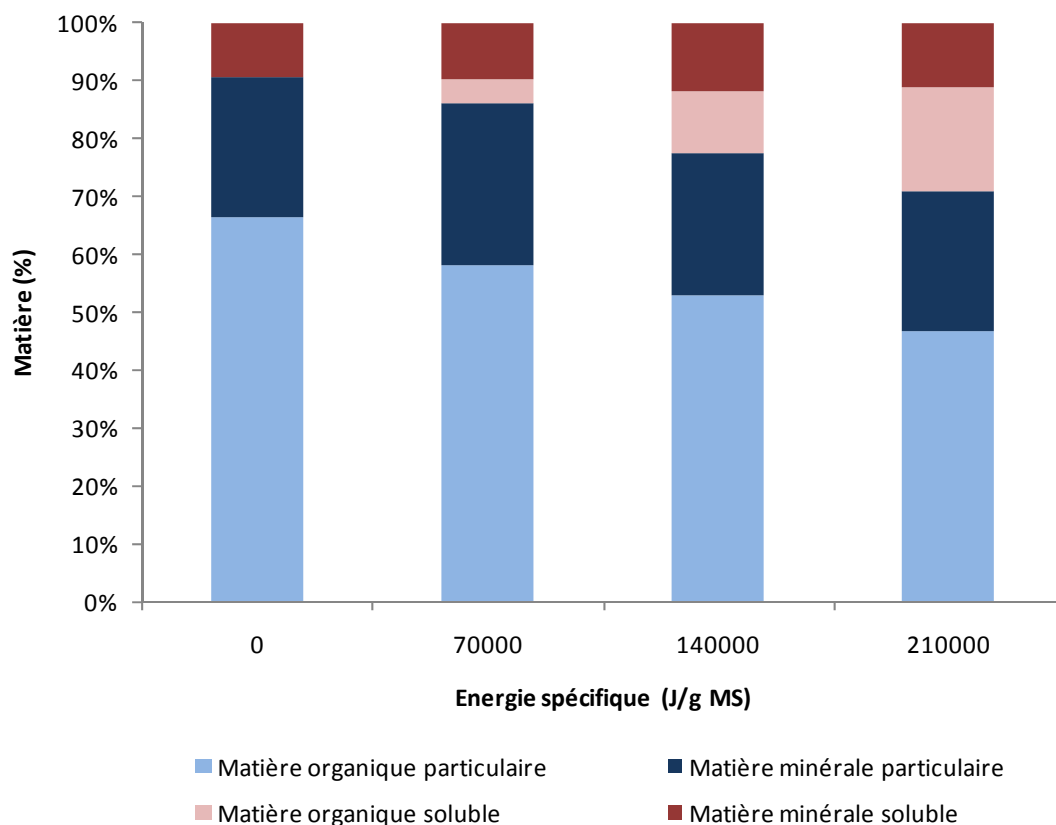


Figure 49 : Effets de la sonication sur la répartition de la matière. Evolution des pourcentages de matières organiques et minérales, solubles et particulaires, en fonction de l'énergie spécifique appliquée.

II. 2. Effets de la sonication sur la solubilisation de la matière organique

Les effets de la sonication sur la solubilisation globale de la matière organique ont d'abord été évalués en terme de DCO (Figure 50). Afin de déterminer plus précisément la composition de la matière organique solubilisée, les taux de solubilisation de la DCO, des sucres et des protéines, composants majoritaires des boues activées, ont également été déterminés (Figure 51). Les concentrations en protéines et acides humiques des fractions solubles des boues avant et après traitement sont présentées sur la Figure 52.

II. 2. a. Evolution des concentrations en DCO des fractions totales et solubles des boues

La concentration en DCO totale n'évolue pas au cours de la sonication dans les conditions testées. La DCO totale des boues non traitées est de 3580 (± 188) mg/L, et celle des boues traitées avec une énergie spécifique de 210 000 J/g MS est de 3600 (± 194) mg/L. En revanche, une très nette augmentation de la DCO soluble au cours de la sonication est

constatée puisqu'elle atteint 1000 (± 52) mg/L lorsque l'énergie spécifique appliquée est maximale (210000 kJ/kg MS) alors qu'elle n'est que de 48 ($\pm 2,52$) mg/L dans la fraction soluble des boues non traitées. Cette augmentation de la DCO soluble, alors que la DCO totale reste constante, met clairement en évidence une modification de la répartition matière soluble/particulaire au cours de la sonication. Cela confirme les résultats présentés précédemment (II. 1). De plus, on constate que la concentration en DCO de la fraction soluble augmente avec l'intensité du traitement.

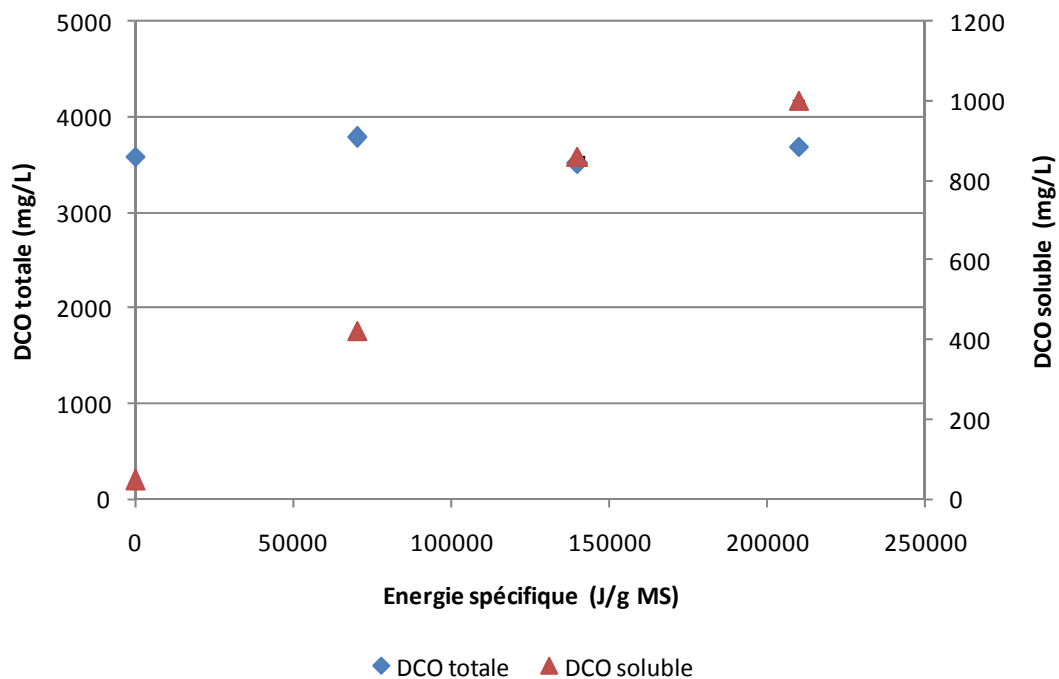


Figure 50 : Evolution de la DCO des fractions totales et solubles en fonction de l'énergie spécifique appliquée aux boues.

II. 2. b. Solubilisation des principaux constituants organiques des boues

Les taux de solubilisation des sucres et des protéines suivent la même tendance que celui de la DCO, c'est-à-dire qu'ils augmentent avec l'énergie spécifique appliquée. A partir d'une énergie spécifique égale à 70 000 J/g MS, les taux de solubilisation de la DCO, des protéines et des sucres sont de 10,6 ($\pm 1,2$)%, 5,1 ($\pm 1,5$)% et 7,5 ($\pm 0,7$)%, respectivement. Après application du traitement maximal (210 000 J/g MS), ces taux atteignent respectivement 26,95 ($\pm 2,9$)%, 15,93 ($\pm 4,3$)% et 18,68 ($\pm 1,8$)%. Cependant, quelle que soit l'énergie spécifique appliquée, le taux de solubilisation de la DCO est supérieur à celui des

protéines. Lorsque une énergie spécifique de 70 000 J/g MS est appliquée, le taux de solubilisation de la DCO est de 10,6 ($\pm 1,2$)% alors que celui des protéines n'est que de 7,5 ($\pm 0,7$)%. Cette tendance se confirme lorsque l'énergie spécifique maximale est appliquée : le taux de solubilisation de la DCO atteint 26,95 ($\pm 2,9$)% alors que celui des protéines est seulement de 18,68 ($\pm 1,8$)%. De plus, les résultats obtenus montrent d'importantes différences dans l'évolution des concentrations en protéines et en acides humiques de la fraction soluble des boues au cours de la sonication (Figure 52). Dans le cas des boues non traitées, la concentration en acides humiques de la fraction soluble augmente de 7,9 ($\pm 0,3$) mg/L avant traitement à 82,8 ($\pm 3,8$) mg/L lorsqu'une énergie spécifique de 210 000 J/g MS est appliquée, soit un taux de solubilisation de 39 ($\pm 3,9$)% si l'on tient compte de la concentration initiale en acides humiques des fractions solubles et particulaires des boues non traitées (Matériel et méthodes, III. 2). En ce qui concerne la concentration en protéines de ces mêmes fractions, elle n'augmente que de 2,8 ($\pm 0,14$) mg/L avant traitement à 228,9 ($\pm 11,4$) mg/L, lorsque l'énergie spécifique atteint 210 000 J/g MS, soit un taux de solubilisation de 18,7 ($\pm 1,8$)%.

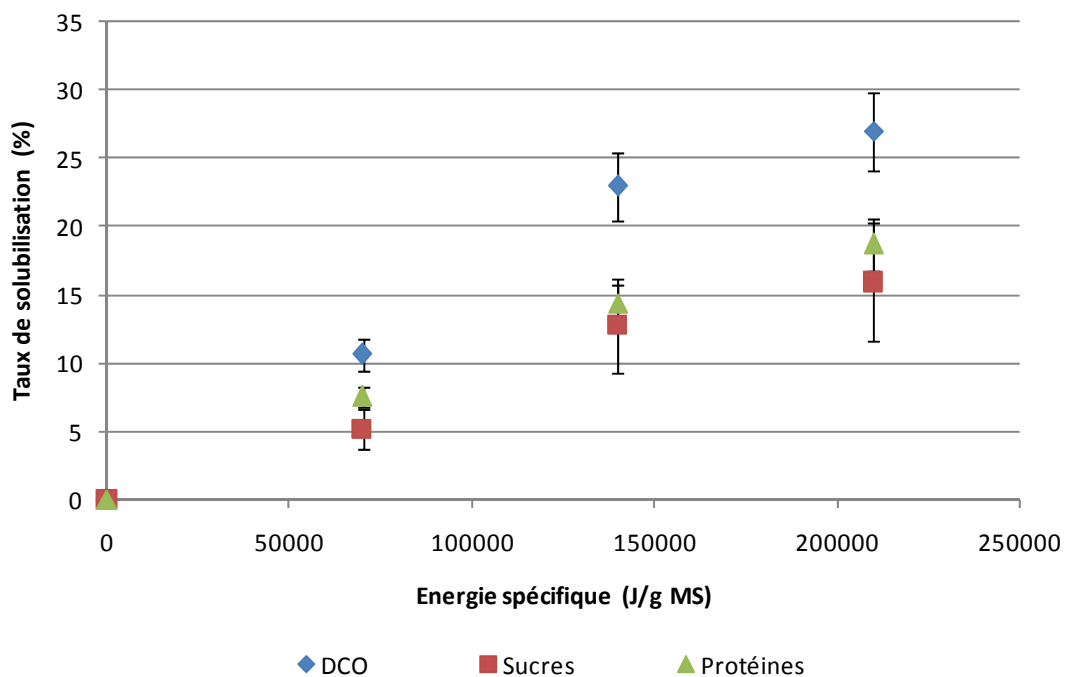


Figure 51 : Taux de solubilisation de la DCO, des protéines et des sucres au cours de la sonication en fonction de l'énergie spécifique appliquée.

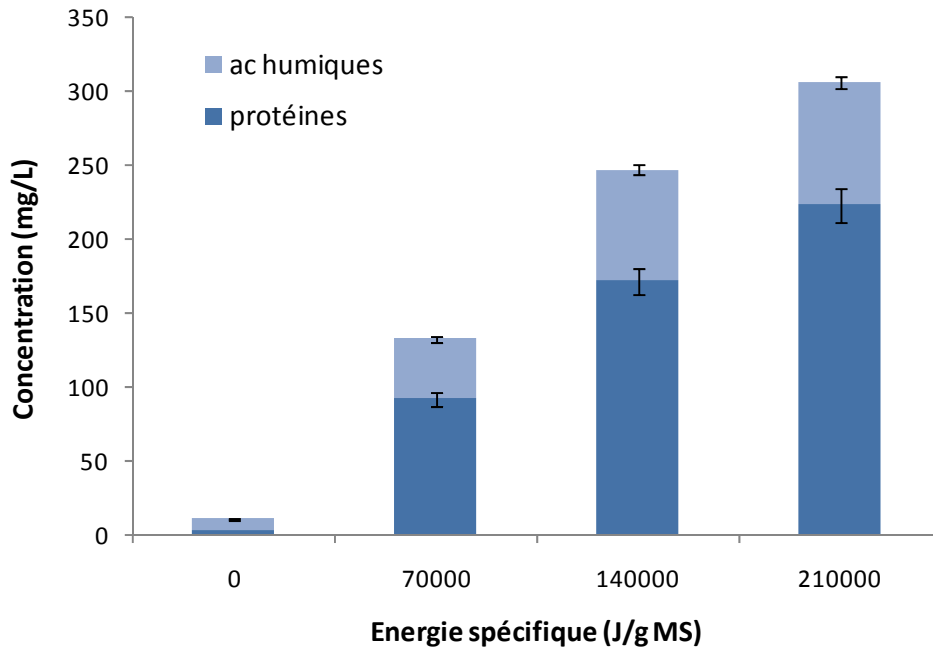


Figure 52 : Concentrations en protéines et en acides humiques des fractions solubles des boues au cours d'un traitement par sonication en fonction de l'énergie spécifique appliquée.

Les essais menés sur la solubilisation de la matière au cours d'un traitement par sonication ont permis de montrer que l'énergie spécifique appliquée a un impact direct sur la solubilisation de la fraction particulaire des boues. En effet, la sonication des boues conduit à des modifications importantes au niveau de la répartition de la matière, de manière proportionnelle à l'énergie spécifique appliquée. La concentration en matière organique soluble, proche de zéro pour les boues non traitées, représente 21,2% de la matière totale lorsque une énergie spécifique de 210 000 J/g MS est appliquée. Par ailleurs, alors que la concentration en DCO totale n'évolue pas au cours de la sonication, la concentration en DCO soluble augmente en fonction de l'énergie spécifique appliquée. Cette augmentation de la DCO soluble est liée à une solubilisation des principaux constituants des boues : les protéines, les sucres et les acides humiques. Cependant, les résultats obtenus montrent que les protéines sont moins solubilisées que les acides humiques.

II. 3. Effets de la sonication sur les microorganismes des boues

Comme dans le cas du traitement thermique, l'étude de la sonication sur la flore microbienne a porté sur la concentration en microorganismes (Tableau 15), l'intégrité membranaire des cellules (Figure 53), le suivi de l'activité respiratoire des microorganismes (Figure 54) et la croissance bactérienne (Figure 55). L'impact de la sonication sur la concentration en microorganismes et sur l'intégrité membranaire est analysé dès la fin de son application. L'activité respiratoire des microorganismes ainsi que la croissance bactérienne sont suivis au cours du temps dès la fin de la sonication. Les résultats présentés dans cette partie, obtenus à partir de 2 séries de traitement, sont issus de 2 lots distincts de boues activées. La caractérisation des effets de la sonication sur l'intégrité membranaire des cellules a été effectuée lors de la série 2.1. Au cours de la deuxième série de traitement (Série 2.2), l'impact de la sonication sur les caractéristiques microbiologiques des boues a été étudié par les techniques culturales et par le suivi de l'activité respiratoire des microorganismes.

Les résultats obtenus suite au marquage des échantillons avec le « Bacteria Counting Kit » couplé à une analyse par CMF mettent en évidence une augmentation relativement importante du nombre de cellules lorsque l'énergie spécifique appliquée est égale à 70 000 J/g MS (Tableau 15). Comme cela a déjà été évoqué lors de l'analyse des résultats issus du traitement thermique, il est probable que cette augmentation soit liée à une désagrégation des microflocs résiduels avec libération de cellules individualisées. Dans le cas de la sonication, ces résultats sont confirmés par « l'allure » de la population bactérienne sur les cytogrammes obtenus (Figure 53). En effet, le cytogramme obtenu à partir de l'échantillon témoin, où est représentée l'intensité de fluorescence verte en fonction de FSC (corrélé à la taille des cellules), met en évidence une population bactérienne relativement hétérogène, probablement en raison de la présence de cellules agrégées. Au contraire, la population bactérienne des échantillons de boues traitées par sonication apparaît plus homogène suite à une individualisation des microorganismes.

A partir d'une certaine énergie spécifique (70 000 J/g MS), une diminution de la concentration bactérienne, traduisant une lyse des microorganismes, est observée.

Les cytogrammes obtenus après analyse par CMF de ces mêmes échantillons, incubés en présence du marqueur d'intégrité membranaire (SYTOX Green), sont présentés Figure 53. Les résultats obtenus, représentés sous la forme de cytogrammes (IF en fonction de FSC),

montrent que l'intensité de fluorescence n'augmente pas au cours du traitement. En d'autres termes, ces résultats signifieraient que, quelle que soit l'énergie spécifique appliquée, les cellules ne présentent pas de perte de leur intégrité membranaire. Cependant, l'analyse de ces cytogrammes doit être corrélée à la concentration en microorganismes totaux (Tableau 15). Ainsi, même si le marquage avec le SYTOX Green ne met pas en évidence de perméabilisation des cellules, la concentration en microorganismes totaux chute à partir d'une énergie spécifique égale à 70 000 J/g MS. L'hypothèse la plus probable serait qu'à partir d'une certaine énergie spécifique (dans cette étude, 70 000 J/g MS), les ultrasons entraînent un «éclatement brutal» des cellules. Dans ce cas, les microorganismes ne passeraient pas par une phase préalable de perméabilisation des membranes, ce qui expliquerait que l'intensité de fluorescence n'augmente pas au cours de la sonication, et que le nombre de cellules, quant à lui, diminue. Cette hypothèse semble vraisemblable dans le sens où les ultrasons sont connus pour être à l'origine de bulles de cavitations générant des conditions extrêmes dans le milieu (Khanal *et al.*, 2007). Cependant, le nombre de cellules lysées reste négligeable puisque la concentration en microorganismes totaux dans l'échantillon traité avec l'énergie spécifique maximale reste supérieure à celle du témoin.

Dans les échantillons soumis à sonication, le nombre de microorganismes détectés serait la résultante de deux phénomènes : l'individualisation de cellules initialement regroupées sous la forme de flocs ou d'agrégats, et l'éclatement d'une fraction des cellules.

Tableau 15 : Concentrations en microorganismes totaux déterminées par CMF au cours d'un traitement par sonication.

Energie spécifique (kJ/kg MS)	Non traitées	70 000	140 000	210 000
Concentration en microorganismes totaux (Bactéries/mL)	1,17E+08	5,74E+08	4,75E+08	2,91E+08

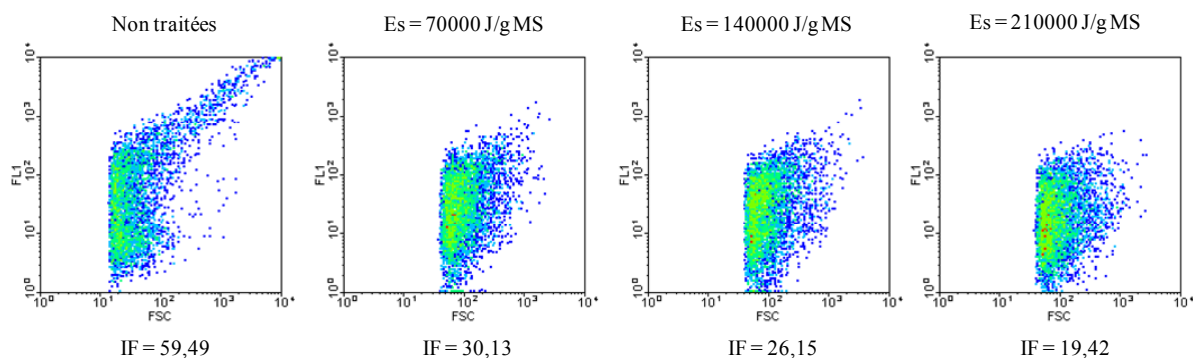


Figure 53 : Cytogrammes représentant la fluorescence verte émise (FL1) par le SYTOX Green en fonction d'un paramètre morphologique (FSC) obtenus après marquage d'échantillons de boues non traitées, et traitées par sonication selon différentes énergies spécifiques.

En ce qui concerne l'activité respiratoire des microorganismes, une diminution de l'absorbance à 470 nm des échantillons traités par sonication (T_0) est observée. Cette diminution de l'absorbance traduit une chute de l'activité respiratoire des microorganismes suite à la sonication. Cette activité diminue d'autant plus que l'énergie spécifique appliquée est importante. De plus, aucune reprise d'activité au cours du temps n'est observée par comparaison à l'échantillon témoin. Cette absence de reprise d'activité est atypique. En effet, la diminution de l'activité à T_0 peut s'expliquer par le stress induit par la sonication. En revanche, nous aurions pu nous attendre à une reprise d'activité des cellules quelques heures après le traitement étant donné l'augmentation de la concentration en matière organique soluble provoquée par le traitement. Au contraire, l'activité respiratoire des cellules des échantillons traités se maintient à un niveau plus faible que celle de l'échantillon témoin. Cette activité est d'autant plus faible que l'énergie appliquée est importante. En d'autres termes, plus l'intensité de la sonication est importante et plus l'activité respiratoire des cellules diminue au cours du temps.

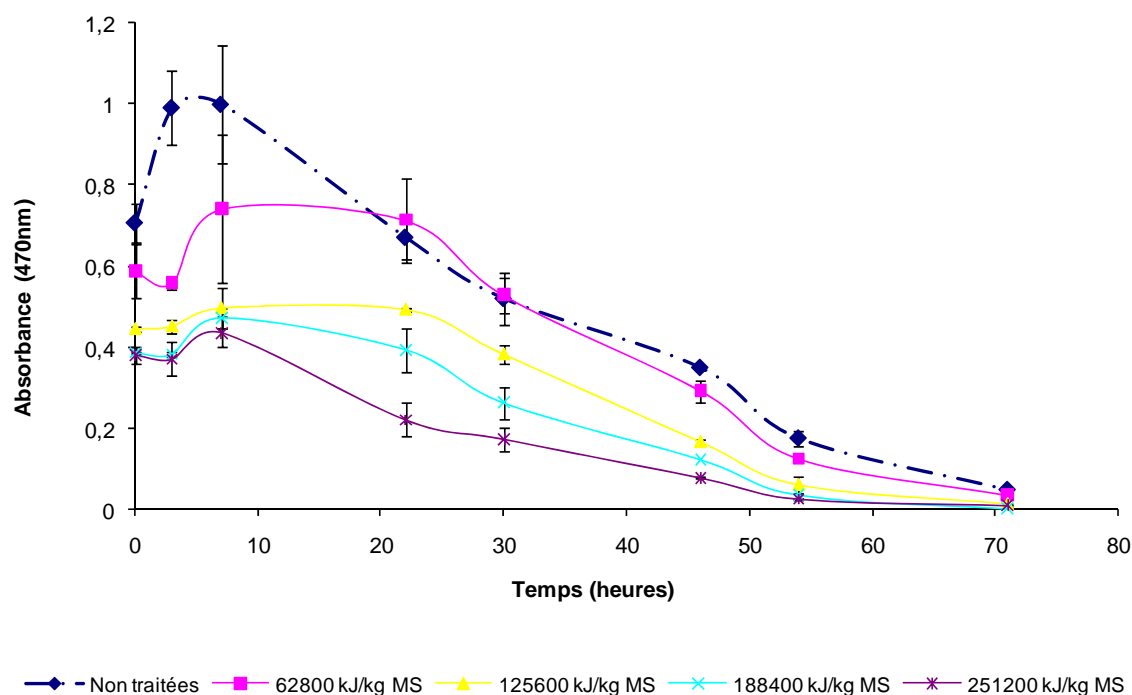


Figure 54 : Evolution de l'activité respiratoire des microorganismes d'échantillons de boues activées soniquées au cours du temps en fonction de l'énergie spécifique appliquée.

Les résultats sur l'évolution de la concentration en microorganismes après le traitement par sonication sont présentés sur la Figure 55. Après traitement (T_0), peu d'effets des ultrasons sur l'aptitude des cellules à se revivifier sont observés. Ces résultats confirment ceux obtenus par CMF. Ainsi, même si une fraction des cellules est lysée suite à la sonication (Tableau 15), elle reste négligeable puisque la concentration en microorganismes revivifiables, déterminée par les techniques culturales, ne diminue pas après sonication.

Au contraire, après sonication (à T_0), une légère augmentation de la concentration en microorganismes revivifiables est observée. Ces résultats, probablement liés à une désagrégation des cellules, confirment ceux obtenus par CMF.

A T_{0+24h} , une faible reprise de la croissance cellulaire est observée dans les échantillons traités. Cette reprise de croissance, probablement liée à l'augmentation de produits solubles dans le milieu suite à la sonication, semble limitée puisqu'elle n'est pas observée au-delà de 24h d'incubation. En effet, 48h après le traitement, la concentration en microorganismes revivifiables diminue légèrement dans les échantillons traités, probablement

en raison d'un épuisement en nutriments du milieu. D'ailleurs, cette diminution de l'aptitude à la revivification des microorganismes est corrélée avec la diminution de l'activité respiratoire observée 48h après le traitement (Figure 54).

Remarque : L'importante augmentation de la concentration en microorganismes revivifiables à T_{0+24h} , observée dans l'échantillon traité avec une énergie spécifique égale à 62800 J/g MS, est probablement liée à une erreur de manipulation. Cette valeur, atypique, n'est pas corrélée avec les résultats obtenus à partir de l'activité respiratoire des microorganismes à T_{0+24h} . De plus, la différence observée entre la concentration en microorganismes à T_{0+24h} et à T_{0+48h} semble peu probable.

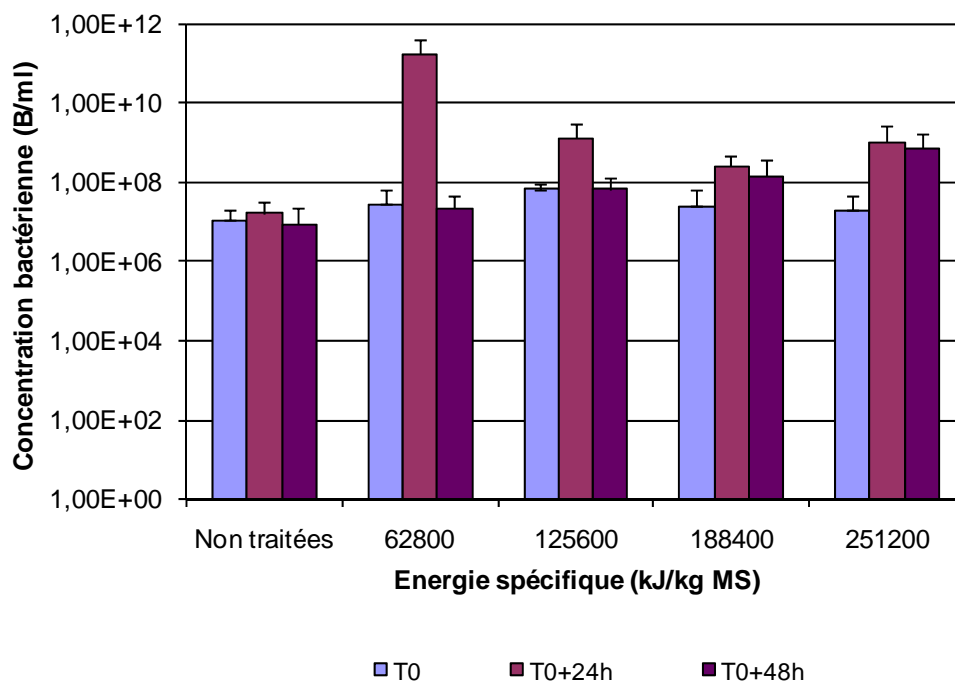


Figure 55 : Evolution de la concentration en microorganismes cultivables d'échantillons de boues activées soumises à un traitement par sonication au cours du temps en fonction de l'énergie spécifique appliquée.

Ces analyses microbiologiques ont permis de caractériser les effets de la sonication sur la population microbienne des boues. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, les ultrasons conduisent à une forte désagrégation des microflocs jusqu'à une énergie spécifique égale à 70 000 J/g MS. A partir de cette énergie, même si une lyse cellulaire a été mise en

évidence, elle reste négligeable. Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus par les techniques culturales à T_0 puisque le nombre d'UFC augmente légèrement après sonication.

La sonication ne modifie pas significativement le comportement des microorganismes au cours du temps par rapport à l'échantillon de boues non traitées. Même si une reprise de croissance, vraisemblablement liée à une augmentation de la concentration en matières solubles dans le milieu, est observée après 24h d'incubation, elle semble être limitée. A partir de 48h d'incubation, l'activité respiratoire ainsi que l'aptitude à la revivification des microorganismes diminuent, probablement en raison d'un épuisement en nutriments du milieu.

II. 4. Effets de la sonication sur la biodégradabilité des fractions totales et solubles des boues

L'impact de la sonication sur la biodégradabilité des boues a été étudié en conditions aérobies et anaérobies dans les mêmes conditions que lors de l'étude du traitement thermique. Ces essais ont donc été menés sur les fractions totales des boues ainsi que sur les fractions solubles afin d'étudier précisément les effets des ultrasons sur chacune de ces fractions. Lors de cette série de traitement, seuls les effets de la sonication selon l'énergie spécifique maximale ($E_s=280290$ J/g MS) ont été étudiés. Les caractéristiques des boues avant et après sonication lors de cette série de traitement sont présentées dans le Tableau 16. Les essais de biodégradabilité en conditions aérobies et anaérobies ont été menés en parallèle à partir des mêmes échantillons.

Tableau 16 : Caractéristiques des boues avant et après un traitement par sonication ($E_s = 280290$ J/g MS).

Traitement	MS (g/L)	MES (g/L)	Taux de solubilisation (%)			
			DCO	Sucres	Protéines	A. Humiques
Témoin	3,43±0,15	3,33±0,15	-	-	-	-
Sonication	3,41±0,15	1,40±0,10	20,81±2,15	10,83±3,09	23,40±2,58	24,72±3,09

i. Biodégradabilité en conditions aérobies

L'effet de la sonication sur la biodégradabilité en conditions aérobies des boues a été étudié par un suivi de la DBO sur les fractions totales et solubles des boues avant et après traitement.

Tableau 17 : DBO à 5, 7 et 21 jours des fractions totales, solubles et particulaires des boues avant et après un traitement par sonication (Es=280290J/g MS).

Traitement	Fractions	DBO ₅ (mg O ₂ /L)	DBO ₇ (mg O ₂ /L)	DBO ₂₁ (mg O ₂ /L)
Témoin	Totale	900±180	900±180	1400±280
	Soluble	10±2	10±2,2	19±3,8
	Particulaire ^(*)	890±178	890±179	1381±276
Sonication	Totale	850±170	850±170	1400±280
	Soluble	300±60	300±60	610±122
	Particulaire ^(*)	550±110	550±110	790±158

(*) : valeurs obtenues par différence entre la fraction totale et soluble.

Tandis que les valeurs de la DBO totale du témoin et de l'échantillon traité sont relativement semblables, les valeurs de la DBO soluble sont largement supérieures après sonication des boues (Tableau 17). Cependant, cette augmentation de la DBO soluble liée à une plus grande concentration en matières organiques solubles suite au traitement (Tableau 16), ne tient pas compte de la concentration initiale en DCO. C'est pourquoi l'évolution du rapport DBO/DCO pour chaque fraction (totale et soluble), traduisant réellement le niveau de biodégradabilité, a été suivie au cours du temps (21 jours) (Figure 56).

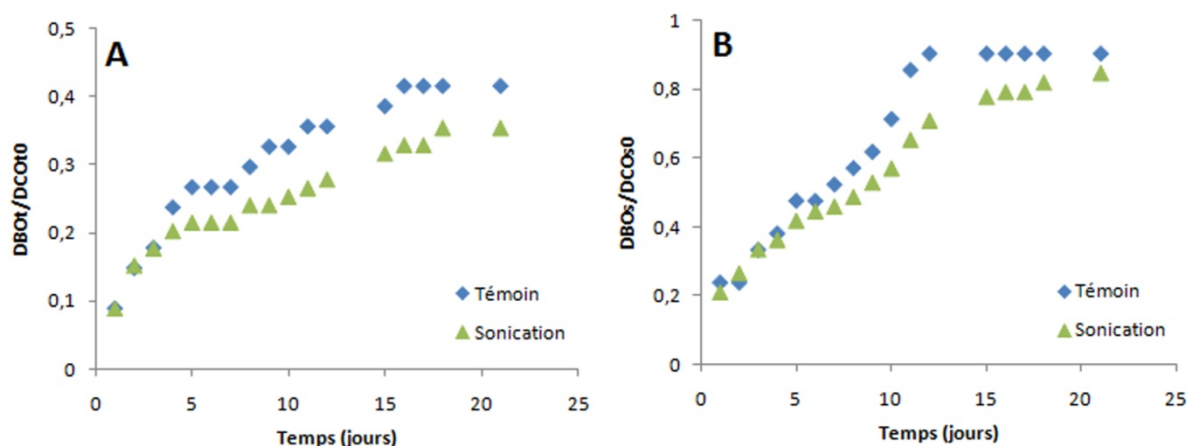


Figure 56 : Evolution du rapport DBO/DCO des fractions totales (A) et solubles (B) de boues non traitées (témoin) et après un traitement par sonication ($E_s=280290\text{J/g MS}$).

Après 21 jours d'incubation, le rapport DBO/DCO de la fraction totale des boues non traitées et après sonication atteint $0,41\pm 0,1$ et $0,35\pm 0,1$ respectivement (Figure 56, A). Ces valeurs, très proches, semblent indiquer que la sonication a peu d'influence sur la biodégradabilité de la fraction totale des boues. L'allure générale des courbes semble même indiquer que les boues non traitées sont légèrement plus biodégradables que les boues traitées. Mais étant donné l'imprécision sur la mesure de la DBO, relativement importante (erreur de mesure de l'ordre 20%), cette observation reste hypothétique. Au niveau de la fraction soluble des boues, là encore, aucune différence significative n'est mise en évidence avant et après la sonication (Figure 56, B). En effet, le rapport DBO/DCO est de $0,91\pm 0,2$ dans le cas du témoin et de $0,84\pm 0,2$ dans le cas des boues traitées après 21 jours. Ce rapport, proche de 1, montre que la quasi-totalité de la fraction soluble est biodégradable en conditions aérobies, avant et après sonication. Les conclusions qui peuvent être déduites à partir de ces résultats sont que (1) la sonication, pour une énergie spécifique égale à 280290J/g MS , n'augmente pas la biodégradabilité intrinsèque des boues, en conditions aérobies, malgré la solubilisation de la fraction particulaire, (2) la fraction soluble des boues après sonication n'est pas moins biodégradable que la fraction soluble des boues non traitées.

ii. Biodégradabilité en conditions anaérobies

L'impact de la sonication sur la biodégradabilité des boues en conditions anaérobies a été étudié en parallèle sur les fractions totales et solubles des boues. Lors de la détermination du volume de biogaz produit pour chaque échantillon (fractions totales et solubles), le volume de biogaz produit par le témoin (inoculum seul) a été soustrait.

Au niveau de la fraction totale des boues, la sonication ne semble pas améliorer la production de biogaz puisque après 23 jours en réacteur batch, le volume total de biogaz produit (CO_2 et CH_4) de l'échantillon traité est similaire à celui du témoin (Figure 57, A). En effet, à la fin des essais, la production de biogaz de l'échantillon soniqué est de $76,44 \pm 2,44$ mL/g MV et de $76,83 \pm 1,12$ mL/g MV dans l'échantillon témoin.

De plus, les vitesses de production du biogaz sont identiques avant et après sonication (Figure 57, B) malgré une importante solubilisation de la matière particulaire induite par ce traitement (Tableau 16).

En ce qui concerne l'élimination de la matière, dans le cas des boues non traitées, 35,5% de la matière organique sont éliminés après 23 jours de digestion anaérobie : la concentration en MS diminue de $3,42 \pm 0,15$ g/L avant digestion à $2,2 \pm 0,1$ g/L après digestion. Dans le cas des boues traitées par sonication, la concentration en MS diminue de $3,4 \pm 0,15$ g/L à $2,35 \pm 0,1$ g/L, soit une élimination de la matière d'environ 31%. Cette valeur, très similaire à celle obtenue après digestion des boues non traitées, ne met pas en évidence une amélioration de la digestion anaérobie, en terme de taux d'élimination de la matière, suite au traitement par ultrasons. Par ailleurs, il est important de noter que lors de la digestion anaérobie, dans le cas de l'échantillon traité, la concentration en MS de la fraction particulaire est quasiment identique avant ($2,25 \pm 0,1$ g/L) et après la digestion ($2,03 \pm 0,09$ g/L). Ce qui signifie que dans le cas d'un couplage traitement par sonication/digestion anaérobie, la solubilisation de la matière particulaire serait essentiellement liée au traitement. Il n'y aurait pas d'hydrolyse de la matière particulaire supplémentaire au cours de la digestion anaérobie. Cependant, ces essais n'ayant été réalisés qu'une seule fois, les résultats devront être confirmés par de nouveaux essais dans les mêmes conditions.

Ces données semblent donc confirmer les résultats obtenus en conditions aérobies, à savoir que la sonication, dans les conditions appliquées, n'améliore pas la biodégradabilité de la fraction totale des boues, malgré la solubilisation de la fraction particulaire.

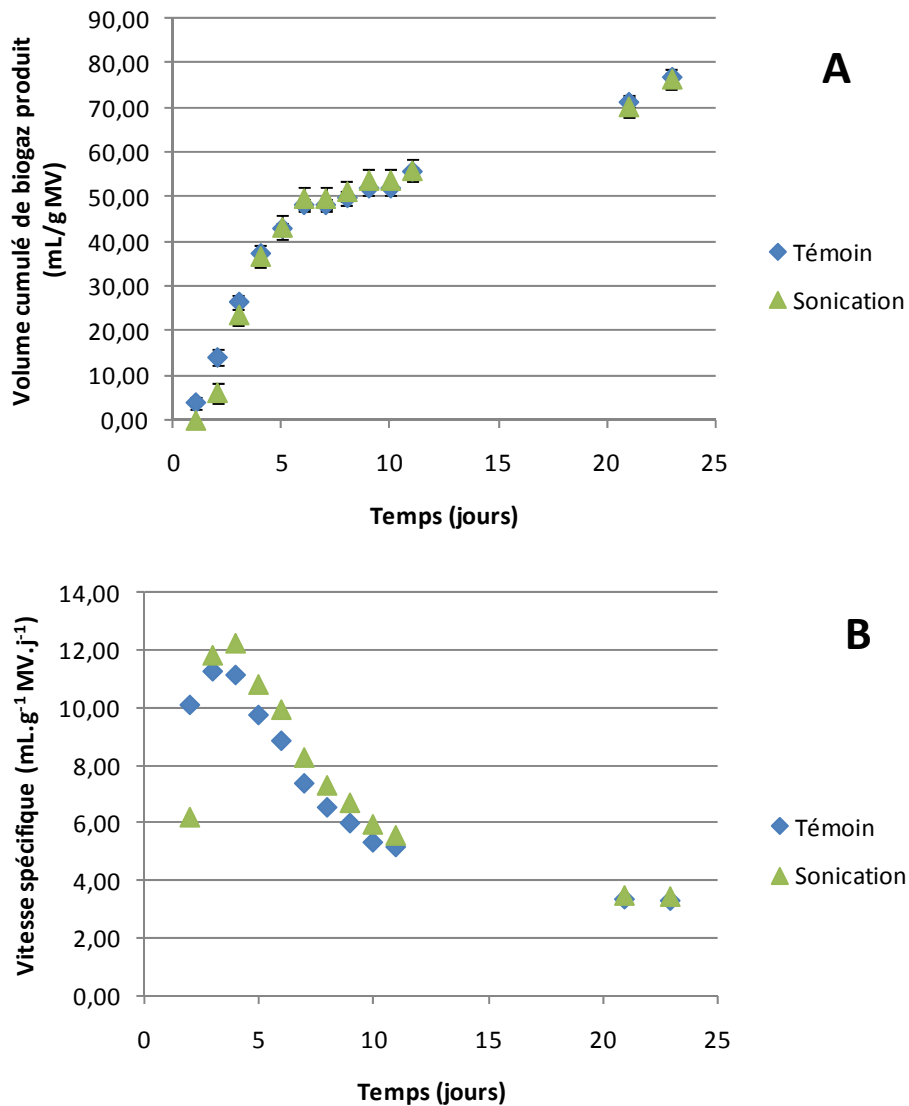


Figure 57 : Production (A) et vitesse de production (B) de biogaz en réacteur batch à partir de la fraction totale de boues non traitées (témoin) et traitées par sonication ($E_s=280290\text{J/g MS}$).

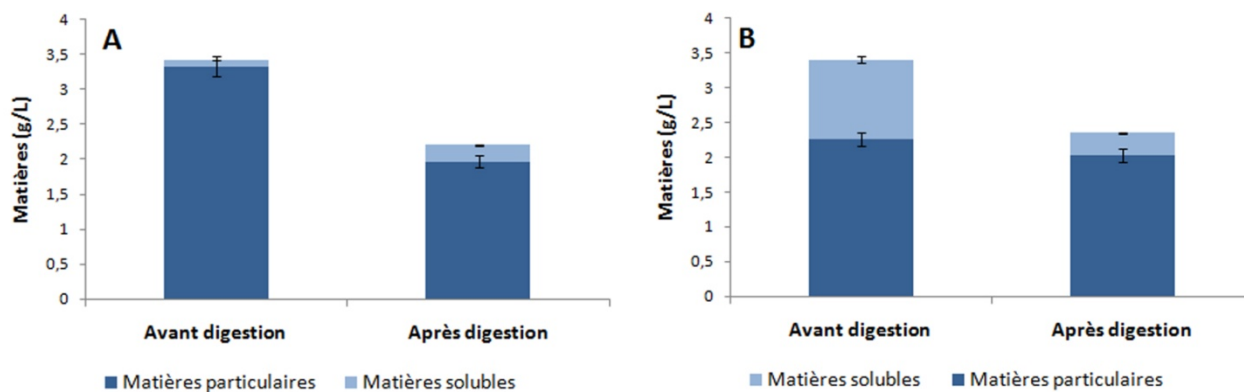


Figure 58 : Concentrations en matières solubles et particulaires des boues non traitées (témoin, A) et des boues traitées par sonication ($E_s=280290\text{J/g MS}$, B) avant et après digestion anaérobie en réacteur batch.

Afin d'évaluer le niveau de biodégradabilité de la matière organique solubilisée suite à la sonication, des tests PBM et des mesures de DBO ont également été effectués sur la fraction soluble des boues.

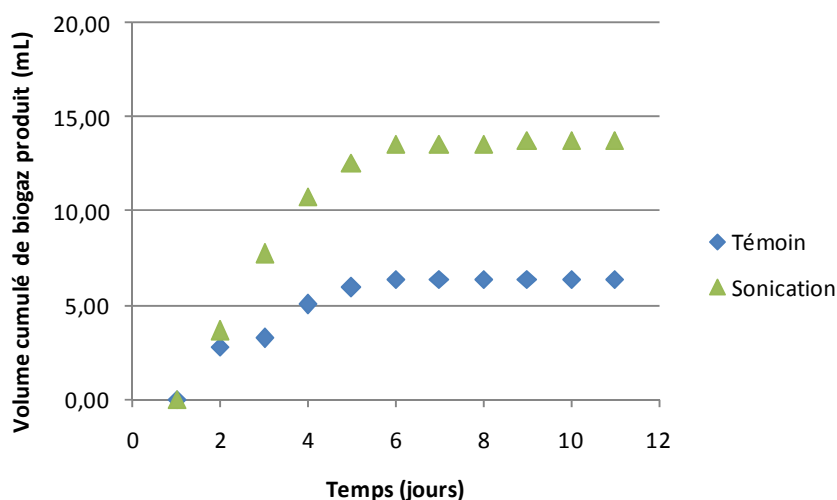


Figure 59 : Production de biogaz en réacteur batch à partir de la fraction soluble de boues non traitées (témoin) et traitées par sonication ($E_s=280290\text{J/g MS}$).

La production de biogaz à partir de la fraction soluble des boues augmente lorsque les boues ont subi un traitement par ultrasons (

Figure 59), en raison de l'augmentation de la concentration en composés organiques solubles suite au traitement. Après 11 jours de digestion anaérobie en réacteur batch, la production de biogaz à partir de la fraction soluble des échantillons traités par sonication est de $13,7 \pm 0,3$ mL, alors qu'elle n'est que de $6,4 \pm 0,3$ mL à partir de l'échantillon témoin.

Dans le cas de l'échantillon témoin, les concentrations en DCO, sucres, protéines et acides humiques, sont quasiment nulles après 23 jours de digestion (Figure 60), ce qui montre que la majorité des composés solubles présents dans les boues non traitées sont biodégradables. En revanche, après sonication, seuls les sucres de la fraction soluble ont été totalement assimilés par les microorganismes. En effet, seulement 26% des protéines et 52% des substances humiques ont été éliminés à la fin des tests PBM. Ces résultats indiquent qu'une partie des composés solubilisés lors de la sonication ne sont pas facilement assimilables par les microorganismes, tout particulièrement les protéines et les substances humiques.

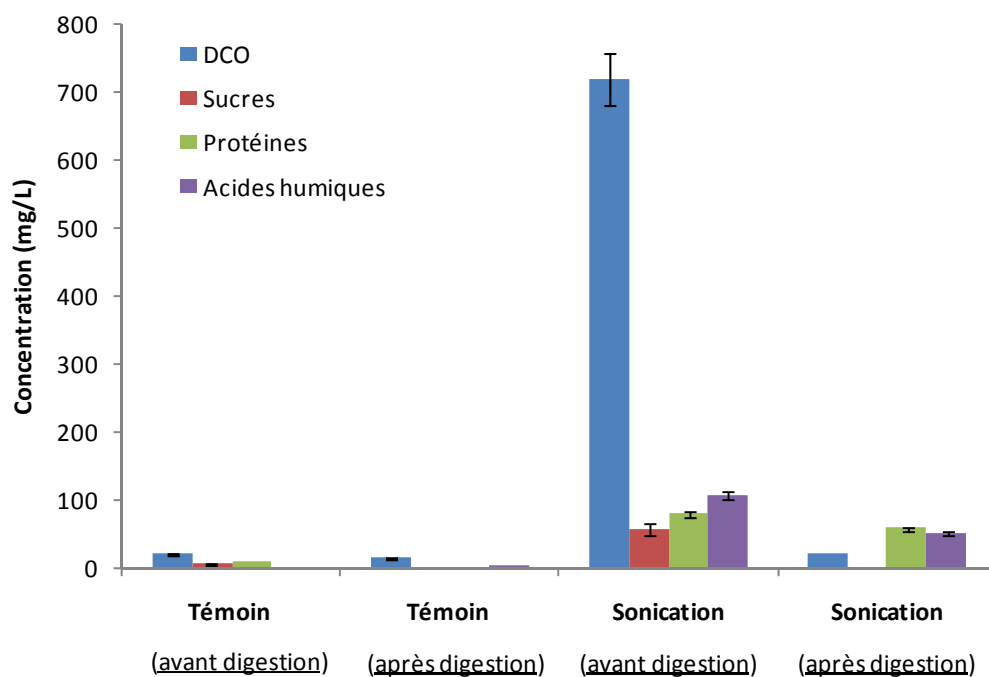


Figure 60 : Concentrations en DCO, sucres, protéines et acides humiques de fractions solubles de boues traitées par sonication et non traitées (témoin) avant et après digestion anaérobie en réacteur batch.

Les essais de biodégradabilité réalisés en conditions aérobies et anaérobies mènent aux mêmes conclusions : la sonication des boues n'augmente pas leur biodégradabilité. En conditions aérobies, les essais menés sur les fractions totales des boues montrent la même évolution du rapport DBO/DCO au cours du temps, que les boues soient traitées ou non. Au niveau des fractions solubles, les essais ont montré que suite à la sonication le rapport DBO/DCO diminue après traitement, ce qui traduit une diminution de la biodégradabilité de la fraction soluble des boues suite à la sonication. En conditions anaérobies, les tests PBM menés sur les fractions totales des boues indiquent que la sonication, dans les conditions appliquées, n'augmente pas la production de biogaz des boues, et ne favorise donc pas l'élimination de la matière. Au contraire, les essais réalisés sur les fractions solubles des boues ont montré qu'une partie de la fraction particulaire solubilisée suite à la sonication n'était pas assimilée par les microorganismes.

II. 4. b. Discussion/conclusion sur les effets induits par la sonication

Les essais menés sur les fractions organiques et minérales, solubles et particulaires des boues au cours de la sonication nous ont permis de mettre en évidence une évolution de la répartition de la matière suite au traitement. Ainsi, le rapport matière organique soluble/matière organique particulaire augmente proportionnellement avec l'énergie spécifique appliquée. Ces résultats sont en accord avec les données issues de la littérature (Thiem *et al.*, 2001, Grönroos *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2005, Khanal *et al.*, 2007).

Alors que la concentration en DCO totale n'évolue pas au cours de la sonication, la concentration en DCO soluble augmente proportionnellement à l'énergie spécifique appliquée. De plus, les essais menés sur la solubilisation des principaux constituants des boues permettent de conclure que le taux de solubilisation des protéines est inférieur à celui des acides humiques.

En ce qui concerne l'aspect microbiologique, il apparaît que les ultrasons conduisent à une forte désagrégation des microflocs jusqu'à une certaine énergie spécifique (égale à 70 000 J/g MS dans cette étude). Au-delà de cette énergie, une lyse cellulaire a été mise en évidence. Cependant, la quantité de microorganismes lysés reste négligeable. La plupart des études traitant de l'utilisation des ultrasons en tant que PRPB évoque la lyse cellulaire comme conséquence de la sonication. Cependant, il est important de rappeler que dans la plupart des

études, ces conclusions ne sont établies qu'à partir d'une solubilisation de la matière organique particulaire (DCO ou protéines). Or, la matière organique solubilisée suite à un traitement peut être de nature intracellulaire ou extracellulaire. La seule détermination de la concentration en DCO, ou en protéines, de la fraction soluble, est insuffisante pour mettre en évidence une lyse des microorganismes. Ainsi, peu d'études ont été réalisées sur les effets de la sonication sur la flore microbienne des boues. Parmi elles, on peut citer celle réalisée par Foladori *et al.* (2007). Les auteurs ont mis en évidence une lyse des cellules suite à la sonication des boues à partir d'une énergie spécifique égale à 120 kJ/L. Selon ces auteurs, deux phénomènes ont lieu lors de la sonication : une désagrégation des microflocs lorsque l'énergie spécifique appliquée est inférieure 80 kJ/L, et une lyse des cellules lorsque l'énergie spécifique appliquée est supérieure à 120 kJ/L. Bien que la lyse des microorganismes dans cette étude ait été suivie également par CMF, après incubation des échantillons avec un marqueur d'intégrité membranaire (iodure de propidium), les conditions de sonication sont différentes de celles de notre étude. En effet, dans les travaux de Foladori *et al.* (2007), même si les boues utilisées sont également des boues activées dont la concentration est comprise entre 3 et 4,4g/L, la sonication est effectuée après dilution des boues (1/500). Or, la concentration des boues est un des facteurs principaux à prendre en considération dans l'étude de la sonication. Même si ces résultats ne peuvent pas être directement comparés à nos données, en terme d'énergie appliquée, les mêmes phénomènes (désagrégation puis lyse des cellules) ont été mis en évidence.

A l'inverse de Foladori *et al.* (2007), Gonze *et al.* (2003) ont étudié la sonication jusqu'à une intensité égale à 0,5 W/mL et n'ont pas observé de lyse cellulaire. Cependant, leurs conclusions sont basées sur une analyse de la taille des particules et sont donc discutables d'un point de vue microbiologique. Par ailleurs, dans cette étude, la puissance appliquée, exprimée en W/mL, ne tient pas compte de la concentration des boues. Il est donc difficile de comparer nos résultats avec cette étude.

En ce qui concerne la biodégradabilité des boues, que ce soit en conditions aérobies ou anaérobies, aucune amélioration n'a été observée. Ces résultats sont étonnants car, à notre connaissance, les données bibliographiques indiquent que la sonication conduit à une augmentation de la biodégradabilité des boues en conditions aérobies et en conditions anaérobies. Pourtant, les résultats obtenus à partir des analyses chimiques et microbiologiques

présentent une certaine cohérence. Ainsi, il apparaît que, malgré d'importants taux de solubilisation de la matière organique, la nature du matériel solubilisé semble être essentiellement extracellulaire. D'une part, les essais menés sur la solubilisation de la matière organique indiquent que les acides humiques (extracellulaires) sont préférentiellement solubilisés par rapport aux protéines (intra et extracellulaires). D'autre part, les analyses microbiologiques indiquent que, bien que la sonication induise une lyse des cellules, celle-ci reste limitée. Par conséquent, un phénomène de croissance cryptique suite à la sonication semble peu probable. L'ensemble de ces données pourrait ainsi expliquer que la biodégradabilité des boues ne soit pas améliorée. Par contre, étant donné que la solubilisation de la matière organique suite au traitement est réelle, donc également l'augmentation de la concentration en substrat facilement biodégradable, la vitesse de production du biogaz devrait être augmentée. Ces essais, bien que réalisés en duplicat, n'ont été effectués que lors d'une seule série de traitement. Il conviendrait donc de réitérer ces essais afin d'être à même de conclure définitivement sur la biodégradabilité des boues au cours de la sonication.

III. CARACTERISATION DES PARAMETRES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES BOUES AU COURS D'UN TRAITEMENT PAR OZONATION

L'ozone est un oxydant puissant, à forte réactivité mais instable en milieu aqueux et qui possède les propriétés d'un dipôle. De ce fait, l'ozone a une grande capacité d'attaque des composés organiques. L'ozone peut réagir selon deux voies : la voie directe (action directe de l'ozone sous forme moléculaire sur la matière organique) et la voie indirecte (l'ozone se décompose en espèces radicalaires plus ou moins actives sur la matière organique). Selon les données bibliographiques, l'ozone a deux modes d'action sur la matière : il permet sa solubilisation et sa minéralisation. Ainsi, l'ozone s'attaque aussi bien à la matière soluble qu'à la matière particulaire. L'objectif des PRPB est de favoriser la solubilisation de la matière organique particulaire afin d'améliorer sa dégradation par voie biologique. La minéralisation directe des composés solubles par l'ozone n'est, par conséquent, pas souhaitable. Il est donc nécessaire de trouver un taux de traitement optimal qui permette de solubiliser la matière organique particulaire tout en évitant sa minéralisation.

Lors de l'étude des autres traitements (thermique et sonication), plusieurs expérimentations ont été réalisées en duplicat, mais compte tenu de la similarité des résultats d'une série à l'autre, les données ont été présentées pour une seule série d'essais. Dans le cas de l'ozonation, les doses appliquées étant différentes d'une série à l'autre (Tableau 18), les résultats obtenus lors des séries 3.1 et 3.2 seront présentés séparément dans cette partie.

Les différents résultats présentés sur les effets de l'ozonation ont fait l'objet de 4 séries de traitement, chacune sur un lot distinct de boues activées. Lors de la première série de traitement (Série 3.1), l'impact de l'ozonation a été étudié sur la répartition de la matière organique et minérale, sur les concentrations en DCO, protéines, sucres et acides humiques des fractions solubles et totales des boues, ainsi que sur la perméabilité membranaire par CMF. Tous ces essais ont été réitérés lors d'une deuxième série de traitement (Série 3.2). Au cours de la troisième série de traitement (Série 3.3), l'impact de l'ozonation a été étudié sur les caractéristiques microbiologiques des boues par les techniques culturales et le suivi de l'activité respiratoire des microorganismes. Les essais de biodégradabilité en conditions aérobies et anaérobies ont été effectués lors d'une quatrième série de traitement (Série 3.4).

Lors de chaque série de traitement, la dose maximale d’ozone correspond à la dose maximale qu’il est possible de délivrer expérimentalement avec le matériel du laboratoire. En effet, le facteur limitant lors de l’ozonation des boues réside dans l’apparition d’un phénomène de moussage au cours du temps. En fonction de la composition des boues, qui peut varier d’un lot à l’autre, le moussage est plus ou moins important et la dose d’ozone maximale permise expérimentalement n’est pas identique.

Force est de constater que bien souvent l’injection de gaz dans un liquide (barbotage) présente des problèmes de moussage. La présence de protéines, à des concentrations plus ou moins importantes, est, selon toute vraisemblance, responsable d’une partie du phénomène de moussage (Jallais et Ibarra, 2008). Lors de la première série de traitement, la concentration totale en protéines, égale à 784,75 ($\pm 40,2$) mg/L, est très supérieure à celles des boues utilisées lors de la série 3.2 puisqu’elle n’était que de 433,33 (± 22) mg/L. Par voie de conséquence, le phénomène de moussage est apparu plus tôt pour la série 3.1 tant est si bien que la dose maximale d’ozone appliquée à la série 3.1 est inférieure à celle appliquée à la série 3.2.

Les doses appliquées lors des différents traitements, ainsi que les concentrations initiales en MS et MES des boues utilisées dans chaque série sont indiquées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Doses d’ozone appliquées aux différents lots de boues et concentrations en MS et MES de chaque lot.

	Dose d’ozone (mg O ₃ /g MS)	MS (g/L) initiale	MES (g/L) initiale
Série 3.1	3 - 5,4 - 5,5 - 6,2	3,69	3,31
Série 3.2	5 - 8,3 - 11,4 - 32	4,12	3,53
Série 3.3	30 - 38,6 - 50,7 - 96,3	3,93	3,58
Série 3.4	28	3,43	3,33

III. 1. Effets de l'ozonation sur la répartition de la matière

Les concentrations en MS restent relativement stables au cours du traitement lors des séries 3.1 et 3.2. Lors de la première série de traitement (3.1) la concentration initiale en MS est de 3,69 ($\pm 0,16$) g/L et de 3,63 ($\pm 0,16$) g/L lorsque la dose maximale (6,2 mg O_3 /g MS) est appliquée. Lors de la série 3.2, la concentration initiale en MS est de 4,12 ($\pm 0,18$) g/L et de 3,88 ($\pm 0,17$) g/L lorsque la dose maximale (32 mg O_3 /g MS) est appliquée. Ces données permettent donc d'affirmer qu'aucun phénomène majeur de minéralisation n'est mis en jeu dans les conditions appliquées.

Quelle que soit la série considérée, l'ozonation des boues conduit à des modifications importantes au niveau de la répartition de la matière (Figure 61). Lors de la série 3.1, la concentration en matière organique soluble, proche de zéro pour les boues non traitées, représente 18,9% de la matière totale lorsque que la dose maximale de cette série (6,2 mg O_3 /g MS) est appliquée (Figure 61, A). Il en est de même pour les résultats obtenus à partir de la deuxième série de traitement (série 3.2). Avant traitement, la concentration en matière organique soluble est également proche de zéro. Après ozonation des boues à une dose de 32 mg O_3 /g MS, la matière organique soluble représente 24,5% de la matière totale (Figure 61, B).

En ce qui concerne la matière minérale, sa concentration dans les fractions solubles des boues n'évolue pas significativement au cours du traitement. L'ozonation a donc peu d'effet sur la solubilisation de la matière minérale. Lors de la série 3.1, la matière minérale soluble des boues non traitées représente 10,3% de la matière totale et 11,4% lorsque la dose maximale d'ozone (6,2 mg O_3 /g MS) est appliquée. Lors de la série 3.2, la matière minérale soluble des boues non traitées représente 12,6% de la matière totale et 13,3% lorsque la dose maximale d'ozone (32 mg O_3 /g MS) est appliquée.

Lors des séries 3.1 et 3.2, les gammes de concentration en ozone appliquées aux boues sont différentes (Tableau 18). Cependant, il peut paraître surprenant qu'avec une dose d'ozone 5 fois plus importante lors de la série 3.2, les taux de solubilisation de la matière organique soient aussi proches. L'hypothèse la plus probable pouvant être émise pour expliquer ces résultats serait liée à la concentration et à la composition des boues. Les séries ont été effectuées indépendamment et sont, par conséquent, réalisées à partir de lots de boues

distincts. Même si les boues utilisées sont à chaque fois des boues activées issues du même bassin d'aération, leur concentration en MS (Tableau 18) ainsi que leur composition diffèrent.

Comme le soulignent Paul et Bellefontaine (2007), la concentration en MS et la composition des boues sont des facteurs clés dans l'efficacité d'un traitement par ozonation. Ainsi, même si la dose spécifique d'ozone appliquée tient compte de la concentration en MS de la boue, les doses appliquées diffèrent en fonction de la concentration et de la composition des matières organiques du milieu à traiter (Pérez-Elvira *et al.*, 2006). Comme précédemment décrits (Introduction II. 2. e. i.), les mécanismes mis en jeu lors de l'ozonation des boues sont relativement complexes. La composition des boues a un impact majeur sur l'efficacité de l'ozonation puisqu'en fonction des concentrations en matières organiques des fractions solubles et particulaires des boues, le transfert de l'ozone dans les boues ne sera pas le même. Ainsi, la présence d'un composé à des concentrations variables, d'un échantillon à l'autre, peut être à même de modifier le transfert de l'ozone dans les boues et, par conséquent, l'efficacité du traitement.

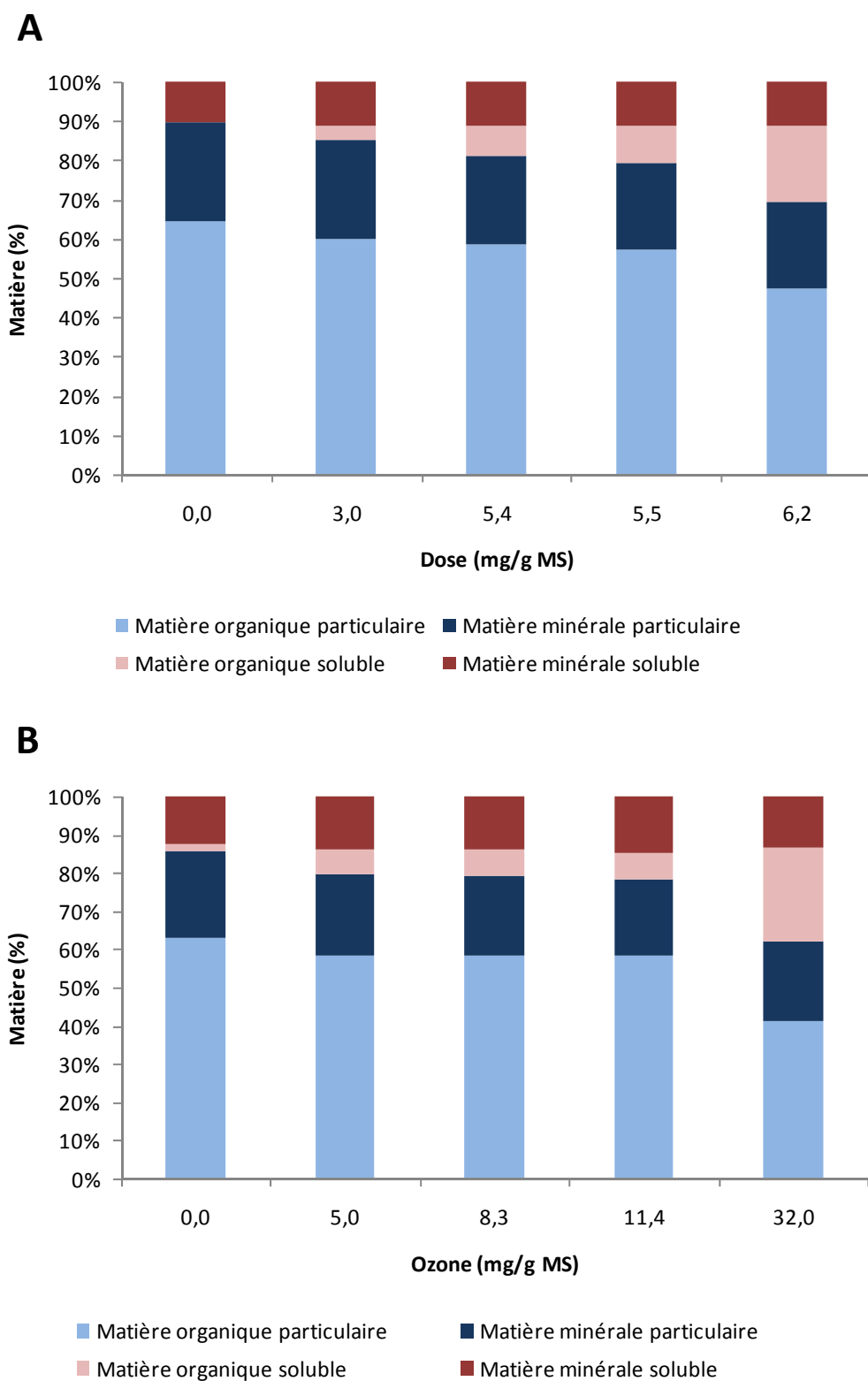


Figure 61 : Effets de l’ozone sur la répartition de la matière lors des séries 3.1 (A) et 3.2 (B). Evolution des pourcentages de matières organiques et minérales, solubles et particulaires, en fonction de la dose d’ozone appliquée.

III. 2. Effets de l'ozonation sur la solubilisation de la matière organique

Les effets de l'ozonation sur la solubilisation globale de la matière organique ont d'abord été évalués en terme de DCO (Figure 62). La composition de la matière organique solubilisée a été estimée par l'évaluation des taux de solubilisation de la DCO, des sucres et des protéines (Figure 63). Les concentrations en protéines et acides humiques des fractions solubles des boues avant et après traitement sont présentées sur la Figure 64.

III. 2. a. Evolution des concentrations en DCO des fractions totales et solubles des boues

Tout comme la concentration en MS, la concentration en DCO totale n'évolue pas significativement au cours de l'ozonation, dans les conditions testées (Figure 62). Lors de la première série de traitement (3.1), la DCO totale des boues non traitées est de 3430 (± 180) mg/L, et celle des boues traitées avec la dose maximale (6,2 mg O_3 /g MS) est de 3420 (± 180) mg/L (Figure 62, A). Lors de la série 3.2, la DCO totale des boues non traitées est de 3345 (± 176) mg/L, et celle des boues traitées selon la dose maximale (32 mg O_3 /g MS) est de 3000 (± 158) mg/L (Figure 62, B). Ces résultats sur la DCO confirment ceux obtenus sur la répartition de la matière et tendent à montrer que le phénomène de minéralisation de la matière, s'il existe, est très faible dans les conditions expérimentales. Le maintien à peu près constant de la concentration en DCO totale au cours de l'ozonation est particulièrement important puisque l'ozone est connu pour conduire à une minéralisation de la matière. Or, comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, l'objectif des PRPB est de favoriser la solubilisation de la matière organique particulaire afin d'améliorer sa dégradation par voie biologique. Il est donc important d'appliquer des concentrations en ozone qui permettent de solubiliser la matière particulaire sans entraîner sa minéralisation.

A la différence de la DCO totale, une très nette augmentation de la DCO soluble au cours de l'ozonation est observée quelle que soit la série de traitement considérée. Lors de la première série de traitement, la concentration en DCO de la fraction soluble de l'échantillon témoin est égale à 32,5 ($\pm 1,7$) mg/L. Après ozonation des boues avec la dose maximale permise, elle atteint 774 ($\pm 40,7$) mg/L (Figure 62, A). Lors de la deuxième série, la concentration en DCO de la fraction soluble de l'échantillon témoin est égale à 27 ($\pm 1,4$) mg/L. Après ozonation des boues à la dose maximale permise, elle atteint 802 ($\pm 42,2$) mg/L. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment sur la répartition de la matière au cours de l'ozonation des boues. Ainsi, l'ozonation des boues, dans les conditions appliquées,

conduit bien à une solubilisation de la matière organique particulaire sans apparition nette d'un phénomène de minéralisation.

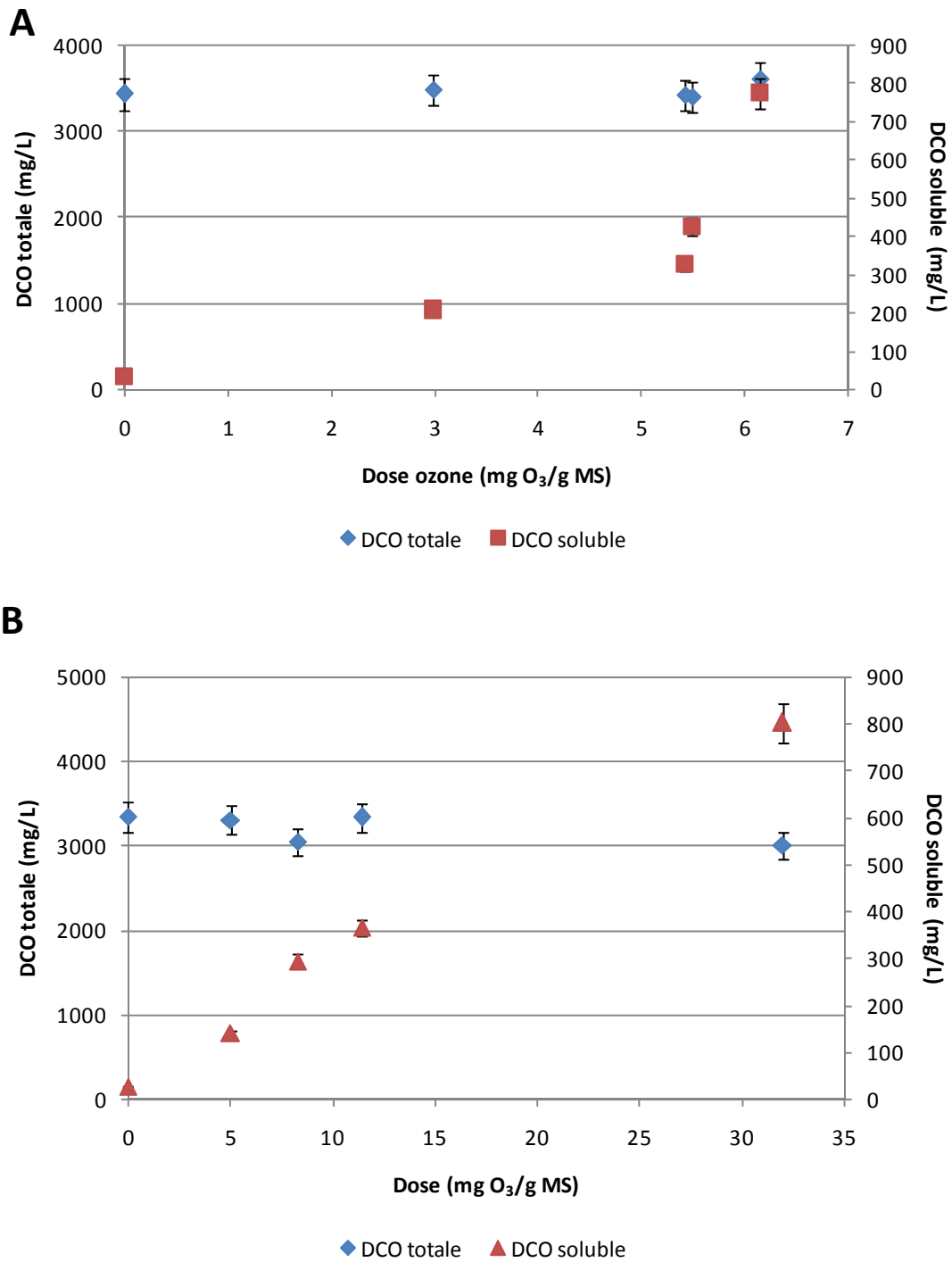


Figure 62 : Evolution de la DCO des fractions totales et solubles en fonction de la dose d'ozone appliquée aux boues lors des séries 3.1 (A) et 3.2 (B).

III. 2. b. Solubilisation des principaux constituants organiques des boues

Les taux de solubilisation des sucres et des protéines suivent la même tendance que celui de la DCO, c'est-à-dire qu'ils augmentent avec la dose d'ozone appliquée (Figure 63). Lors de la série 3.1, à partir d'une dose égale à 3 mg O_3 /g MS, les taux de solubilisation de la DCO, des sucres et des protéines sont respectivement de 5,1 ($\pm 0,6$)%, 3,9 ($\pm 1,2$)% et 6,6 ($\pm 0,6$)%. Après application du traitement maximal à cette série (6,2 mg O_3 /g MS), ces taux atteignent respectivement 20,8 ($\pm 2,3$)%, 18,6 (± 5)% et 23,5 ($\pm 2,2$)%. Lors de la série 3.2, à partir d'une dose égale à 5 mg O_3 /g MS, les taux de solubilisation de la DCO, des sucres et des protéines sont respectivement de 3,4 ($\pm 0,4$)%, 3,8 (± 1)% et 14,3 ($\pm 0,6$)%. Ces taux atteignent respectivement 24,3 ($\pm 2,4$)%, 25,1 ($\pm 6,6$)% et 66,5 ($\pm 7,1$)% lorsque le traitement maximal (32 mg O_3 /g MS) est appliqué.

Quelques différences apparaissent entre les deux séries. Lors de la première série de traitement, bien que les taux de solubilisation de la DCO, des sucres et des protéines augmentent au cours du traitement, on remarque qu'aucun composant des boues n'est majoritairement solubilisé par rapport aux autres. Ceci est également vrai au cours de la deuxième série de traitement jusqu'à une dose de 8,3 mg O_3 /g MS. Au-delà de cette dose, le taux de solubilisation des protéines augmente brusquement par rapport au taux de solubilisation de la DCO et des sucres. Lorsque la dose maximale de cette série est appliquée, le taux de solubilisation des protéines atteint 66,5 ($\pm 7,1$)%. Ce phénomène est probablement à relier avec une libération brutale de protéines intracellulaires liée à la lyse des microorganismes.

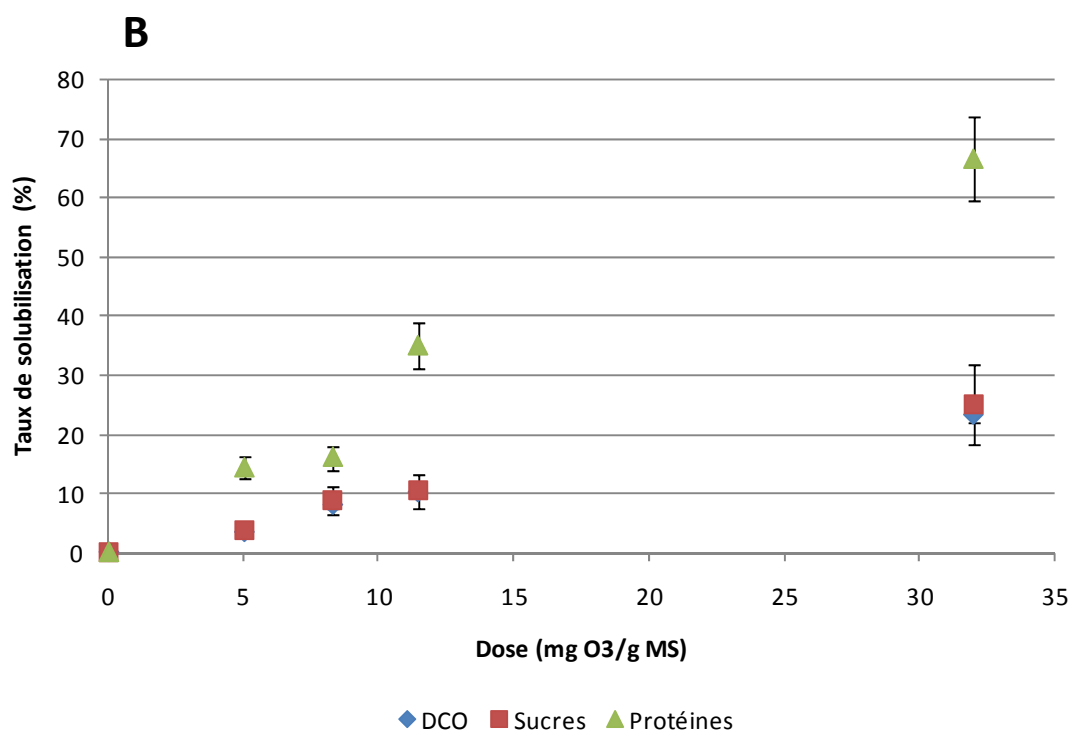
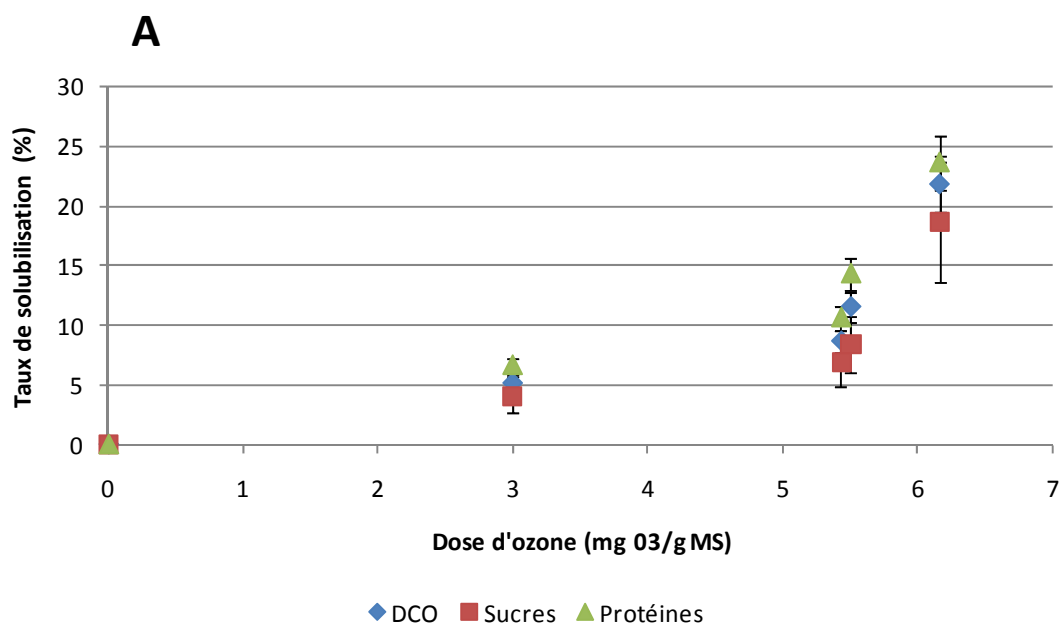
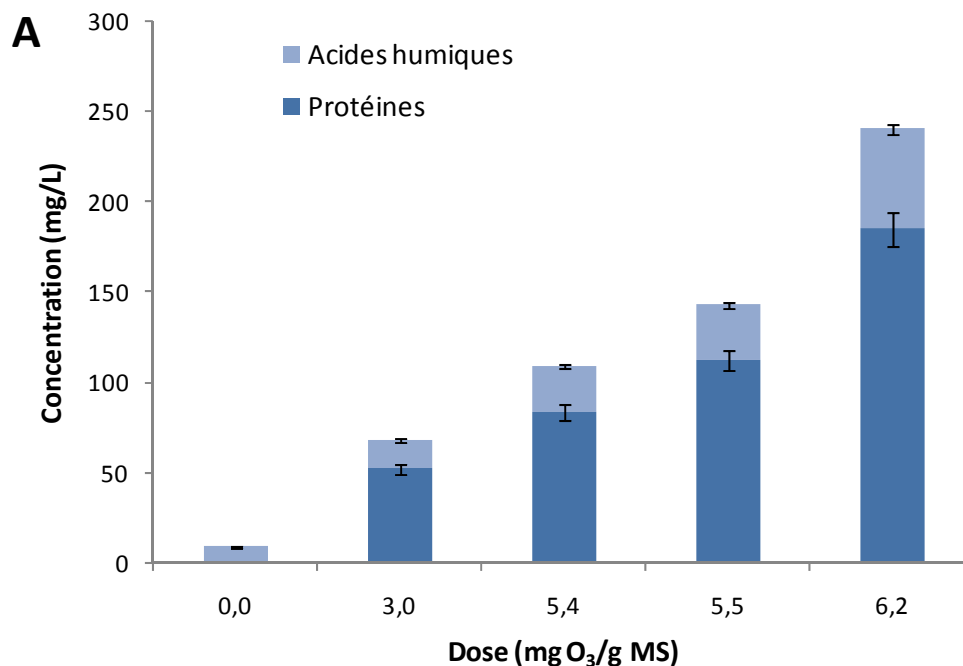


Figure 63 : Taux de solubilisation de la DCO, des protéines et des sucres au cours de l'ozonation en fonction de la dose appliquée lors des séries 3.1 (A) et 3.2 (B).

Les résultats sur la solubilisation des protéines et des acides humiques (Figure 64) confirment les données précédentes sur la DCO. Lors de la première série de traitement, aucune différence significative n'est mise en évidence entre le taux de solubilisation des protéines et des acides humiques. Avant traitement, les concentrations en protéines et en acides humiques de la fraction soluble des boues de la première série sont respectivement égales à 0 et 8,34 ($\pm 0,38$) mg/L. Lorsque la dose maximale d'ozone est appliquée, ces concentrations atteignent respectivement 184,7 ($\pm 9,46$) mg/L et 55,58 ($\pm 2,55$) mg/L, soit un taux de solubilisation de 23,5 ($\pm 2,3$)% pour les protéines et un taux de solubilisation égal à 17,4 ($\pm 1,8$)% pour les acides humiques. En revanche lors de la deuxième série de traitement, les concentrations en protéines et en acides humiques de la fraction soluble des boues non traitées sont respectivement égales à 16,92 ($\pm 0,86$) et 2,96 ($\pm 0,13$) mg/L. Lorsque la dose maximale d'ozone est appliquée, ces concentrations atteignent respectivement 293,85 ($\pm 15,06$) mg/L et 96,78 ($\pm 4,45$) mg/L, soit un taux de solubilisation de 66,5 ($\pm 7,1$)% pour les protéines et un taux de solubilisation égal à 37,9 ($\pm 3,4$)% pour les acides humiques.



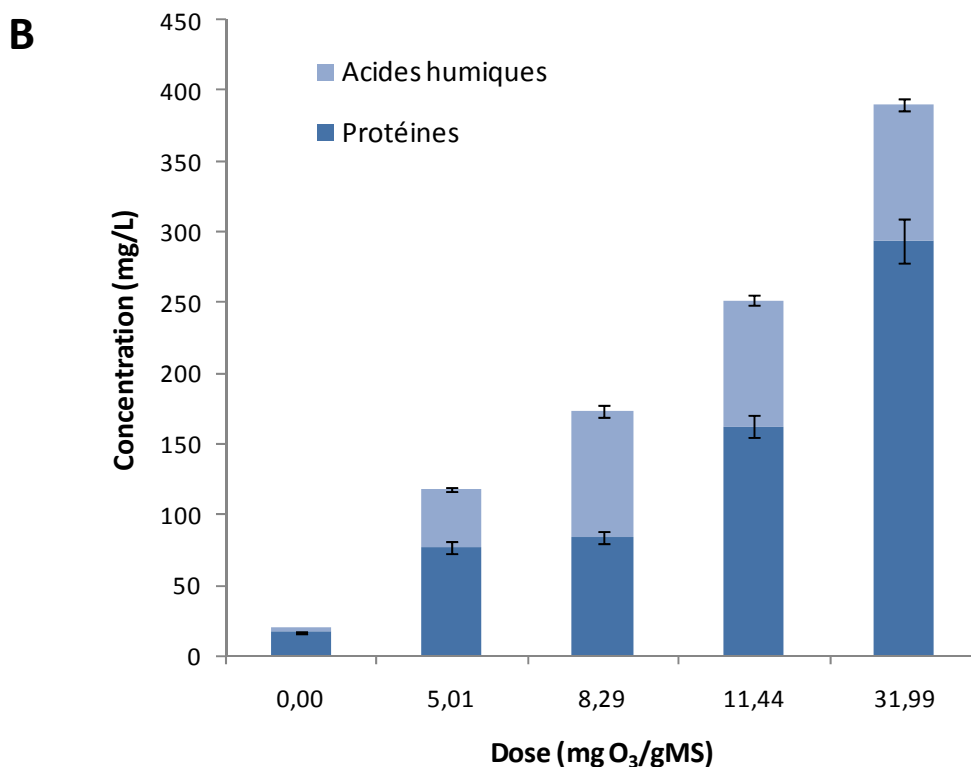


Figure 64 : Concentrations en protéines et en acides humiques des fractions solubles des boues au cours d'un traitement par ozonation en fonction de la dose appliquée lors des séries 3.1 (A) et 3.2 (B).

Les deux séries de traitement effectuées ont permis de mettre en évidence que, dans les gammes de traitement appliquées, l'ozonation conduit à une solubilisation de la matière organique. La solubilisation de la matière minérale est, quant à elle quasiment négligeable. De plus, aucun phénomène majeur de minéralisation de la matière n'a été observé puisque les différences entre les concentrations en MS avant et après traitement sont très faibles.

Néanmoins, même si les doses mises en cause ne sont pas identiques dans les deux séries de traitement, l'ozonation des boues conduit à des effets relativement similaires sur la répartition de la matière.

L'hypothèse la plus probable pour expliquer la différence en terme de dose d'ozone appliquée est probablement à relier avec des compositions différentes des boues en raison de la présence, dans chaque lot de boues, de composés spécifiques et/ou communs, à des concentrations différentes.

Les essais menés sur la solubilisation de la matière organique conduisent à des conclusions différentes qui sont probablement à relier avec cette différence de composition des boues et donc avec les doses d'ozone appliquées. Lors de la première série de traitement, les taux de solubilisation de la DCO, des sucres et des protéines augmentent au cours du traitement de manière quasiment similaire. Lors de la deuxième série de traitement, les résultats montrent qu'à partir d'une dose d'ozone égale à 8,3 mg O₃/g MS, le taux de solubilisation des protéines augmente brusquement par rapport au taux de solubilisation de la DCO et des sucres pour atteindre 66,5 (±7,1)% lorsque la dose maximale (32 mg O₃/g MS) est appliquée. Ce phénomène, qui n'a pas été observé lors de la première série de traitement, est à relier, probablement, avec une libération importante de protéines intracellulaires lors de la deuxième série en raison de l'application d'une dose d'ozone plus forte.

III. 3. Effets de l'ozonation sur les microorganismes des boues

Comme décrit précédemment lors de l'étude des effets du traitement thermique et de la sonication, l'étude de l'ozonation sur la flore microbienne a porté sur la concentration en microorganismes (Tableau 19 et Tableau 20), l'intégrité membranaire (Figure 66), le suivi de l'activité respiratoire des microorganismes (Figure 67) et la croissance bactérienne (Figure 68). De la même façon, l'impact de l'ozonation sur la concentration en microorganismes et sur l'intégrité membranaire est analysé dès la fin de l'application du traitement. L'activité respiratoire des microorganismes ainsi que la croissance bactérienne sont suivis au cours du temps dès la fin de l'ozonation des boues. La caractérisation des effets de l'ozone sur la concentration en microorganismes totaux et sur l'intégrité membranaire des cellules a été effectuée lors des séries 3.1. et 3.2. Au cours de la troisième série de traitement (Série 3.3), l'impact de l'ozonation sur les caractéristiques microbiologiques des boues a été évalué par les techniques culturales et par le suivi de l'activité respiratoire des microorganismes.

L'impact de l'ozone sur la population bactérienne des boues diffère également significativement lors des deux séries de traitement.

Lors de la première série de traitement, une augmentation du nombre de microorganismes est observée jusqu'à une dose d'ozone égale à 5,5 mg O₃/g MS (Tableau 19), probablement liée à l'individualisation des cellules agrégées dans les microflocs. Lorsque la dose appliquée atteint 6,2 mg O₃/g MS, la concentration bactérienne diminue, diminution à mettre en relation avec l'apparition du phénomène de lyse bactérienne. Lors de la deuxième

série de traitement (3.2), la concentration en microorganismes totaux diminue de $7,11E+08$ B/mL (témoin) à $5,28E+08$ B/mL dès la première dose d'ozone (5 mg O_3 /g MS) ce qui traduit également le début de la lyse des microorganismes à partir de cette dose (Tableau 20).

Ainsi, lors de la première série de traitement, une dissociation des cellules et une lyse bactérienne ont été successivement mises en évidence par l'application de doses croissantes d'ozone. Lors de la deuxième série de traitement, aucune libération des cellules des microflocs n'a été observée puisque dès la plus faible dose d'ozone, une diminution de la concentration en microorganismes totaux, reflétant une lyse des cellules, est mise en évidence.

Par référence aux doses d'ozone appliquées dans les deux séries, le début de la lyse cellulaire se situerait pour des doses d'ozone de l'ordre de 5 à 6 mg O_3 /g MS. Au dessous de cette dose, l'ozonation entraînerait uniquement une désagrégation des floccs et expliquerait ainsi que l'accroissement du nombre de microorganismes est uniquement décelable dans la première série de traitement puisque la dose la plus faible dans la deuxième série est de 5 mg O_3 /g MS.

La concentration bactérienne de l'échantillon traité avec la dose d'ozone la plus élevée (32 mg O_3 /g MS) de la deuxième série de traitement est difficile à déterminer de manière précise (Tableau 20). Le principe du « Bacteria Counting Kit » est fondé sur un marquage de l'ADN des microorganismes avec le SYTO BC. Ce fluorochrome pénètre par simple diffusion à l'intérieur de toutes les cellules (viables et non viables). Après diffusion dans la cellule, sa complexation avec l'ADN conduit à l'émission d'une fluorescence verte qui peut ensuite être détectée par CMF. Dans le cas de l'échantillon traité avec une dose égale à 32 mg O_3 /g MS, le cytogramme représentant la fluorescence verte émise *versus* FSC met en évidence une population bactérienne dont la fluorescence moyenne est beaucoup plus faible que celle du témoin.

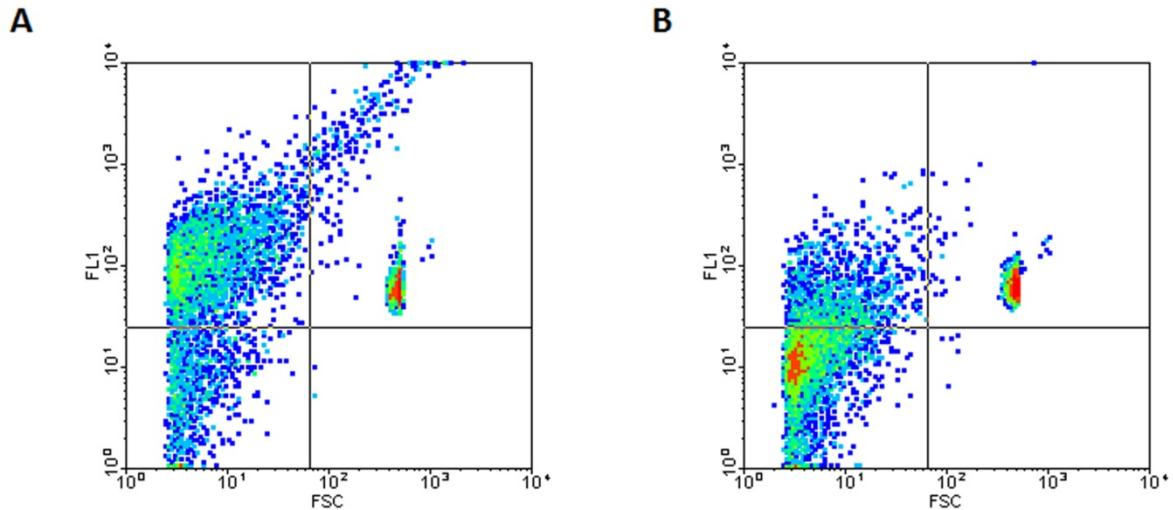


Figure 65 : Cytogrammes représentant la fluorescence verte (FL1) *versus* FSC obtenus après marquage à l'aide du « Bacteria Counting Kit » d'échantillons de boues non traitées (A) et de boues traitées par ozonation (32mg O₃/ g MS) (B).

Ces résultats pourraient éventuellement s'expliquer par une oxydation du fluorochrome (le SYTO BC), liée à la présence d'ozone résiduelle dans les boues suite au traitement, qui se traduirait par une diminution ou une perte de la capacité de fixation du SYTO BC à l'ADN. Cependant, ce problème n'ayant pas été rencontré pour les autres échantillons de cette série, cette hypothèse reste à valider ou infirmer.

L'autre hypothèse pouvant être envisagée serait liée à une destruction de l'ADN des microorganismes. Dans ce cas, le SYTO BC, connu pour marquer spécifiquement l'ADN (mécanisme précis non connu), ne pourrait plus se fixer sur l'ADN. Ainsi, la forte diminution de l'intensité de fluorescence verte observée lorsque les boues sont traitées avec 32 mg O₃/g MS (Figure 65) serait due à une dénaturation partielle de la structure de l'ADN. Etant donné la spécificité de marquage du SYTO BC et les propriétés de l'ozone (qui plus est appliquée à une concentration élevée), c'est l'hypothèse qui semble la plus plausible. Par voie de conséquence, l'évaluation du nombre de microorganismes totaux est plus difficile à déterminer puisque le seuil de séparation entre, d'une part, les microorganismes (dont le repérage se fait sur la base d'une spécificité de marquage sur de l'ADN intègre) et, d'autre part, les débris cellulaires, l'autofluorescence de particules et le bruit de fond du cytomètre, est moins net que dans le cas où l'ADN cellulaire n'est pas dénaturé.

Tableau 19 : Concentrations en microorganismes totaux déterminées par CMF au cours d'un traitement par ozonation (Série 3.1).

Dose d'ozone (mg O ₃ /g MS)	Non traitées	3	5,4	5,5	6,2
Concentration en microorganismes totaux (Bactéries/mL)	1,17E+08	3,61E+08	3E+08	3,9E+08	2,19E+08

Tableau 20 : Concentrations en microorganismes totaux déterminées par CMF au cours d'un traitement par ozonation (Série 3.2).

Dose d'ozone (mg O ₃ /g MS)	Non traitées	5	8,3	11,4	32
Concentration en microorganismes totaux (Bactéries/mL)	7,11E+08	5,28E+08	4,14E+08	4,43E+08	nd

nd : non déterminé

En parallèle, des essais ont été menés sur la perméabilité membranaire des cellules suite à l'incubation des échantillons avec le SYTOX Green. Lors de la première série de traitement, aucune augmentation de l'intensité de fluorescence n'a été mise en évidence suite à l'ozonation des boues, quelle que soit la dose d'ozone appliquée (Figure 66). Au contraire, la fluorescence du SYTOX Green a tendance à diminuer avec des doses croissantes en ozone. Les cytogrammes obtenus suite à l'analyse par CMF des échantillons issus de la deuxième série de traitement (3.2), identiques à ceux obtenus lors de la série 3.1, ne sont pas présentés.

Lors des deux séries de traitement, puisque la fluorescence du SYTOX Green, marqueur de l'intégrité membranaire des microorganismes, n'augmente pas, ce résultat semblerait traduire un maintien de la structure membranaire des microorganismes au cours de l'ozonation.

Ce résultat peut donc paraître surprenant par comparaison aux résultats obtenus avec le « Bacteria Counting Kit » (Tableau 19 et Tableau 20) qui semblent indiquer qu'une lyse bactérienne apparaît à partir de doses d'ozone supérieures à 5-6 mg O₃/g MS et que cette lyse est importante avec 32 mg O₃/g MS. Les résultats obtenus avec le SYTOX Green sembleraient donc contredire ceux obtenus avec le « Bacteria Counting Kit ». Même si les mécanismes précis de la fixation du SYTOX Green sur l'ADN ne sont pas communiqués par

le fabricant (Invitrogen), ce marqueur est connu pour sa grande spécificité à l'ADN (Burnett *et al.*, 2002). Il est donc normal que si l'ADN est plus ou moins dénaturé, le résultat se traduise par une diminution ou une absence totale de fluorescence. Finalement, dans tous les cas de figure, il est logique qu'il n'y ait pas d'augmentation de l'intensité de fluorescence puisque selon la dose d'ozone appliquée, soit les cellules restent intactes (pas de perméabilisation membranaire ni d'altération de l'ADN), soit la dénaturation de leur ADN est consécutive ou simultanée au phénomène de perméabilisation cellulaire.

La baisse de l'intensité de fluorescence des microorganismes suite à l'ozonation des boues et marquage avec le SYTOX Green (Figure 66) s'expliquerait donc par une dénaturation simultanée (ou consécutive) de l'ADN, à l'étape de perméabilisation cellulaire. Ce marquage, où le paramètre FSC est à peu près identique sur les échantillons non traités et traités à l'ozone, tend encore à ne pas privilégier l'hypothèse d'un éclatement brutal des microorganismes. Dans ce cas, la diminution de l'intensité de fluorescence de la population cellulaire « marquée » au SYTOX Green ne peut probablement pas s'expliquer uniquement par une désintégration des floccs accompagnée d'une libération des cellules individualisées, comme constatée lors du traitement thermique ou lors de la sonication, car le nombre de microorganismes tend à diminuer avec des concentrations croissantes en ozone (Tableau 19 et Tableau 20).

Quoi qu'il en soit, la population bactérienne subit des dommages conséquents lorsque la concentration en ozone atteint des valeurs de 32 mg O₃/g MS (Figure 65, B).

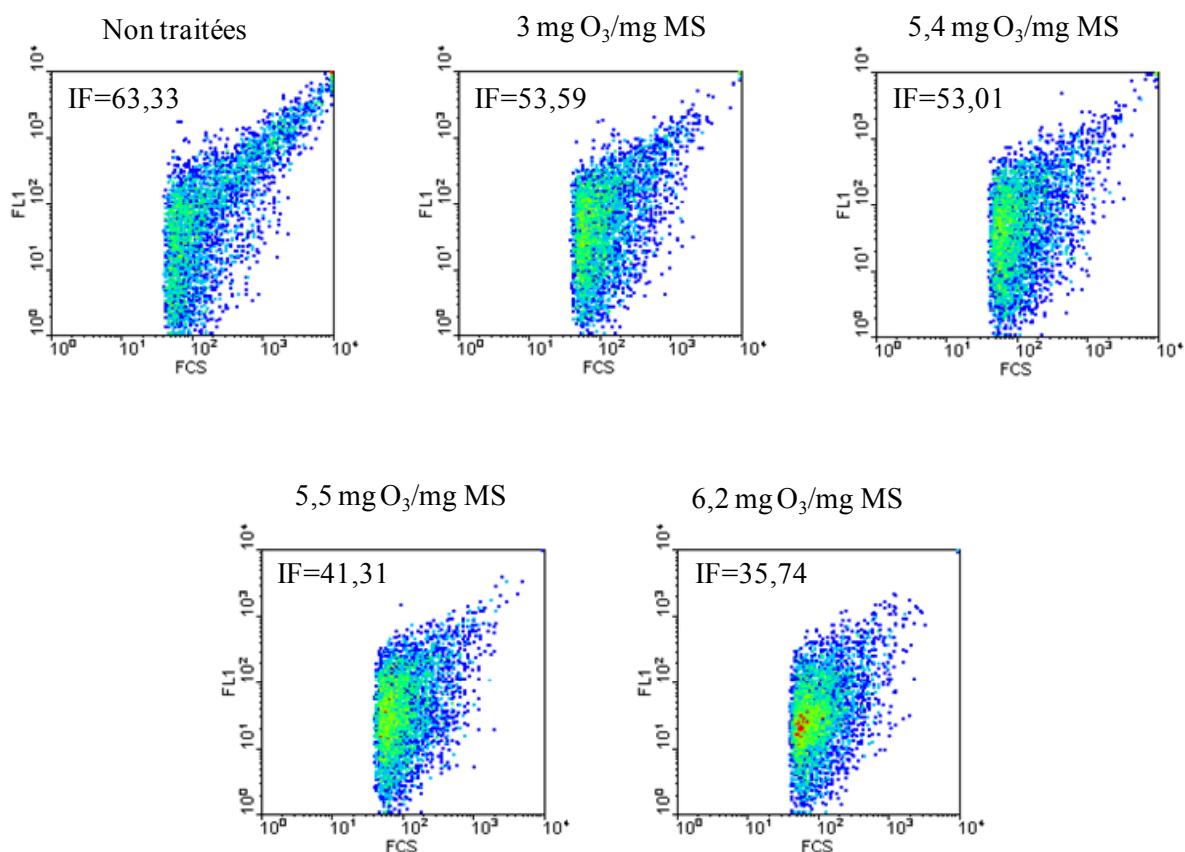


Figure 66 : Cytogrammes représentant la fluorescence verte émise (FL1) par le SYTOX Green en fonction d'un paramètre morphologique (FSC) obtenus après marquage d'échantillons de boues non traitées, et traitées selon différentes doses d'ozone.

Les essais menés sur la reprise de la croissance bactérienne et sur l'activité respiratoire ont été effectués à partir d'un autre lot de boues activées. Les doses d'ozone appliquées sont donc différentes. Lors de cette série (3.3), malgré des doses d'ozone beaucoup plus élevées que précédemment (séries 3.1 et 3.2), les taux de solubilisation de la DCO sont du même ordre de grandeur puisqu'ils sont de 5,9 ($\pm 0,8$) mg/L, 8,2 ($\pm 1,1$) mg/L, 15 ($\pm 2,1$) mg/L et de 23 ($\pm 3,1$) mg/L par dose d'ozone croissante (respectivement 30, 39, 51 et 96 mg O₃/g MS).

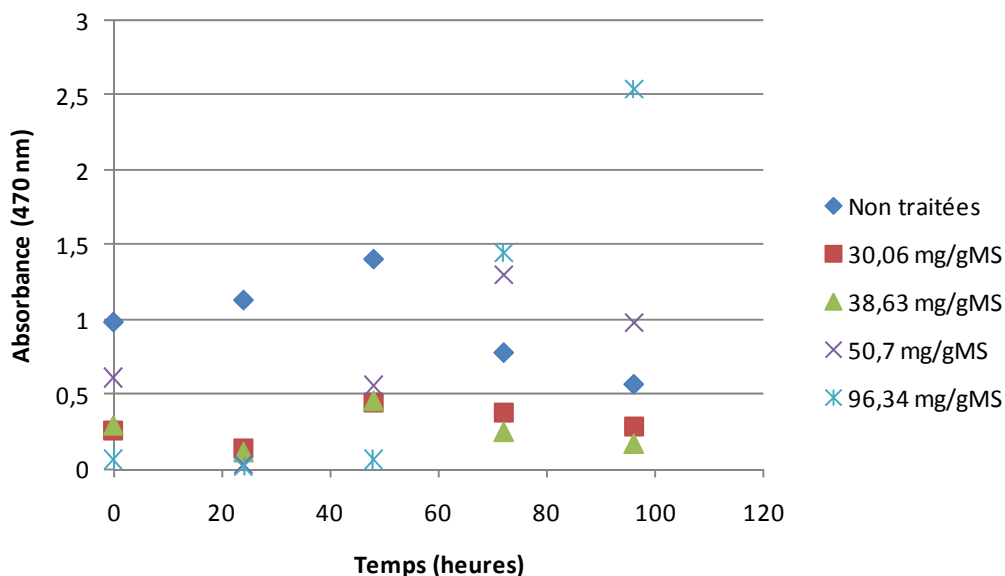


Figure 67 : Evolution de l'activité respiratoire des microorganismes d'échantillons de boues activées soniquées au cours du temps en fonction de la dose d'ozone appliquée initialement.

En ce qui concerne l'activité respiratoire des microorganismes, après traitement (T_0), une diminution de l'absorbance des échantillons de boues ozonées par rapport au témoin est observée. Ces résultats traduisent une chute de l'activité respiratoire des microorganismes suite à l'ozonation. Cette activité diminue encore après 24h d'incubation puisque l'absorbance des échantillons de boues traitées est proche de zéro alors que celle de l'échantillon témoin est proche de 1. Cette tendance est confirmée après 48h d'incubation.

Les résultats obtenus pour des doses d'ozone supérieures à 30 mg O_3 /g MS sont cohérents avec ceux obtenus lors de la série 3.2 qui montrent, en particulier pour la plus forte dose appliquée dans cette série (32 mg O_3 /g MS) une désorganisation cellulaire prononcée : lyse microbienne, perméabilisation membranaire ou encore dénaturation de l'ADN.

En revanche, à partir de 72h d'incubation, alors que l'activité respiratoire de l'échantillon témoin et des échantillons traités selon une dose d'ozone de 30 et 39 mg O_3 /g MS commence à décliner, celle des échantillons traités à 50,7 et 96,34 mg O_3 /g MS augmente significativement. Ces résultats mettent donc en évidence une reprise de l'activité respiratoire dans les échantillons de boues traitées avec des doses d'ozone supérieures à 50,7 mg O_3 /g

MS. Cette reprise d'activité est, probablement, à mettre en relation avec une libération importante de constituants intracellulaires issus de la lyse microbienne.

Les résultats obtenus à partir des techniques culturales mettent clairement en évidence un effet bactéricide de l'ozone puisque le nombre d'UFC diminue significativement suite au traitement (T_0) (Figure 68). Cet effet bactéricide est d'autant plus important que la dose d'ozone appliquée est élevée. Ces résultats, obtenus pour des doses d'ozone supérieures ou égales à 30 mg O_3 /g MS, confirment les résultats obtenus lors de la série 3.2 qui montraient, en particulier avec une concentration d'ozone de 32 mg O_3 /g MS, qu'une fraction de la population microbienne était lysée et qu'une autre fraction présentait une dénaturation prononcée de l'ADN.

Après 24h et 48h d'incubation, une reprise de croissance est observée dans tous les échantillons, quelle que soit la dose d'ozone appliquée initialement, excepté dans le cas du témoin. La reprise de croissance est d'autant plus importante que la dose d'ozone consommée par les boues est élevée. Là encore, on peut supposer que plus le matériel intracellulaire libéré est important, plus la reprise de croissance est importante.

Le décalage temporel mesuré entre la reprise d'activité respiratoire (T_{0+72h}) et la reprise de la croissance cellulaire (T_{0+24h}) peut paraître atypique. Il s'explique probablement par le fait que la reprise de croissance (associée à une disponibilité accrue de matières organiques solubles issues de la lyse cellulaire) concerne une faible fraction de microorganismes, et qu'entre T_0 et T_{0+72h} , l'activité métabolique d'une importante fraction de cellules, endommagées par le traitement, diminue progressivement au cours du temps. La résultante, liée à l'accroissement de l'activité métabolique d'une fraction de cellules aptes à se diviser et à la diminution progressive de l'activité métabolique d'une autre fraction de cellules endommagées par le traitement d'ozonation, peut ainsi aboutir, à un temps donné, à une diminution de l'activité respiratoire globale de la population microbienne totale contenue dans les boues.

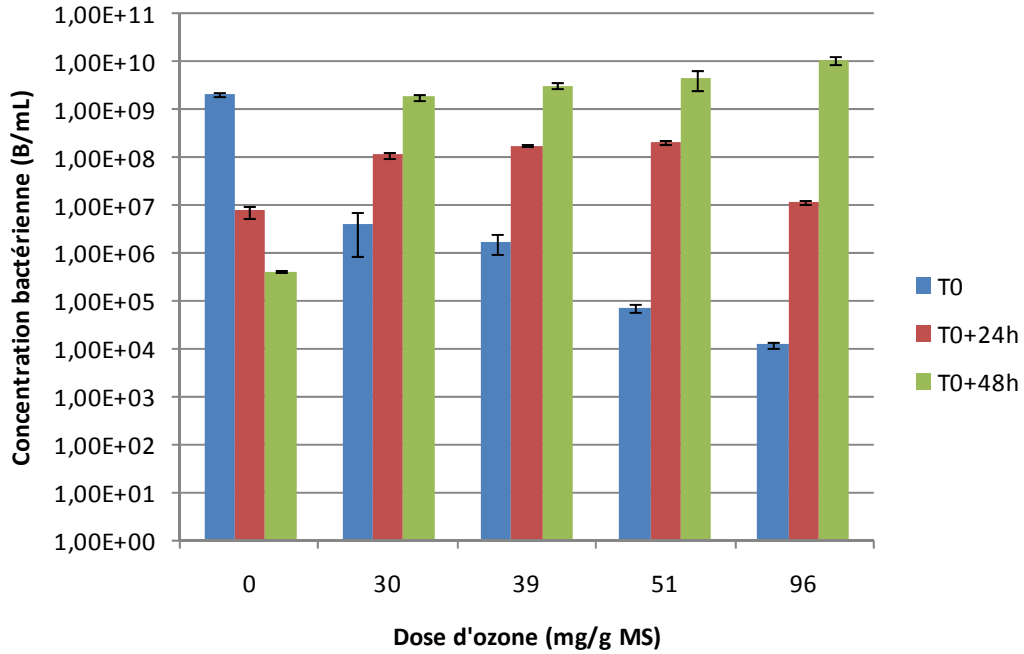


Figure 68 : Evolution de la concentration en microorganismes cultivables d'échantillons de boues activées soumises à un traitement par ozonation au cours du temps en fonction de la dose d'ozone appliquée.

L'effet de l'ozonation sur la population microbienne des boues est délicat à déterminer de manière rigoureuse, en raison, principalement, du manque de reproductivité entre les différents essais en terme de dose d'ozone consommée par les boues.

Les analyses par CMF permettent cependant d'apporter des éléments de réponse quant aux effets de l'ozonation sur les microorganismes. Lors de la première série de traitement, une dissociation des cellules puis une lyse bactérienne ont été mises en évidence avec des doses d'ozone croissantes. Lors de la deuxième série de traitement, une lyse bactérienne est observée dès la première dose d'ozone. Cependant, lors de ces séries de traitement, il est important de noter que la dose d'ozone minimale consommée dans la série 3.2 est recouvrante avec la dose maximale consommée dans la série 3.1.

Au niveau de l'intégrité membranaire, la non augmentation de l'intensité de fluorescence de la population microbienne après marquage au SYTOX Green laisserait croire à une absence de perméabilisation des membranes. Au contraire, la diminution de fluorescence enregistrée est probablement à corréliser avec une dénaturation de l'ADN puisque le SYTOX Green est un marqueur de l'ADN. Les résultats obtenus dans la série 3.2 avec 32

mg O₃/g MS confirment cette hypothèse puisque le marquage avec le SYTO BC montre une dénaturation importante de l'ADN des microorganismes (Figure 65, B).

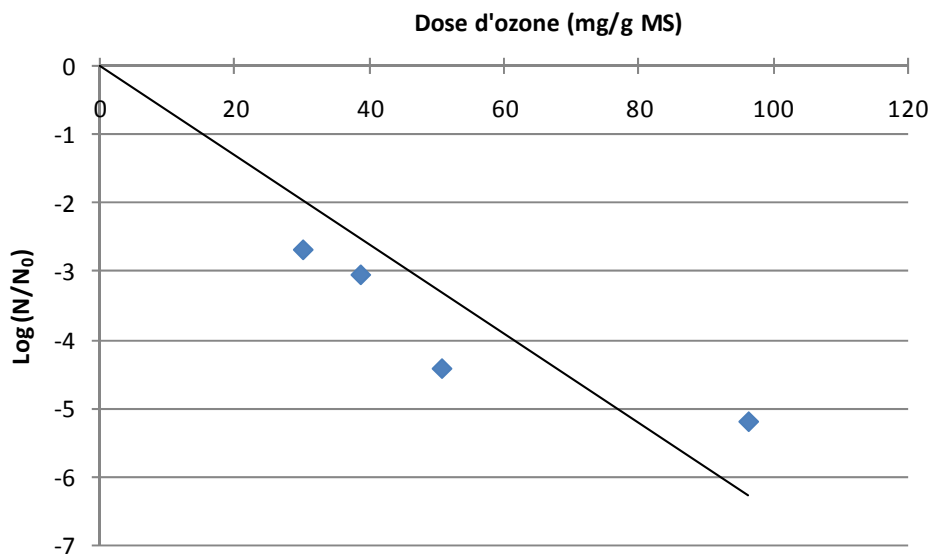


Figure 69 : Taux d'abattement de la population bactérienne déterminé par les techniques culturales en fonction de la dose d'ozone appliquée suite au traitement (T_0).

Dans cette série, la dose minimale (30 mg O₃/g MS) est recouvrante avec la dose maximale de la série 3.2 qui est de 32 mg O₃/g MS. Les effets bactéricides à T_0 , proportionnels à la dose d'ozone et importants dès la plus faible dose d'ozone (Figure 69), sont cohérents avec ceux obtenus dans la série 3.2 avec la plus forte dose d'ozone, qui eux, révèlent qu'une fraction de la population microbienne est très endommagée par le traitement, en particulier au niveau de l'ADN.

De ces différents essais sur les effets biologiques de l'ozone, il en ressort également que la reprise de croissance (Figure 68) est liée à une disponibilité accrue de matière organique soluble extracellulaire et/ou intracellulaire. La reprise de croissance, mais aussi l'activité respiratoire (Figure 67), étant systématiquement précédée d'une lyse cellulaire et donc d'une disponibilité accrue de matières intracellulaires, il est probable que la reprise de croissance passe pour partie par de la croissance cryptique.

III. 4. Effets de l'ozonation sur la biodégradabilité des fractions totales et solubles des boues

L'impact de l'ozonation sur la biodégradabilité des boues a été étudié en conditions aérobies et anaérobies dans les mêmes conditions que lors de l'étude du traitement thermique et de la sonication. Ces essais ont donc été menés sur les fractions totales des boues ainsi que sur les fractions solubles afin d'étudier précisément les effets de l'ozonation sur chacune de ces fractions. Lors de cette série de traitement, seuls les effets de l'ozonation pour une dose égale à 28mg O₃/g MS ont été étudiés. Les essais de biodégradabilité en conditions aérobies et anaérobies ont été menés en parallèle à partir des mêmes échantillons.

Lors de ce traitement, suite à l'ozonation, d'importants taux de solubilisation des principaux constituants des boues sont observés, le taux de solubilisation des protéines atteignant même 75,94 (±7,84) % (Tableau 21). Ce phénomène, déjà observé lors des séries de traitements précédentes, est probablement à relier avec une libération brutale de protéines intracellulaires.

Le choix d'étudier les effets de l'ozonation sur la biodégradabilité des boues à une concentration de 28 mg O₃/g MS dans la série 3.4 parmi les différents traitements appliqués provient du fait que cette dose est proche de :

- la dose maximale de la série 3.2 (32 mg O₃/g MS) qui entraîne des effets délétères sur la population microbienne (lyse de microorganismes, perméabilisation membranaire et dénaturation de l'ADN).
- la dose minimale de la série 3.3 (30 mg O₃/g MS) qui montre qu'à T0, il y a une diminution de l'activité respiratoire et un abattement net de la concentration en microorganismes.

Tableau 21 : Caractéristiques des boues avant et après un traitement par ozonation (Dose = 28 mg/g MS).

Traitement	MS (g/L)	MES (g/L)	Taux de solubilisation (%)			
			DCO	Sucres	Protéines	A. Humiques
Témoin	3,43±0,15	3,33±0,15	-	-	-	-
Ozonation	3,40±0,15	1,58±0,11	26,01±2,68	14,36±4,02	75,94±7,84	32,44±4,02

i. Biodégradabilité en conditions aérobies

L'effet de l'ozonation sur la biodégradabilité en conditions aérobies des boues a été étudié par un suivi de la DBO des fractions totales et solubles des boues avant et après traitement.

Tableau 22 : DBO à 5, 7 et 21 jours des fractions totales, solubles et particulaires des boues avant et après un traitement par ozonation (28g/g MS).

Traitement	Fractions	DBO ₅ (mg O ₂ /L)	DBO ₇ (mg O ₂ /L)	DBO ₂₁ (mg O ₂ /L)
Témoin	Totale	900±180	900±180	1400±280
	Soluble	10±2	10±2,2	19±3,8
	Particulaire ^(*)	890±178	890±179	1381±276
Ozonation	Totale	750±150	800±160	1450±290
	Soluble	340±68	390±78	620±124
	Particulaire ^(*)	410±82	410±82	830±166

(*) : valeurs obtenues par différence entre la fraction totale et soluble.

Comme dans le cas des autres traitements (thermique et sonication), les valeurs de la DBO de la fraction totale de l'échantillon témoin et de l'échantillon traité sont relativement semblables (Tableau 22). Au contraire, les valeurs de la DBO de la fraction soluble sont supérieures après ozonation des boues par rapport au témoin, en raison d'une plus grande concentration en matière organique soluble (Tableau 21).

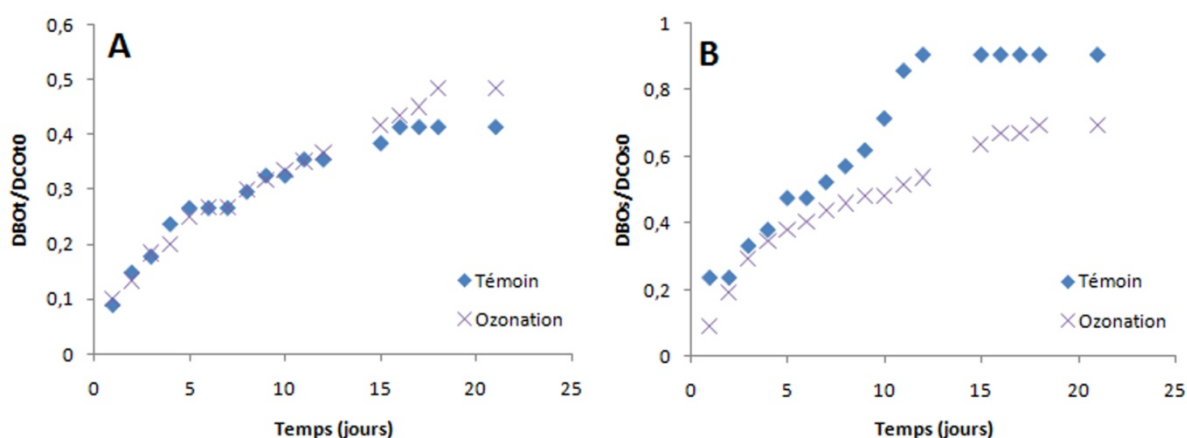


Figure 70 : Evolution du rapport DBO/DCO des fractions totales (A) et solubles (B) de boues non traitées (témoin) et après un traitement par ozonation (28 mg/g MS).

Les résultats concernant la fraction totale des boues sont confirmés lorsque les valeurs de la DBO sont ramenées à la concentration initiale en DCO (Figure 70, A). Ainsi, après 21 jours, les rapport DBO/DCO des fractions totales des boues non traitées et des boues ozonées sont respectivement égaux à $0,41 \pm 0,1$ et à $0,49 \pm 0,1$. Ces valeurs, relativement similaires, montrent que l'ozonation des boues n'augmenterait pas leur biodégradabilité, en conditions aérobies. Au contraire, les essais menés sur les fractions solubles des boues, avant et après traitement, semblent indiquer qu'une partie de la fraction particulaire solubilisée lors du traitement ne serait pas biodégradable (Figure 70, B). En effet, après 21 jours, le rapport DBO/DCO de la fraction soluble des boues après ozonation n'est que de $0,69 \pm 0,1$, alors qu'il est égal à $0,9 \pm 0,2$ dans le cas des boues non traitées. La diminution de ce rapport, après traitement, indique donc qu'une fraction de la DCO solubilisée lors de l'ozonation n'est pas assimilable par les microorganismes, et donc non biodégradable.

ii. Biodégradabilité en conditions anaérobies

L'impact de l'ozonation sur la biodégradabilité des boues en conditions anaérobies a été étudié sur les fractions totales et solubles des boues, en parallèle. Lors de la détermination du volume de biogaz produit pour chaque échantillon (fractions totales et solubles), le volume de biogaz produit par le témoin (inoculum seul) a été soustrait. Lors des essais menés sur les fractions totales des boues, les concentrations en MS des fractions totales, particulaires et solubles des boues traitées et non traitées ont été déterminées avant et après digestion. Lors des essais réalisés sur les fractions solubles, les concentrations en DCO, protéines, substances humiques et sucres ont été déterminées avant et après digestion.

Les résultats obtenus à partir de la fraction totale des boues montrent que la production de biogaz (Figure 71) est améliorée après le traitement. Après 23 jours de digestion, la production totale de biogaz (CO_2 et CH_4) à partir de l'échantillon de boues ozonées est de $114,94 \pm 0,62$ mL/g MV alors qu'elle n'est que de $76,83 \pm 1,12$ mL/g MV lorsque les boues ne sont pas traitées. Ainsi, l'ozonation des boues conduit à une amélioration de la production de biogaz de l'ordre de 49%.

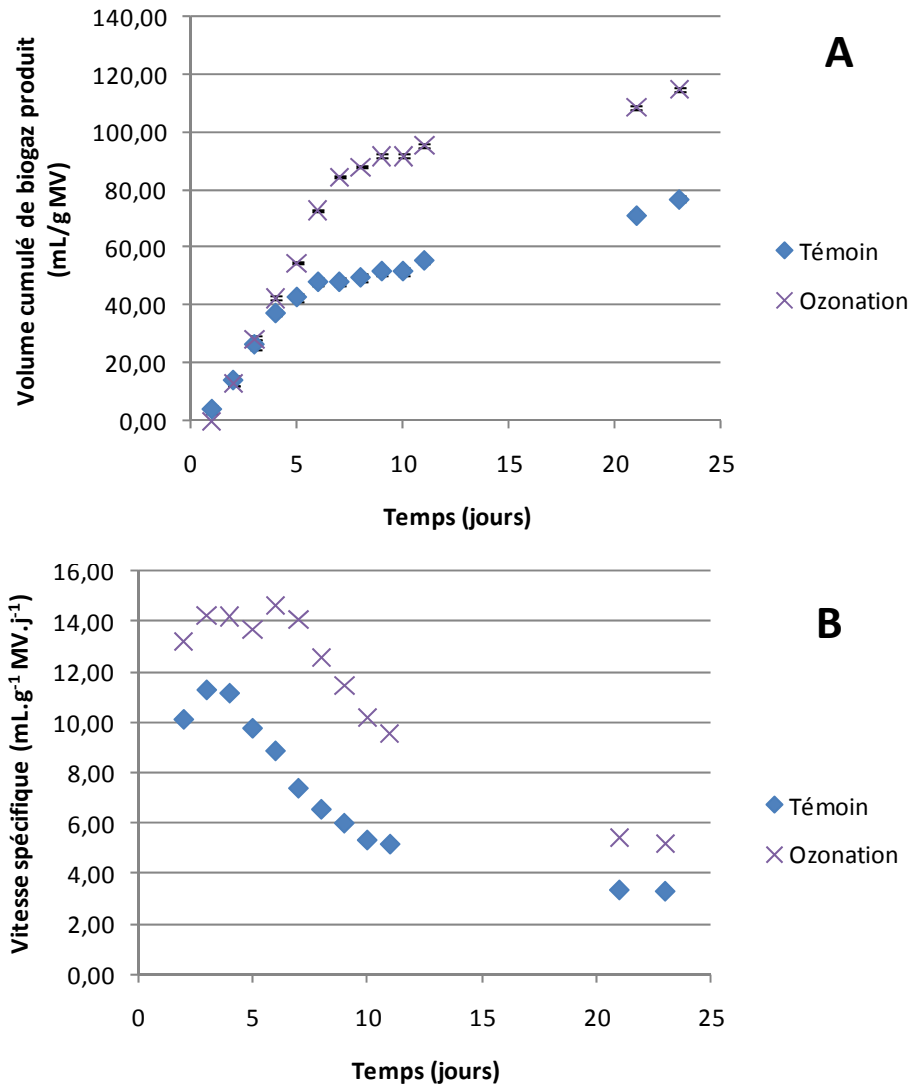


Figure 71 : Production (A) et vitesse de production (B) de biogaz en réacteur batch à partir de la fraction totale de boues non traitées (témoin) et traitées par ozonation (28 mg/g MS).

Si l'on représente les évolutions des vitesses spécifiques instantanées de production de biogaz, on constate que celles-ci sont maximales dans les six premiers jours pour décliner jusqu'à stabilisation vers 20 jours (Figure 71). La vitesse de production du biogaz, proportionnelle à l'accessibilité et à la digestibilité de la matière organique, est supérieure pour l'échantillon traité que pour l'échantillon témoin, ce qui traduit une augmentation de la digestion de la matière organique suite à l'ozonation. De plus, alors que la vitesse spécifique instantanée de production de biogaz à partir de l'échantillon témoin présente un pic à 2-3 jours d'incubation, celle correspondant à l'échantillon traité présente un plateau pendant environ 5 jours. Ce plateau, correspondant à une vitesse spécifique constante pendant environ

5 jours, traduit une importante libération de matière organique facilement biodégradable. Ainsi, l'augmentation de la biodégradabilité des boues suite à un traitement par ozonation se traduit donc non seulement par une augmentation de la quantité de biogaz produite (Figure 71, A), mais également par une augmentation de la vitesse de production du biogaz (Figure 71, B).

La conséquence directe de cette augmentation de la production de biogaz à partir des boues ozonées est une augmentation du taux d'élimination de la matière (Figure 72). Dans le cas des boues non traitées, la concentration en MS diminue de $3,42 \pm 0,15$ g/L avant digestion à $2,2 \pm 0,1$ g/L après digestion soit un taux d'élimination de la matière de 35,5%. Dans le cas des boues ozonées, la concentration en MS diminue de $3,39 \pm 0,15$ g/L avant digestion à $1,76 \pm 0,08$ g/L après digestion soit un taux d'élimination de la matière de 48%.

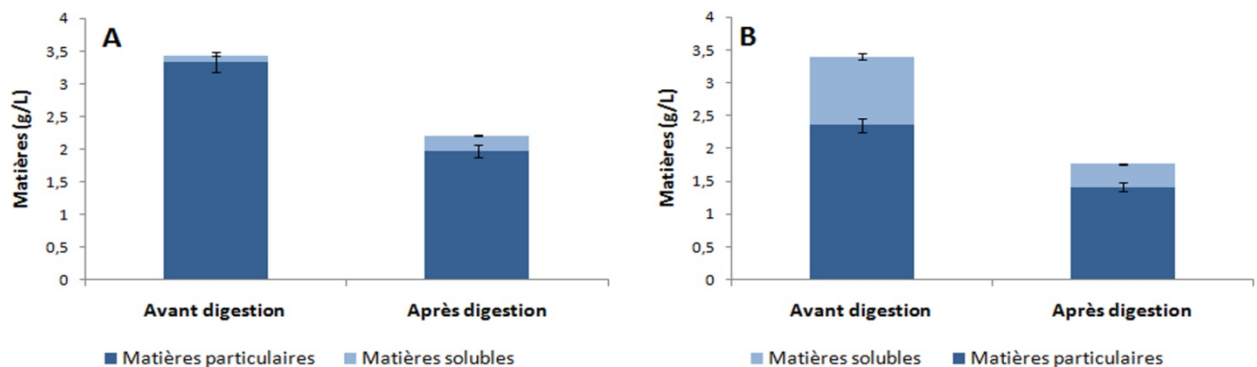


Figure 72 : Concentrations en matières solubles et particulaires des boues non traitées (témoin, A) et des boues traitées par ozonation (28 mg/g MS, B) avant et après digestion anaérobie en réacteur batch.

La production de biogaz à partir de la fraction soluble des boues est également augmentée suite à l'ozonation (Figure 73), en raison de l'augmentation de la concentration en composés organiques solubles générée par l'ozonation. Ainsi, après 11 jours de digestion anaérobie en réacteur batch, la production de biogaz à partir de la fraction soluble des échantillons traités par ozonation est de $16,6 \pm 1,1$ mL, alors qu'elle n'est que de $6,4 \pm 0,3$ mL sur le témoin. Pourtant, après digestion de la fraction soluble des boues traitées, il semble que la totalité des composés solubles ne soit pas assimilée par les microorganismes (Figure 74). Dans le cas de l'échantillon témoin, les concentrations en DCO, sucres, protéines et acides humiques, sont quasiment nulles après 23 jours de digestion (Figure 74), ce qui montre que la majorité des composés solubles présents dans les boues non traitées est biodégradable. En

revanche, après ozonation, seuls les sucres de la fraction soluble ont été totalement assimilés par les microorganismes. En effet, seulement 88% de la DCO ont été éliminés à la fin des tests PBM. Ces résultats semblent donc indiquer qu'une partie des composés solubilisés par ozonation ne sont pas assimilables par les microorganismes.

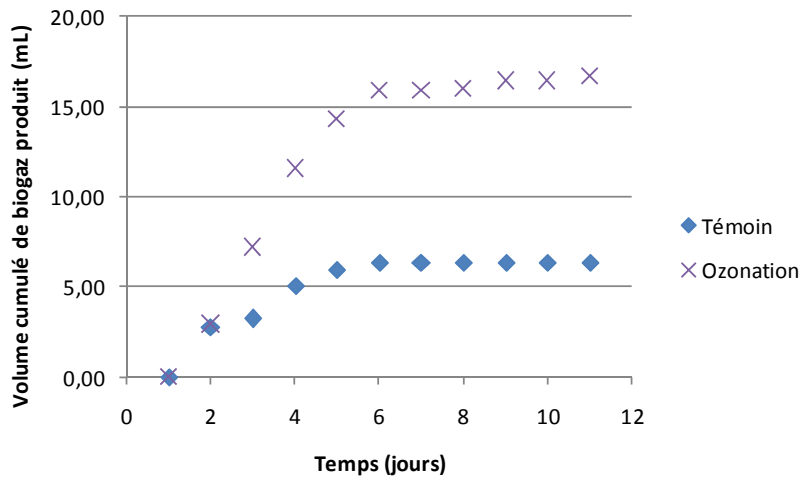


Figure 73 : Production de biogaz en réacteur batch à partir de la fraction soluble de boues non traitées (témoin) et traitées par ozonation (28 mg/g MS).

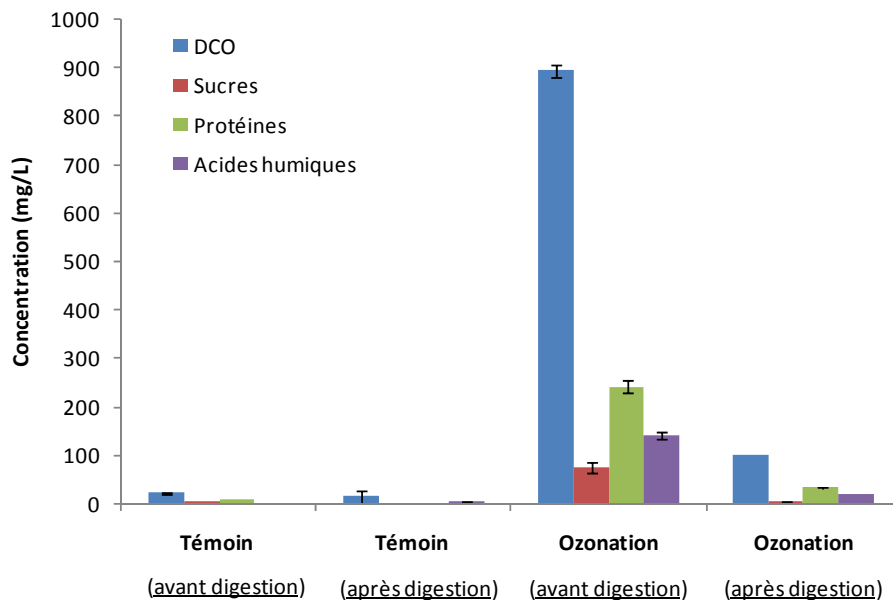


Figure 74 : Concentrations en DCO, sucres, protéines et acides humiques de fractions solubles de boues traitées par ozonation (28 mg/g MS) et non traitées (témoin) avant et après digestion anaérobie en réacteur batch.

Les essais de biodégradabilité réalisés sur la fraction totale des boues en conditions aérobies ne montrent pas de réelles différences entre le témoin et les boues ayant subi une ozonation (28 mg/g MS). Cependant, les tests PBM (en conditions anaérobies) ont montré que le traitement par ozonation permet d'augmenter significativement la quantité de biogaz au cours de la digestion. Cette augmentation de la production de biogaz se traduit par un taux d'élimination de la quantité de matière au cours de la digestion anaérobie supérieur à celle du témoin. Par contre, il semblerait que la fraction soluble des boues, bien que plus concentrée en matière organique, soit moins biodégradable par comparaison avec le témoin en conditions aérobies. Ces données ont été confirmées par les résultats obtenus après les tests PBM sur la fraction soluble des boues puisqu'ils ont montré qu'une partie de la DCO soluble induite par le traitement ne serait pas biodégradable.

III. 4. b. Discussion/conclusion sur les effets induits par l'ozonation

Les analyses des différentes fractions des boues activées (solubles et particulaires, minérales et organiques) au cours d'un traitement par ozonation ont permis de mettre en évidence une évolution significative de la répartition de la matière suite au traitement. Les résultats semblent indiquer que la nature de la matière solubilisée est essentiellement organique. La solubilisation de la matière minérale suite à l'ozonation apparaît très limitée.

Les essais menés sur la solubilisation de la matière organique des boues confirment cette tendance. Les taux maximums de solubilisation de la DCO atteignent respectivement 20,8 ($\pm 2,3$)% et 24,3 ($\pm 2,4$)% lors de la première et de la deuxième série de traitement. Par contre, au niveau des doses d'ozone consommées par les boues, à l'origine de cette solubilisation, les résultats diffèrent significativement entre la première et la deuxième série de traitement, puisqu'elles sont respectivement égales à 6,2 et 32 mg O₃/g MS. Par rapport aux données bibliographiques, ces observations ne sont pas incohérentes, dans le sens où, selon les auteurs, les taux de solubilisation de la DCO peuvent varier très fortement pour une même dose d'ozone appliquée (Tableau 4). Cette variation est à relier avec des différences de composition et de concentrations en MS des boues. Dans notre cas, cette faible différence en matière de solubilisation des boues entre les essais réalisés à 6,2 et 32 mg O₃/g MS peut probablement s'expliquer de la même manière. En effet, les résultats sont obtenus à partir de lots différents de boues activées. La réactivité de l'ozone sur la matrice « boues » étant

fortement liée à la concentration et à la composition des boues, cette hypothèse semble plausible.

En ce qui concerne les essais menés sur la solubilisation des principaux constituants des boues (sucres, protéines et acides humiques), les résultats montrent qu'ils évoluent de manière très semblable lors de la première série. Lors de la deuxième série, cette tendance est confirmée pour des doses d'ozone inférieures à 11,4 mg O₃/g MS. Par contre à partir de cette dose, le taux de solubilisation des protéines augmente brusquement par rapport à celui des autres constituants. Ce phénomène est encore plus marqué lorsque la dose appliquée est égale à 32 mg O₃/g MS. Si ces observations sont mises en corrélation avec les essais menés sur l'intégrité membranaire des microorganismes, on constate que ce taux de solubilisation des protéines, relativement élevé, coïncide avec un niveau de lyse cellulaire très important. En effet, dans cet échantillon, il semble que l'ADN d'une fraction importante de cellules soit dénaturé. Une désintégration de l'ADN des microorganismes laisse supposer que les autres constituants cellulaires, particulièrement les membranes, soient fortement endommagés, ce qui aurait pour conséquence une fuite du contenu cellulaire. Il paraît donc probable que la forte concentration en protéines dans la fraction soluble de cet échantillon soit la conséquence de la lyse cellulaire des microorganismes.

D'après les résultats obtenus par CMF, il semble que le phénomène de lyse cellulaire ne soit pas progressif mais qu'il apparaisse avec une dose minimale d'ozone. Ces observations seraient en accord avec les hypothèses émises par Finch et Smith (1989) selon lesquelles il existerait une dose critique en dessous de laquelle l'inactivation bactérienne est négligeable. Les auteurs supposent que ce seuil correspond à une quantité d'ozone critique en dessous de laquelle la concentration en ozone résiduel est proche de zéro et donc en dessous de laquelle les microorganismes ne peuvent pas être détruits ni même inactivés.

Même si le mode d'action de l'ozone sur les microorganismes reste controversé, Ishizaki *et al.* (1987) ont montré que l'ozone entraîne la conversion d'ADN plasmidique circulaire fermé en ADN plasmidique circulaire ouvert. Ainsi, l'ozone, par diffusion directe au travers de la membrane (perméabilisée ou non) serait apte à réagir avec les constituants cellulaires, en particulier avec l'ADN, ce qui constituerait la cause majeure de l'inactivation bactérienne. De manière simultanée, l'ozone aurait également une capacité d'oxydation des

constituants membranaires aboutissant à une perméabilisation des membranes et donc à la lyse cellulaire.

Les techniques culturales mettent en évidence un effet bactéricide de l'ozone proportionnel à la dose appliquée à partir de 30 mg O₃/g MS. Par CMF, l'analyse a montré qu'il n'y avait pas d'effets délétères sur la perméabilité membranaire pour des doses inférieures à 5-6 mg O₃/g MS. Même s'il est peut être difficile de comparer les résultats obtenus par des techniques analytiques différentes sachant, qui plus est, que les gammes de concentration en O₃ sont différentes d'une série à l'autre, les résultats obtenus mettent en évidence une dose critique en dessous de laquelle les effets de l'ozone sur l'intégrité membranaire sont négligeables et au dessus de laquelle il semble que la majeure partie des microorganismes soit inactivée.

Les techniques culturales et les analyses cytométriques fournissent des informations complémentaires. D'une part, en terme d'aptitude à la division des microorganismes, une relation de proportionnalité entre la dose d'ozone appliquée et le taux d'abattement microbien a été mise en évidence. D'autre part, en terme de viabilité, il semble qu'une dose d'ozone « seuil » soit nécessaire pour inactiver totalement les microorganismes.

La solubilisation importante de la matière particulaire et les modifications physiologiques de la population microbienne, suite à l'ozonation, ont pour conséquence une importante augmentation de la biodégradabilité des boues. Ainsi, en conditions anaérobies, la production de biogaz est non seulement augmentée (de l'ordre de 49%) mais aussi accélérée. Par contre, il semblerait qu'une fraction de la matière solubilisée au cours du traitement ne soit pas assimilable par les microorganismes. De la même façon, Bougrier (2005) a mis en évidence une augmentation de la quantité de biogaz produit à partir de boues ozonées. Mais, d'après cet auteur, l'amélioration de la digestion anaérobie serait également associée à la formation de composés réfractaires. Selon Diaz (2003), même si l'ozonation de composés non biodégradables permet en général de les rendre biodégradables, et cela d'autant plus que la dose d'ozone appliquée est importante, l'ozonation de composés partiellement ou facilement biodégradables conduit, dans certains cas, à des produits moins biodégradables que les composés initiaux.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Face aux problèmes que rencontrent actuellement les filières classiques d'évacuation des boues, les PRPB apparaissent comme une solution alternative séduisante pour les collectivités, les industriels ou les exploitants des stations de traitement des eaux usées. C'est pourquoi, ces procédés font actuellement l'objet de nombreux travaux de recherche aussi bien dans le milieu industriel qu'académique. Cependant, les répercussions des PRPB sur la population bactérienne des boues restent actuellement peu documentées, malgré le rôle majeur des microorganismes dans l'épuration des eaux usées. L'objectif de ce travail consistait donc à caractériser les effets, à la fois chimiques et biologiques, de trois catégories de PRPB (traitement thermique, sonication, ozonation), dont le principe commun est fondé sur une hydrolyse de la matière particulaire, afin de les comparer.

Dans un premier temps, des protocoles expérimentaux ont été développés et validés afin d'évaluer les effets générés par les traitements d'hydrolyse des boues, non seulement sur la répartition de la matière et la solubilisation de la matière organique particulaire, mais également sur la population bactérienne.

La méthodologie expérimentale retenue, basée sur l'évaluation comparée des effets de trois types de traitement sur la solubilisation de la matière et sur l'état physiologique des microorganismes, permet de conclure sur les potentialités de ces traitements à favoriser ou non la biodégradabilité des boues. L'approche expérimentale présentée a donc été orientée autour de trois axes principaux :

1. la répartition de la matière suite au traitement et la solubilisation de la matière organique particulaire, traduisant la conversion de polymères en monomères simples facilement assimilables par les bactéries. Pour cela, les concentrations en protéines, acides humiques, sucres (composants organiques majoritaires des boues) ainsi que la DCO ont été déterminées dans les phases solubles et particulaires des boues avant et après les différents traitements. Ce transfert de matière de la fraction particulaire vers la fraction soluble suite aux traitements est exprimé par le taux de solubilisation.

2. le suivi des paramètres microbiologiques afin d'estimer les conséquences de ces traitements en terme de lyse bactérienne, d'une part, et en terme de reprise de croissance et d'activité métabolique, d'autre part. Pour étudier les effets des PRPB sur l'intégrité membranaire des microorganismes, un protocole d'analyse des cellules par CMF a été mis au point. Ce protocole comprend une désagrégation des boues suivie d'une filtration et d'un marquage des cellules avec une sonde de viabilité : le SYTOX Green. En parallèle, la concentration en microorganismes a été déterminée à l'aide du « Bacteria Counting Kit ». L'activité respiratoire des microorganismes ainsi que la croissance bactérienne ont été suivis au cours du temps dès la fin de l'application de chaque traitement. Le suivi de la croissance bactérienne est réalisé par techniques culturales classiques. Le suivi de l'activité respiratoire est effectué par méthode spectrophotométrique après incubation des échantillons avec un sel de tétrazolium, le XTT.

3. la biodégradabilité afin de savoir dans quelle mesure la matière solubilisée est biodégradable. Pour cela, la biodégradabilité des différentes fractions (solubles et particulaires) des boues ayant subi les différents traitements, a été analysée en conditions aérobies par une mesure de la DBO, et en conditions anaérobies par des tests PBM.

Cette démarche analytique a été appliquée à la caractérisation comparée des différents traitements : le traitement thermique (températures comprises entre 50 et 95°C avec des temps de traitement compris entre 5 et 60 minutes), la sonication (énergies spécifiques comprises entre 0 et 280290 J/g MS) et l'oxydation par ozonation (doses comprises entre 0 et 96 mgO₃/g MS).

La synthèse des principaux résultats de nos travaux, relatifs à chaque traitement appliqué en conditions maximales, est présentée Figure 75 (traitement thermique), Figure 76 (sonication) et Figure 77 (ozonation). Elle met en évidence des mécanismes de solubilisation différents en fonction de la nature du traitement. La quantité ainsi que la nature de la matière solubilisée varient en fonction du PRPB utilisé. Quel que soit le traitement appliqué, la solubilisation de la matière minérale reste relativement faible, voire négligeable. La solubilisation de la matière organique, quant à elle, est toujours observée même si son taux varie en fonction du traitement appliqué. Par contre, la caractérisation des paramètres à la fois chimiques et biologiques des boues, au cours des différents traitements, a permis de mettre en évidence d'importantes différences quant à la nature de la matière solubilisée.

Lors du traitement thermique (Figure 75), alors que le taux de solubilisation de la matière organique est plus faible que celui observé lors de la sonication et de l'ozonation, les effets délétères sur la population bactérienne sont relativement importants. Le traitement thermique conduit à la lyse cellulaire d'une fraction relativement importante de la population microbienne ; ce qui laisse supposer qu'une partie de la matière organique solubilisée au cours du traitement thermique est de nature intracellulaire. De plus, une reprise de la croissance bactérienne et de la respiration cellulaire est clairement constatée dans les échantillons où une lyse des cellules a été mise en évidence, ce qui laisse présager un phénomène de croissance cryptique suite au traitement thermique.

Lors de la sonication (Figure 76), alors que le taux de solubilisation de la matière organique est plus important que celui observé lors du traitement thermique, les effets des ultrasons sur la population bactérienne sont faibles. En effet, dans cette étude, la lyse cellulaire ne concerne qu'une très faible fraction de la population bactérienne, et reste, par conséquent, peu significative. Les principaux effets des ultrasons sur la flore microbienne des boues semblent donc limités à une désagrégation des microflocs. Par ailleurs, aucune reprise de croissance cellulaire, ni de reprise d'activité respiratoire significative n'ont été observées. Ainsi, dans le cas de la sonication, la très faible quantité de microorganismes lysés couplée à l'absence de reprise de l'activité respiratoire et de reprise de la croissance bactérienne exclut clairement un phénomène de croissance cryptique. Par conséquent, le taux de solubilisation de la matière organique particulaire, relativement important, semble uniquement lié à une solubilisation de la matière organique extracellulaire des boues, c'est-à-dire à une déstructuration des SPE.

Dans le cas de l'ozonation (Figure 77), les mécanismes mis en jeu sont encore différents de ceux précédemment décrits. Un important taux de solubilisation de la matière organique (comme dans le cas du traitement par sonication) ainsi que des effets majeurs sur la population bactérienne (comme dans le cas du traitement thermique) ont été mis en évidence lorsque la dose maximale permise a été appliquée. Les essais menés ont permis une meilleure compréhension des mécanismes d'inactivation des microorganismes suite à l'ozonation des boues :

- une relation de proportionnalité entre la dose d'ozone appliquée et le taux d'abattement microbien a été mise en évidence,

- il semble qu'une dose d'ozone « seuil » soit nécessaire pour inactiver totalement les microorganismes.

De plus, les taux de solubilisation des principaux constituants des boues, relativement importants comparativement à ceux obtenus lors des autres traitements, laissent supposer que la matière solubilisée serait d'origine à la fois intra et extracellulaire, lorsque la dose d'ozone « seuil » est atteinte.

L'hydrolyse de la fraction particulaire des boues, qui met en jeu, soit une lyse bactérienne (cas du traitement thermique), soit une hydrolyse des SPE (cas de la sonication), soit les deux phénomènes (cas de l'ozonation), peut être corrélée à la biodégradabilité des boues soumises aux différents traitements. Suite au traitement thermique, dont l'application aux boues conduit à une lyse d'une fraction importante des microorganismes sans pour autant déstructurer la matrice extracellulaire (SPE), seule une augmentation de la vitesse de production du biogaz, en conditions anaérobies, a été mise en évidence. La production finale de biogaz, et par conséquent le taux d'élimination de la matière, suite à la digestion anaérobie, est identique que les boues soient traitées ou non.

De la même manière, un traitement par sonication, dans les conditions appliquées, ne semble pas améliorer la biodégradation des boues (en conditions aérobies et anaérobies) malgré une importante solubilisation des SPE suite au traitement. Seule l'ozonation, dont l'application conduit à la fois à une déstructuration des SPE et à la lyse des microorganismes, conduit à une amélioration significative de la biodégradabilité des boues. En d'autres termes, dans le cadre de la réduction de production de boues, il semble que ces deux phénomènes : l'hydrolyse de la matrice extracellulaire des boues (les SPE) et la lyse des microorganismes soient tous les deux nécessaires pour qu'une amélioration de la biodégradabilité des boues puisse être observée. Dans les gammes de traitement appliquées lors de ces travaux, seul un traitement par ozonation apparaît efficace au regard de l'accroissement de la biodégradabilité.

Le postulat sur lequel reposent les PRPB est qu'ils attaquent (oxydent, hydrolysent, lysent, déflocculent...) la matière organique constitutive des floccs bactériens. La confusion est souvent faite entre la destruction des floccs bactériens (*via* le relargage des exopolymères) libérant ainsi des entités cellulaires plus ou moins altérées, et une réelle lyse cellulaire, c'est-à-dire l'éclatement des cellules, libérant le contenu cellulaire. Cette étude montre :

- d'une part que ces deux cas de figures sont envisageables en fonction du type de traitement appliqué et/ou de l'énergie déployée,
- et d'autre part que la voie privilégiée (solubilisation du matériel intra ou extracellulaire) va influencer directement le caractère biodégradable des boues.

Cette étude, qui s'est attachée à étudier les mécanismes fondamentaux mis en jeu dans les différents procédés d'hydrolyse, ne permet pas une comparaison financière des différents traitements à l'échelle industrielle mais peut proposer une comparaison basée sur la consommation énergétique nécessaire à la solubilisation d'1 mg de DCO ($J/mg \text{ DCO}_{\text{solubilisée}}$). Dans le cas de l'ozonation, cette dépense énergétique correspond à 76 $J/mg \text{ DCO}_{\text{solubilisée}}$. La consommation énergétique augmente à 96 $J/mg \text{ DCO}_{\text{solubilisée}}$ dans le cas de la sonication et atteint 440 $J/mg \text{ DCO}_{\text{solubilisée}}$ lors du traitement thermique. Même si ces données semblent indiquer que l'ozonation des boues est moins coûteuse, il ne s'agit que d'une comparaison basée sur la consommation énergétique dans le cadre d'essais menés en laboratoire. Une comparaison financière plus approfondie sous-entend l'élaboration d'un pilote de type semi-industriel afin de tenir compte, en plus des coûts énergétiques, des coûts liés aux réactifs (par exemple l'oxygène dans le cas de l'ozonation), des coûts de main d'œuvre et de maintenance ainsi que des coûts d'installation. Cette étude ayant été intégralement réalisée à partir de boues activées, son application s'intégrerait préférentiellement au niveau du bassin d'aération. Cependant, la biodégradabilité des boues soumises aux différents traitements en conditions anaérobies ayant également été appréhendée, les résultats de cette étude pourraient éventuellement être transposés à l'optimisation de la digestion anaérobie.

Les conclusions relatives à chaque traitement ont pu être établies suite à la démarche analytique suivie qui prend en compte les paramètres à la fois chimiques et biologiques des boues sachant que la seule caractérisation des effets chimiques générés par un traitement d'hydrolyse ne permet pas de conclure en terme de lyse cellulaire. Inversement, la seule caractérisation des effets biologiques générés par un PRPB ne permet pas d'identifier la nature de la matière solubilisée, ni de la quantifier. Cependant, la tendance observée à partir des résultats obtenus dans cette étude semble indiquer que le taux de solubilisation des protéines pourrait être un bon indicateur de lyse cellulaire. Suite au traitement thermique ou à l'ozonation des boues, la lyse des microorganismes est corrélée à un taux de solubilisation des protéines relativement important par rapport à celui des autres constituants, et plus

particulièrement celui des acides humiques. Cette remarque peut s'avérer intéressante dans le sens où, parmi les différents constituants des boues, seuls les acides humiques ne sont pas de nature intracellulaire, à la différence des protéines ou des sucres, constituants à la fois des SPE et des microorganismes. Même si la seule détermination du taux de solubilisation des protéines n'est pas suffisante pour conclure en terme de lyse des microorganismes, son suivi, s'il est effectué parallèlement à celui des acides humiques, apparaît tout à fait approprié.

Par rapport à la compréhension des mécanismes impliqués dans les procédés d'hydrolyse, la CMF s'est révélée être un outil relativement pertinent. Cependant, cette technique analytique ne nous a pas permis de réaliser des analyses quantitatives en raison de la présence de microflocs, malgré la désagrégation préalable des échantillons. L'autre difficulté rencontrée dans cette étude est liée aux sondes fluorescentes. L'utilisation de sondes spécifiques nécessite que le paramètre cellulaire ciblé soit fonctionnel. Or, suite à un traitement, qui plus est, un traitement d'hydrolyse, certains composants cellulaires, tel que l'ADN, peuvent être endommagés rendant ainsi impossible toute fixation du fluorochrome, comme cela a été le cas lors des essais sur l'ozonation. L'interprétation des résultats peut alors s'avérer délicate si d'autres méthodes de caractérisation (telles que les techniques culturales ou le suivi de l'activité respiratoire) n'ont pas été mises en œuvre parallèlement. C'est dans ce sens que la CMF reste une technique d'analyse comparative.

Grâce aux outils microbiologiques utilisés dans cette étude, il a été possible de mettre en évidence plusieurs phénomènes (lyse cellulaire, reprise de croissance et/ou d'activité respiratoire) qui diffèrent en fonction du traitement appliqué. Cependant, seul un « échantillon » restreint des méthodes microbiologiques actuellement disponibles a été employé. Cette étude constitue donc un point de départ pour de futures recherches qui permettront de fournir de plus amples informations quant à l'évolution de la diversité microbienne qui suit ces traitements. Les résultats obtenus suite à l'ozonation ou au traitement thermique des boues laissent présager un phénomène de croissance cryptique, ce qui signifie également des modifications au sein de la diversité microbienne des boues activées. Il serait intéressant de savoir quels sont les microorganismes lysés lors de ces traitements et surtout quels sont les espèces bactériennes dominantes suite au PRPB. Seule l'utilisation d'outils moléculaires permettra de répondre à cette problématique. Claude Bernard ne disait-il pas déjà au XIX^e siècle : "[...] *Quelqu'heureux que l'on puisse être dans les recherches*

expérimentales, on ne peut jamais arriver qu'à éclairer partiellement un ordre de phénomènes, et il y a toujours à côté des questions plus ou moins connexes qui restent encore obscures [...]".

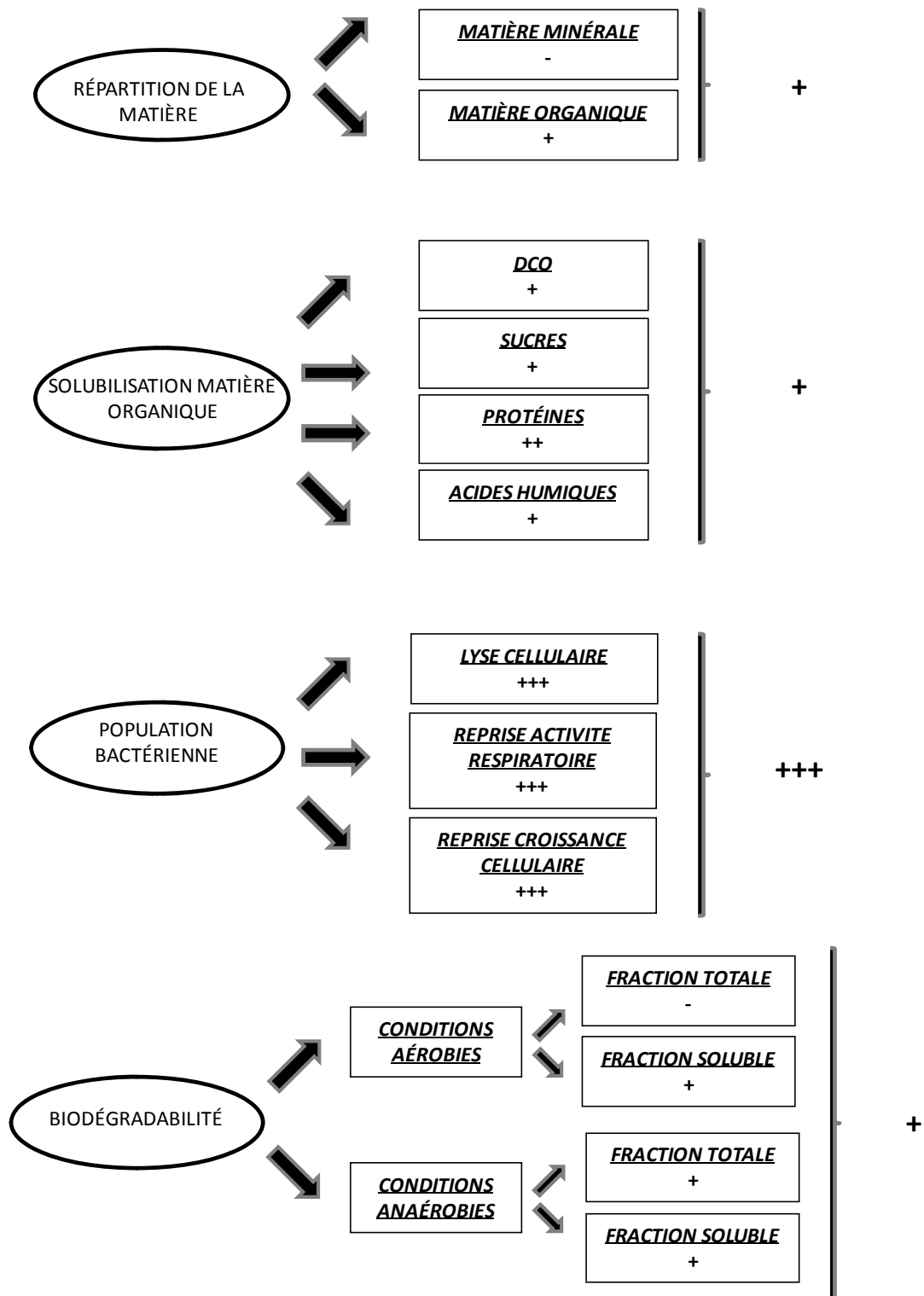


Figure 75 : Bilan du traitement thermique (température maximale).

Avec :
- : pas d'effet,
+ : peu d'effets,
++ : effets importants,
+++ : effets très importants.

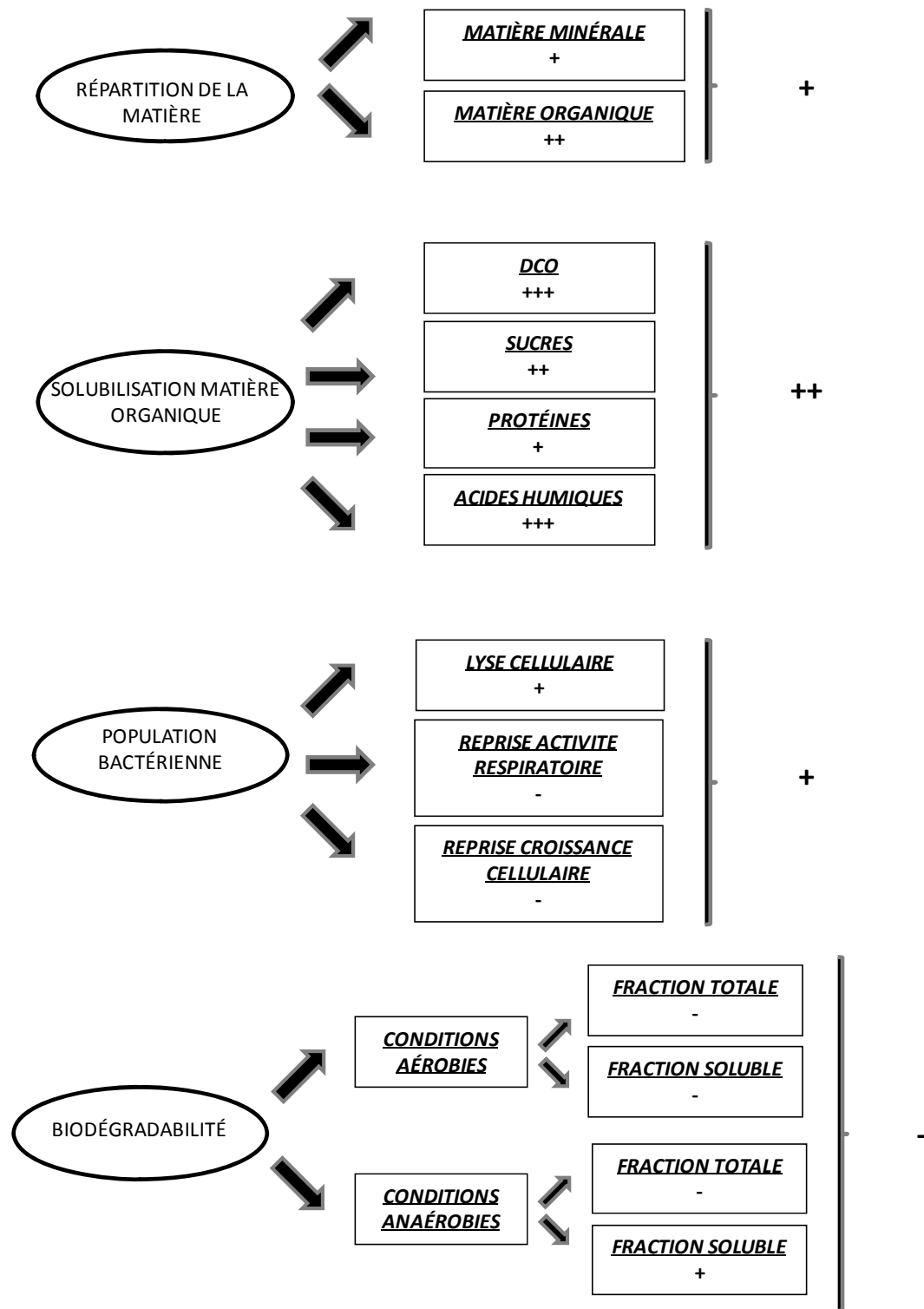


Figure 76 : Bilan de la sonication (énergie spécifique maximale).

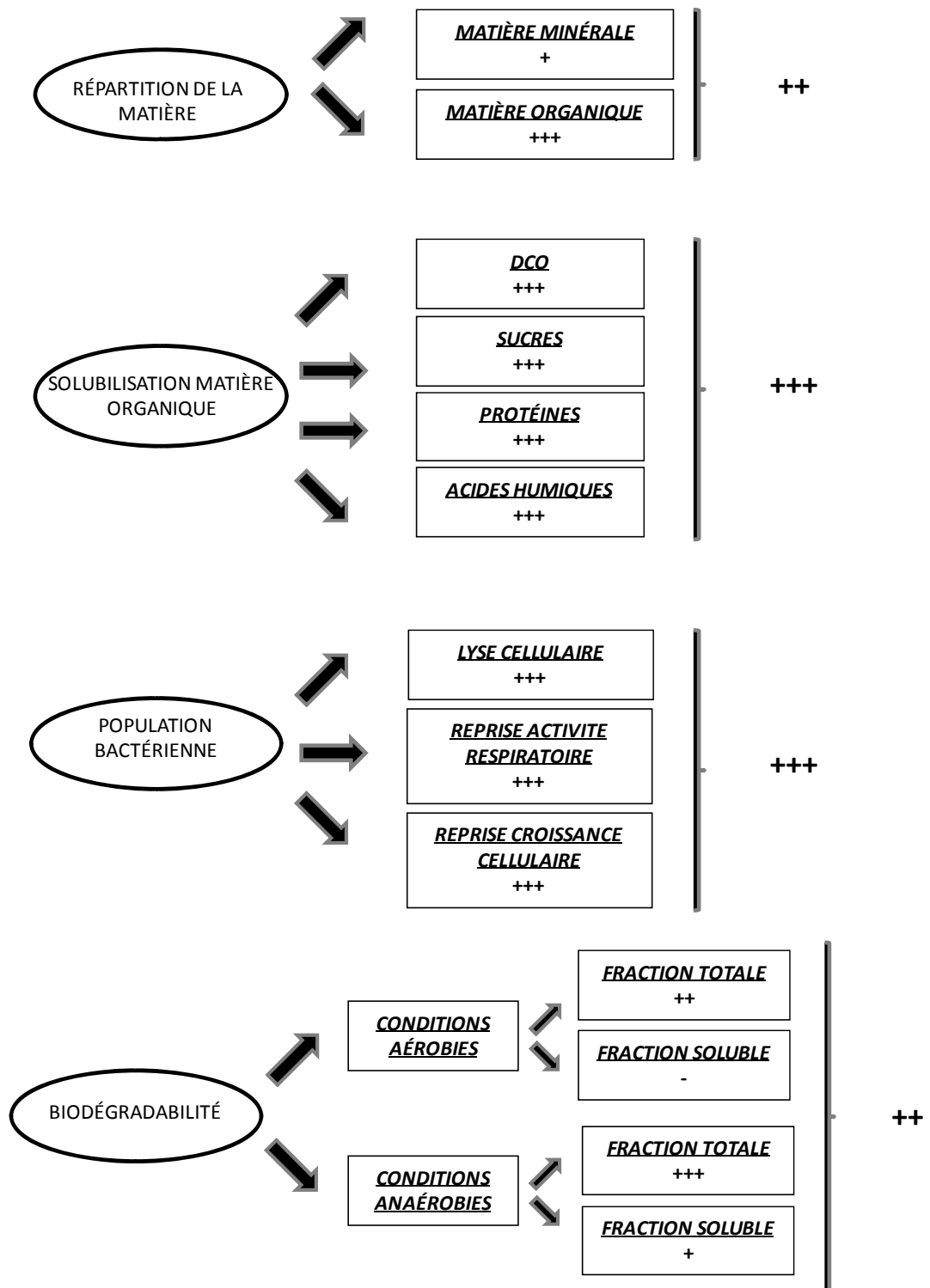


Figure 77 : Bilan du traitement par ozonation (dose maximale).

Avec :
 - : pas d'effet,
 + : peu d'effets,
 ++ : effets importants,
 +++ : effets très importants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ahn, K.H., Park, K.Y., Maeng, S.K., Hwang, J.H., Lee, J.W., Song, K.G. et Choi, S. (2002) Ozonation of wastewater sludge for reduction and recycling. *Water Science and Technology* **46**: 71-77.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. et Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1919-1925.

Amann, R.I., Ludwig, W. et Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.

Andreottola, G., Foladori, P., Gelmini, A., and Ziglio, G. (2002) Biomass active fraction evaluated by a direct method and respirometric techniques. *Water Science and Technology* **46**: 371-379.

Bensaid, A., Thierie, J. et Penninckx, M. (2000) The use of the tetrazolium salt XTT for the estimation of biological activity of activated sludge cultivated under steady-state and transient regimes. *Journal of Microbiological Methods* **40**: 255-263.

Bernal, A. (2005) Elimination des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les boues d'épuration par couplage ozonation-digestion anaérobie. Montpellier: Université Montpellier II Sciences et techniques du Languedoc.

Bhupathiraju, V.K., Hernandez, M., Landfear, D. et Alvarez-Cohen, L. (1999) Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **37**: 231-243.

Biggerstaff, J.P., Le Puil, M., Weidow, B.L., Prater, J., Glass, K., Radosevich, M. et White, D.C. (2006) New methodology for viability testing in environmental samples. *Molecular and Cellular Probes* **20**: 1-6.

Björnsen, P.K. (1986) Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **51**: 1199-1204.

Björnsen, P.K. et Kuparinen, J. (1991) Determination of bacterioplankton biomass net production and growth efficiency in the Southern Ocean. *Marine Ecology Progress series* **71**: 185-194.

Bloem, J., Veninga, M. et Shepherd, J. (1995) Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes, and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 926-936.

Borsheim, K.Y., Bratbak, G. et Haldal, M. (1990) Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 352-356.

Bougrier, C. (2005) Optimisation du procédé de méthanisation par mise en place d'un co-traitement physico-chimique : application au gisement de biogaz représenté par les boues d'épuration des eaux usées. Toulouse: Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

Bougrier, C., Delgenès, J.-P. et Carrère, H. (2006) Combination of thermal treatments and anaerobic digestion to reduce sewage sludge quantity and improve biogas yield. *Process Safety and Environmental Protection* **84**: 280-284.

Bougrier, C., Battimelli, A., Delgenes, J.P. et Carrere, H. (2007) Combined ozone pretreatment and anaerobic digestion for the reduction of biological sludge production in wastewater treatment. *Ozone: Science & Engineering* **29**: 201-206.

Burnett, S.L. et Beuchat, L.R. (2002) Comparison of methods for fluorescent detection of viable, dead, and total *Escherichia coli* O157:H7 cells in suspensions and on apples using

confocal scanning laser microscopy following treatment with sanitizers. *International Journal of Food Microbiology* **74**: 37-45.

Camacho, P., Deleris, S., Geaugey, V., Ginestet, P. et Paul, E. (2002) A comparative study between mechanical, thermal and oxidative disintegration techniques of waste activated sludge. *Water Science and Technology* **46**: 79-87.

Canales, A., Pareilleux, A., Rols, J.L., Goma, G. et Huyard, A. (1994) Decreased sludge production strategy for domestic wastewater treatment. *Water Science and Technology* **30**: 97-106.

Canler, J.P., Perret, J.M., Duchène, P. et Cotteux, E. (1999) *Aide au diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des boues activées.*

Carballa, M., Omil, F. et Lema, M. (2004) Improvement of anaerobic digestion operation and digested sludge characteristics using a chemical and thermal pre-treatment. *Proceedings, 10th World Congress Montréal, Canada.*

Chauzy, J., Cretenot, D., Fernandes, P. et Patria, L. (2003) Les procédés de réduction de production de boues : des solutions innovantes pour la problématique boues.

Chen, C.L., Macarie, H., Ramirez, I., Olmos, A., Ong, S.L., Monroy, O. et Liu, W.T. (2004) Microbial community structure in a thermophilic anaerobic hybrid reactor degrading terephthalate. *Microbiology* **150**: 3429–3440.

Chen, G.H., Saby, S., Djafer, M. et Mo, H.K. (2001) New approaches to minimize excess sludge in activated sludge systems. *Water Science and Technology* **44**: 203-208.

Chu, C.P., Feng, W.C., Chang, B.V., Chou, C.H. et Lee, D.J. (1999) Reduction of microbial density level in wastewater activated sludge via freezing and thawing. *Water Research* **33**: 3532-3535.

Chu, C.P., Chang, B.V., Liao, G.S., Jean, D.S. et Lee, D.J. (2001) Observations on changes in ultrasonically treated waste-activated sludge. *Water Research* **35**: 1038-1046.

Chudoba, P., Chudoba, J. et Capdeville, B. (1992) The Aspect of Energetic Uncoupling of Microbial Growth in the Activated Sludge Process: OSA System. *Water Science and Technology* **26**: 2477-2480.

Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K. Chu, C.P., Chang, B.V., Liao, G.S., Jean, D.S. et Lee, D.J. (2001) Observations on changes in ultrasonically treated waste-activated sludge. *Water Research* **35**: 1038-1046.

Wagner, M. (2001) In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied Environmental Microbiology* **67**: 5273–5284.

Dawes, E.A. et Ribbons, D.W. (1964) Some aspects of the endogenous metabolism of bacteria. *Bacteriological reviews* **28**: 126-149.

De los Reyes, F.L., Oerther, D.B., De los Reyes, M.F., Hernandez, M. et Raskin, L. (1998) Characterization of filamentous foaming in activated sludge systems using oligonucleotide hybridization probes and antibody probes. *Water Science and Technology* **37**: 485-493.

Déléris, S., Paul, E., Audic, J.M., Roustan, M. et Debellefontaine, H. (2000) Effect of ozonation on activated sludge solubilization and mineralization. *Ozone: Science & Engineering* **22**: 473-486.

Diaper, J.P., Tither, K. et Edwards, C. (1992) Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**: 268-272.

Diaz, A. (2003) Procédés couplés - préozonation et traitement biologique aérobie en réacteur SBR - pour le traitement des eaux de production de l'extraction pétrolière. Toulouse: Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

Dignac, M.F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D. et Scribe, P. (1998) Chemical description of extracellular polymers : implication on activated sludge floc structure. *Water Science and Technology* **38**: 45-53.

Dogruel, S., Sievers, M. et Germirli-Babuna, F. (2007) Effect of ozonation on biodegradability characteristics of surplus activated sludge. *Ozone: Science & Engineering* **29**: 191-199.

Doré, M. (1989) *Chimie des oxydants et traitement des eaux.*: Technique de documentation - Editions Lavoisier, Paris.

Dziurla, M.A., Salhi, M., Leroy, P., Paul, E., Ginestet, P. et Block, J.C. (2005) Variations of respiratory activity and glutathione in activated sludges exposed to low ozone doses. *Water Research* **39**: 2591-2598.

Egemen, E., Corpening, J. et Nirmalakhandan, N. (2001) Evaluation of an ozonation system for reduced waste sludge generation. *Water Science and Technology* **44**: 445-452.

Egli, K., Langer, C., Siegrist, H.R., Zehnder, A.J.B., Wagner, M. et Roelof Van der Meer, J. (2003) Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3213-3222.

Eskicioglu, C., K.J., K., et R.L., D. (2006) Characterization of soluble organic matter of waste activated sludge before and after thermal pretreatment. *Water Res.* **40**: 3725-3736.

Eskicioglu, C., Prorot, A., Marin, J., Droste, R.L., and Kennedy, K.J. (2008) Synergetic pretreatment of sewage sludge by microwave irradiation in presence of H₂O₂ for enhanced anaerobic digestion. *Water Res.* **42**: 4674-4682.

Finch, G.R. et Smith, D.W. (1989) Ozone dose-response of *Escherichia coli* in activated sludge effluent. *Water Research* **23**: 1017-1025.

Foladori, P., Laura, B., Gianni, A. et Giuliano, Z. (2007) Effects of sonication on bacteria

viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry—Fecal indicators, wastewater and activated sludge. *Water Research* **41**: 235-243.

Frølund, B., Griebe, T. et Nielsen, H. (1995) Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**: 755-761.

Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K. et Nielsen, P.H. (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* **30**: 1749-1758.

Frostegård, A. et Bååth, E. (1996) The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* **22**: 59-65.

Gernaey, A.K., Petersen, B., Ottøy, J.P. et Vanrolleghem, P. (2001) Activated sludge monitoring with combined respirometric-titrimetric measurements. *Water Research* **35**: 1280-1294.

Ghyoot, W. et Verstraete, W. (2000) Reduced sludge production in a two-stage membrane-assisted bioreactor. *Water Research* **34**: 205-215.

Gonze, E., Pillot, S., Valette, E., Gonthier, Y. et Bernis, A. (2003) Ultrasonic treatment of an aerobic activated sludge in a batch reactor. *Chemical Engineering and Processing* **42**: 965-975.

Gregory, G. (2001) Ultraplankton dans la baie de Marseille : séries temporelles, viabilité bactérienne et mesure de la respiration par cytométrie en flux. Marseille: Université de la Méditerranée, Centre d'Océanologie de Marseille.

Grönroos, A., Kyllönen, H., Korpijärvi, K., Pirkonen, P., Paavola, T., Jokela, J. et Rintala, J. (2005) Ultrasound assisted method to increase soluble chemical oxygen demand (SCOD) of sewage sludge for digestion. *Ultrasonics Sonochemistry* **12**: 115-120.

Gujer, W., Henze, M., Mino, T. et Van Loosgrecht, M.C. (1999) Activated sludge model n°3. *Water Science and Technology* **39**: 183-193.

Hales, S.G., Philpotts, C.J. et Gillard, C. (1996) A respirometer with improved sensitivity for ready biodegradation testing. *Chemosphere* **33**: 1247-1259.

Hamer, G. (1985) Lysis and "cryptic" growth in wastewater and sludge treatment processes. *Acta Biotechnologica* **5**: 117-127.

Harrison, S.T.L. (1991) Bacterial cell disruption : a key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnology Advances* **9**: 217-240.

Haug, R.T., Stuckey, D.C., Gossett, J.M. et McCarty, P.L. (1978) Effect of Thermal Pretreatment on Digestibility and Dewaterability of Organic Sludges. *Journal Water Pollution Control Federation*: 73-85.

Henze, M., Grady, J.C.P.L., Gujer, W., Marais, G.v.R. et Matsuo, T. (1987) Activated sludge model n°1. *IAWQ Scientific and technical report n°1*.

Henze, M., Gujer, W., Mino, T., Matsuo, T., Wentzel, M.C.M. et Marais, G.v.R. (1995) Activated sludge model n°2. *IAWQ Scientific and technical report n°2*.

Hodson, R.E., Holm-Hansen, O. et Azam, F. (1976) Improved methodology for ATP determination in marine environments. *Marine Biology* **34**: 143-149.

Hoefel, D., Grooby, W.L., Monis, P.T., Andrews, S. et Saint , C.P. (2003) A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. *Journal of Microbiological Methods* **52**: 379-388.

Ishizaki, K., Sawadaishi, K., Miura, K. et Shinriki, N. (1987) Effect of Ozone on Plasmid DNA of Escherichia coli In Situ. *Water Research* **21**: 823-828.

Jallais, S. et Ibarra, D. (2008) Method of lowering the redox potential of a liquid by injection of a gas while preventing foaming, brevet n° WO/2008/003887.

Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J.C., Bottero, J.Y., Villemin, G., Urbain, V. et Manem, J. (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Research* **29**: 1639-1647.

Joux, F. et Lebaron, P. (2000) Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection* **2**: 1523-1535.

Keer, J.T. et Birch, L. (2003) Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods* **53**: 175-183.

Kell, B., Kaprelyants, A., Weichart, D., Harwood, C. et Barer, M. (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion on the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 169-187.

Kepner, R.L. et Pratt, J.R. (1994) Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples : past and present. *Microbiology Reviews* **58**: 603-615.

Khanal, S.K., Grewell, D., Sung, S. et Van Leeuwen, J.H. (2007) Ultrasound Applications in Wastewater Sludge Pretreatment: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **37**: 277-313.

Kim, J., Park, C., Kim, T.H., Lee, M., Kim, S., Kim, S.W. et Lee, J. (2003) Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95**: 271-275.

Kogure, K., Simidu, U. et Taga, N. (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian journal of microbiology* **25**: 415-420.

Kopplow, O., Barjenbruch, M. et Heinz, V. (2004) Sludge pre-treatment with pulsed electric fields. *Water Science and Technology* **49**: 123-129.

Kroer, N. (1994) Relationships between biovolume and carbon and nitrogen content of bacterioplankton. *FEMS Microbiology Ecology* **13**: 217-224.

Kwok, N.Y., Dong, S., Lo, W. et Wong, K.Y. (2005) An optical biosensor for multi-sample determination of biochemical oxygen demand (BOD). *Sensors and Actuators B : Chemical* **110**: 289-298.

Lapidou, C.S. et Rittmann, B.E. (2002) A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research* **36**: 2711-2720.

Laurent, P. et Servais, P. (1995) Fixed bacterial biomass estimated by potential exoproteolytic activity. *Canadian journal of microbiology* **41**: 749-752.

Lebonté, S. (2003) Méthodes multivariées pour la caractérisation des eaux usées. Nancy: Institut National Polytechnique de Lorraine.

Lee, S. et Fuhrman, J.A. (1987) Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 1298-1303.

Li, Y. et Chrost, R.J. (2006) Microbial enzymatic activities in aerobic activated sludge model reactors. *Enzyme and Microbial Technology* **39**: 568-572.

Li, Y.Y. et Noike, T. (1992) Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by thermal pretreatment. *Water Science and Technology* **26**: 857-866.

Liang, P., Huang, X. et Qian, Y. (2006) Excess sludge reduction in activated sludge process through predation of *Aeolosoma hemprichi*. *Biochemical Engineering Journal* **28**: 117-122.

Liu, Y. (2003) Chemically reduced excess sludge production in the activated sludge process. *Chemosphere* **50**: 1-7.

Liu, Y. et Tay, J.H. (2001) Strategy for minimization of excess sludge production from the activated sludge process. *Biotechnology Advances* **19**: 97-107.

López-Amorós, R., Comas, J., Garcia, M.T. et Vives-Rego, J. (1998) Use of the 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride reduction test to assess respiring marine bacteria and grazing effects by flow cytometry during linear alkylbenzene sulfonate degradation. *FEMS Microbiology Ecology* **27**: 33-42.

Low, E.H. et Chase, H.A. (1998) The use of chemical uncouplers for reducing biomass production during biodegradation. *Water Science and Technology* **37**: 399-402.

Low, E.H. et Chase, H.A. (1999) Reducing production of excess biomass during wastewater treatment. *Water Research* **33**: 1119-1132.

Low, E.H. et Chase, H.A. (1999) The effect of maintenance energy requirements on biomass production during wastewater treatment. *Water Research* **33**: 847-853.

Low, E.H., Chase, H.A., Milner, M.G. et Curtis, T.P. (2000) Uncoupling of metabolism to reduce biomass production in the activated sludge process. *Water Research* **34**: 3204-3212.

Madrid, R.E. et Felice, C.J. (2005) Microbial Biomass Estimation. *Critical Reviews in Biotechnology* **25**: 97-112.

Massé (2004) Bioréacteur à membranes immergées pour le traitement des eaux résiduaires urbaines : spécificités physico-chimiques du milieu biologique et colmatage. Toulouse: Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

Mayhew, M. et Stephenson, T. (1998) Biomass yield reduction: is biochemical manipulation possible without affecting activated sludge process efficiency? *Water Science and Technology* **38**: 137-144.

Meletiadis, J., Mouton, J.W., Meis, J.F.G.M., Bouman, B.A., Donnelly, J.P. et Verweij, P.E. (2001) Colorimetric Assay for Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 3402-3408.

Monger, B.C. et Landry, M.R. (1993) Flow Cytometric Analysis of Marine Bacteria with Hoechst 33342. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 905-911.

Moriarty, D.J.W. (1977) Improved method using muramic acid to estimate biomass of bacteria in sediments. *Oecologia* **26**: 317-323.

Morono, Y., Takano, S., Miyanaga, K., Tanji, Y., Unno, H. et Hori, K. (2004) Application of glutaraldehyde for the staining of esterase-active cells with carboxyfluorescein diacetate. *Biotechnology Letters* **26**: 379-383.

Mortimer, F.C., Mason, D.J. et Gant, V.A. (2000) Flow cytometric monitoring of antibiotic-induced injury in *Escherichia coli* using cell-impermeant fluorescent probes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 676-681.

Müller, J.A., Winter, A. et Strükmann, G. (2004) Investigation and assessment of sludge pre-treatment processes. *Water Science and Technology* **49**: 97-104.

Munch, E. et Pollard, P. (1997) Mesuring bacterial biomass-COD in wastewater containing particulate matter. *Water Research* **31**: 2550-2556.

Murillo Murillo, M. (2004) Caractérisation de l'effet d'un traitement au peroxyde d'hydrogène sur une boue; application à la réduction de la production de boue. Toulouse: Institut National des Sciences Appliquées.

Ouvrage Collectif n°2, (1997) Traiter et valoriser les boues, OTV Collection.

Nebe-Von-Caron, G., Stephens, P.J., Hewitt, C.J., Powell, J.R. et Badley, R.A. (2000) Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods* **42**: 97-114.

Neyens, E., Baeyens, J. et Creemers, C. (2003) Alkaline thermal sludge hydrolysis. *Journal of Hazardous Materials* **97**: 295-314.

Nielsen, J.L., Aquino de Muro, M. et Nielsen, P.H. (2003) Evaluation of the redox dye 5-Cyano-2,3-Tolyl-Tetrazolium Chloride for activity studies by simultaneous use of microautoradiography and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 641-643.

Nielsen, P.H., Jahn, A. et Palmgren, R. (1997) Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Science and Technology* **36**: 11-19.

Ødegaard, H. (2004) Sludge minimization technologies – an overview. *Water Science and Technology* **49**: 31-40.

Parmar, N., Singh, A. et Ward, O.P. (2001) Enzyme treatment to reduce solids and improve settling of sewage sludge. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **26**: 383-386.

Paul, E., Camacho, P., Lefebvre, D. et Ginestet, P. (2006) Organic matter release in low temperature thermal treatment of biological sludge for reduction of excess sludge production. *Water Science and Technology* **54**: 59-68.

Paul, E. et Debellefontaine, H. (2007) Reduction of excess sludge produced by biological treatment processes: effect of ozonation on biomass and on sludge. *Ozone: Science & Engineering* **29**: 415-427.

Pérez-Elvira, S.I., Nieto Diez, P. et Fdz-Polanco, F. (2006) Sludge minimisation technologies. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **5**: 375-398.

Pinnekamp, J. (1989) Effects of thermal pretreatment of sewage sludge on anaerobic digestion. *Water Science and Technology* **21**: 97-108.

Rastogi, S., Rathee, P., Saxena, T.K., Mehra, N.K. et Kumar, R. (2003) BOD analysis of industrial effluents: 5 days to 5 min. *Current Applied Physics* **3**: 191-194.

Rivard, C.J. et Nagle, N.J. (1998) Pretreatment of high solid microbial sludges. Etats Unis, brevet n°5785852.

Rivero, J.A.C., Madhavan, N., Suidan, M.T., Ginestet, P. et Audic, J.M. (2006) Enhancement of Anaerobic Digestion of Excess Municipal Sludge with Thermal and/or Oxidative Treatment. *Journal of Environmental Engineering* **132**: 638-644.

Roszak, D.B. et Colwell, R.R. (1987) Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 2889-2893.

Roxburgh, R., Sieger, R., Johnson, B., Rabinowitz, B., Goodwin, S., Crawford, G. et Daigger, G. (2006) Sludge Minimization Technologies-Doing more to get less. *Water Environment Foundation*: 506-525.

Sakai, Y., Aoyagi, T., Shiota, N., Akashi, A. et Hasegawa, S. (2000) Complete decomposition of biological waste sludge by thermophilic aerobic bacteria. *Water Science and Technology* **36**: 163-170.

Salhi, M. (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. Toulouse: Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

Sanz, J.L. et Köchling, T. (2007) Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* **42**: 119-133.

Sears, K.J., Alleman, J.E. et Gong, W.L. (2005) Feasibility of using ultrasonic irradiation to recover active biomass from waste activated sludge. *Journal of Biotechnology* **119**: 389-399.

Show, K.Y., Mao, T. et Lee, D.J. (2007) Optimisation of sludge disruption by sonication. *Water Research* **41**: 4741-4747.

Sievers, M. et Schaefer, S. (2007) The impact of sequential ozonation – aerobic treatment on the enhancement of sludge dewaterability. *Water Science and Technology* **55**: 201-205.

Simon, M. et Azam, F. (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress series* **51**: 201-213.

Smith, G. et Göransson, J. (1992) Generation of an effective internal carbon source for denitrification through thermal hydrolysis of pre-precipitated sludge. *Water Science and Technology* **25**: 211–218.

Stall, T.R. et Sherrard, J.H. (1976) Effect of wastewater composition and cell residence time on phosphorus removal in activated sludge. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **48**: 307-322.

Strand, S.E., Harem, G.N. et Stensel, H.D. (1999) Activated-Sludge Yield Reduction Using Chemical Uncouplers. *Water Environment Research* **71**: 454-458.

Tanaka, S., Kobayashi, T., Kamiyama, K. et Signey, M. (1997) Effects of thermochemical pretreatment on the anaerobic digestion of waste activated sludge. *Water Science and Technology* **35**: 209-215.

Thiem, A., Nickel, K., Zellhorn, M. et Neis, U. (2001) Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. *Water Research* **35**: 2003-2009.

Trousselier, M., Courties, C., Lebaron, P. et Servais, P. (1999) Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids. *FEMS Microbiology Ecology* **29**: 319–330.

Valo, A., Carrère, H. et Delgenès, J.P. (2004) Thermal chemical and thermo-chemical pretreatment of waste activated sludge for anaerobic digestion. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **19**: 1197-1203.

Van der Waarde, J.J., Geurkink, B., Henssen, M. et Heijnen, G. (1998) Detection of filamentous and nitrifying bacteria in activated sludge with 16S rRNA probes. *Water Science and Technology* **37**: 475-479.

Veal, D.A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J. et Attfield, P.V. (2000) Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods* **243**: 191-210.

Vives-Rego, J., Lebaron, P. et Nebe-Von-Caron, G. (2000) Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 429-448.

Vollertsen, J., Jahn, A., Nielsen, J.L., Jacobsen, T.H. et Nielsen, P.H. (2001) Comparison of methods for determination of microbial biomass in wastewater. *Water Research* **35**: 1649-1658.

Völsch, A., Nader, W.F., Geiss, H.K., Nebe, G. et Birr, C. (1990) Detection and analysis of two serotypes of ammonia-oxidizing bacteria in sewage plants by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 2430–2435.

Vrede, K., Heldal, M., Norland, S. et Bratbak, G. (2002) Elemental composition (C, N, P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2965-2971.

Wagner, J. et Rosenwinkel, K.H. (2000) Sludge production in membrane bioreactors under different conditions. *Water Science and Technology* **4**: 251–258.

Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. et Schleifer, K.H. (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria : inadequacy of culture-dependant methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1520-1525.

Wagner, M. et Loy, A. (2002) Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 218-227.

Wallner, G., Erhart, R. et Amann, R. (1995) Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1859-1866.

Wang, F., Wang, Y. et Ji, M. (2005) Mechanisms and kinetics models for ultrasonic waste activated sludge disintegration. *Journal of Hazardous Materials* **123**: 145-150.

Wang, F., Lu, S. et Ji, M. (2006) Components of released liquid from ultrasonic waste activated sludge disintegration. *Ultrasonics sonochemistry* **13**: 334-338.

Wang, J., Zhao, Q., Jin, W. et Lin, J. (2008) Mechanism on minimization of excess sludge in oxic-settling-anaerobic (OSA) process. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China* **2**: 36-43.

Wei, Y., Van Houten, R.T., Borgen, A.R., Eikelboom, D.H. et Fan, Y. (2003) Minimization of excess sludge production for biological wastewater treatment. *Water Research* **37**: 4453-4467.

Werther, J. et Ogada, T. (1999) Sewage sludge combustion. *Progress in Energy and Combustion Science* **25**: 55-116.

Wilén, B.M., Jina, B. et Lanta, P. (2003) The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Research* **37**: 2127-2139.

Wong, W.T., Chan, W.I., Liao, P.H., Lo, K.V. et Mavinic, D.S. (2006) Exploring the role of hydrogen peroxide in the microwave advanced oxidation process: solubilization of ammonia and phosphates. *Journal of Environmental Engineering and Science* **5**: 459-465.

Xing, D., Ren, N., Gong, M., Li, J. et Li, Q. (2005) Monitoring of microbial community structure and succession in the biohydrogen production reactor by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Science in China. Series C, Life sciences* **48**: 155-162.

Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J. et Colwell, R.R. (1982) Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *FEMS Microbiology Ecology* **8**: 313-323.

Yamaguchi, N., Sasada, M., Yamanaka, M. et Nasu, M. (2003) Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk, and ground beef by flow cytometry. *Cytometry Part A* **54**: 27-35.

Yin, G., Liao, P.H. et Lo, K.V. (2007) An ozone/hydrogen peroxide/microwave-enhanced advanced oxidation process for sewage sludge treatment. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **42**: 1177-1181.

Zhang, P., Zhang, G. et Wang, W. (2007) Ultrasonic treatment of biological sludge: Floc disintegration, cell lysis and inactivation. *Bioresource Technology* **98**: 207-210.

Zhao, Y.X., Yin, J., Yu, H.L., Han, N. et Tian, F.J. (2007) Observations on ozone treatment of excess sludge. *Water Science and Technology* **50**: 167-175.

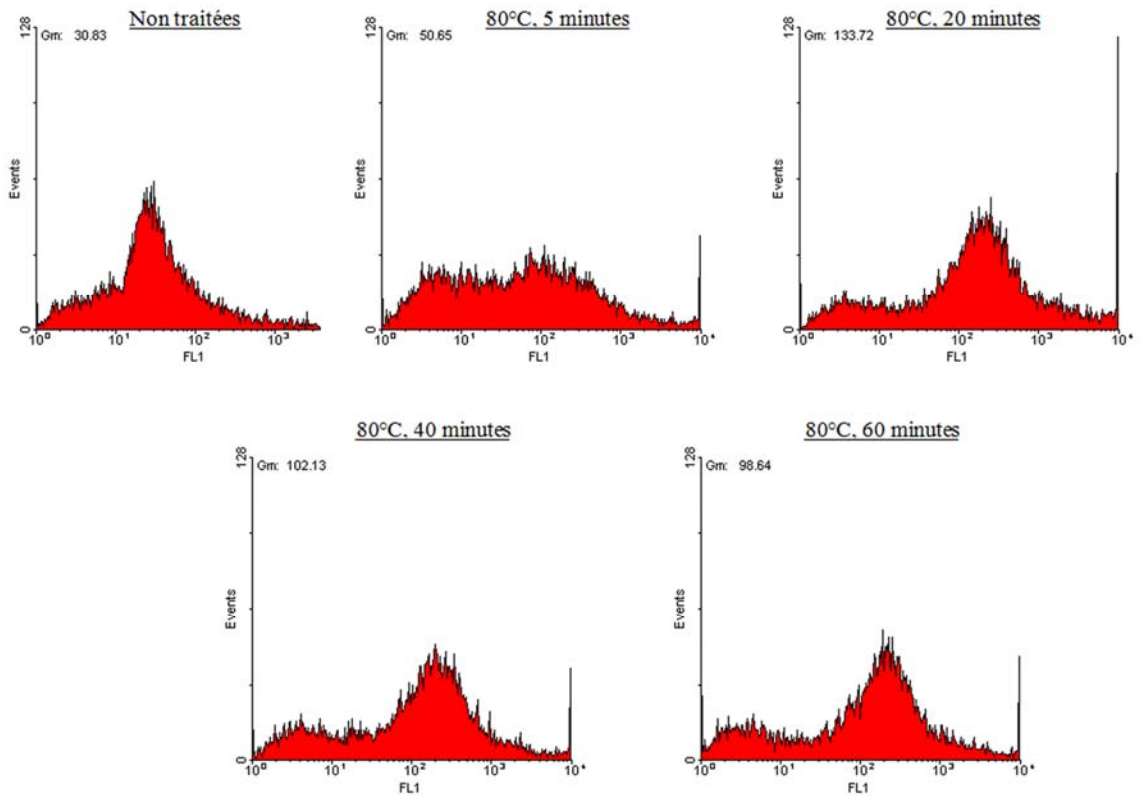
Ziglio, G., Andreottola, G., Barbesti, S., Boschetti, G., Bruni, L., Foladori, P. et Villa, R. (2002) Assessment of activated sludge viability with flow cytometry. *Water Research* **36**: 460-468.

Zukerkandl, E. et Pauling, L. (1965) *Evolutionary divergence and convergence in proteins, dans Evolving genes and proteins*. New York: Academic press.

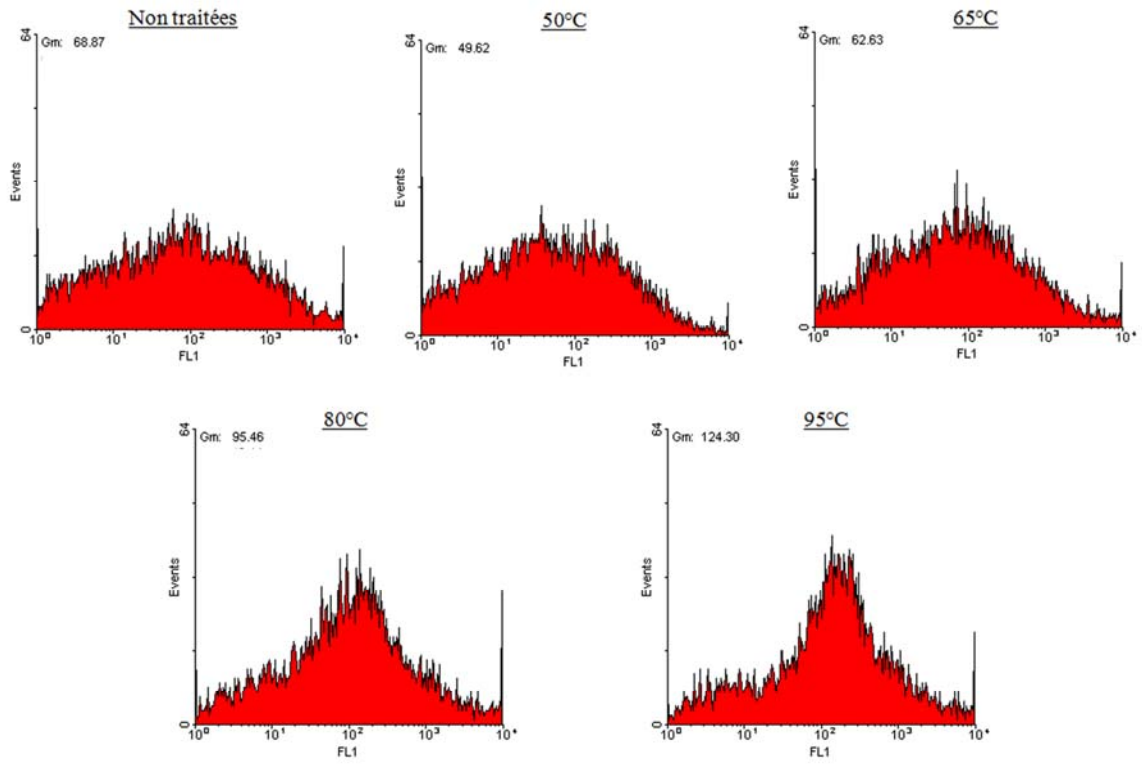
Annexe A

**HISTOGRAMMES OBTENUS LORS DES
DIFFERENTES SERIES DE
TRAITEMENT**

Série 1.a.1 (traitement thermique)

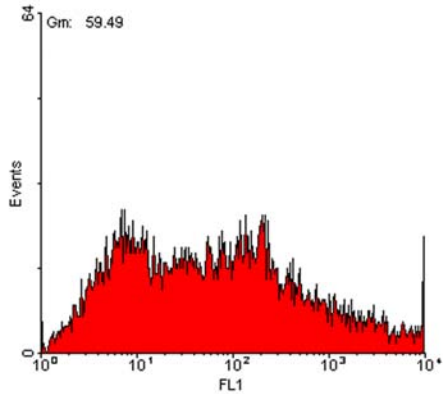


Série 1.b.1 (traitement thermique)

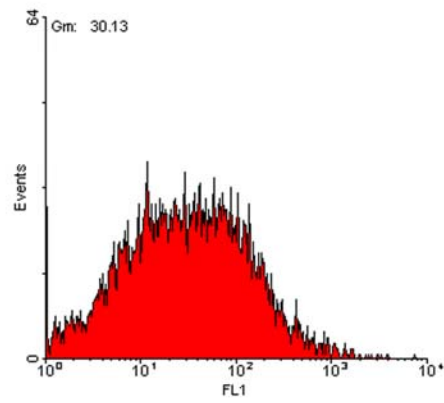


Série 2.1 (sonication)

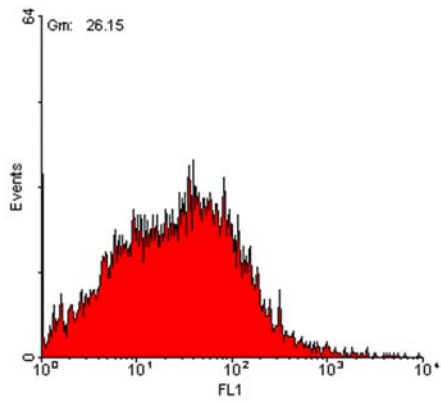
Non traitées



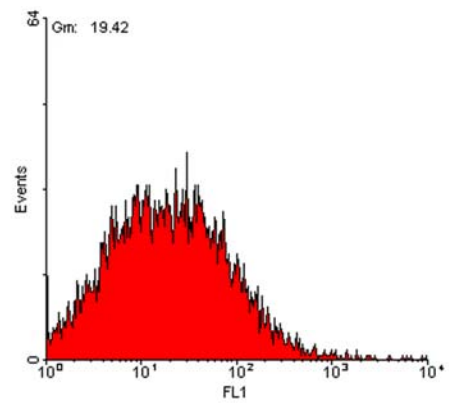
Es = 70000 J/g MS



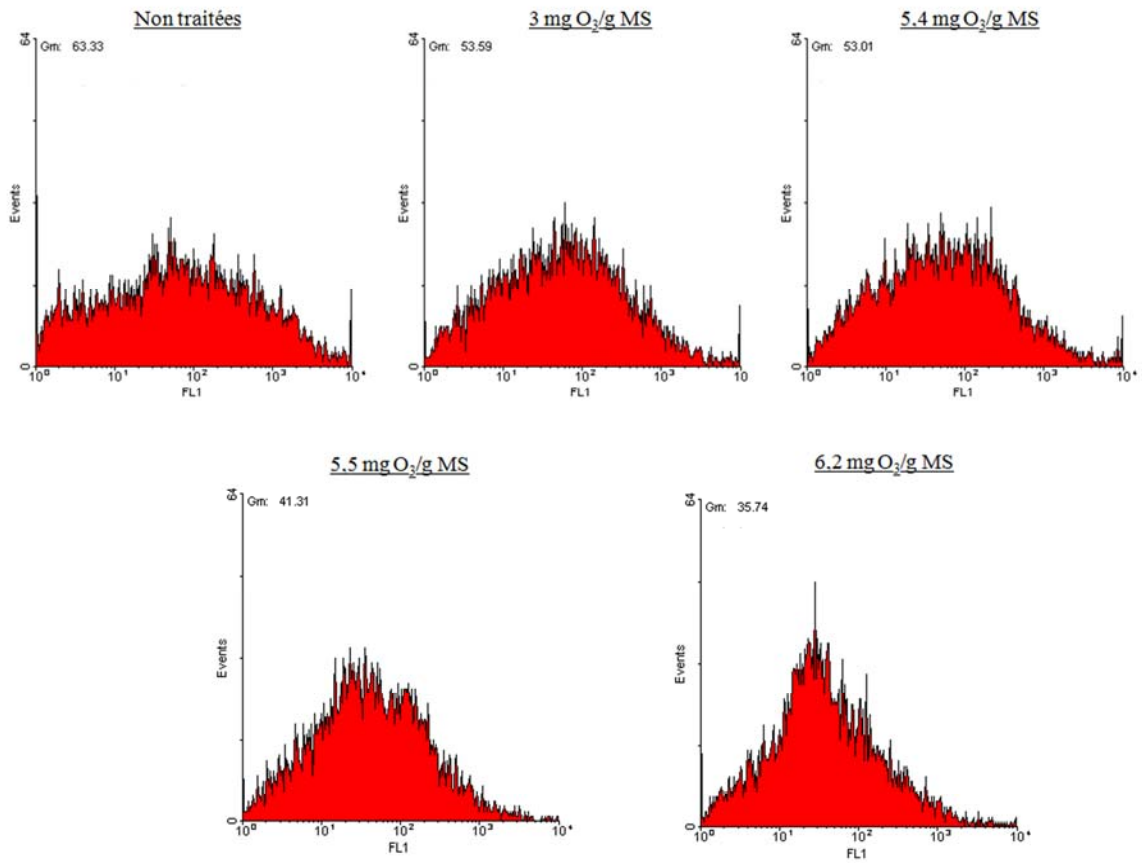
Es = 140000 J/g MS



Es = 210000 J/g MS



Série 3.1 (ozonation)



Annexe B

CYTOMETRIE EN FLUX PRINCIPES ET APPLICATIONS ⁽¹⁾

⁽¹⁾: Patrick LEPRAT, Cours Microbiologie Appliquée, ENSIL

INTRODUCTION

Qu'est ce que la Cytométrie en flux?

C'est une technologie qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule.

Quelles sont les informations sur la cellule apportées par la cytométrie en flux (CMF)?

Sa taille relative (Forward Scatter),

Sa granularité ou sa complexité interne relative (Side Scatter),

Son intensité relative de fluorescence.

HISTORIQUE

Les méthodes d'analyse des cellules individuelles sont essentielles pour la compréhension des fonctions des cellules normales et la possibilité de modulation des cellules pathologiques. La cytométrie en flux (CMF) est née du besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang.

Les origines de la CMF sont anciennes puisque c'est en 1934 que Moldavan conçut le premier appareil avec lequel il réalisait des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans un fin capillaire où elles étaient vues par un capteur photo électrique. Dans les années 70, les chercheurs de Los Alamos et de Stanford associaient des méthodes de mesure individuelle du volume ou de la fluorescence de cellules entraînées par un flux avec des méthodes électrostatiques permettant le tri cellulaire dans des conditions vitales. La diffusion de la lumière compléta rapidement la liste des propriétés capables de discriminer plusieurs types cellulaires. Le développement simultané d'appareillages commercialisés polyvalents et l'apparition des hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux a conduit à une explosion des activités impliquant la cytométrie en flux. L'utilisation des propriétés cellulaires intrinsèques (diffusion, auto fluorescence) et le développement permanent de fluorochromes capables de traduire de nombreuses propriétés et fonctions cellulaires ont conduit à la mise en oeuvre de méthodes de plus en plus fines pour l'analyse de populations de cellules hétérogènes.

DEFINITIONS

La CMF est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide.

Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs:

-aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne, ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton...

-aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (1 paramètre) ou de cytogrammes (2 paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

La fonction tri des cytomètres en flux les plus évolués permet de trier physiquement une ou deux populations cellulaires définies par leurs propriétés optiques

PRINCIPES TECHNIQUES DE LA CMF

Les principes de la cytométrie sont résumés dans les figures 1 et 2.

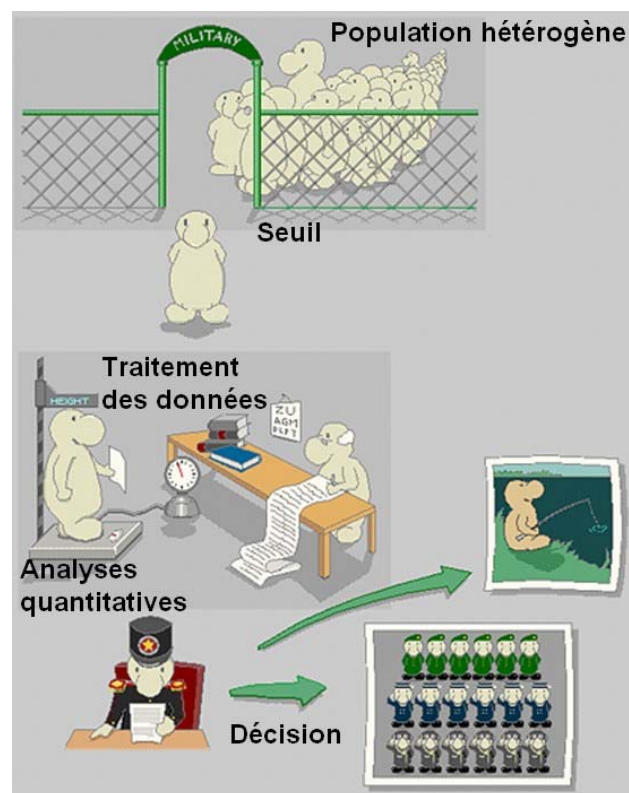


Figure 1 : Le principe de la cytométrie appliqué à l'armée

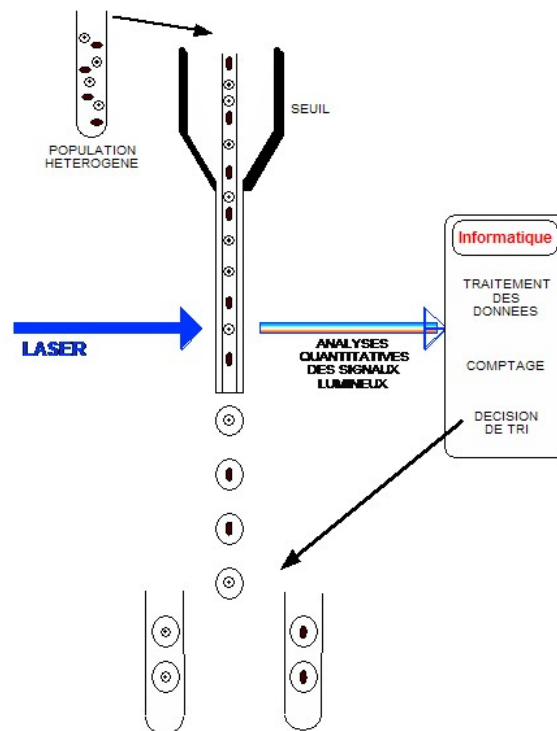


Figure 2 : Principe simplifié d'un cytomètre en flux

Pour fonctionner un cytomètre en flux nécessite une combinaison de:

- Fluidique: pour introduire et canaliser les cellules,
- Optique: une source d'excitation et de récupération des signaux,
- Electronique: pour convertir les signaux optiques en des signaux électroniques proportionnels et les numériser pour les analyser avec un ordinateur.

LES ECHANTILLONS CELLULAIRES

Les cellules doivent être mises en suspension pour pouvoir être analysées. L'analyse du sang ne pose aucun problème les cellules étant déjà en suspension. Par contre les tissus cellulaires doivent être dissociés et les agrégats éliminés afin de pouvoir être analysés.

LE CENTRAGE HYDRODYNAMIQUE

Les cellules sont amenées au centre de la buse de mesure et alignées les unes derrière les autres (au moyen du système de centrage hydrodynamique de l'échantillon) afin d'être excitées une par une avec le faisceau lumineux. Le liquide de gaine subit une accélération progressive ce qui entraîne un étirement du liquide échantillon et ainsi aligne les cellules au centre du jet (Figure 3).

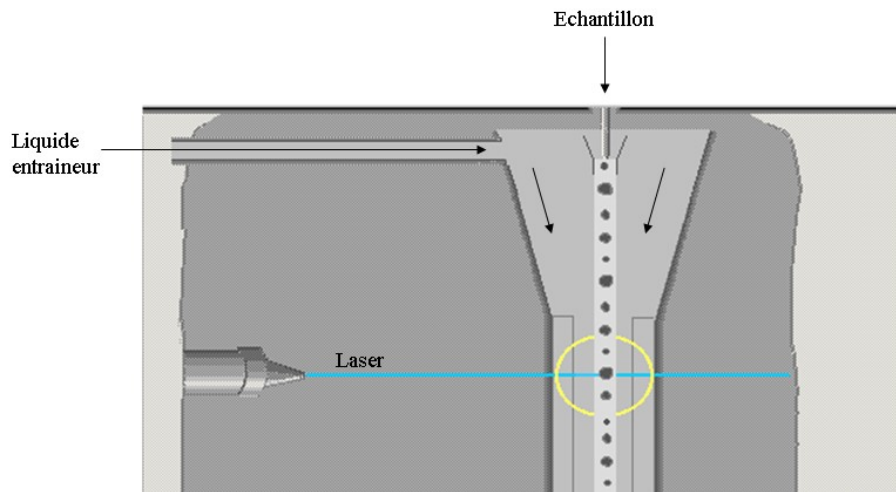


Figure 3 : Principe du centrage hydrodynamique

CIRCUITS OPTIQUES

La source d'excitation lumineuse doit permettre une illumination des colorants à une longueur d'onde proche de leur maximum d'absorption. Elle doit être puissante, stable et nécessite une bonne focalisation.

Deux types de sources sont actuellement utilisées:

Les lasers (les plus fréquemment utilisés) qui présentent un grand nombre d'avantages: puissance, stabilité, finesse du faisceau. Les lasers ont des spectres d'émission discontinus (Figure 4).

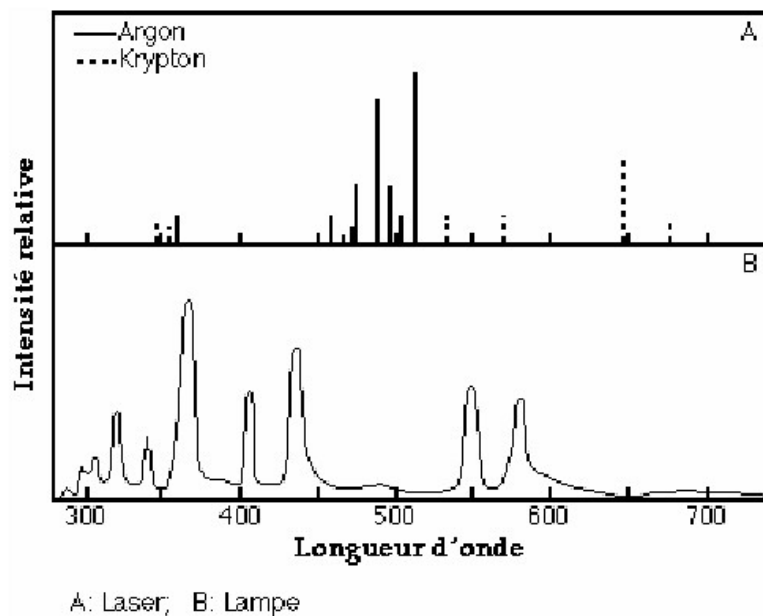


Figure 4 : principales sources lumineuses utilisées en cytométrie en flux

COLLECTE DE LA LUMIERE EMISE

Les différents signaux optiques émis par la cellule doivent être focalisés, séparés, puis acheminés vers des systèmes de détection, photomultiplicateurs ou photodiodes. Ils sont pour cela, sélectionnés par différents circuits optiques, composés d'une alternance de miroirs et de filtres.

Un miroir est une surface réfléchissante. Suivant le traitement de sa surface, on peut obtenir trois types de miroirs: passe-haut, passe-bas et passe bande (Figure 5, 6, 7). De plus, les longueurs d'onde réfléchies varient aussi avec l'angle formé par le rayon incident et la surface du filtre.

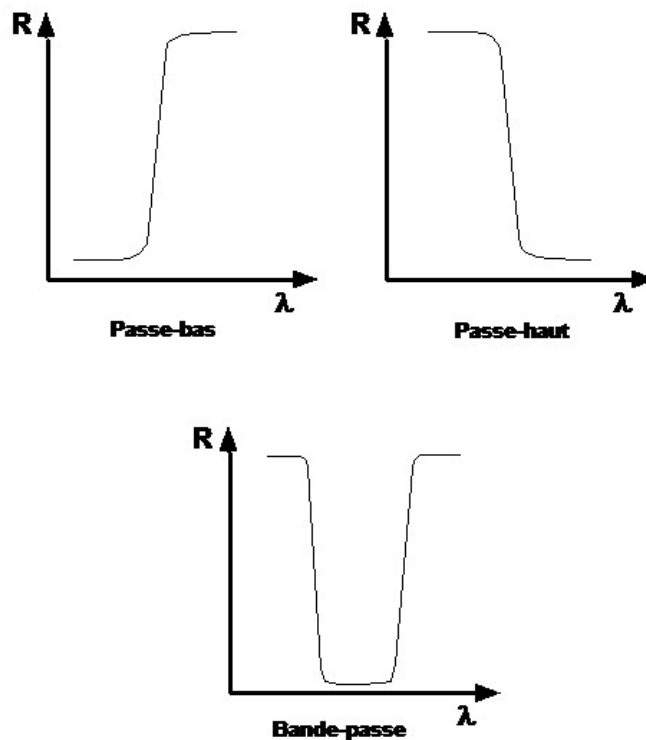


Figure 5 : Les différents types de filtres utilisés en cytométrie (R: Réflexion, λ : longueur d'onde)

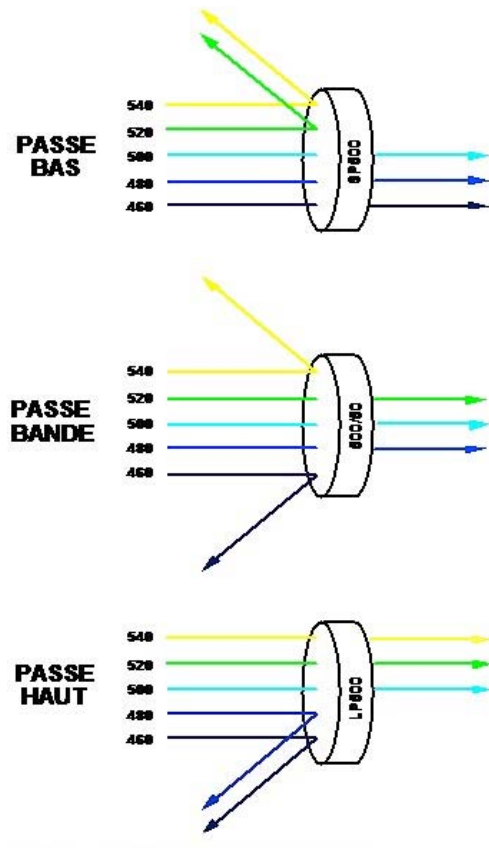


Figure 6 : Les différents types de filtres utilisés en cytométrie

Si les longueurs d'onde non réfléchies sont transmises, on obtient ainsi des miroirs dichroïques.

Pour les filtres, on retrouve en transmission les mêmes courbes que pour les miroirs, par contre les longueurs d'onde non transmises ne sont pas réfléchies. Elles sont soit absorbées soit détruites.

Après avoir traversé cette succession de miroirs et de filtres, la lumière est recueillie et transformée en signal électrique par un photomultiplicateur ou une photodiode.

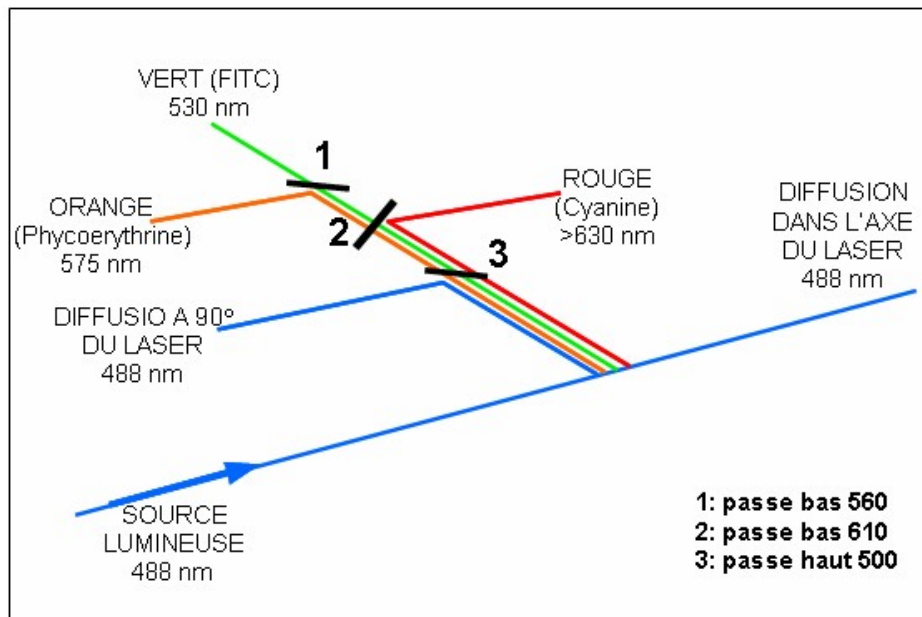


Figure 7 : Exemple de trajet optique dans un cytomètre en flux

LES SIGNAUX RECUEILLIS

Les signaux optiques recueillis ont une intensité corrélée avec des propriétés cellulaires :

- la diffusion de la lumière aux petits angles proportionnelle au diamètre cellulaire permet une identification morphologique des cellules,
- la diffusion de la lumière à angle droit proportionnelle au contenu cellulaire permet une identification morphologique des cellules,
- la fluorescence proportionnelle à l'intensité du marquage (marqueurs cellulaires, ADN, ARN, fonctions cellulaires...)

La lumière diffusée

La lumière diffusée renseigne sur la morphologie et la structure de la cellule. Si la diffusion de la lumière est mesurée dans l'axe du rayon incident, l'intensité du signal peut être corrélée avec la taille et la viabilité cellulaire.

Sous un angle de 90° , la mesure correspond à la structure intracellulaire de la cellule (réfringence du cytoplasme, morphologie, rapport nucléo-cytoplasmique). L'utilisation

simultanée de ces deux paramètres permet de distinguer, dans un sang périphérique par exemple, les plaquettes, les lymphocytes, les monocytes et les polynucléaires (figure 8).

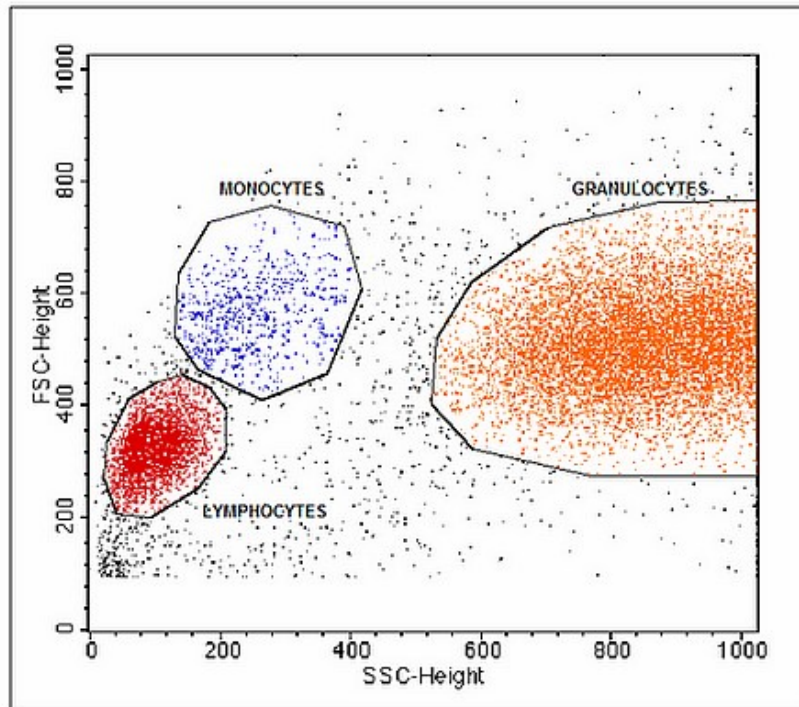


Figure 8 : Utilisation de la double diffusion de la lumière pour distinguer les diverses sous populations sanguines (FSC: diffusion aux petits angles, SSC diffusion aux grands angles).

La lumière absorbée

Cette mesure évolue proportionnellement au diamètre de la cellule (supposée sphérique) et à l'indice d'absorption des constituants cellulaires.

La fluorescence émise

Cette fluorescence peut être spontanée, mais le plus souvent, elle est apportée à la cellule par un fluorochrome. Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et réémet l'énergie absorbée par vibration et dissipation de chaleur, émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée

CONVERSION DES SIGNAUX

Les signaux optiques sont convertis en signaux électriques par les photomultiplicateurs. Ces signaux électriques ont une valeur comprise le plus souvent entre 0 et 10 volts (signal analogique). L'ordinateur ne peut traiter ces données que si elles sont sous

forme binaire (signal digital). Le rôle du convertisseur analogique-digital est de convertir, comme son nom l'indique, un signal analogique (valeur continue) en signal digital (valeur discontinue) assimilable par l'ordinateur. C'est à dire de transformer une valeur comprise entre 0 et 10 volts en une valeur binaire comprise entre 0 et 255 pour un convertisseur 8 bits (28) ou entre 0 et 1023 pour un convertisseur 10 bits (210) (figure 9).

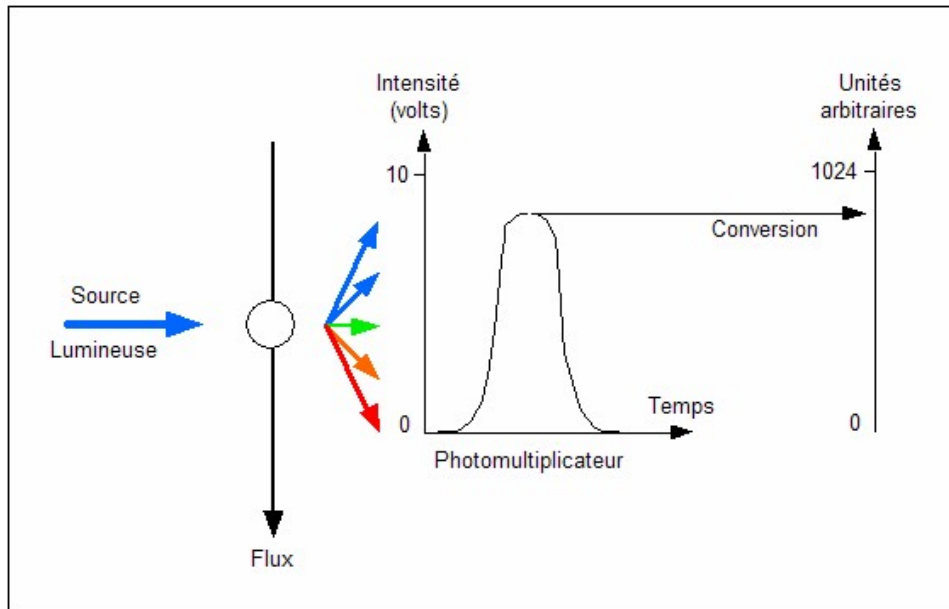


Figure 9 : Principe de fonctionnement d'un convertisseur

PRESENTATION DES RESULTATS

Les valeurs numériques issues des convertisseurs sont stockées par l'informatique et présentées sur les écrans des cytomètres sous deux formes :

- des histogrammes monoparamétriques où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules (figure 10).
- des histogrammes biparamétriques ou cytogrammes présentant deux signaux simultanément.

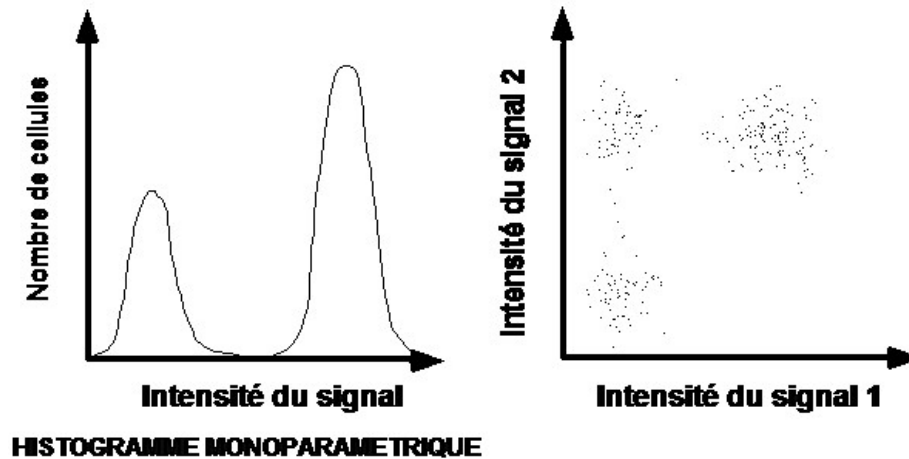


Figure 10 : Présentation des résultats en cytométrie en flux.

LE TRI CELLULAIRE

L'analyse multiparamétrique d'une suspension cellulaire hétérogène permet de définir des sous-populations qui peuvent être séparées physiquement de la population globale. Pour cela, des critères de séparation sont déterminés par l'utilisateur (définition des zones d'intérêt du tri) et toute cellule dont les caractéristiques seront comprises entre les valeurs choisies sera isolée.

Dans ce but, la veine liquide sera chargée électriquement, puis fractionnée en une succession de gouttelettes. La gouttelette contenant la cellule voulue est déviée en passant dans un champ électrostatique et récupérée dans un récipient collecteur. Si la cellule appartient à une sous-population non sélectionnée ou si la gouttelette formée ne contient pas de cellule, la veine liquide ne sera pas chargée et la gouttelette éliminée.

AVANTAGE ET LIMITES DE LA CMF

Ce qui distingue la CMF des autres techniques analytiques et préparatives est qu'elle réunit les cinq caractéristiques essentielles suivantes: analyse quantitative, sensibilité de détection, rapidité, analyse multiparamétrique cellule par cellule, tri.

ANALYSE QUANTITATIVE

C'est un atout majeur par rapport à la microscopie optique courante que de pouvoir quantifier les paramètres observés. En effet, au microscope, il est difficile de classer des cellules en plus de quatre catégories selon leur fluorescence: "négatives", "faibles", "moyennes", "fortes". Un cytomètre avec amplificateur logarithmique permet de quantifier

rigoureusement chaque critère optique sur une gamme de 1 à 10000 unités arbitraires de fluorescence. Mais le nombre de paramètres intervenant dans toute analyse de CMF (réglages optiques, fluorochromes, marqueurs) impose, dans le cadre d'une quantification absolue, l'utilisation de standards calibrés (billes fluorescentes par exemple).

SENSIBILITE DE DETECTION

En immunofluorescence, il est possible de discerner du bruit de fond une population de cellules lymphoïdes portant environ 1000 déterminants antigéniques par cellule.

VITESSE DE TRAVAIL

La vitesse moyenne d'analyse d'un cytomètre est de 1000 cellules par seconde bien qu'il soit possible, sur les appareils modernes, d'analyser de manière fiable jusqu'à 10000 événements par seconde sur plusieurs paramètres. En quelques secondes, la signification statistique du comptage est bien supérieure à celle obtenue classiquement par un microscope optique, même pour une sous-population de cellules très minoritaires.

L'ANALYSE SIMULTANEE DE PLUSIEURS PARAMETRES

La CMF offre la possibilité de travailler simultanément sur plusieurs paramètres, ce qui permet de mesurer, par exemple, deux ou trois paramètres simultanés sur une population lymphocytaire du sang ou de la moelle. Aucune autre méthode, qu'elle soit physico-chimique (centrifugation en gradient, élutriation) ou immunologique (panning, colonnes, rosettes) n'offre cette polyvalence.

LE TRI

Les cellules peuvent être isolées avec des taux de pureté supérieurs à 99%. Ces cellules peuvent être remises en culture. Il ne faut pas pour autant oublier la relative lenteur du tri: pour obtenir 10⁶ cellules d'une population représentant initialement 1% de la population de départ, il faudrait, à la vitesse théorique de 1000 cellules par seconde environ 30 heures de tri. La grande pureté des populations triées par CMF ne peut donc être obtenue qu'au prix d'une sérieuse limitation du nombre de cellules recueillies et d'une surveillance critique constante lors de la séparation.

PRINCIPALES APPLICATIONS

L'hématologie a été l'une des premières disciplines médicales à bénéficier des applications cliniques de la CMF. Certaines de ces applications sont maintenant utilisées régulièrement pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique de différentes affections. Ces applications concernent aussi bien l'étude fonctionnelle de cellules saines que la mise en évidence du caractère pathologique des cellules analysées.

IMMUNOFLUORESCENCE POUR LA CARACTERISATION DES SOUS-POPULATIONS CELLULAIRES

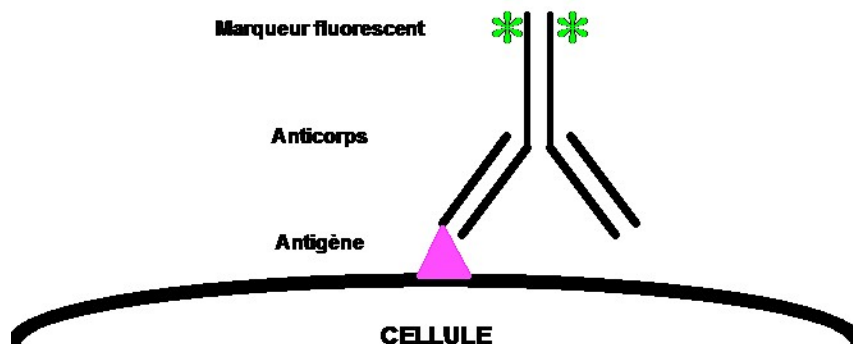
L'association de l'immunofluorescence et de la cytométrie en flux (CMF) est devenue un élément essentiel dans l'étude des systèmes biologiques, surtout dans la discrimination entre cellules d'une population hétérogène. En effet, l'utilisation des anticorps monoclonaux (AcM), dirigés contre des composants membranaires spécifiques, permet de distinguer des sous-populations lymphocytaires. Ces dernières années, l'identification et la caractérisation des antigènes (Ag) de surface des lymphocytes a progressé très rapidement. Cependant, il n'existe pas d'AcM pouvant reconnaître à lui seul une cellule particulière pourvue de certaines fonctions. Cette limitation a conduit les utilisateurs de la technique d'immunofluorescence à passer des simples aux multiples marquages en utilisant des combinaisons d'AcM révélés par des fluorochromes différents.

Par rapport aux investigations initiales réalisées au microscope, la CMF apporte en plus la quantification à l'échelon cellulaire individuel du nombre de sites reconnus et la possibilité de trier ces cellules selon l'intensité de leur marquage en vue d'études fonctionnelles ultérieures. Enfin elle peut se combiner à l'analyse d'autres paramètres (cycle cellulaire, Calcium) et donc nous informer sur l'état fonctionnel des cellules.

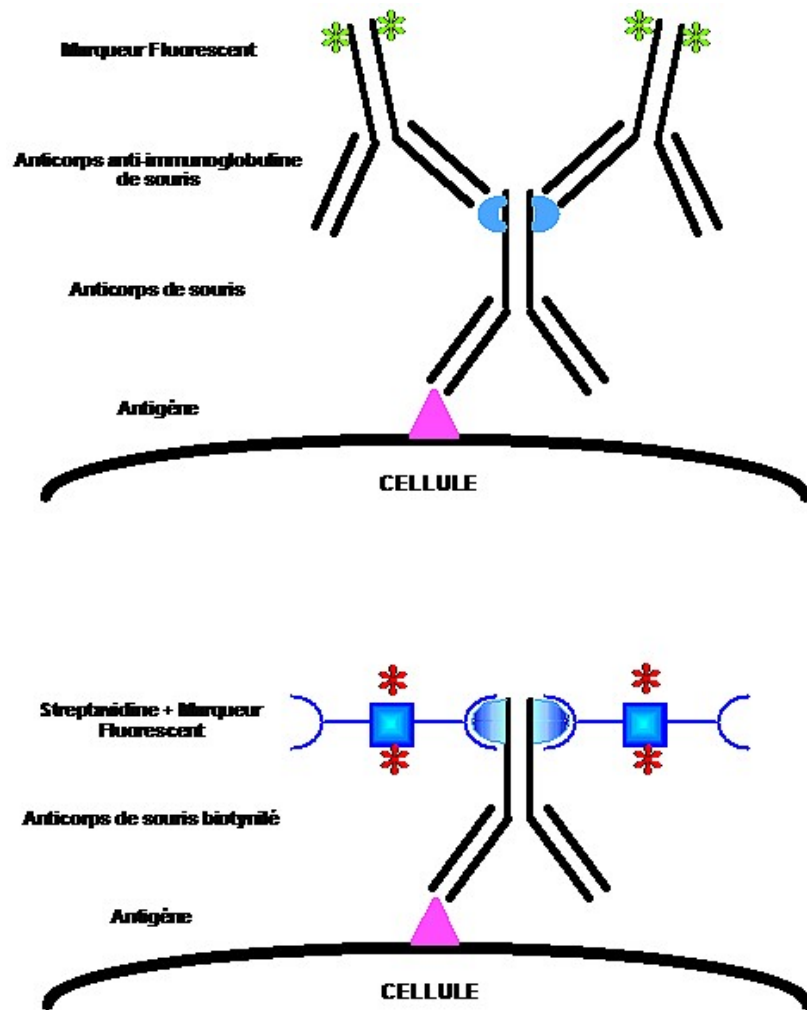
Principes de l'immunofluorescence

Les méthodes d'immunofluorescence se répartissent en deux groupes:

- les réactions directes où l'AcM est directement couplé à un fluorochrome :



- les réactions indirectes où l'AcM est révélé par un second réactif couplé au fluorochrome :



Ces deux méthodes font appel à des réactifs fluorescents: les fluorochromes. Un exemple de spectres d'émission de fluorochromes utilisé en immunofluorescence est représenté figure 11.

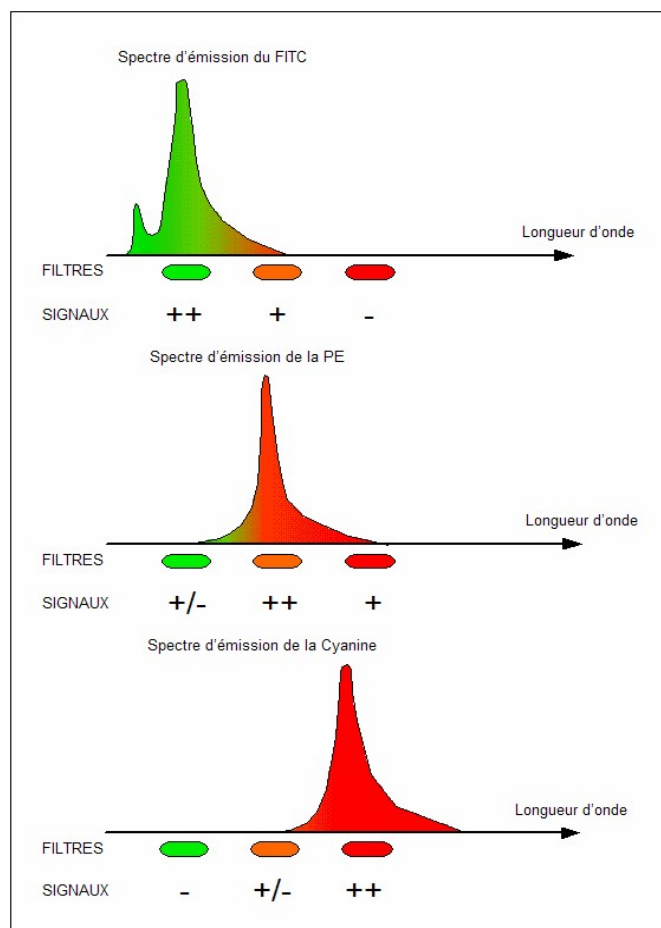


Figure 11 : Spectres d'émission des principaux fluorochromes utilisés en immunofluorescence.

Pour les marquages multiples plusieurs fluorochromes sont utilisés simultanément. Dans ce cas, il faut que:

- leurs longueurs d'onde d'excitation correspondent à la source lumineuse du cytomètre (en général 488 nm pour les cytomètres les plus courants),

- leurs longueurs d'onde d'émission soient suffisamment éloignées pour que leurs signaux soient analysés séparément.

L'obstacle majeur dans les analyses multiparamétriques est constitué par le chevauchement important des spectres d'émission des fluorochromes employés pour révéler les AcM.

L'introduction d'un second laser a permis de vaincre une telle interférence en rendant possible l'excitation de plusieurs fluorochromes à spectres d'excitation et d'émission bien distincts. Mais cette technique était trop lourde et complexe pour être couramment utilisée. En effet, les analyseurs du marché ne disposent que d'une seule source lumineuse.

Actuellement la nécessité d'un troisième marqueur pour caractériser les populations cellulaires a conduit à l'élaboration de nouveaux fluorochromes dont le principe de fonctionnement est basé sur le transfert d'énergie entre plusieurs constituants. Le premier colorant est excité à 488 nm, il réémet à sa longueur d'onde d'émission qui est la longueur d'onde d'excitation du second colorant.

Principes de la compensation de fluorescence

Les chevauchements des spectres d'émission des divers fluorochromes utilisés en cytométrie nécessitent l'emploi de compensations électroniques de fluorescence afin de soustraire la superposition des deux signaux de fluorescence (figure 12).

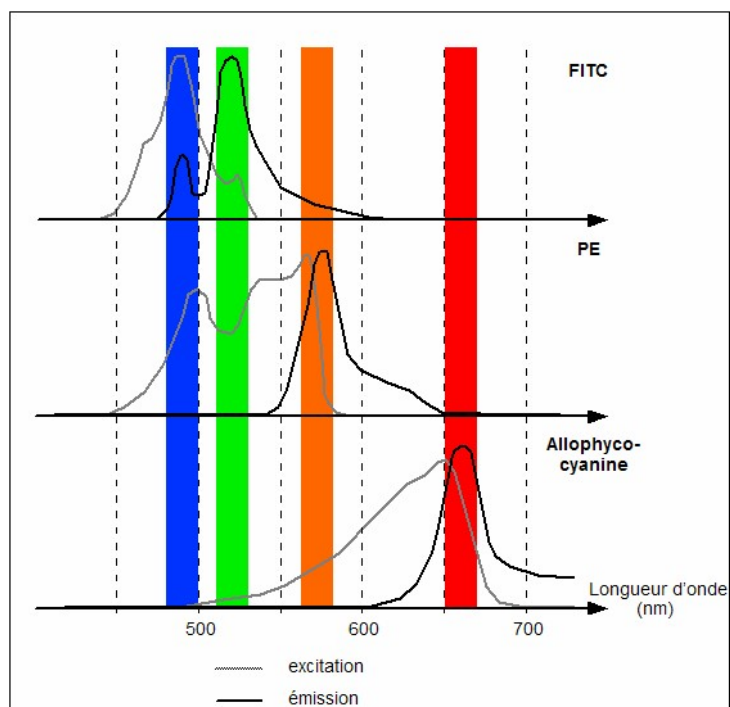
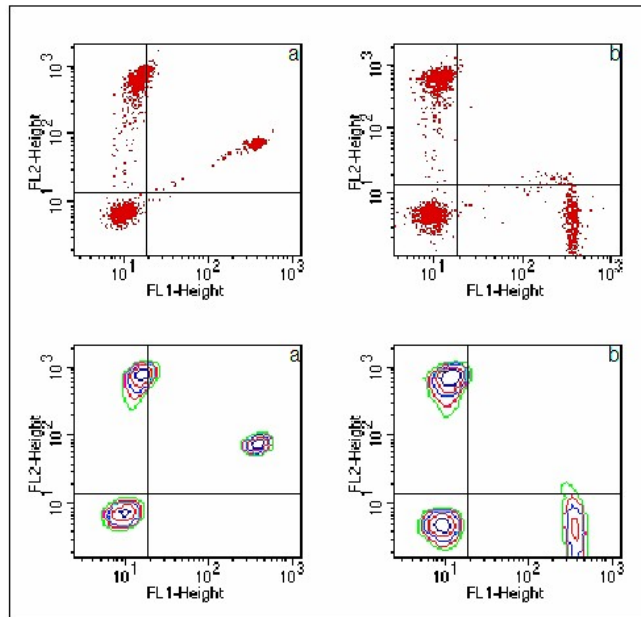


Figure 12 : Fuites de fluorescence.

Ainsi, sans compensation de fluorescence, une population cellulaire marquée en fluorescence verte (FITC) mais non marquée en fluorescence orange (PE) est positionnée sur la bissectrice de l'histogramme biparamétrique des deux fluorescences (figure 13a).

Le système de compensation permet de soustraire artificiellement la fluorescence orange qui résulte de la fuite de fluorescence du FITC dans le canal de la PE (figure 13b).



Chaque pourcentage de compensation sera ainsi déterminé par l'analyse des cellules simplement marquées par les divers colorants.

En cancérologie, la détection de la cellule pathologique est l'application la plus développée. Cette détection repose essentiellement sur la mesure d'un contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule tumorale.

MARQUAGE SPECIFIQUE DE L'ADN POUR LA MESURE DU CYCLE CELLULAIRE

“Le cycle cellulaire représente l'intégralité de la période de division, c'est à dire l'ensemble des événements biochimiques et morphologiques qui sont responsables de la prolifération cellulaire”.

La mesure du cycle cellulaire par des méthodes classiques de CMF divise le cycle en trois phases: G0/G1, phase d'activation des cellules, S, phase de synthèse de l'ADN, G2/M phase de mitose. La distinction entre G0 (phase quiescente) et G1 (phase de préparation à la synthèse d'ADN) ainsi que G2 (préparation de la mitose) et M (mitose) est impossible avec une méthode utilisant un intercalant comme l'iodure de propidium.

La CMF offre une méthodologie rapide et simple à mettre en oeuvre pour l'analyse du cycle cellulaire. Elle permet de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle en fonction de divers stimuli ou de l'ajout de certaines drogues. Elle permet aussi de voir la présence de cellules avec des contenus anormaux d'ADN...

Marquage spécifique de l'ADN

Il existe de nombreux colorants de l'ADN pour les études en CMF.

Le Hoechst est un dérivé de benzimidazole qui émet une fluorescence bleue quand il est excité dans l'UV. Il a une haute affinité pour l'ADN et se lie préférentiellement aux bases A-T, mais ce n'est pas un intercalant. Le DAPI présente les mêmes caractéristiques que le Hoechst et peut être interchangé avec lui.

La mithramycine, la chromomycine sont des antibiotiques excitable à 445nm et qui émettent à 575 nm (orange). Ils se lient aux régions G-C par des mécanismes non-intercalants.

L'iodure de propidium et le bromure d'éthidium sont les colorants les plus utilisés. Ces deux colorants sont des intercalants aussi bien des doubles brins d'ADN que d'ARN. Tous les deux sont excitable dans le bleu et émettent dans le rouge (615 nm).

Stœchiométrie de la coloration

Il est important que la fluorescence émise par la sonde soit proportionnelle à sa fixation sur l'ADN. Dans le cas contraire il n'est pas possible de mesurer un cycle cellulaire ou un contenu en ADN.

Les intercalants, bien que leur fixation soit liée à l'accessibilité de l'ADN, sont plus utilisés pour mesurer les contenus en ADN car la teneur en A-T et G-C n'intervient pas dans leur fixation.

Présentation des résultats

La plupart des applications qui concernent le cycle cellulaire n'utilisent qu'un seul paramètre, le contenu en ADN (figure 14). Des programmes mathématiques calculent les différentes phases du cycle. Les principales applications concernent la pharmacologie: étude de l'effet de drogues sur le cycle cellulaire, la cancérologie: pour déterminer la prolifération d'une tumeur et voir son contenu en ADN par rapport aux cellules normales.

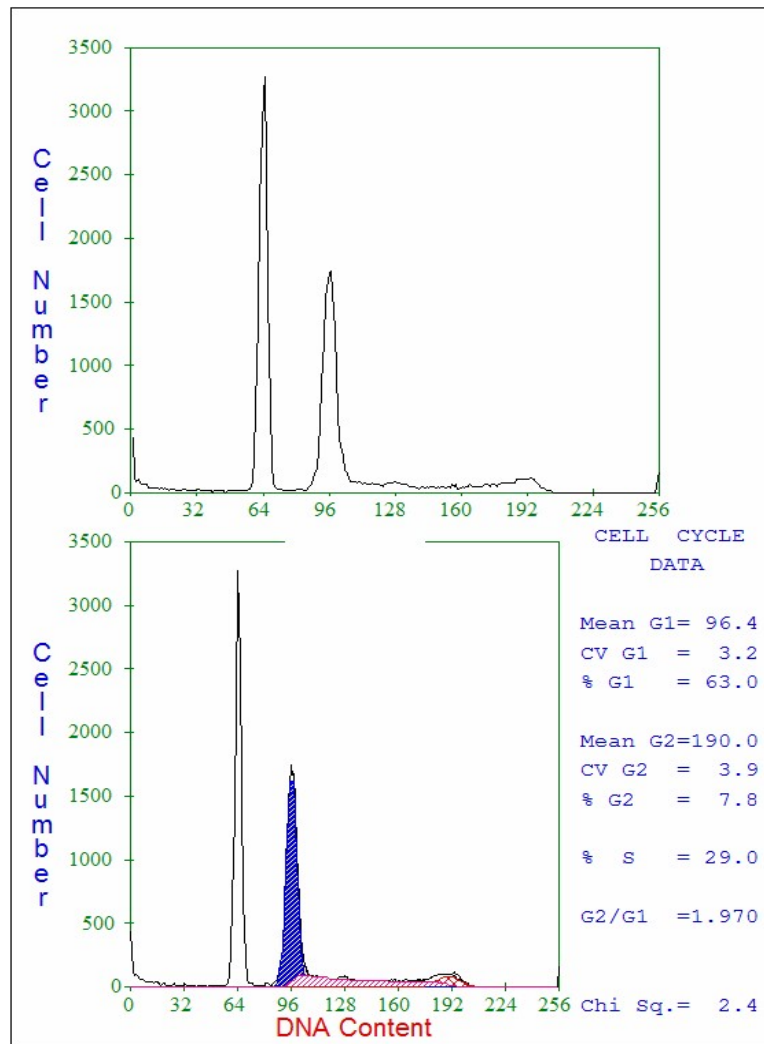


Figure 15 : Analyse du cycle cellulaire d'une lignée tumorale.

De nombreuses études en pharmacologie font aussi appel à des techniques de CMF: mise au point ou étude de drogues antimétabolites, immunothérapie.

D'autres recherches font appel à la CMF: l'analyse des chromosomes, la physiologie végétale (ploïdie, contenu en ADN, pour la sélection des plantes les plus résistantes), l'océanographie...

Annexe C

PUBLICATIONS DANS DES REVUES A COMITES DE LECTURE

1. **A. Prorot, C. Eskicioglu, R. Droste, C. Dagot et P. Leprat (2008)**, Assessment of physiological state of microorganisms in activated sludge with flow cytometry: application for monitoring sludge production minimization, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **35** : 1261-1268.
2. **C. Eskicioglu, A. Prorot, J. Marin, R.L. Droste et Kennedy, K.J. (2008)** Synergetic pretreatment of sewage sludge by microwave irradiation in presence of H₂O₂ for enhanced anaerobic digestion. *Water Research*. **42**: 4674-4682.
3. **M.R.Salsabil, A Prorot, M. Casellas et C. Dagot**, Pre-treatment of activated sludge: Effect of sonication on aerobic and anaerobic digestibility, *Chemical Engineering Journal*, Article in Press.

Annexe D

CURRICULUM VITAE DETAILLE

Janvier 2009

CURRICULUM VITAE DETAILLE

- **CURRICULUM VITAE**

- **BILAN D'ACTIVITES**

- RECHERCHE
- ENSEIGNEMENT ET ENCADREMENT
- ADMINISTRATION ET RESPONSABILITES COLLECTIVES

- **Liste des titres et travaux**

- PUBLICATIONS
- COMMUNICATIONS
- RAPPORTS

PROROT Audrey

Adresse professionnelle :

ENSIL

16, rue Atlantis

87000 LIMOGES

Tél. : 05 55 42 36 70

Fax : 05 55 42 36 62

FONCTION ACTUELLE

Depuis novembre 2008 : Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) à l'ENSIL, Université de Limoges (87)

FORMATION

2008 : Docteur en "Biologie, Sciences, Santé", Université de Limoges, dans le cadre d'une convention CIFRE (ADIV, Clermont Ferrand).

Sujet de thèse : **Approche comparative des effets microbiologiques et chimiques de traitements d'hydrolyse de boues urbaines dans le cadre de la réduction de leur production.**

Sous la responsabilité de : P. LEPRAT (Pr, UMR INRA 1061) et de C. DAGOT (Pr, GRESE)

Laboratoire de rattachement : Génétique moléculaire animale (UMR 1061 INRA)

2002/2003: Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées (DESS) de Biotechnologie mention génie cellulaire et moléculaire, Université de Limoges.

2001/2002: Maîtrise de Biochimie, Université de Limoges.

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Depuis le 01/11/2005 : Doctorante (STS) sous la direction de C. DAGOT (Pr) et P. LEPRAT (Pr). Sujet de recherche : Caractérisation comparée de l'avancement réactionnel et de l'efficacité des Procédés de Réduction de Production de Boues (PRPB).

01/2008-03/2008 : Stage doctoral de recherche sous la direction de Pr DROSTE – Department of Civil Engineering – University of Ottawa (Canada). Etude des effets d'un traitement thermique par micro-ondes couplé au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sur la réduction de production de boues : caractérisation des effets en termes de solubilisation de la matière organique et de biodégradabilité.

06/2005-10/2005 : Contractuelle de recherche – Société BORDAS (Objat, 19). Evaluation des propriétés germicides des systèmes UV Germi AP 60, UV Germi AD 200 et UV Germi Ultra 1000 par Biodosimétrie.

10/2003-05/2005 : Technicienne de laboratoire – ENSIL (Limoges, 87).

03/2003-09/2003 : Stage de DESS sous la direction de Vincent CARRE – Société Métis Biotechnologies (Limoges, 87). Mise au point de marquages par cytométrie en flux en vue de dénombrer Listeria monocytogenes dans les produits agroalimentaires.

03/2002-06/2002 : Stage professionnel de maîtrise de Biochimie sous la direction de Patrick LEPRAT – ENSIL (Limoges, 87). Apport de la cytométrie en flux dans l'évaluation des propriétés germicides des UV.

LANGUES ET INFORMATIQUE

Anglais: courant (lu, écrit, parlé).

Stage de recherche de 2 mois au Canada (Ontario), conférences internationales et rédaction de publications.

Espagnol : notions scolaires

Informatique : Utilisation de logiciels de bureautique (Word, Excel, Power Point) et bonne connaissance de Win MDI.

BILAN D'ACTIVITES

I. ACTIVITES DE RECHERCHE

○ **Stage professionnel de Maîtrise de Biochimie : Apport de la cytométrie en flux dans l'évaluation des propriétés germicides des UV (3 mois).**

Ce stage de maîtrise s'est déroulé à l'Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Limoges (ENSIL, 87) sous la direction de Patrick LEPRAT.

La désinfection de l'eau par rayonnement UV est un traitement physique, qui, entre autres avantages, possède la propriété de ne pas entraîner la formation de sous produits nocifs. Cependant, leur mode d'action, qui consiste en une altération photochimique, peut générer des effets potentiellement réparables sur les microorganismes. Ainsi des bactéries traitées aux UV peuvent rester dans un état de vie ralentie pendant un certain temps, puis retrouver leur aptitude à se diviser. Ce sont les bactéries viables non cultivables (BVNC). L'évaluation des effets réels générés par les UV est donc problématique car cet état physiologique ne peut être mis en évidence par les techniques culturales classiques. L'objectif de ce stage était donc d'évaluer les capacités d'une autre technique, la cytométrie en flux (CMF), à mettre en évidence les différents états physiologiques de microorganismes traités par les UV. Pour cela, une eau artificiellement contaminée par *E.Coli* a été traitée aux UV. Les effets germicides ont ensuite été analysés par les deux types de techniques (techniques culturales classiques et CMF). Trois paramètres biologiques ont été testés par CMF : l'intégrité membranaire (marquage à l'IP), l'activité estérasique (marquage au FDA) et l'activité oxydo-réductrice (marquage au CTC). Bien que cette étude nous ait permis de mettre en évidence l'apparition de BVNC suite à un traitement UV, les différents marquages utilisés ne nous ont pas permis de tirer de conclusions définitives quant au devenir des BVNC.

Compétences acquises :

- Technique de numération microbiologique,
- Marquages fluorescents intracellulaires,
- Prise d'initiatives.

○ **Stage de DESS : Mise au point de marquages par cytométrie en flux en vue de dénombrer *Listeria monocytogenes* dans les produits agroalimentaires (6 mois).**

Ce stage a été réalisé au sein de la Société Métis Biotechnologies (Limoges, 87) sous la direction de Vincent CARRE.

Etant donné le danger potentiel que représente *Listeria monocytogenes* (*L.monocytogenes*), particulièrement chez les personnes immunodéprimées et les femmes enceintes, et étant donnée sa présence fréquente dans les industries agroalimentaires, il est important de la détecter rapidement et de la différencier des autres *Listeria*, qui elles, ne sont pas pathogènes. Cette nécessité d'une réponse rapide a entraîné le développement d'un grand nombre de techniques d'isolement et d'identification. L'objectif de ce stage était d'évaluer les capacités

de la cytométrie en flux à différencier *L.monocytogenes* des autres espèces de *Listeria* par l'utilisation de fluorochromes appropriés. Pour cela, nous avons choisi de mettre en évidence des différences d'activités enzymatiques. Deux activités enzymatiques ont été ciblées : l'activité sérine protéasique impliquée dans l'activation d'un facteur de virulence spécifique de *L.monocytogenes* la listeriolysine (LLO), et une activité alanine aminopeptidase présente chez toutes les *Listeria*, excepté *L.monocytogenes*. La DL-Alanine- β -Naphthylamide (DLA β N) couplée au Fast Red Violet (FRV) spécifique de l'alanine aminopeptidase a permis de différencier *L.monocytogenes* par une réaction colorimétrique. En revanche, cette différenciation n'a pu être mise en évidence par cytométrie en flux, en raison de la précipitation des cellules liée à l'ajout du FRV. De plus, aucune activité sérine protéasique n'a pu être mise en évidence chez *L.monocytogenes*, quel que soit le substrat testé, probablement en raison d'une impossibilité des sondes à pénétrer dans les cellules étant donné leur caractère Gram-.

Compétences acquises :

- Cytométrie en flux,
- Microscopie en épifluorescence,
- Mise en place et optimisation de protocoles expérimentaux,
- Gestion du stress lié aux contraintes industrielles.

o Contractuelle de recherche – Société BORDAS (Objet, 19) : Evaluation des propriétés germicides des systèmes UV Germi AP 60, UV Germi AD 200 et UV Germi Ultra 1000 par Biodosimétrie (4 mois).

L'objectif de ce travail consistait à déterminer la dose UV effective fournie par trois réacteurs: l'UV Germi AD 200, l'UV Germi Ultra 1000 et l'UV Germi AP 60 développés par la société Bordas. Pour cela, nous avons choisi une méthode expérimentale, la biodosimétrie, qui consiste à vérifier que la dose UV émise par un réacteur a inactivé une suspension bactérienne dont la sensibilité aux UV est bien connue (*Bacillus subtilis*). Cette méthode nous a ainsi permis de déterminer, à partir de la concentration en *Bacillus Subtilis* de l'eau contaminée avant et après traitement UV, la Réduction de Fluence Equivalente (REF) et d'en déduire le « débit maximum permis », (Q_{max}) pour chaque réacteur, en fonction de la transmittance du liquide à traiter pour une dose donnée (40 mJ/cm²).

Compétences acquises :

- Procédés physiques de décontamination,
- Biodosimétrie,
- Rigueur et méthode,
- Travail d'équipe,
- Adaptabilité aux exigences industrielles.

o Thèse de Doctorat : Caractérisation comparée de l'avancement réactionnel et de l'efficacité des Procédés de Réduction de Production de Boues (PRPB).

Ce travail a été réalisé à l'ENSIL sous la direction de C.DAGOT et de P.LEPRAT en collaboration avec l'Association de Développement des Industries de la Viande (ADIV, Clermont Ferrand, 63) dans le cadre d'une convention CIFRE.

Les Procédés de Réduction de Production de Boues (PRPB) basés sur des prétraitements d'hydrolyse ont pour vocation d'accélérer l'hydrolyse de la matière organique particulaire

d'une part et d'amplifier la croissance cryptique d'autre part. En effet, ces étapes étant considérées comme limitantes dans la conversion de la matière organique en biogaz, l'idée est d'appliquer un prétraitement (thermique, chimique ou mécanique) afin de réduire la taille des particules et ainsi augmenter leur biodégradation. La production de biogaz en serait augmentée et la quantité de boues résiduelles pourrait être réduite. Cependant, bien que ces procédés soient très étudiés à l'heure actuelle, très peu d'informations sont disponibles quant à leur impact réel sur la flore microbienne. Il est pourtant essentiel de bien comprendre le devenir de la population bactérienne soumise à ces prétraitements étant donné son rôle prépondérant dans la production de boues. L'objectif premier de ce travail est donc de développer une méthode analytique pertinente permettant d'évaluer les effets générés par ces prétraitements non seulement sur la solubilisation de la matière organique particulaire mais également sur la population bactérienne. Notre approche expérimentale s'oriente donc autour de ces 2 axes principaux : la solubilisation de la matière organique et le suivi de paramètres microbiologiques. La caractérisation et la comparaison des différents prétraitements sont ensuite effectuées selon l'approche analytique décrite précédemment. Afin d'être à même de transposer ces résultats à la réduction de production de boues, en terme d'application, la troisième partie de ce projet consiste à comparer les niveaux de biodégradabilité (aérobie et anaérobie) des boues issues de ces différents prétraitements.

Compétences acquises :

- Caractérisation physico-chimique des boues de station d'épuration,
- Application des techniques microbiologiques sur une matrice complexe (les boues activées),
- Gestion de projet scientifique,
- Esprit d'analyse et de synthèse,
- Persévérance,
- Valorisation des résultats : publications et communications orales.

○ **Stage doctoral de recherche : Etude des effets d'un traitement thermique par micro-ondes couplé au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sur la réduction de production de boues : caractérisation des effets en termes de solubilisation de la matière organique et de biodégradabilité.**

Ce travail a été réalisé à l'Université d'Ottawa (Canada) dans le département de Génie Civil sous la direction de R.DROSTE (Pr) grâce à un co-financement de l'Ecole Doctorale.

L'objectif de ce stage de recherche était de caractériser les effets générés par un traitement par micro-ondes combiné au peroxyde d'hydrogène sur des boues concentrées. Pour cela, plusieurs paramètres ont été suivis avant et après traitement : la solubilisation et la répartition de la matière organique, la solubilisation des composants majoritaires des boues (saccharides et protéines), et la biodégradabilité *via* des tests de biométhanisation. Les résultats obtenus ont montré que, malgré une très nette augmentation de la solubilisation de la matière lorsque le traitement thermique est couplé au peroxyde d'hydrogène, la biodégradabilité des boues n'est pas améliorée. En effet, les échantillons de boues issus du traitement thermique seul, présentent un meilleur rendement en terme de production de biogaz.

Ce projet de recherche a fait l'objet d'une publication en collaboration avec le département de génie chimique de l'Université d'Ottawa.

Compétences acquises :

- Réalisation de test de biométhanisation,
- Analyses qualitatives et quantitatives de biogaz,
- Autonomie,
- Valorisation des résultats (présentation orale au sein d'un laboratoire étranger),
- Anglais courant.

II. ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT ET D'ENCADREMENT

○ Enseignement

Depuis 2005 j'enseigne à l'Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Limoges (ENSIL) en tant que vacataire pour un total de 96 h eq. TD.

Le tableau suivant synthétise les activités d'enseignement :

Année universitaire	Discipline	Nature	Volume horaire	Niveau
2005-2006	Biochimie ¹	TP	48	2 ^{ème} cycle Ingénieur
2006-2007	Biochimie	TP	48	2 ^{ème} cycle Ingénieur
2007-2008	Biochimie	TP	48	2 ^{ème} cycle Ingénieur

¹ **Travaux Pratiques de Biochimie (ENSIL – 2^{ème} cycle)**

En lien direct avec les Cours Magistraux et les Travaux Dirigés, ils font intervenir les concepts de base de la Biochimie (techniques séparatives des biomolécules et méthodes de dosages). L'objectif pédagogique est de permettre aux étudiants d'appréhender les concepts expérimentaux de base de la biochimie.

○ Encadrement d'étudiants :

J'ai également participé au co-encadrement de 2 stages dans ma thématique de recherche :

- **Co-encadrement de stage de MASTER**, MUNGKALASIRI Jitty, *Interaction des champs électriques pulsés avec des boues activées* (2003/2004 et 2004/2005).
- **Co-encadrement d'élèves ingénieurs** (stage tutoré, 2^{ème} année), BELLEC Cécile et RUCHAUD Delphine, *Evaluation de l'activité biologique des boues activées par cytométrie en flux* (2004/2005).

L'objectif de ces travaux d'initiation à la recherche était de sensibiliser les étudiants, en deuxième année de leur cursus ingénieur ou en MASTER, à la démarche scientifique de recherche. Ils devaient mener à bien un sujet de recherche : réalisation d'expériences, analyses des résultats, rédaction d'un rapport et soutenance.

Suite à l'obtention de mon DESS, j'ai également eu l'opportunité de travailler en tant que **technicienne de laboratoire** (ENSIL, 87). En plus de l'aspect strictement technique, cette expérience professionnelle m'a permise de participer aux différents Travaux Pratiques de la Spécialité « Eau et Environnement ». Ce travail m'a, par ailleurs, permis de développer mes connaissances sur le fonctionnement et l'intendance d'un laboratoire en termes de

négociations de commande, de gestion de matériels ainsi que sur la tenue de salles de recherche.

III. ACTIVITES ADMINISTRATIVES

- Depuis 2005, je participe chaque année aux jurys d'entretien d'admission des élèves ingénieurs de l'ENSIL.

- Par ailleurs, ayant effectué mon doctorat dans le cadre d'une convention CIFRE, j'étais l'interface fonctionnelle entre les responsables académiques de ma thèse et la direction de l'entreprise (ADIV) à laquelle j'étais rattachée.

LISTE DES TITRES ET TRAVAUX

○ Publications internationales avec comité de lecture

A. Prorot, C. Eskicioglu, R. Droste, C. Dagot, and P. Leprat. (2008) Physiological state of microorganisms assessment in activated sludge with flow cytometry: application to the sludge production minimization monitoring. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35 : 1261-1268.

Eskicioglu, C., Prorot, A., Marin, J., Droste, R.L., and Kennedy, K.J. (2008) Synergetic pretreatment of sewage sludge by microwave irradiation in presence of H₂O₂ for enhanced anaerobic digestion. *Water Research*. 42: 4674-4682.

M.R.Salsabil, A Prorot, M. Casellas, C. Dagot, Pre-treatment of activated sludge: Effect of sonication on aerobic and anaerobic digestibility, *Chemical Engineering Journal*.

○ Communications internationales

C. Dagot, A. Prorot, R. Salsabil, P. Leprat (2006) Characterization of the microbial activity within the framework of the minimization of excess sludge production. Fondation de l'Eau de Gdansk : disintegration of municipal sludge, Gdansk (Pologne).

A. Prorot, C. Dagot, and P. Leprat (2007) Application of flow cytometry to monitor physiological state of microorganisms in activated sludge – II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Séville (Espagne).

○ Actes dans un congrès international

A. Prorot, C. Dagot, and P. Leprat (2007) Application of flow cytometry to monitor physiological state of microorganisms in activated sludge – II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. Article soumis (24/03/2008).

○ Communications par affiche à un congrès international

R. Salsabil, A. Prorot, M. Casellas, C. Dagot, M. Baudu and P. Leprat (2007) Effect of ultrasonic on sludge solubilization by biological methods and flow cytometry –11e Congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Saint Etienne (France).

○ Rapports d'activité

Evaluation des propriétés germicides du système UV Germi AP-60 – Biodosimétrie. Société BORDAS (Objat, 19), 30 pages, (2005).

Evaluation des propriétés germicides du système UV Germi AD-200 – Biodosimétrie. Société BORDAS (Objat, 19), 30 pages, (2005).

Evaluation des propriétés germicides du système UV Germi Ultra 1000 – Biodosimétrie. Société BORDAS (Objat, 19), 25 pages, (2005).

Evaluation des capacités de la cytométrie en flux à mettre en évidence des microorganismes présents dans les boues biologiques. ANJOU RECHERCHE (Maison Laffite, 78), 25 pages, (2006).

Rapport technique de contrat « Caractérisation comparée de l'avancement réactionnel et de l'efficacité des Procédés de Réduction de Production de Boues (PRPB) des industries de la viande : validation des procédés de traitement des effluents ». ADIV (Clermont Ferrand, 63), 65 pages, (2005-2006).

Rapport technique de contrat « Caractérisation comparée de l'avancement réactionnel et de l'efficacité des Procédés de Réduction de Production de Boues (PRPB) des industries de la viande : validation des procédés de traitement des effluents ». ADIV (Clermont Ferrand, 63), 65 pages, (2006-2007).