

N° d'ordre : 01-2012

## UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science pour l'Environnement Gay-Lussac  
ENSIL  
Groupe de Recherche Eau Sol Environnement

### THESE

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Limoges  
Discipline : Chimie et Microbiologie de l'Eau

Présentée et soutenue publiquement par

**Kaïs JAZIRI**

Ingénieur INSAT en Biologie industrielle

Le 20 Janvier 2012

**Impact de la mise en œuvre de prétraitements thermique, chimique  
(ozone) et physique (ultrasons) sur la sensibilité au cadmium de  
boues secondaires lors de l'étape de stabilisation biologique**

Directeurs de thèse : Dr Magali CASELLAS-FRANÇAIS et Pr Christophe DAGOT

### JURY :

#### **Rapporteurs**

M. Moktar Hamdi, Professeur, INSAT Tunis  
M. Claude Maranges, Professeur, INSA Toulouse

#### **Examineurs**

M. Frédéric Monette, Professeur, ETS Québec  
M. Julien Laurent, Maître de conférences, ENGEES Strasbourg  
M. Théodore Bouchez, Ingénieur-Docteur, Animateur du laboratoire de microbiologie, IRSTEA Antony  
M. Michel Baudu, Professeur, FST Limoges  
M<sup>me</sup> Magali Casellas-Français, Maître de conférences, ENSIL Limoges  
M. Christophe Dagot, Professeur, ENSIL Limoges



N° d'ordre : 01-2012

## UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science pour l'Environnement Gay-Lussac

ENSIL

Groupe de Recherche Eau Sol Environnement

### THESE

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Limoges  
Discipline : Chimie et Microbiologie de l'Eau

Présentée et soutenue publiquement par

**Kais JAZIRI**

Ingénieur INSAT en Biologie industrielle

Le 20 Janvier 2012

**Impact de la mise en œuvre de prétraitements thermique, chimique  
(ozone) et physique (ultrasons) sur la sensibilité au cadmium de  
boues secondaires lors de l'étape de stabilisation biologique**

Directeurs de thèse : Dr Magali CASELLAS-FRANÇAIS et Pr Christophe DAGOT

### JURY :

#### **Rapporteurs**

M. Moktar Hamdi, Professeur, INSAT Tunis  
M. Claude Maranges, Professeur, INSA Toulouse

#### **Examineurs**

M. Frédéric Monette, Professeur, ETS Québec  
M. Julien Laurent, Maître de conférences, ENGEES Strasbourg  
M. Théodore Bouchez, Ingénieur-Docteur, Animateur du laboratoire de microbiologie, IRSTEA Antony  
M. Michel Baudu, Professeur, FST Limoges  
M<sup>me</sup> Magali Casellas-Français, Maître de conférences, ENSIL Limoges  
M. Christophe Dagot, Professeur, ENSIL Limoges



« Confronté à la roche, le ruisseau l'emporte toujours, non par la force mais par la persévérance. »

H. Jackson Brown



# Remerciements

Ce travail présenté dans cette thèse de doctorat a été réalisé au sein du Groupement de Recherche Eau Sol Environnement (GRESE, [grese.fr](http://grese.fr)) de l'Université de Limoges sur le site de l'Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Limoges (ENSIL, [www.ensil.fr](http://www.ensil.fr)) sous la direction du Professeur Christophe DAGOT et du Dr Magali CASELLAS-FRANÇAIS.

Je remercie le Professeur Michel BAUDU, directeur du GRESE, de m'avoir accueilli au sein de l'équipe et pour avoir accepté de présider ce jury.

J'exprime ma profonde reconnaissance à mes directeurs de thèse Madame Magali CASELLAS-FRANÇAIS et Monsieur Christophe DAGOT pour leurs encouragements, l'aide qu'ils m'ont apportée, le temps qu'ils m'ont consacré, la confiance et la responsabilité qu'ils m'ont accordées pour développer le nouvel outil moléculaire au laboratoire, et l'accord qu'ils m'ont donné pour procéder aux achats d'appareils et de consommables tout en respectant le budget inscrit dans le cadre de ces travaux.

Je voudrais dire à Madame CASELLAS que j'ai développé grâce à elle, la manière d'être exigeant envers moi-même et je la remercie encore une fois du soutien et de la persévérance qu'elle a manifestés tout au long de mes travaux de recherche.

Je remercie encore une fois Monsieur DAGOT pour son soutien qu'il a bien voulu manifester à mon égard surtout pendant les moments difficiles que j'ai connus au cours de ces trois années de thèse.

Je remercie messieurs : Moktar HAMDI, Professeur à l'INSAT Tunis et Claude MARANGES, Professeur à l'INSA Toulouse pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je tiens également à remercier monsieur Frédéric MONETTE, Professeur à L'ETS Québec, monsieur Julien LAURENT, Maître de conférences à l'ENGEES Strasbourg, monsieur Théodore BOUCHEZ, animateur du laboratoire de microbiologie à l'IRSTEA (CEMAGREF) Antony et monsieur Michel BAUDU, Professeur à la faculté des sciences et techniques de Limoges, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également monsieur Stefan GREEN, Directeur de recherche de l'unité « DNA Services » de l'Université de l'Illinois à Chicago (UIC-USA) pour son aide et ses conseils utiles pour l'outil moléculaire (PCR-DGGE) que j'ai réussi à développer avec succès au sein du GRESE.

Je remercie aussi le conseil régional du Limousin pour m'avoir attribué un financement à ce travail de thèse.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe du GRESE de la faculté des sciences et techniques et de l'ENSIL.

Merci Julien (Ficus) pour ta bonne humeur et surtout de m'avoir permis d'effectuer mes premières expérimentations moléculaires sur les échantillons des pilotes qui sans doute étaient bons et je te remercie aussi pour le transfert du savoir-faire, tes précieux conseils et idées sur la partie procédé du sujet. Merci à tous les permanents de l'ENSIL (Guy, Geneviève, Serge, Rudy, Virginie, Audrey, Marie-Line, David, Corinne et Philippe). Merci à tous les doctorants et post-doctorants que j'ai côtoyés pendant cette thèse : Thouraya CHANTOU pour son soutien moral, sa bonne humeur et de m'avoir soutenu surtout durant la dernière phase de la thèse. Merci Jean-Noël LOUVET pour la joie que tu apportes chaque jour au bureau, les échanges constructifs et le soutien réciproque (Recherche ?). Merci Junfeng WAN pour ta disponibilité et surtout les bons moments qu'on a passés ensemble. Merci Thibault STALDER, Naïma TAHRAOUI, Brahim BOUHADIBA, Delphine DELACHASSAGNE, Maud LE LOUP (toutes les deux c'est difficile de s'occuper de la salle café en première année de thèse ?), Moussab AL RAHMOUN et Mutassem AL MANSOURI. Merci aux stagiaires et Masters particulièrement Romain GUIGNARD, Ryma AL CHAAR et Lise SHULTZ.

# Dédicaces

Je dédie ce travail :

A la mémoire de ma regrettée grand-mère Khadija veuve du Général Slim JAZIRI dit DZIRI, Ministre plénipotentiaire auprès du Bey de Tunis Ahmed II et Commandeur de la légion d'honneur Française. Elle m'a élevé, elle nous a quittés pendant le début de ma thèse et cela m'a beaucoup chagriné.

A mon père qui m'a apporté son plus grand soutien moral et autre et qui m'a entouré d'amour, de tendresse et d'affection dès mon jeune âge. Merci papa pour tes conseils et les échanges quotidiens. C'est un grand sacrifice d'être loin des siens mais les priorités passent toujours avant, tout comme d'ailleurs tu me l'as appris.

A ma mère qui en me mettant au monde m'a offert l'opportunité d'apprécier cette réussite. A mes frères Karim, Mahdi, Mourad auxquels je souhaite une vie pleine de bonheur, de réussite et de prospérité.

A ma famille en général et en particulier à ma toute première nièce Chayma, venue au monde durant ma thèse.

A tous mes amies et amis qui se reconnaîtront.

Et enfin, à Faten ma princesse avec qui je partage ma vie, mes joies et mes peines, et qui m'a apporté son soutien indéfectible ainsi que son aide scientifique à travers les discussions régulières et constructives, et pour son hardiesse, son zèle et courage d'avoir pu supporter l'éloignement (Toulouse - Limoges : C'est loin ?). Et en guise de conclusion, bon courage Docteur Faten JAZIRI.



# Liste des publications et communications liées à cette thèse

Laurent J., **Jaziri K.**, Guinard R., Casellas M., Dagot C. Comprehensive insight of the performances of excess sludge reduction by low temperature thermal treatment at pilot scale: COD and N removal, bacterial populations, fate of heavy metals, *Process Biochemistry*, Volume 46 (9), pp. 1808-1816, **2011**.

**Jaziri K.**, Casellas M., Dagot C. Comparing the effects of three pre-treatment disintegration techniques on aerobic sludge digestion: biodegradability enhancement and microbial community monitoring by PCR–DGGE. *Environmental Technology (United Kingdom)*, Volume 33 (10-12), pp. 1435-1444, **2012**.

**Jaziri K.**, Casellas M., Laurent J., Dagot C. Analysis of the effects of low thermal treatment on activated sludge sensitivity to cadmium during batch tests experiments: respirometric and enzymatic activities measurements. Submitted (2012).

**Jaziri K.**, Stalder T., Casellas M., Dagot C. Thorough study of the effects of low thermal treatment on waste activated sludge structure, activity and microbiological diversity. (Submitted 2012).

**Jaziri K.**, Casellas M., Dagot C. Microbial and enzymes activities responses to Cd for sonicated activated sludge on aerobic digestion. (in prep.)

**Jaziri K.**, Casellas M., Dagot C. Anaerobic digestion of sonicated sludge-physicochemical properties-cadmium effects and microbial communities assesment. (in prep.)

## Communications orales

**Jaziri K.**, Guinard R., Laurent J., Casellas M., Dagot C. Conséquences de l'introduction d'un PRPB sur la communauté bactérienne dans un procédé à boues activées par une approche moléculaire : PCR-DGGE, 8<sup>ème</sup> congrès international du GRUTTEE « Ressources en eau : Quels outils scientifiques pour une gestion durable de leur qualité ? », Nancy (France), 26-28 Octobre **2009** (Communication orale, résumé étendu).

**Jaziri K.**, Casellas M., Dagot M. Comparaison de l'impact de prétraitement de réduction de boue (traitement thermique 90°C et sonication 165000 kJ/kg MS) sur la communauté microbienne utilisant la PCR-DGGE des fragments d'ADNr 16s et ciblant les populations bactériennes. Le 2<sup>ème</sup> colloque francophone PLUridisciplinaire sur les Matériaux, l'Environnement et l'Electronique (PLUMEE 2011), 30 Mai – 1<sup>er</sup> Juin **2011** Limoges, France.

Casellas M, Salsabil R, **Jaziri K**, Laurent J, Dagot C. Utilisation des ultrasons pour réduire la production de boues : Retour d'expérience. Journées Ultrasons : Sonochimie et Procédés, 4 et 5 Juillet **2011**, Grenoble, France.

### **Communications par affiche**

**Jaziri K.**, Casellas M., Dagot M. Impact of Sludge Minimization Technology on Aerobic Sludge Digestion Sensitivity to Cadmium. Water & Industry 2011, IWA Specialist Conference - Chemical Industries, 2<sup>nd</sup> May – 4<sup>th</sup> May **2011**, Valladolid, Spain.

# Table des matières

<b>Introduction générale .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>Chapitre 1 - Synthèse bibliographique .....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>1. La production de boue dans les ouvrages de traitement des eaux usées et la problématique des métaux .....</b>	<b>- 7 -</b>
1.1. La production de boue dans les ouvrages d'épuration des eaux usées.....	- 7 -
1.1.1. Origine et quantité des boues produites .....	- 7 -
1.1.2. La structure des boues secondaires.....	- 9 -
1.2. Les métaux lourds dans les boues .....	- 12 -
1.2.1. Sources et concentrations des métaux lourds dans les boues d'épuration.....	- 12 -
1.2.2. La qualité des boues : aspect réglementaire.....	- 15 -
1.2.3. Les phénomènes régissant la répartition des espèces métalliques dans les boues activées.....	- 15 -
1.2.3.1. Aspects mécanistiques du devenir des métaux dans les boues activées.....	- 16 -
1.2.3.2. Les paramètres influant les mécanismes .....	- 19 -
1.2.4. Mesure de la spéciation des métaux dans les boues.....	- 23 -
1.2.5. La toxicité des métaux envers les microorganismes des boues activées.....	- 25 -
1.2.5.1. Mécanismes .....	- 25 -
1.2.5.2. Mesure de la toxicité des métaux .....	- 27 -
1.2.5.3. Adaptation des microorganismes à la toxicité des métaux.....	- 29 -
1.3. Conclusion de la première partie du Chapitre 1 .....	- 32 -
<b>2. La stabilisation biologique des boues : amélioration des performances des procédés et devenir des métaux.....</b>	<b>- 33 -</b>
2.1. La digestion aérobie .....	- 34 -
2.1.1. Principe et performances .....	- 34 -
2.1.2. Facteurs limitant l'efficacité de la digestion .....	- 36 -
2.1.3. Modifications de la spéciation des métaux au cours de la digestion aérobie .....	- 38 -
2.2. La digestion anaérobie .....	- 39 -
2.2.1. Principe et performances .....	- 39 -
2.2.2. Facteurs limitant l'efficacité de la digestion anaérobie.....	- 41 -
2.2.3. Modifications de la spéciation des métaux .....	- 44 -
2.3. Amélioration des performances de digestion aérobie et anaérobie : les prétraitements.....	- 45 -
2.3.1. La sonication .....	- 46 -
2.3.1.1. Principe.....	- 46 -
2.3.1.2. Modifications des propriétés des boues après sonication .....	- 47 -
2.3.1.3. Amélioration des performances de réduction de boue en amont d'une digestion.....	- 53 -
2.3.2. Le traitement thermique .....	- 57 -
2.3.2.1. Principe.....	- 57 -
2.3.2.2. Modification des propriétés des boues .....	- 57 -
2.3.2.3. Amélioration des performances de digestion .....	- 61 -
2.4. Conclusion de la deuxième partie du Chapitre 1.....	- 67 -
2.5. Références bibliographiques: .....	- 68 -
<b>Chapitre 2 - MATERIELS ET Méthodes.....</b>	<b>- 89 -</b>
<b>1. Matériels et dispositifs expérimentaux.....</b>	<b>- 91 -</b>
1.1. L'origine des boues.....	- 91 -
1.2. Les traitements d'hydrolyse des boues.....	- 92 -

1.2.1. La sonication .....	- 92 -
1.2.2. Le traitement thermique basse température .....	- 93 -
1.2.3. L'ozonation .....	- 93 -
1.3. Les tests de stabilisation aérobie et anaérobie .....	- 96 -
1.3.1. Digestion aérobie mésophile des boues en mode batch .....	- 96 -
1.3.2. Digestion anaérobie mésophile des boues en mode batch .....	- 97 -
<b>2. METHODES .....</b>	<b>- 98 -</b>
2.1. Séparation des phases solubles et particulières .....	- 100 -
2.2. Caractérisation physique, chimique et biochimique des boues .....	- 102 -
2.2.1. La détermination de la quantité de matière et de sa répartition .....	- 102 -
2.2.2. Caractérisation chimique et biochimique des boues .....	- 102 -
2.2.2.1. Dosage de la demande chimique en oxygène (DCO) .....	- 102 -
2.2.2.2. Le dosage des protéines et des substances de types humiques .....	- 103 -
2.2.2.3. Le dosage des polysaccharides .....	- 104 -
2.2.2.4. Le dosage du carbone organique dissous (COD) .....	- 105 -
2.2.2.5. Le dosage des cations et anions majeurs .....	- 105 -
2.2.2.6. La caractérisation des fonctions chimiques dans les phases solubles et particulières des boues .....	- 105 -
2.3. Mesure des activités enzymatiques .....	- 108 -
2.3.1. Les protéases .....	- 108 -
2.3.2. Les lipases .....	- 109 -
2.3.3. Alpha et bêta Glucosidases .....	- 109 -
2.4. Le dosage des éléments métalliques dans les boues .....	- 110 -
2.4.1. La préparation des échantillons .....	- 110 -
2.4.2. La spectrométrie d'adsorption atomique flamme (FAAS) .....	- 111 -
2.4.3. Spectrométrie d'adsorption atomique four (ETAAS) .....	- 111 -
2.4.4. Mesure de la spéciation du cadmium dans les boues .....	- 112 -
2.5. Mesure de l'action du prétraitement sur le taux de solubilisation et sur les performances épuratoires : .....	- 112 -
2.5.1. Taux de solubilisation après le traitement .....	- 112 -
2.5.2. Performances épuratoires .....	- 113 -
2.6. Mesure de l'activité respiratoire .....	- 113 -
2.6.1. Mesure du volume et de la composition du ciel gazeux .....	- 113 -
2.6.2. Calcul des vitesses instantanées et modélisation de l'inhibition par le cadmium, détermination de la CI50. ....	- 114 -
2.7. La caractérisation des populations microbiennes par la biologie moléculaire .....	- 116 -
2.7.1. La méthode d'extraction des ADNg totaux .....	- 116 -
2.7.2. L'amplification par PCR de la région V3 de l'ADNr 16S .....	- 117 -
2.7.3. La discrimination par DGGE des amplicons et analyse des données .....	- 120 -
2.7.4. Séquençage de fragments d'ADN .....	- 121 -
2.7.5. Analyse phylogénétique .....	- 121 -
2.8. Expériences effectuées .....	- 122 -
2.9. Références bibliographiques .....	- 125 -
<b>Chapitre 3 – Comparaison des effets de 3 prétraitements par désintégration (thermique, chimique, ultrasons) sur les performances et les communautés microbiennes lors de l'étape de stabilisation aérobie. ....</b>	<b>- 127 -</b>
<i>Comparing the effects of three pre-treatment disintegration techniques on aerobic sludge digestion: biodegradability enhancement and microbial community monitoring by PCR–DGGE .....</i>	<i>- 146 -</i>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>- 147 -</b>

<b>2. Materials and methods.....</b>	<b>- 149 -</b>
2.1. Sample collection and preparation .....	- 149 -
2.2. Sludge treatment.....	- 150 -
2.3. Aerobic digestion .....	- 150 -
2.4. Analytical methods.....	- 151 -
2.5. Molecular analysis .....	- 151 -
2.5.1. DNA extraction .....	- 151 -
2.5.2. PCR–DGGE analysis .....	- 151 -
2.6. Calculations.....	- 152 -
<b>3. Results and discussion.....</b>	<b>- 153 -</b>
3.1. Biochemical and molecular sludge characteristics after pre- treatment.....	- 153 -
3.1.1. Biochemical soluble phase modifications.....	- 153 -
3.1.2. DGGE patterns after sludge pre-treatment .....	- 154 -
3.2. Improvement in aerobic digestion.....	- 157 -
3.3. DGGE patterns after batch aerobic sludge digestion .....	- 159 -
<b>4. Conclusions .....</b>	<b>- 163 -</b>
<b>References .....</b>	<b>- 164 -</b>
<b>Chapitre 4 –Analyse des effets d’un prétraitement thermique basse température sur la sensibilité au cadmium de boues activées lors de l’étape de stabilisation biologique: mesure des activités respiratoires et des activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme .....</b>	<b>- 169 -</b>
<i>Analysis of the effects of low thermal treatment on activated sludge sensitivity to cadmium during aerobic batch tests experiments: respirometric and enzymatic activities measurements .....</i>	<i>- 173 -</i>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>- 174 -</b>
<b>2. Materials and Methods .....</b>	<b>- 176 -</b>
2.1. Samples preparation.....	- 176 -
2.2. Sludge thermal pre-treatment conditions .....	- 177 -
2.3. Cadmium concentration measurement .....	- 177 -
2.4. Batch aerobic digestion experiments.....	- 178 -
2.5. Enzymatic sludge activities measurement and residual activity calculation.....	- 178 -
2.5.1. Protease activity .....	- 179 -
2.5.2. Lipase activity .....	- 179 -
2.5.3. $\alpha$ and $\beta$ -glucosidase activities .....	- 180 -
2.5.4. Residual enzymatic activities calculation .....	- 180 -
2.6. Respirometric sludge activities assessment and inhibition modelling .....	- 180 -
<b>3. Results and discussion.....</b>	<b>- 181 -</b>
3.1. Effect of low thermal treatment on activated sludge respirometric sensitivity to Cadmium .....	- 181 -
3.2. Effect of low thermal treatment on activated sludge enzymatic activities sensitivity to cadmium during batch aerobic digestion .....	- 188 -
<b>4. Conclusions .....</b>	<b>- 194 -</b>
<b>References .....</b>	<b>- 195 -</b>

**Chapitre 5 – Effets d’un prétraitement thermique basse température (90°C, 2h) sur la diversité des populations bactériennes, sur les performances de réduction de boue : résultats obtenus sur la boucle de recirculation au niveau de la file eau et au niveau de l’étape de stabilisation sur la file boue..... - 201 -**

*Comprehensive insight of the performances of excess sludge reduction by 90°C thermal treatment coupled with activated sludge at pilot scale: COD and N removal, bacterial populations, fate of heavy metals..... - 208 -*

**1. Introduction ..... - 209 -**

**2. Methods ..... - 211 -**

- 2.1. Analytical methods..... - 211 -
- 2.2. Pilots..... - 212 -
  - 2.2.1. Conception ..... - 212 -
  - 2.2.2. Experimental conditions..... - 213 -
  - 2.2.3. Calculation of sludge production..... - 214 -
  - 2.2.4. Fate of heavy metals..... - 215 -
- 2.3. Bacterial populations assessment ..... - 215 -
  - 2.3.1. DNA extraction ..... - 215 -
  - 2.3.2. PCR..... - 215 -
  - 2.3.3. DGGE analysis..... - 216 -

**3. Results and discussion..... - 216 -**

- 3.1. Sludge production ..... - 217 -
- 3.2. Effluent and sludge characteristics..... - 217 -
- 3.3. Bacterial populations..... - 219 -
- 3.4. Fate of heavy metals..... - 223 -
  - 3.4.1. Copper..... - 224 -
  - 3.4.2. Cadmium..... - 225 -
- 3.5. Economical and energetic analysis ..... - 225 -

**4. Conclusions and perspectives ..... - 226 -**

**References ..... - 227 -**

*Low thermal treatment impact on the effectiveness of aerobic sludge digestion under cadmium exposure..... - 231 -*

**1. Introduction ..... - 232 -**

**2. Materials and Methods ..... - 234 -**

- 2.1. Samples preparation..... - 234 -
- 2.2. Sludge thermal pre-treatment conditions ..... - 235 -
- 2.3. Chemical and biochemical sludge composition ..... - 235 -
- 2.4. Cadmium concentration measurement ..... - 236 -
- 2.5. Batch mesophilic aerobic digestion experiments ..... - 236 -
- 2.6. Enzymatic sludge activities measurement..... - 237 -
  - 2.6.1. Protease ..... - 237 -
  - 2.6.2. Lipase ..... - 238 -
  - 2.6.3.  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase ..... - 238 -
- 2.7. Bacteria population diversity analysis by PCR-DGGE..... - 238 -
  - 2.7.1. DNA extraction ..... - 239 -

2.7.2. PCR-DGGE analysis .....	- 239 -
2.7.3 Sequencing of DNA fragments and phylogenic tree construction .....	- 240 -
2.7.4 Quantitative PCR protocol .....	- 240 -
2.8 Calculations.....	- 241 -
<b>3. Results and Discussion .....</b>	<b>- 242 -</b>
3.1 Effect of low thermal pre-treatment on sludge characteristics.....	- 242 -
3.1.1 Low thermal treatment effect on sludge solubilisation before aerobic digestion.....	- 242 -
3.1.2 Low thermal pre-treatment effect on enzymatic activity before aerobic digestion .....	- 244 -
3.1.3. Population changes due to heat treatment.....	- 245 -
3.2. Effect of cadmium exposure on aerobic sludge digestion performances: comparison of thermally pretreated and non pretreated sludges .....	- 250 -
3.3 Effect of cadmium exposure on aerobic sludge population diversity .....	- 254 -
3.3.1 Effect of cadmium exposure on population diversity during the aerobic stabilization step : case of non pre-treated sludge. ....	- 254 -
3.3.2 Effect of cadmium exposure on population diversity during the aerobic stabilization step: case of thermally pre-treated sludge.....	- 256 -
<b>4. Conclusions .....</b>	<b>- 262 -</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>- 263 -</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>- 267 -</b>



## Liste des figures

Figure 1-1. La production de boues dans les ouvrages classiques de traitement des eaux usées.....	- 7 -
Figure 1-2. Schéma synthétique de la production de boues secondaires.....	- 8 -
Figure 1-3. Pontage par les cations divalents (source : Sobeck et Higgins, 2002).....	- 10 -
Figure 1-4. Capacités bactériennes et les mécanismes de tolérance aux métaux lourds (source Valls <i>et al.</i> , 2002).....	- 31 -
Figure 1-5. Les différentes étapes de traitement et de valorisation des boues .....	- 33 -
Figure 1-6. Schématisation de l'étape d'hydrolyse lors de la digestion aérobie des boues activées.....	- 37 -
Figure 1-7. Abondance relative des quatre types de sites associés à leur pKa pour (a) la fraction particulaire (flocs) et (b) la phase soluble de boues soniquées. La contribution relative de groupements de type carboxyle augmente considérablement à la surface des flocs (Laurent, 2009). .....	- 50 -
Figure 1-8. Contributions relatives des types de sites associés à leur pKa pour (a) la fraction particulaire (flocs) et (b) la phase aqueuse de boues traitées thermiquement. La répartition des différents groupements évolue de manière significative (Laurent, 2009). .....	- 59 -
Figure 2-1. La station d'épuration de Limoges (1, Clarificateur ; 2, Recirculation des boues secondaires ; 3, Digesteurs) (d'après une image satellite google map) .....	- 91 -
Figure 2-2. Schémas du dispositif utilisé pour le traitement des boues activées à l'ozone (source : Prerot, 2008) .....	- 93 -
Figure 2-3. Méthodologie mise en œuvre pour la thèse .....	- 99 -
Figure 2-4. Hydrolyse de l'azocaséine par la protéase.....	- 108 -
Figure 2-5. Hydrolyse du p-NPP par la lipase.....	- 109 -
Figure 2-6. Hydrolyse du p-nitrophényl-D-glucopyranoside par les gluosidases .....	- 110 -
Figure 2-7. Protocole d'analyse des échantillons de boues activées par PCR-DGGE .....	- 116 -
Figure 2-8. Appareil de DGGE : D-code system (Biorad).....	- 121 -
Figure 3-1. Arbre phylogénétique des trois domaines du monde vivant et qui a été réalisé à partir des séquences de l'ARN ribosomal 16S et 18S reconstruit avec les méthodes de maximum de vraisemblance et de parcimonie d'après DeLong et Pace (2011) .....	- 131 -
Figure 3-2. Les différentes étapes de l'étude des populations par biologie moléculaire (méthodes indirectes).....	- 132 -
Figure 3-3. Les composants de la PCR .....	- 133 -
Figure 3-4 . Stratégies de l'analyse des communautés microbiennes. ....	- 138 -
Figure 3-5. Schéma du principe de la DGGE.....	- 142 -
Figure 3-6. (A) DGGE profiles of 16S rRNA genes. Activated sludge samples: (1) activated sludge from aeration basin of Limoges WWTP = inoculum; (2) returned activated sludge; (3) heat-treated returned activated sludge, (4) return activated sludge treated with ultrasound, (5) return activated sludge treated with ozone (B) Schematic of overall DGGE banding patterns showing band number (side bars) for the five samples previously cited.....	- 156 -
Figure 3-7. (A) DGGE profiles of 16 r RNA genes. Activated sludge samples ; (T0) Before aerobic digestion; (TF) After aerobic digestion ; (NT) untreated samples; (T°) heat-treatment ; (US) sonicated samples ; (O3) ozonated samples ;(B) Schematic of overall DGGE banding patterns showing band number (side bars) for the seven samples previously cited.....	- 160 -
Figure 4-1. Evolution of qCO <sub>2</sub> max as a function of cadmium concentration for pre-treated or untreated sludge .....	- 182 -
Figure 4-2. Evolution of qCO <sub>2</sub> max as a function of cadmium concentration for treated sludge. ....	- 182 -

Figure 4-3. Percentage of metal sorbed to the sludge as a function of cadmium added before aerobic digestion. ....	185 -
Figure 4-4. Percentage of metal sorbed to the sludge as a function of cadmium added at the end of aerobic digestion. ....	185 -
Figure 4-5. Cadmium speciation in heat treated sludge. ....	187 -
Figure 4-6. Cadmium speciation in the particulate phase of heat treated sludge. ....	187 -
Figure 4-7. Lipase residual activity (expressed in percentage of the initial activity) for treated and non treated sludge at the end of aerobic digestion for increasing cadmium (CdCl <sub>2</sub> ) concentrations. ....	190 -
Figure 4-8. Protease residual activity (expressed in percentage of the initial activity) for treated and non treated sludge at the end of aerobic digestion for increasing cadmium (CdCl <sub>2</sub> ) concentrations. ....	191 -
Figure 4-9. Beta-glucosidase residual activity (expressed in percentage of the initial activity) for treated and non treated sludge at the end of aerobic digestion for increasing cadmium (CdCl <sub>2</sub> ) concentrations. ....	193 -
Figure 4-10. Alpha-glucosidase residual activity (expressed in percentage of the initial activity) for treated and non treated sludge at the end of aerobic digestion for increasing cadmium concentrations. ....	193 -
Figure 5-1. Positionnement du prétraitement thermique lors des études sur la file eau et sur la file boue .....	203 -
Figure 5-2. Schematic diagram of the combined thermal treatment / activated sludge process.....	213 -
Figure 5-3. Sludge production yield with and without 90°C treatment of return activated sludge. VSS production was 30.4% lower in the thermal treatment combined system .....	217 -
Figure 5-4. Effluent quality during pilot scale experiments. (a) Effluent soluble COD concentration (b) Soluble COD degradation yield (c) Effluent TSS concentration (d) TSS elimination yield. Effluent quality was worsened in terms of COD and TSS removals in the thermal treatment combined reactor.....	218 -
Figure 5-5. DGGE patterns of 16S ribosomal DNA (rDNA) fragments from untreated pilot samples collected once a week until 63 days.....	220 -
Figure 5-6. Characterization of bacterial population evolutions within in the activated sludge process coupled with 90°C thermal treatment (a) DGGE band patterns of bacterial 16S rDNA obtained from tank aeration of treated pilot. PCR products were synthesized with the bacterial primer pair 341f-GC/518r. Numbering 0-9 correspond to sampling once a week until the end of treatment (steady state). (0) State before treatment, (1 à 9) State after treatment. The black dots show bands intensified by the treatment, while white dots show bands disappeared or attenuated by the treatment. (b) A schematic representation of overall DGGE banding patterns showing band number (side bars) and generated from Quantity One which is based on bands presence or absence. All percentages shown below this image are defined in comparison with the first DGGE profile (0). (c) Dendrogram representing genetic similarity of microbial communities in 16S eubacterial DGGE patterns based on UPGAMA cluster analysis. The dendrogram was generated using the Quantity One Software (Bio-Rad). This phylogenetic tree is a statistically optimal representation of the similarities between DGGE profiles based on Table 5-2 and UPGMA. It was constructed from the bacterial DGGE profiles to describe the relationship of bacterial community among samples.....	221 -
Figure 5-7. Metal mass balance at the outlet of the pilots: (a)Copper fluxes at the outlet of the pilots ; (b) Copper and cadmium concentrations in excess sludge from the two pilots on a dry weight basis. Contrary to control reactor, Cu was released from the thermal treatment combined system mostly through the treated effluent .....	225 -

Figure 5-8. (a) DGGE profiles of 16S rRNA genes. Untreated (NT) RAS on the left and treated (T) RAS on the right of the electrophoresis gel; (b) Concentration of gene encoding 16S rRNA in non-treated (NT) and treated recirculation sludge; (c) Phylogenetic tree of bacteria in the activated sludge and closely related sequences retrieved from NCBI GenBank were given together with their names. Number at nodes indicated bootstrap values (expressed as percentage of 100 replications). Bar 0.05 nucleotide substitution per position .....	247 -
Figure 5-9. (a) Protein removal in total fractions of both treated and control digested sludge; (b) Humic-like substances removal in total fractions of both treated and control digested sludge; (c) Carbohydrate removal in total fractions of both treated and control digested sludge; (d) TSS removal in total fractions of both treated and control digested sludge .....	253 -
Figure 5-10. (a) DGGE profiles of 16S rRNA of control mixture (non treated). (TT): heat-treated sludge, (NT): untreated sludge, (T0): State before digestion (TF): State after sludge digestion samples: (1) sludge mixture without metal addition ; (2) sample in the absence of metal (3) ; sample with 1 mg/L cd ; (4) sample with 2 mg/L of cd ; (5) sample with 3 mg/L cd ; (6) sample with 5 mg/L cd ; (7) sample with 7 mg/L cd ; (8) sample with 10 mg/L cd ; (9) sample with 20 mg/L cd ; (10) sample with 40 mg/L of cd ; (11) sample with 100 mg/L cd; (b). Dendrogram representing genetic similarity of microbial communities using DGGE profiles (Fig. 5-10a) of the genes coding for bacterial 16s. The same numbers (1-11) are used in Fig. 5-10a with (1') sludge mixture without metal - and before digestion.....	255 -
Figure 5-11. (a) DGGE profiles of 16S rRNA of treated sludge mixture (90°C). (TT): heat-treated sludge, (NT): untreated sludge, (T0): State before digestion (TF): State after sludge digestion samples: (1) sludge mixture without metal addition ; (2) sample in the absence of metal (3) ; sample with 1 mg/L cd ; (4) sample with 2 mg/L of cd ; (5) sample with 3 mg/L cd ; (6) sample with 5 mg/L cd ; (7) sample with 7 mg/L cd ; (8) sample with 10 mg/L cd ; (9) sample with 20 mg/L cd ; (10) sample with 40 mg/L of cd ; (11) sample with 100 mg/L cd; (b). Dendrogram representing genetic similarity of microbial communities using DGGE profiles (Fig. 5-11a) of the genes coding for bacterial 16s. The same line numbering is used in Fig. 5-11a. (1) Sample of Fig. 5-10a (untreated samples before digestion).....	257 -
Figure 5-12. Impact of increasing cadmium concentration on bacteria population similarity (%) at the end of aerobic digestion for raw activated sludge and thermally pre-treated activated sludge.....	259 -



# Liste des tableaux

Tableau 1-1. Part de métal entrant fixée par les boues (Miquel, 2003).....	14 -
Tableau 1-2. Concentrations en métaux lourds dans les boues résiduaire de plusieurs stations d'épuration ( $\mu\text{g/g}$ ) .....	14 -
Tableau 1-3. Valeurs limites de concentrations et de flux en éléments traces apportés par les boues selon la réglementation française (arrêté du 8 janvier 1998).....	15 -
Tableau 1-4. Quelques exemples de séquences d'affinité des ETM vis-à-vis des boues et des PEC .....	19 -
Tableau 1-5. Principaux ligands associés aux PEC (Decho, 2000).....	21 -
Tableau 1-6. Capacités des PEC à lier un métal extraites de la littérature .....	21 -
Tableau 1-7. Comparaison des différentes méthodes d'extraction séquentielle des métaux dans les boues .....	24 -
Tableau 1-8. Concentrations inhibitrices en cadmium et autres métaux lourds .....	27 -
Tableau 1-9. Avantages et inconvénients des digestions aérobie et anaérobie des boues (OTV, 1997).....	34 -
Tableau 1-10. Concentrations inhibitrices IC50 pour la méthanogenèse et l'acidogenèse (mg/L) pour différentes espèces métalliques .....	43 -
Tableau 1-11. Concentrations inhibant en cuivre à 50% l'hydrolyse, l'acidogenèse et la méthanogenèse (en mg/L) (Lin <i>et al.</i> ,2008).....	44 -
Tableau 1-12. Solubilisation de la matière organique suite à un traitement par ultrasons .....	48 -
Tableau 1-13. Amélioration des performances des digestions aérobies et anaérobies par un prétraitement aux ultrasons. (En partie de Carrère <i>et al.</i> , 2010) .....	55 -
Tableau 1-14. Effets du traitement thermique sur la solubilisation des boues .....	58 -
Tableau 1-15. Amélioration des performances de la digestion aérobie et anaérobie suite à un prétraitement thermique basse température .....	62 -
Tableau 1-16. Amélioration des performances de la digestion anaérobie suite à un prétraitement thermique haute température .....	64 -
Tableau 2-1. Les caractéristiques moyennes des boues utilisées .....	92 -
Tableau 2-2. Composition des fioles lors des tests batch de digestion aérobie mésophile.....	97 -
Tableau 2-3. Composition des fioles lors des tests batch de digestion anaérobie mésophile.....	98 -
Tableau 2-4. Protocoles utilisés au cours des différentes analyses pour séparer la phase soluble de la phase particulaire .....	100 -
Tableau 2-5. Techniques de caractérisation des propriétés physiques, chimiques et biochimiques de phases particulières et solubles des boues .....	101 -
Tableau 2-6. Protocole de dosage des protéines et des substances de type humique .....	104 -
Tableau 2-7. Protocole de dosage des polysaccharides .....	105 -
Tableau 2-8. Méthodes utilisées pour le dosage des éléments métalliques par SAA dans la flamme .....	111 -
Tableau 2-9. Méthodes utilisées pour le dosage des éléments métalliques par ETAAS .....	112 -
Tableau 2-10. Méthodes de mesure du volume et de la composition du biogaz lors des tests de digestion en mode batch. ....	114 -
Tableau 2-11. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN (F=Forward=sens ; R=Reverse=antisens).....	118 -
Tableau 2-12. Composition du mix PCR pour 100 $\mu\text{L}$ de réaction.....	119 -
Tableau 2-13. Conditions opératoires de la PCR-DGGE .....	119 -
Tableau 2-14. Traitements et analyses effectuées au cours de ce projet de thèse .....	122 -

Tableau 3-1. Les amorces principales amorces utilisées pour l'amplification des ADN 16S pour les populations de bactéries et d'archaea.....	- 135 -
Tableau 3-2. Les principaux avantages et inconvénients des techniques de biologie moléculaire citées ci avant.....	- 139 -
Table 3-3. Effects of the pre-treatment on chemical and biochemical sludge composition.....	- 149 -
Table 3-4. Similarity and dissimilarity matrices for the five sludge samples (1) activated sludge from aeration basin of Limoges Wastewater treatment plant (WWTP) = inoculum; (2) return activated sludge; (3) heat-treated return activated sludge, (4) return activated sludge treated with ultrasound, (5) return activated sludge treated with ozone.....	- 155 -
Table 3-5. Improvement in aerobic digestion (at the end operation period).....	- 158 -
Table 3-6. Similarity and dissimilarity matrices for the sludge samples at the end of aerobic digestion.....	- 161 -
Table 4-1. AS and RAS characteristics.....	- 177 -
Table 4-2. $I_{max}$ and $K_I$ values determined with the model for thermally pre-treated and non treated sludge.....	- 184 -
Table 4-3. Estimation of the residual enzymatic activity in the soluble phase for increasing cadmium concentrations for thermally treated and non treated sludge at the end of aerobic digestion.....	- 189 -
Tableau 5-1. Récapitulatif des procédés affectant les populations microbiennes démontré par PCR-DGGE.....	- 204 -
Table 5-2. Dice coefficient similarity matrix generated from DGGE fingerprints from pilot with thermal treatment.....	- 222 -
Table 5-3. Energetic balance of 90°C treatment of return activated sludge.....	- 226 -
Table 5-4. Activated sludge (AS) and raw activated sludge (RAS) characteristics.....	- 235 -
Table 5-5. Matter solubilization after RAS thermal treatment (90°C, 2h).....	- 243 -
Table 5-6. Ionic species in soluble fraction (22µm) for both control and heat-treated RAS.....	- 243 -
Table 5-7. Enzymatic activities residual activities measurements (protease, lipase alpha and beta glucosidase) and soluble residual enzymatic activities before (Non treated sludge: NT) and after thermal treatment (Thermally treated sludge: TT).....	- 245 -
Table 5-8. Sequences closely related to DGGE bands.....	- 248 -
Table 5-9. Presence (+) or absence (-) of the species of interest at the end of the aerobic digestion in thermally treated and untreated sludge.....	- 260 -

## Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNr :	Acide désoxyribonucléique ribosomal
AGV :	Acide gras volatil
AOB :	Ammonium Oxidizing Bacteria
ARN :	Acide ribonucléique
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomal
AT :	Adénine – Thymine
ATAD :	Autothermal Aerobic Digester
BA :	Bassin d'Aération
BD :	Boues du digesteur
BET :	Bromure d'ETHidium
C/N :	Rapport Carbone sur Azote (DCO/NTK)
COD :	Carbone Organique Dissous (mg C/L)
D/TGGE :	Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis
DCO :	Demande Chimique en Oxygène (mgO <sub>2</sub> /L)
DD :	Dégré de désintégration
DOM :	matières organiques dissoutes
EDTA :	Ethylène diamine tétracétique (Acide)
EH :	Equivalent Habitant
ETAAS :	Spectrométrie d'Absorption Atomique par atomisation Electro-Thermique
ETM :	Eléments Traces Métalliques
FAAS :	Spectrométrie d'Absorption Atomique par atomisation de Flamme

FISH :	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
GC :	Guanine - Cytosine
ICPE :	Installation Classée pour la Protection de l'Environnement
IFEN :	Institut Français de l'Environnement
LEMA :	Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques
MES :	Matières En Suspension (g/L)
MS :	Matières Sèches
MVS :	Matières Volatile en Suspension (g/L)
pb :	paire de bases
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PEC :	Polymères extracellulaires
PRPB:	Procédé de Réduction de la Production de Boues
RAPD :	Random amplification polymorphisme DNA
RDP :	Ribosomal Database Project
RPM :	Rotation per minute
rRNA	Ribosomal RNA
SSCP :	Single strand conformation polymorphisme
STEP :	Station d'Épuration
T-RF :	Terminal Restriction Fragment
T-RFLP :	Terminal Restriction fragment lenght polymorphisme
TRH :	Temps de rétention hydraulique
UV :	Ultrat Violet

# INTRODUCTION GENERALE

Les boues d'épuration constituent un déchet issu des différentes étapes de l'épuration des eaux. Les boues primaires sont produites dès les premières étapes par décantation des particules contenues dans l'effluent. Les boues secondaires sont issues du traitement biologique et éventuellement du traitement tertiaire (plutôt physico-chimique) lors des étapes d'élimination de l'azote et du phosphore. Mais les boues sont également un produit structuré, riche en microorganismes, en composés biologiques et minéraux, particulaires, colloïdaux, dissous, siège de réactions enzymatiques ou biochimiques, d'interactions entre éléments et entre phases, qui en font un matériau complexe, dont l'étude et la maîtrise nécessitent la synthèse d'approches différentes.

En France fin 2002, la production annuelle de boues d'épuration municipales représentait 950000 tonnes de matières sèches (t MS), soit environ 9 millions de tonnes brutes (tous types de boues confondus). Les projections d'évolution de la production de boues d'épuration sont directement fonction des progrès du système d'assainissement des eaux usées (collecte et traitement). Concrètement, pour un taux de dépollution (part de la pollution traitée sur la pollution émise) évoluant de 49 % (2000) à 65 % (objectif fixé par les pouvoirs publics), la production de boues d'épuration atteindrait, 1 100 000 tonnes soit une augmentation de 30 %.

La gestion des volumes de boues produites devient un véritable enjeu pour les traiteurs d'eau qui doivent de manière concomitante réduire les volumes et les masses produites, maîtriser leur siccité, leur salubrité (hygiénisation), et maintenir une qualité en accord avec leur mode d'évacuation (principalement la valorisation agricole en France). Les principales voies d'élimination des boues de station d'épuration sont : la mise en centre de stockage, l'incinération et l'épandage agricole. La mise en centre de stockage des déchets ultimes autrefois pratiquée est aujourd'hui réservée aux déchets non recyclables (décret n° 2002-540 du 18 avril 2002). Il est cependant possible d'obtenir des dérogations de mise en stockage pour les boues non conformes aux seuils autorisés pour les filières de valorisation ou pour des boues dont la valorisation est localement impossible dans des conditions économiquement acceptables. L'incinération, soit spécifique (il existe une quinzaine d'installations spécifiques d'incinération des boues), soit avec des déchets ménagers, représente 15 à 20 % du tonnage en France (Miquel, 2003). Cette voie d'élimination est plutôt privilégiée dans les grandes

agglomérations urbaines, car elle permet une valorisation thermique et un gain de place par rapport notamment à l'épandage. Cependant, l'incinération représente un coût important (investissement et fonctionnement), car elle génère la production de fumées et résidus à traiter et à revaloriser. La valorisation agricole par épandage des boues stabilisées est une des voies les plus usitées en France (50 à 60 % du tonnage) en raison de la disponibilité de surfaces agricoles, d'une volonté politique, de la mise en place d'une planification préalable et de coûts plus réduits. Toutefois, l'épandage souffre d'une mauvaise image et de l'absence jusqu'à récemment de fonds de garanties pour les agriculteurs en cas de pollutions par les boues. L'utilisation de boues d'épuration en agriculture est très réglementée (décret du 8 décembre 1997 et arrêté du 8 janvier 1998), réglementation qui impose des traitements, fixe des limites quant à la concentration maximale de certains polluants (métaux lourds par exemple) et interdit ou limite l'épandage sur certaines cultures (Gomez Palacios *et al.*, 2002). Cependant, même si cette filière est la plus « durable » (moins d'émissions et moins d'énergie consommée, réintroduction de la matière organique et de nutriments dans les cycles de la matière) (Suh et Roussaux, 2002), elle est de plus en plus controversée, compte tenu de l'augmentation des tonnages, de l'opinion publique, des difficultés de stockage et de manutention, du problème d'odeurs et des risques sanitaires et environnementaux (présence potentielle d'agents pathogènes et de composés toxiques). De plus, la valorisation agricole nécessite des surfaces disponibles et des stockages importants. Ce sont donc principalement les boues des petites et moyennes stations qui sont valorisées de la sorte. La traçabilité et la maîtrise de la qualité sont donc essentielles.

Dans ce contexte, l'étape de stabilisation des boues est une étape cruciale permettant de réduire le volume et la masse des boues produites. L'étape de stabilisation peut être conduite par voie chimique ou biologique, cette dernière voie étant de loin la plus utilisée en France. La stabilisation biologique réduit la teneur des boues en matières fermentescibles. Elle se fait soit par voie aérobie (en présence d'oxygène) dans les bassins d'aération ou dans des bassins de stabilisation aérobie, soit par voie anaérobie (absence d'oxygène) dans des digesteurs avec production d'un biogaz riche en méthane. Dans le premier cas, on obtient des boues « aérobies » ou « stabilisées aérobies », dans le second cas des boues « digérées », encore appelées « anaérobies » ou « stabilisées anaérobies ». La digestion anaérobie se pratique dans environ 200 stations d'épuration en France. Il s'agit d'installations de taille souvent supérieure à 50 000 EH et totalisant 21 millions d'EH. Le procédé de digestion aérobie est lui plutôt destiné à de petites installations (taille < à 20 000 m<sup>3</sup>/j) pour lesquelles ce procédé constitue le

meilleur compromis en terme de stabilisation, avec des coûts d'investissement moindres et des conditions de fonctionnement plus simples. A température ambiante, la digestion aérobie permet d'atteindre des taux de réduction des MES de l'ordre de 42-53 % et de réduction des MVS de l'ordre de 53-64 % pour un temps de séjour de 17 jours.

Les macromolécules organiques ne peuvent pas être assimilées telles quelles au cours de l'étape de stabilisation aérobie, elles doivent d'abord faire l'objet d'une hydrolyse. L'étape d'hydrolyse constitue en réalité le facteur limitant de l'efficacité du procédé. C'est pourquoi depuis plusieurs années des procédés dits de désintégration visant à faciliter cette étape ont été développés avec succès. Ces traitements, également testés en couplage avec les boues activées, ont pour objectif d'accélérer cette étape pour conduire in fine à une accélération de l'étape d'hydrolyse et donc à une amélioration des performances de la digestion aérobie (Salsabil *et al.*, 2010). Différents procédés dits de désintégration peuvent être utilisés : ultrasons, ozonation, température. L'utilisation des basses températures (<100 °C) en amont d'une étape de stabilisation biologique apparaît constituer une alternative intéressante compte tenu de la facilité de mise en œuvre et de besoins énergétiques réduits (Héry *et al.*, 2010 ; Salsabil *et al.*, 2010). C'est pourquoi dans ce travail de thèse nous nous sommes particulièrement intéressés à la mise en œuvre d'un traitement thermique basse température (90 °C, 2h) en amont d'une étape de stabilisation aérobie mésophile et sur la boucle de recirculation d'un procédé à boues activées.

Il est possible de trouver dans la littérature une multitude de résultats confirmant l'intérêt de l'introduction d'un traitement de désintégration sur la réduction de la production de boue au niveau de la file eau ou de la file boue. Cependant, il a aussi été démontré que ces traitements ont des conséquences sur la structure physique, chimique et microbiologique de la boue (Laurent, 2009 ; Yan *et al.*, 2008) pouvant à terme modifier le comportement des micropolluants dans la boue. Or la pérennisation de ces procédés passe par une meilleure compréhension de leur mode d'action et de leurs conséquences notamment en regard du devenir et du mode d'action de micropolluants pouvant être plus ou moins toxiques dans certaines conditions. Dans ce travail de thèse nous nous sommes particulièrement attachés à répondre à la question suivante : l'introduction d'un procédé de réduction de la production de boue induit-il une sensibilité plus importante des boues à un élément toxique lors de l'étape de stabilisation aérobie ? L'élément toxique choisi est le cadmium du fait de son occurrence potentielle dans les boues et de sa forte toxicité. Parallèlement, et du fait des progrès des méthodes moléculaires d'écologie microbienne, il devient intéressant d'éclaircir la boîte noire

biologique que constituaient les approches précédemment menées au laboratoire. La réponse à cette question a ainsi conduit à la mise en œuvre de méthodes visant à mieux connaître la flore des boues et son fonctionnement par l'étude des populations, de l'activité respiratoire et des activités enzymatiques notamment.

Traditionnellement les communautés microbiennes des flores de boues ont été étudiées soit par des techniques d'observations microscopiques (Dagot *et al.*, 2001), soit par des techniques culturales sur boîtes. Ces dernières permettent d'obtenir des modèles pour les principaux mécanismes impliqués dans les activités microbiennes mais ne permettent d'identifier que 1 à 10 % de la microflore des boues activées (Amann *et al.*, 1995). Le développement de techniques moléculaires a permis de s'affranchir de cette problématique, d'identifier les communautés et d'enrichir les connaissances sur la dynamique des populations. Dans un premier temps, l'étude bibliographique nous a permis de faire un point sur les interactions des boues et des métaux et sur les procédés de réduction de la production de boue. Le travail de recherche s'est ensuite concentré sur 3 axes de réflexion :

- 1) Trois types de procédés de désintégration (ozone, ultrasons, basses températures) ont été mis en œuvre en amont de l'étape de stabilisation aérobie ; les performances obtenues ont été comparées et les modifications des populations bactériennes analysées.
- 2) Pour la suite de l'étude, seul le traitement thermique basse température a été retenu notamment pour des raisons de facilité de mise en œuvre. L'impact de la mise en œuvre d'un tel traitement sur la sensibilité des boues au cadmium a été étudié lors de l'étape de stabilisation aérobie. En particulier, les activités respiratoires et les principales activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme ont été étudiées.
- 3) Dans la dernière partie, nous nous sommes particulièrement attachés à comparer les effets de l'introduction d'un traitement thermique basse température soit sur la boucle de recirculation de la file eau, soit en amont de l'étape de digestion aérobie. La technique de PCR-DGGE a été utilisée dans ce travail pour suivre en particulier l'impact de l'introduction d'un tel traitement sur la diversité des populations microbiennes.

# **CHAPITRE 1 - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**



# 1. LA PRODUCTION DE BOUE DANS LES OUVRAGES DE TRAITEMENT DES EAUX USEES ET LA PROBLEMATIQUE DES METAUX

## 1.1. La production de boue dans les ouvrages d'épuration des eaux usées

### 1.1.1. Origine et quantité des boues produites

Le traitement biologique de la pollution constitue la principale filière de traitement des eaux résiduaires urbaines. Il consiste à mettre en contact la matière organique contenue dans les eaux usées avec un écosystème actif (« boues activées ») en présence d'oxygène. L'oxydation de la matière organique conduit à la formation de sous produits et de nouveaux microorganismes qui, mélangés à la matière particulaire minérale et organique non biodégradable, constituent les « boues d'épuration ».

La production de boue dans les ouvrages d'épuration « classiques » se situe à deux niveaux (Figure 1-1) : 1) la production de boues primaires au niveau des décanteurs primaires et 2) la production de boues secondaires au niveau des bassins d'aération dans lesquels s'opère l'épuration biologique des polluants.

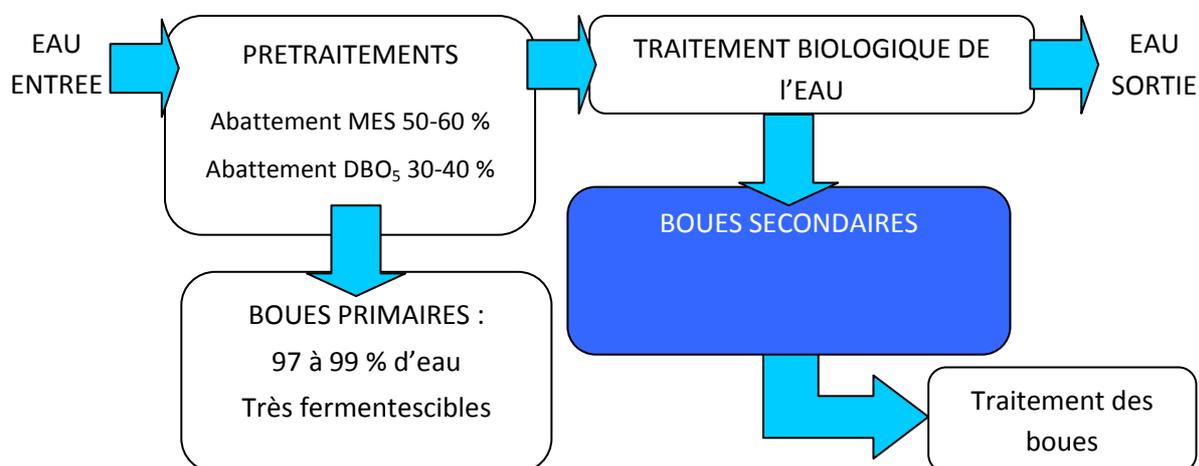


Figure 1-1. La production de boues dans les ouvrages classiques de traitement des eaux usées

**Les boues primaires :** La production de boues primaires est liée à une séparation physique (décantation) des matières en suspension de l'effluent entrant. Les boues primaires produites lors de cette étape sont très peu stabilisées et présentent une forte teneur en matière organique. La présence de décanteurs primaires n'est pas systématique : cette étape est peu ou pas

présente sur les petites installations. C'est pourquoi ces boues n'ont pas été étudiées dans le cadre de cette étude.

### Les boues secondaires :

Les boues secondaires sont issues de l'épuration biologique, principalement par boues activées, des eaux usées urbaines. L'épuration biologique est réalisée par la mise en contact de microorganismes hétérotrophes et autotrophes et de l'effluent à traiter aboutissant à l'élimination du carbone, la nitrification de l'azote réduit et, dans certain cas, du phosphore. L'épuration biologique des effluents repose sur la consommation de la matière organique 1) pour assurer la croissance cellulaire (anabolisme) et 2) pour assurer les besoins de fonctionnement des cellules à travers l'oxydation de la matière ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) (catabolisme) (Figure 1-2).

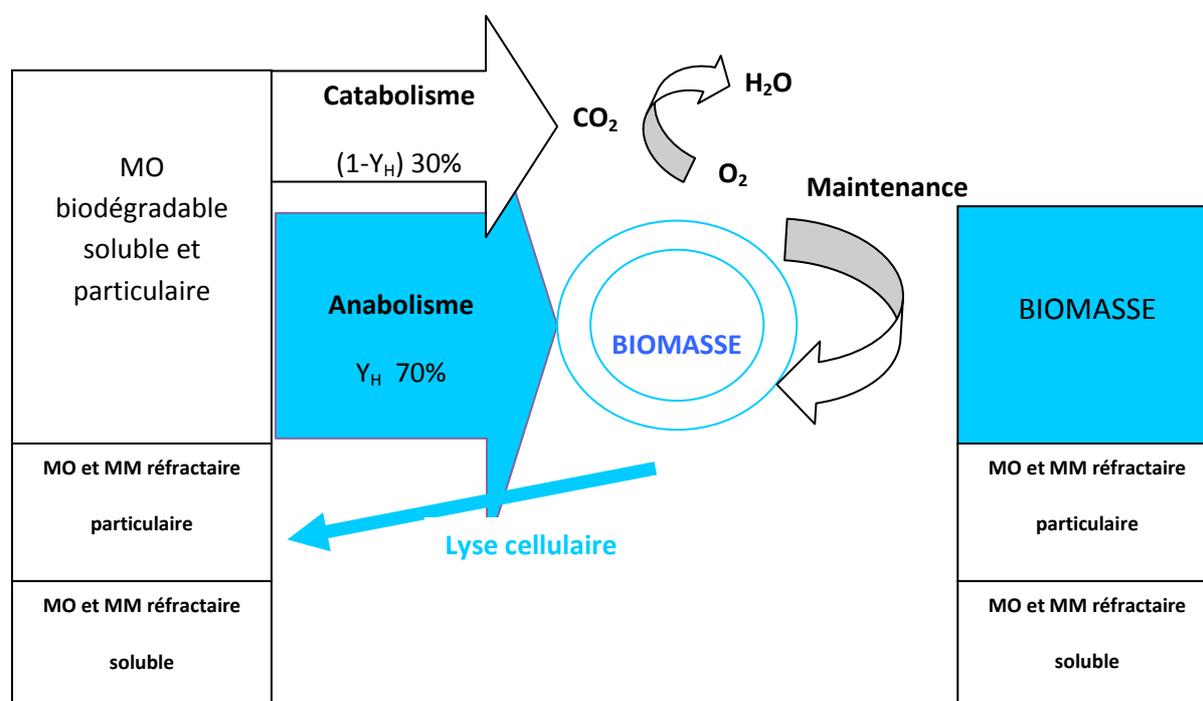


Figure 1-2. Schéma synthétique de la production de boues secondaires

Les conditions du milieu et le mode de conduite du process vont permettre à ces microorganismes de s'agglomérer sous forme de floccs capables d'être séparés lors de l'étape aval de décantation. A l'issue de l'étape de clarification (séparation des boues et de l'eau traitée), une partie des boues va être recirculée vers le bassin d'aération et une autre partie sera purgée afin de maintenir un taux de croissance fixé et un renouvellement continu de la biomasse. Les boues ainsi purgées sont ensuite acheminées vers des filières de déshydratation

et de traitement des boues. Les boues secondaires seront donc considérées, légalement, comme un déchet de l'épuration des eaux. Si elles sont principalement constituées de matières organiques (60 % de matière organique inerte (Paul *et al.*, 2005) et 70 % de biomasse (Lehne *et al.*, 2001)) et présentent ainsi un intérêt agronomique, elles sont susceptibles de renfermer certains micropolluants organiques persistants qualifiés « d'émergents » (polychlorophenyle - PCB – phtalates, résidus de médicaments...), ou métalliques (métaux lourds notamment).

En France, la production de boue annuelle est de l'ordre de 20 kg/habitant de matière sèche, soit 100 kg de boues pâteuses à 20 % de siccité (Miquel, 2003). En Europe, la production de boues est estimée à 60-90 g MS/équivalent habitant/jour, ce qui représente à peu près 10 millions de tonnes de boues sèches par an pour l'union européenne (Appels *et al.*, 2008). L'accroissement de la population française, l'amélioration des rendements et le nombre de raccordement aux réseaux d'assainissement sont les principales raisons de l'augmentation du volume des boues en provenance des stations d'épuration collectives. En 2003, toutes sources confondues, la production totale de boues urbaines était de 850000 tonnes de matière sèche (Miquel, 2003). En 2010, la production de boue approchait les 3,5 millions de tonnes de MS pour un coût d'investissement pour le recyclage de l'ordre de 250 millions d'euro. Conséquences de l'augmentation du volume des boues produites, le volume des boues traitées a augmenté de 28,3 % en lien avec l'application des législations et des efforts importants faits sur les capacités et performances des équipements de traitement des boues d'assainissement des eaux usées.

### 1.1.2. La structure des boues secondaires

Les floes : une structure tri-dimensionnelle

Soumises aux contraintes hydrodynamiques du procédé, les boues s'organisent sous forme de floes qui résultent de l'agrégation de différents constituants présents dans la liqueur mixte (= mélange boues activées et eaux usées) : des microorganismes (bactéries essentiellement, protozoaires, virus), des particules inorganiques (silicates, oxydes ferriques, phosphate de calcium...), des cations multivalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) et des PEC (polymères extra cellulaires) qui assurent la cohésion de l'ensemble (Urbain *et al.*, 1993). Au sein des floes des boues activées les PEC jouent un rôle structurel et protecteur. Ils forment une matrice dans laquelle sont organisées les cellules bactériennes (Jorand *et al.*, 1995). Cette matrice structurée de pores et de chaînes, possède une grande surface de contact capable d'adsorber des polluants, des

nutriments et des minéraux (Liu *et al.*, 2001) liés à l'existence à l'intérieur de la matrice de zones hydrophiles et de zones hydrophobes, confèrent ainsi à la structure de multiples propriétés d'adsorption (Flemming et Wingender, 2001).

Différents modèles permettent de représenter la structure tri-dimensionnelle des floccs.

→ Un modèle est proposé par Jorand *et al.* (1995). Ce modèle propose que les floccs s'organisent selon une structure tri-dimensionnelle : 1) de petites particules (bactéries) de 2,5  $\mu\text{m}$  sont reliées entre elles grâce à des exopolymères pour former des microflocs d'environ 13,2  $\mu\text{m}$  ces particules forment à leur tour des particules d'environ 125  $\mu\text{m}$  (macroflocs poreux) avec des bactéries isolées et des polymères.

→ Le modèle « DCB » (Divalent cation Bridging) implique l'existence de ponts polymériques. Les PEC contiennent des groupements chargés négativement (au pH proche de la neutralité) qui sont liés ensemble par des cations divalents ou trivalents (Erikson *et al.* 1992 ; Bruus *et al.* 1992 ; Nielsen et Keiding, 1998) afin de former un large réseau dans lequel les différents constituants des floccs tels que les bactéries ou les colonies de bactéries sont intégrées. Ce pontage favorise l'agrégation et la stabilisation de la matrice formée par les microorganismes et les biopolymères (figure 1-3).

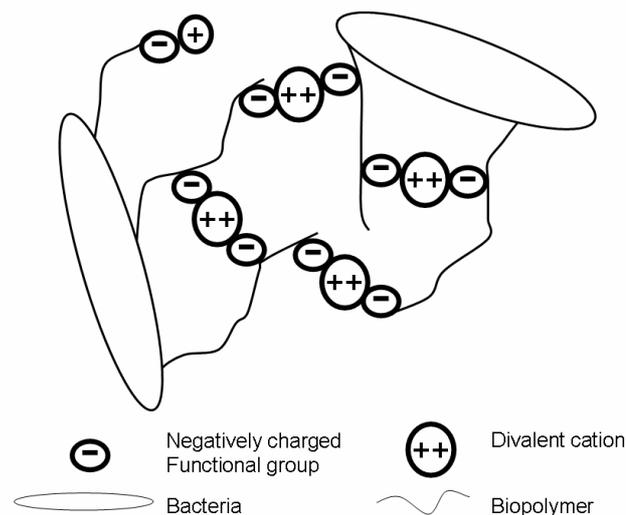


Figure 1-3. Pontage par les cations divalents (source : Sobeck et Higgins, 2002)

### Le rôle des polymères extra-cellulaires

Les polymères extracellulaires PEC sont issus de la sécrétion des bactéries et de la lyse cellulaire. Ils se composent de polysaccharides, de protéines et de substances « humique like » (Jorand *et al.*, 1995 ; Comte *et al.*, 2007), d'acides nucléiques, d'acides uroniques, de substances humiques (Frølund *et al.*, 1995), et de lipides notamment. Les sucres ou polysaccharides et les protéines sont les deux composants étant le plus souvent majoritaires, les substances type humiques, les acides uroniques, les (phospho) lipides, les acides nucléiques sont présents en plus petites quantités (Frølund *et al.*, 1996).

La proportion de chacune des espèces biochimiques entrant dans la composition des PEC est fortement dépendante de la nature de l'effluent entrant dans la station (Sponza, 2002). Les floccs de boues activées (bactéries + polymères) sont globalement chargés négativement. Les cations multivalents (i.e.,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) présents dans la structure du flocc permettent de créer des liaisons polymères-cations et donc l'agglomération du flocc (Bura *et al.*, 1998).

Les polymères extracellulaires de floccs de boues activées constituent la « fraction réactive » notamment au regard de la rétention des éléments traces métalliques (Comte, 2005). La fonctionnalité chimique des floccs de boues activées a montré que la connaissance des constantes d'acidité portées par les PEC de boues activées permet de prévoir en partie leur réactivité. Au pH proche de la neutralité, les PEC portent des charges négatives dues à l'ionisation de certains groupes fonctionnels anioniques tels que les groupements carboxyliques et phosphoriques.

Les valeurs de pKa apportent des précisions quant à la capacité des PEC à se lier à d'autres composés en fonction du pH du milieu. Guibaud *et al.*, 2003 se sont particulièrement intéressés à la fonctionnalité des PEC extraits de boues activées et montrent que les fonctions carboxyliques et hydroxyles sont majoritaires. Les travaux de Laurent (2009) ont permis de caractériser plus précisément les pKa portés par les fractions totales et solubles de floccs de boues activées. Dans la fraction particulaire des boues activées, on retrouve des pKa très divers associés aux fonctions suivantes : amine/hydroxyle (pKa 9,2-10) (40 %), amine/hydroxyle (pKa 8,4-8,8) (10 %), phosphorique (pKa 6,1-7,2) (20 %), phosphorique/carboxylique (pKa 2,7-3,2) (30 %). Dans la phase soluble, on retrouve seulement deux types de fonctions : phosphorique (pKa 6,8-7,1) (15%) et amine/hydroxyle (pKa 8,0-9,8) (75%). Les groupements phosphoriques sont liés aux phospholipides des membranes bactériennes, et aux composés de l'ATP et de l'ADP. Les groupements carboxyles

sont présents dans les protéines, les substances de type humique et les acides uroniques. Les groupements de type amine sont principalement présents dans les protéines tandis que les hydroxyles proviennent essentiellement des polysaccharides et des substances humiques.

## 1.2. Les métaux lourds dans les boues

La fonction métal caractérise les éléments minéraux qui, à l'état d'ions, manifestent une grande affinité pour les groupes hydroxyles de l'eau avec lesquels ils vont se lier. L'expression « métaux lourds » est fréquemment employée pour désigner les micropolluants minéraux. Elle englobe cependant à la fois des métaux et des métalloïdes ainsi que des éléments de masse volumique supérieure à 6 g/mL (ADEME, 1995). On parle d'éléments traces lorsque la teneur d'un élément dans la croûte terrestre est inférieure à un pour mille.

Les métaux lourds dans les boues sont présents sous forme particulaire et soluble ou accumulés dans les cellules. Les différents métaux se retrouvent à des concentrations comparables dans les boues primaires et activées. Cette concentration dépend de différents facteurs : 1) la composition de l'effluent, 2) le type de traitement mis en œuvre en lien avec une capacité plus ou moins importante des boues à fixer les espèces métalliques, 3) la spéciation de l'espèce et sa capacité à se lier préférentiellement à la phase soluble ou à la phase particulaire de la boue.

Dans ce chapitre, un effort particulier sera fait afin de mettre en lumière les points suivants: quelles sont les sources, les concentrations en métaux lourds, quelle est la réglementation applicable, comment mesure-t-on la spéciation des métaux dans les boues, leur toxicité et quels sont les mécanismes qui régissent cette spéciation.

### *1.2.1. Sources et concentrations des métaux lourds dans les boues d'épuration*

☞ *Source* : Les eaux usées traitées par la station d'épuration sont le vecteur de micropolluants organiques et minéraux et, parmi eux les métaux lourds. La teneur en métaux lourds dans les effluents entrant dans la station peut être liée à différentes origines (ADEME, 1995 ; Gagnon et Saulnier, 2003 ; Karvelas *et al.*, 2003 ; Sörme et Lagerkvist, 2002 ; Sörme *et al.*, 2003) : 1) les activités domestiques, 2) les activités issues des produits médicaux et de nettoyage, ainsi que des piles usagées, 3) l'activité urbaine, avec la corrosion des conduites d'eau, le ruissellement des eaux de pluie sur les toits et les chaussées, 4) l'activité commerciale ou artisanale (garages, cabinets dentaires, laboratoires...), et enfin 5) l'activité industrielle. Les

micropolluants métalliques les plus présents dans les eaux usées sont le fer, le zinc, le manganèse, le cuivre et le nickel. Suivent le chrome, le plomb et le cadmium (Laurent, 2009).

Nous nous intéresserons particulièrement à une espèce que l'on retrouve majoritairement dans la file boue à l'issue du traitement biologique : le cadmium. **Le cadmium** est essentiellement d'origine industrielle, il peut provenir également d'activités domestiques (composant de produits cosmétiques tels que shampooings, teintures capillaires). C'est également un composant pharmaceutique phytosanitaire (pesticides de jardin). L'apport de cadmium dans les eaux usées provient aussi des eaux de ruissellement (retombées atmosphériques de cet élément en zone urbaine, résidus de pneus sur la chaussée et corrosion des conduites d'eau). La teneur en cadmium des boues correspondrait à 75 % du métal entrant. L'Agence Internationale pour la Recherche contre le Cancer (IARC) a classé le cadmium dans la catégorie 2A, c'est-à-dire avec les substances probablement carcinogènes pour l'homme (Rapport IARC, 1987). La réalisation d'enquêtes épidémiologiques sur des ouvriers a démontré que le cadmium est impliqué dans l'induction de tumeurs des poumons, de la prostate et des testicules. Des études réalisées sur des rats soulignent son rôle dans le cancer de la prostate et ont montré une relation dose dépendante entre l'inhalation du cadmium et le cancer des poumons. Il s'agit dans ces études de surexpositions particulières, sans mesure avec une exposition alimentaire.

☞ *Teneur en métaux lourds dans les boues* : L'importance de la teneur en métaux lourds dans les boues est surtout liée à la taille de l'installation (en équivalents habitants), et au type d'activités. Les deux secteurs déterminants sont l'activité industrielle (notamment la chimie, la papeterie...) et l'activité artisanale qui, dans les grandes agglomérations, finissent par masquer l'influence de l'activité domestique (Miquel, 2003). Le tableau 1-2 présente les concentrations moyennes en éléments métalliques dans les boues déshydratées issues des unités de traitement des eaux résiduaires.

A l'issue du traitement des eaux, les éléments traces se retrouvent dans leur grande majorité (70 à 90 %) dans les boues produites (ADEME, 1995 ; Karvelas *et al.*, 2003), et pour la partie restante, dans les eaux épurées. Cependant, il est difficile d'établir des généralités : la rétention dans les boues dépend du métal considéré. Karvelas *et al.* (2003) montrent que le fer et le manganèse sont rejetés via les boues à 37 % et 77 % respectivement. Dans cette même étude certaines espèces comme le Cr, le Pb, Ni, Cd et Zn seraient rejetées à 50 % via les boues. 45 à 70 % du plomb, du zinc, du cadmium, du chrome, se trouvent à l'état dissous dans les eaux usées, et sont par conséquent difficilement éliminables (Miquel, 2003).

Tableau 1-1. Part de métal entrant fixée par les boues (Miquel, 2003)

Mercure	Plomb	Cuivre	Chrome	Cadmium	Zinc	Fer
92 %	85 %	85 %	77 %	75 %	74 %	77 %

Les variations de concentration et l'occurrence du cadmium dans les boues sont représentées dans le tableau 1-2 et sont comparées à celles du cuivre.

Tableau 1-2. Concentrations en métaux lourds dans les boues résiduelles de plusieurs stations d'épuration ( $\mu\text{g/g}$ )

Cd	Cu	Références
4	147	Voutsas <i>et al.</i> , 1996
2,1	370	Lazzari <i>et al.</i> , 2000
55,7	755	Bodzek <i>et al.</i> , 1997
2,8	436	Scancar <i>et al.</i> , 2000
1,8		Baralkiewicz et Siepak, 2001
	315	Perez Cid <i>et al.</i> , 2001
	1403	Cornu <i>et al.</i> , 2001
2	258	Zorpas <i>et al.</i> , 2000
	934	Bragato <i>et al.</i> , 1998
1,8	287	Madoni <i>et al.</i> , 1999
	167	Planquart <i>et al.</i> , 1999
9,2	326	Alonso Alvarez <i>et al.</i> , 2002
3,2	239	Abdel-Shafy <i>et al.</i> , 1996
5	200	Chipasa, 2003
10	1200	Karvelas <i>et al.</i> , 2003

Le contenu en métaux lourds dans les boues avant épandage peut varier de 0,5 à 2 % et peut aller jusqu'à 4 % (sur la base de la masse sèche) pour des métaux comme le Cd, le Cr, le Cu et le Ni (Babel et Dacera, 2006).

### 1.2.2. La qualité des boues : aspect réglementaire

Le dispositif réglementaire français actuel relatif à l'épandage des boues est constitué de cinq textes (décret du 8 décembre 1997, arrêté du 8 janvier 1998, circulaire du 16 mars 1999, circulaire du 18 avril 2005, et in fine la loi sur l'eau et les milieux aquatiques (LEMA) du 30 décembre 2006), textes qui assimilent les boues urbaines à des déchets et mettent l'accent sur la responsabilité de l'exploitant, la qualité des boues et des sols, les analyses des boues et sur les périmètres d'épandage.

Particulièrement, les valeurs limites de concentration en éléments traces métalliques dans les boues avant épandage sont fixées dans l'arrêté du 8 janvier 1998 (tableau 1-3)

Tableau 1-3. Valeurs limites de concentrations et de flux en éléments traces apportés par les boues selon la réglementation française (arrêté du 8 janvier 1998)

<b>Eléments traces</b>	<b>Valeurs limites dans les boues (mg/kg MS)</b>	<b>Flux maximum cumulé apporté par les boues sur 10 ans (g/m<sup>2</sup>)</b>
<i>Cd</i>	10	0,015
<i>Cr</i>	1000	1,5
<i>Cu</i>	1000	1,5
<i>Hg</i>	10	0,015
<i>Ni</i>	200	0,3
<i>Pb</i>	800	1,5
<i>Zn</i>	3000	4,5
<i>Cr+Cu+Ni+Zn</i>	4000	6

### 1.2.3. Les phénomènes régissant la répartition des espèces métalliques dans les boues activées

La spéciation chimique de l'élément trace métallique est un élément important permettant de comprendre et d'interpréter la présence de certaines espèces plutôt dans la phase « soluble » (eau traitée) ou dans la phase « particulaire » (boues).

Aux pH de l'eau usée (7-9), les métaux sont présents sous différentes formes chimiques ayant des solubilités différentes ce qui explique que la répartition entre phases liquide et solide au cours du traitement semble être spécifique de chaque métal (Karvelas *et al.*, 2003). Les éléments traces évoluent sous trois états physiques : 1) l'état particulaire - matières solides décantables, sous forme de précipités métalliques au sein du floc de boues activées 2) l'état colloïdal, matières solides non décantables sous la forme de complexes métal soluble-biopolymères 3) - l'état dissous, sous forme de métal libre ou accumulé dans les cellules (Brown et Lester, 1979 ; Chipasa, 2003). Au cours du traitement de l'eau, cette répartition est susceptible d'évoluer : Karvelas *et al.* (2003) ont observé une légère augmentation des concentrations en phase soluble après chaque étape du traitement. La répartition de certaines espèces va être plutôt affectée par la décantation primaire (Zn, Pb et Cr) alors que d'autres seront plus sensibles à l'étape du procédé biologique ou de la décantation secondaire comme Cu, Cd et Ni (Santarsiero *et al.*, 1998).

#### 1.2.3.1. Aspects mécanistiques du devenir des métaux dans les boues activées

L'accumulation et le transport des métaux lourds dans les stations d'épuration sont influencés par 4 mécanismes : 1) la biosorption (somme des interactions passives avec la cellule microbienne et les ions métalliques). Les métaux lourds s'adsorbent aux groupements carboxyles, hydroxyles, phosphate et sulfonate des lipides, protéines, et polysaccharides de la surface cellulaire, 2) la bioaccumulation (interaction active au cours de laquelle les métaux lourds pénètrent à l'intérieur des cellules), 3) la sorption aux PEC et aux particules des eaux usées et 4) la solubilité du métal. Globalement, les concentrations et la spéciation des espèces métalliques sont donc régis par les interactions avec la biomasse et la précipitation (Chipasa, 2003). La rétention passive dans les boues activées, notamment l'adsorption et la complexation avec les polymères extra cellulaires (PEC), serait le mécanisme dominant par rapport à la bioaccumulation (Guibaud *et al.*, 1999 ; Guibaud *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2002).

##### *a) Interactions avec la biomasse :*

Les métaux interagissent avec la biomasse des floccs de boues activées à travers les mécanismes de biosorption, de bioaccumulation et par des réactions induites par la réponse à un stress toxique.

- La **biosorption** est définie comme la somme de toutes les interactions passives (non liées au métabolisme des cellules) avec les PEC et la surface des cellules (Yuncu *et al.* 2006 ; Veglio' et Beolchini, 1997 ; Pagnanelli *et al.*, 2009 ; Volesky et Holan, 1995). La biosorption constitue un phénomène physico-chimique plutôt que biologique qui implique différents mécanismes simultanés qui sont susceptibles d'interagir entre eux:

⇒ *L'échange d'ions* : les cations métalliques se fixent sur des sites occupés initialement par les contre-ions présents dans la matrice des PEC ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) (Veglio' et Beolchini, 1997) induisant alors un relargage de ces derniers (Yuncu *et al.* 2006, Laurent *et al.*, 2009a ; 2010).

⇒ *La complexation et la microprécipitation* de surface impliquant les très nombreux sites de fixation présents sur les PEC (Brown et Lester, 1982 ; Guibaud *et al.*, 2005) et des surfaces bactériennes (Borrok *et al.*, 2004 ; Johnson *et al.*, 2007). Liu et Fang (2002) ont démontré que les sites de fixation impliqués sont des groupements carboxyles, hydroxyles et phosphoriques. Les groupements carboxyles seraient notamment impliqués dans la biosorption du cadmium et du plomb par une boue activée (Pagnanelli *et al.* 2009).

⇒ *L'échange de protons* : la libération ou relargage de protons serait la conséquence de la sorption des cations métalliques sur les groupements fonctionnels des PEC et des cellules notamment dans le cas de la rétention du cadmium, du plomb, du cuivre et du zinc (Guibaud *et al.* 2008 ; Yuncu *et al.* 2006).

- La **bioaccumulation** désigne l'interaction active entre cellules et les ions métalliques qui peuvent alors pénétrer à l'intérieur de celles-ci. Ces phénomènes restent peu connus mais de nombreux auteurs suggèrent que la rétention de métaux par les microorganismes vivants se déroule en deux étapes (Veglio' et Beolchini, 1997 ; Arican *et al.*, 2002 ; Yuncu *et al.*, 2006). Dans un premier temps, une biosorption rapide et indépendante du métabolisme sur les parois cellulaires et autres surfaces externes (i.e., PEC) (on parle également d'interaction passive) puis dans un second temps, une étape plus lente, constitue le transport actif qui dépend du métabolisme à travers la membrane cellulaire.

- **Les réactions induites par la réponse à un stress toxique** : lorsque la concentration ou la nature de l'espèce métallique sont de nature toxique pour les boues activées, différents mécanismes susceptibles de modifier la spéciation de l'espèce métallique dans les boues

activées sont générés induisant à leur tour la modification de la spéciation de l'élément métallique considéré et notamment leur degré d'oxydation (Valls et Lorenzo, 2002). Par exemple, *Sphaerotilus natans*, microorganisme filamenteux fréquemment rencontré dans les boues activées, est capable de réduire le Cr(VI), très toxique et soluble, en Cr(III), moins toxique et moins soluble (50 % du Cr(III) produit) est adsorbé et/ou précipité sous forme de Cr(OH)<sub>3</sub> (Caravelli *et al.*, 2008). Une source de carbone est nécessaire à cette réduction biologique, efficace pour des concentrations en Cr(VI) variant de 4,5 et 80 mg Cr(VI)/L. Ce point sera particulièrement développé au paragraphe (1.2.5.)

### b) La précipitation

La précipitation peut avoir différentes origines : 1) le niveau de solubilité du métal (spéciation) au pH de la boue, 2) la présence dans l'effluent d'espèces ioniques susceptibles d'interagir avec les espèces métalliques (précipitation d'origine purement chimique), 3) la présence dans la boue de microorganismes capables de générer des espèces actives pour la précipitation comme les groupements sulfures ou phosphates (Valls *et al.*, 2002) et ce en liaison avec le mécanisme de détoxification.

⇒ Selon leur solubilité, les métaux vont être présents de manière plus ou moins importante dans la fraction soluble de l'eau usée et de la boue : la précipitation constitue un des mécanismes essentiels de la rétention des métaux dans les boues (Brown et Lester, 1982). Chang *et al.* (2007) montrent l'importance de ce mécanisme de précipitation dans l'élimination du zinc, du nickel et du cadmium de l'eau usée. Il est difficile de prédire les quantités de métal précipité en utilisant les valeurs théoriques de solubilité compte tenu de la complexité du milieu boues activées (Nelson *et al.*, 1981) et la présence de ligands organiques qui augmentent la solubilité des métaux (Brown et Lester, 1982 ; Cheng, 1973).

⇒ La présence dans l'effluent de carbonates, sulfates ou orthophosphates peut générer la précipitation chimique de l'espèce métallique. Selon Patterson *et al.* (1977), la précipitation sous forme de carbonates domine en condition neutre pour le cadmium, le zinc et le nickel. Pour Pagnanelli *et al.* (2009) à pH 7,5 la précipitation paraît le mécanisme majoritaire pour le plomb (précipitation des hydroxydes de plomb) alors que la biosorption pure (interactions avec la biomasse) était dominante dans le cas du cadmium.

⇒ Le mécanisme de précipitation en liaison avec la détoxification est traité au paragraphe (1.2.5.).

### 1.2.3.2. Les paramètres influant les mécanismes

Les différents mécanismes régissant les flux d'ETM dans les stations d'épuration sont conditionnés par différents facteurs relatifs à l'environnement des sites de fixation et/ou leur nature chimique (Volesky et Holan, 1995). Ainsi, la biosorption des métaux sur les boues (en particulier sur les PEC) peut dépendre (Comte, 2005 ; Decho, 2000) :

- des propriétés physico-chimiques du milieu : pH (Baudu *et al.*, 2000), force ionique, température, concentration en oxygène dissous, présence d'autres cations métalliques et d'autres ligands (comme la matière organique dissoute, Wang *et al.*, 2003), caractéristiques de l'effluent (Guibaud *et al.*, 2003),
- du métal considéré : concentration présente (Yuncu *et al.*, 2006), ratio taille/charge, spéciation,
- du biosorbant considéré (ici la boue activée) : propriétés de surface, composition des PEC (Yuncu *et al.*, 2006) et de la membrane bactérienne, concentration.

#### a) Nature et concentration du métal

En fonction de la nature et de la concentration du cation métallique considéré, les mécanismes et l'efficacité de la rétention du métal par les boues sont susceptibles de varier. La variabilité des séquences d'affinité des métaux pour les boues ou les PEC démontre que la nature et la structure des boues (boues ou PEC seuls) influencent la rétention des métaux lourds (tableau 1-4). La solubilité du métal considéré ainsi que l'existence de sites spécifiques de sorption conditionnent les mécanismes de sorption. Les résultats de la littérature tendent à montrer que le cadmium est facilement adsorbé sur les PEC (Yuncu *et al.* 2006; Brown et Lester, 1982). Dans le cas d'autres métaux (manganèse, plomb), le mécanisme de précipitation sera prépondérant (Brown et Lester, 1982 ; Pagnanelli *et al.*, 2009). Ainsi, selon Pagnanelli *et al.* (2009), le cadmium est préférentiellement sorbé dans les boues tandis que le Pb serait précipité.

Tableau 1-4. Quelques exemples de séquences d'affinité des ETM vis-à-vis des boues et des PEC

Référence	Séquence
Cheng <i>et al.</i> , 1975 (PEC)	Pb > Cu > Cd > Ni
Brown et Lester, 1979 (PEC)	Fe > Zn > Cu, Cr > Pb > Hg > Cd > Ni > Mn
Nelson <i>et al.</i> , 1981 (PEC)	Zn > Cu > Cd

Brown et Lester, 1982 (PEC)	Cd > Co > Ni > Mn
Su <i>et al.</i> , 1995 (PEC)	Zn > Cd > Ni
Guibaud <i>et al.</i> , 2005 (PEC)	Pb>Ni>Cd
Chang <i>et al.</i> , 2007 (PEC)	Cd > Ni > Zn
Guibaud <i>et al.</i> , 2004 (PEC)	Zn < Ni < Cu
Guibaud <i>et al.</i> , 2003 (PEC)	Cu>Pb>Cd
Hu <i>et al.</i> , 2003	Cu>Zn>Cd>Ni
Comte <i>et al.</i> , 2006 (PEC)	Cu>Pb>Ni>Cd
Ong <i>et al.</i> , 2010 (boues activées)	Cu>Ni>Cd=Cr
You <i>et al.</i> , 2009 (boues activées)	Pb=Cd>Ni
Gould et Genetelli, 1984 (Boues anaérobies)	Cu>Cd>Zn>Ni

#### b) Composition et structure de la boue

⇒ La composition de la boue :

Depuis les études de Brown et Lester (1979), on sait que les PEC jouent un rôle crucial dans la biosorption des métaux lourds mais peu de données sont disponibles dans la littérature en raison de la difficulté à normaliser une méthode commune d'isolement et de quantification des PEC. La réactivité des biopolymères disponibles (PEC, biomasse) et la composition de l'eau usée sont des paramètres influant sur la réactivité des espèces métalliques. Le contenu en protéines, substances humiques et polysaccharides des PEC influe sur les paramètres de complexation des espèces métalliques (nombre de sites, stabilité du complexe formé). Guibaud *et al.*, 2003 ont montré que plus les taux de protéines, d'acides humiques et de polysaccharides augmentent, plus les PEC sont capables de fixer le Cu. En revanche, la fixation du Ni par les PEC est dépendante de la concentration en acides uroniques (Guibaud *et al.*, 2004). De manière générale, en ce qui concerne le nombre de site de fixation, l'ordre est le suivant : Cu > Pb >> Cd tandis que l'ordre de stabilité est le suivant : Cd > Pb ≈ Cu. Plus les PEC sont capables de fixer un métal, moins le complexe formé est stable (Guibaud *et al.*, 2003). La composition des PEC est elle-même affectée par de nombreux facteurs (Brown et Lester, 1982) : ratios C : N : P et C : S du substrat, oxydation des PEC, concentration en oxygène dissous, charge organique, DBO<sub>5</sub>. Keevil (2004) montre que dans un milieu riche en cuivre le ratio PEC/cellules est élevé, suggérant que la production des PEC participe de

manière importante à une stratégie de défense des cellules contre la toxicité des ions cuivre. Aux pH proches de la neutralité, la fixation des cations par des interactions électrostatiques sur les polymères des floccs de boues activées est principalement liée à la nature de la charge négative portée. La nature des charges portées par ces groupements fonctionnels peut permettre aux PEC de retenir des métaux lourds (Comte, 2005 ; Laurent, 2009). Le tableau 1-5 établi par Decho (2000) identifie les principaux ligands associés aux PEC.

Tableau 1-5. Principaux ligands associés aux PEC (Decho, 2000)

Principaux ligands intervenant dans la fixation des métaux	Composants des PEC dans lesquels on peut trouver les ligands	Références
<b>Hydroxyles</b>	polysaccharides etc...	Sutherland (1990)
<b>Carboxyliques</b>	protéines, amino-polysaccharides, acides uroniques, substances humiques	Wingender <i>et al.</i> (1999)
	acides nucléiques phospholipides	Liu et Fang (2002)
<b>Phosphates</b>	polysaccharides issus de cyanobactéries	De Philippis et Vincenzini (1998)
<b>Pyruvates</b>	polysaccharides hexoses	Smith <i>et al.</i> (1990)
<b>Acétyles</b>	polysaccharides neutres	Lindberg (1990) Sutherland (1990)
<b>Phénoliques</b>	protéines, substances humiques, polysaccharides	Liu et Fang (2002a)
<b>Amines</b>	protéines, amino-polsaccharides	Lindberg (1990) Sutherland (1990)

La spécificité de la biosorption des métaux par les PEC serait donc liée à leur composition, composition principalement fonction de leur origine (tableau 1-6).

Tableau 1-6. Capacités des PEC à lier un métal extraites de la littérature

Biosorbant	Capacité à lier un métal en mmol.g <sup>-1</sup>					Références
	Pb	Cd	Zn	Cu	Ni	
PEC issus de boues activées	/	0,250	/	0,188	0,034	Rudd <i>et al.</i> 1984
PEC issus de boues activées	2,54	0,17	/	3,64	/	Guibaud <i>et al.</i> 2003
PEC issus	/	/	0,14	3,66	0,70	Guibaud <i>et</i>

Capacité à lier un métal en mmol.g <sup>-1</sup>						
de boues activées						<i>al.</i> 2004
Boues activées	/	0.42	/	>0.8	/	Laurent, 2009

Comte *et al.*, (2006) montrent que la nature liée ou soluble des PEC influence aussi la liaison aux espèces métalliques. Les PEC solubles montrent une plus forte affinité pour Cu, Pb et Ni et un nombre de sites de fixations associés plus important. L'affinité du Cd pour les deux formes de PEC (solubles ou liés) est proche du fait de la faible affinité de ce métal pour les PEC en général. Les PEC solubles ont donc probablement un rôle de barrière protectrice contre la toxicité des métaux.

Ainsi, pour comprendre les interactions des boues et des métaux dans les procédés de traitement, il est nécessaire de travailler non seulement sur la caractérisation des PEC extraits mais aussi sur les boues elles-mêmes.

⇒ La surface spécifique :

L'augmentation de la surface spécifique des biopolymères capables de se lier aux métaux accroît la capacité de la biomasse à la rétention des cations métalliques (Macaskie *et al.*, 1987). L'augmentation de la surface spécifique des floccs de boues activées suite à un traitement par sonication par exemple induit une augmentation de la rétention du cadmium dans les boues. En revanche, la matière organique soluble /colloïdale relarguée lors du même traitement présente une affinité importante avec le cuivre et limite donc sa rétention sur les boues (Laurent, 2009)

### c) Le pH

Le pH affecte la chimie de la solution, l'activité des groupes fonctionnels de la biomasse ainsi que la compétition entre les ions métalliques à travers la modification de l'état de spéciation des métaux. Il constitue donc le facteur le plus important influant sur les mécanismes de biosorption des métaux.

⇒ Lorsque le pH augmente, les métaux ont tendance à précipiter sous forme d'hydroxydes et à passer sous forme particulaire (Wang *et al.*, 1999). Stumm et Bilinski, 1973 montrent que l'adsorption de Cd et Zn sur des boues activées augmente avec le pH jusqu'à obtenir

une « élimination » de 90 % à pH 10. L'adsorption de Cu est de pratiquement 100 % à pH 7 et diminue de manière marquée jusqu'à des valeurs inférieures à 40% pour les pH faibles et élevés (Nelson *et al.*, 1981).

⇒ Lopez *et al.* (2000) émettent l'hypothèse que l'augmentation du pH augmente la charge négative à la surface des cellules jusqu'à la totale déprotonation des groupements fonctionnels présents à la surface, favorisant l'attraction électrochimique et l'adsorption des cations métalliques.

#### 1.2.4. Mesure de la spéciation des métaux dans les boues

La spéciation chimique peut être définie comme une méthode d'identification et de quantification des différentes espèces, formes et phases présentes dans un matériau. L'extraction séquentielle permet donc de savoir de quelle manière le métal est lié à la boue et permet par conséquent d'expliquer la toxicité potentielle d'un métal (Alonso *et al.*, 2005). Avec cette approche Hu *et al.* (2003) montrent par exemple que l'inhibition de la nitrification est liée non pas à la quantité de métal (cadmium, Zn, Ni) sorbée mais internalisée. Alonso *et al.* (2006) montrent que tous les métaux ne sont pas liés de la même manière à la boue : le cobalt, le manganèse, le nickel et le zinc sont, selon cette étude, faiblement liés à la boue (et donc potentiellement disponibles) alors que l'aluminium, le fer, le titane, le cadmium, le chrome et le plomb se retrouvent dans la fraction résiduelle et donc fortement liés à la boue. De manière globale, seuls 7 % des métaux sont présents dans des formes facilement mobilisables et 90 % sont liés à la boue. Dans une autre étude Scancar *et al.* (2000) confirment ces résultats dans des boues activées : Ni et Zn sont potentiellement fortement mobiles car dans la fraction échangeable alors que les autres métaux sont plus fortement liés à la boue.

Au cours des dernières décennies différentes méthodes d'extractions séquentielles ont été développées (tableau 1-7) dans les boues rendant les comparaisons difficiles. Pour cette raison de nombreux auteurs choisissent la méthode BCR (Ure *et al.*, 1993).

↳ L'information obtenue à partir de la méthode BCR (Bureau Community of Reference) permet d'aboutir à des informations générales sur la quantité de métal lié à la matière organique sans prendre en considération la contribution des mécanismes de biosorption et de bioaccumulation (Chipasa, 2003). Elle permet de distinguer 4 fractions distinctes : 1) la

fraction échangeable : le métal est adsorbé sur la boue ou sur ces composés (hydroxydes de fer et de manganèse, substances humiques) ; elle représente les métaux ayant une grande biodisponibilité. 2) La fraction réductible : fraction associée aux oxydes de fer et de manganèse, qui occupe la deuxième place en terme de mobilité (les métaux de cette fraction sont mobilisables en conditions anoxiques). 3) La fraction oxydable : associée à la matière organique (le métal est complexé à la matière organique naturelle), les formes solubles du métal sont libérées quand la matière organique est attaquée en conditions oxydantes. 4) La fraction résiduelle totale : le métal associé à cette fraction ne présente pas de risque pour l'environnement. La méthode BCR bien que très utilisée présente un certain nombre d'inconvénients notamment lié à la longueur de son mode de mise en œuvre et à des problèmes de sélectivité (Pagnanelli *et al.*, 2004) ou de réadsorption possible des métaux (Van Hullebusch *et al.*, 2005). D'autre part, le protocole d'extraction peut en lui-même modifier la structure de la boue et donc la rétention des espèces métalliques (Lead *et al.*, 1998).

☞ Les ultrasons : Kazi *et al.* (2006) proposent de réduire la durée des différentes étapes par l'utilisation des ultrasons. Dans cette étude les métaux mobilisables sont le Cd et le Zn, le Pb liés à la fraction réductible et le Cr à la fraction oxydable.

☞ Extraction à l'EDTA : D'autres auteurs comme Hu *et al.* (2003), Pagnanelli *et al.* (2009) proposent une technique simple basée sur la différenciation de la quantité de métal sorbée (biosorption) de celle internalisée (bioaccumulation) par l'utilisation de l'EDTA. Avec cette technique, Pagnanelli *et al.* (2009) montrent que le principal mécanisme d'élimination du Cd dans les boues est la sorption et que les principaux sites de fixation sont les fonctions carboxyles et amines.

Tableau 1-7. Comparaison des différentes méthodes d'extraction séquentielle des métaux dans les boues

Méthode	Fractions identifiées	Avantages	Inconvénients	Références
BCR Bureau Community of Reference (Ure <i>et al.</i> , 1993)	Fraction échangeable Fraction réductible : Fraction oxydable : Fraction résiduelle totale	Reconnue	méthode très longue. Durée 48h. Problème de sélectivité.	Alonso <i>et al.</i> , 2006 ; Fuentes <i>et al.</i> , 2008 ; Yuan <i>et al.</i> , 2011 ; Hanay <i>et al.</i> , 2008 ; Scancar <i>et al.</i> , 2000
Extraction des métaux par les ultrasons	Fractions identiques à la méthode BCR	Accélération des étapes de la méthode BCR par l'utilisation des ultrasons.		Kazi <i>et al.</i> , 2006

		Résultats comparables à la méthode BCR classique pour tous les métaux sauf pour le cuivre. Plus rapide que la méthode BCR classique. Durée 1-2h.	
Tessier (Tessier <i>et al.</i> , 1979) modifié	Fractions identiques à la méthode BCR	Durée 4h30	Van Hullebusch <i>et al.</i> , 2005; Van der Veen <i>et al.</i> , 2007
Extraction à l'EDTA	Métal extracellulaire (biosorption) Métal intracellulaire (bioaccumulation)	Rapide	Hu <i>et al.</i> , 2003 Pagnanelli <i>et al.</i> , 2009

Quelle que soit la méthode choisie, l'efficacité de l'extraction chimique dans la prédiction d'une réponse biologique (i.e., toxicité) dépend de différents paramètres : 1) les caractéristiques du système, 2) le type de polluant, 3) le type de microorganismes (Geebelen *et al.*, 2003). Les résultats doivent donc toujours être interprétés avec précautions.

### 1.2.5. La toxicité des métaux envers les microorganismes des boues activées

#### 1.2.5.1. Mécanismes

A l'état de trace certains métaux comme le Fe, le Ni, le Cu et le Co sont connus pour stimuler la croissance microbienne (catalyse des réactions microbiennes, stabilisation des enzymes, régulation de l'expression de certains gènes, contrôle de la pression osmotique (Valls *et al.*, 2002 ; Silver, 1995)). D'autres espèces au contraire (Hg, Ag, Cd, Au) ne sont pas connues pour jouer un rôle bénéfique et sont considérées comme des substances « non essentielles » à la croissance microbienne (Bruins *et al.*, 2000).

L'effet toxique est principalement attribué à la perturbation de la fonctionnalité et de la structure des enzymes par liaison du métal avec un thiol ou d'autres groupes fonctionnels (groupements sulfhydryle) ou par remplacement d'un métal naturellement présent dans des

groupes d'enzymes prosthétiques (Vallee et Ulner, 1972 ; Valls *et al.*, 2002). Les métaux peuvent donc être classés en 3 catégories :

- les métaux essentiels et potentiellement non toxiques (i.e., Ca et Mg) ;
- les métaux essentiels mais dangereux à forte concentration (i.e., Fe, Mn, Cu, Co, Mo) ;
- les métaux toxiques (Hg et Cd).

Les différents mécanismes à travers lesquels une espèce métallique peut être toxiques sont les suivants : 1) fixation substitutive à un ligand, 2) réactions rédox avec des groupements sulfures, 3) réactions type Fenton, 4) inhibition du transport membranaire (Harrison *et al.*, 2007).

Hu *et al.* (2003) observent qu'en présence de 1 mM de Cu, seulement 13% des cellules restent viables contre 85% pour des concentrations identiques en Zn, Ni, et Cd. Ce résultat laisserait penser que le mécanisme d'inhibition par le cuivre est lié à une perte rapide de l'intégrité membranaire alors que pour les autres métaux et notamment le Cd le mécanisme de toxicité serait lié à une cinétique plus lente corrélé au processus d'internalisation du métal (Hu *et al.*, 2003). Dans cette étude, le cuivre est rapidement internalisé (9,4 h) alors que le cadmium est lentement internalisé dans la biomasse (66,1 h). De même, la cinétique de sorption du cuivre est rapide (1h pour atteindre l'équilibre) alors qu'elle est lente pour le Cd (< 12 h).

Semerci et Ceçen (2007) démontrent que les sites sensibles au Cadmium (dans le cadre de l'inhibition de la nitrification) se situent à la surface des cellules des microorganismes des boues plutôt qu'à l'intérieur. Selon Ong *et al.* (2010), les profils d'adsorption du Cu, du Cd, du Zn, du Ni et du Cr dans les boues activées montrent qu'il existe deux étapes : une fixation de surface rapide suivi par un lent processus de diffusion intracellulaire. Selon cette étude, le cuivre est l'élément le plus adsorbé et le plus toxique pour les boues en comparaison notamment du cadmium.

L'âge de boue influence la sorption du Cd : son affinité pour les boues diminue quand l'âge de boue augmente. Selon Battistoni *et al.* (1993) le cadmium serait adsorbé préférentiellement sur les PEC. Ceçen *et al.* (2010) ont étudié l'inhibition du cadmium sur l'activité respiratoire et ont mis en relation la spéciation de l'élément avec le niveau de toxicité. L'effet inhibiteur du Cd est notable assez rapidement après exposition. La spéciation du Cd montre que la

majorité du Cd est sous forme particulaire (soit sorbés aux boues soit précipités avec les ions carbonate et bicarbonate) et que les formes labiles et sorbées sont toxiques.

La sensibilité des microorganismes à une espèce métallique toxique est lié à différentes caractéristiques physico-chimiques comme : le potentiel rédox, l'électronégativité, la solubilité des complexes métal-sulfite, l'indice de Pearson, l'index covalent (Workentine *et al.*, 2008 ; Nies *et al.*, 2003).

#### 1.2.5.2 Mesure de la toxicité des métaux

De nombreuses méthodes permettent d'évaluer la toxicité des métaux à travers notamment l'inhibition de certaines fonctions cellulaires:

Inhibition de certaines activités enzymatiques (Boswell *et al.*, 1999),

Inhibition de la vitesse de respiration (Battistoni *et al.*, 1993 ; Madoni *et al.*, 1999 ; Ong *et al.*, 2010), de la nitrification (Hu *et al.*, 2003 ; Madoni *et al.*, 1999 ; You *et al.*, 2009) : ces mesures aboutissent en général à la détermination de la dose qui inhibe 50% de l'activité (IC 50) d'un paramètre (CF tableau 1-8),

D'après la bibliographie, le cadmium est un métal très toxique pour les flores aérobies et anaérobies. Les concentrations inhibitrices sont indiquées dans le tableau 1-8.

Tableau 1-8. Concentrations inhibitrices en cadmium et autres métaux lourds

<b>Concentration du cadmium (mg/L)</b>	<b>Autres métaux (mg/L)</b>	<b>Effet sur l'activité biologique</b>	<b>Référence bibliographique</b>
2		Perturbe la réaction biologique de l'élimination du phosphate	Tsai <i>et al.</i> (2006)
3		Inhibition de 20 % des bactéries hétérotrophes et nitrifiantes après 1h	Madoni <i>et al.</i> (1999)
5		Il n'existe plus d'espèce pour éliminer les nutriments	Tsai <i>et al.</i> (2005)
12,48	Cu 95,23 Zn 62,11	IC 50	Wei <i>et al.</i> (2005)
14	Cu 5,52 Zn 72,99 Hg 1,71 Ni, 357,14 Pb 446,35 Ag 5,36	IC 50	Anderson <i>et al.</i> (1998)
21,74	Cu 2,5-5,1 Zn 20 Hg 6 Ni, 190 Pb 18	IC 50	Yin <i>et al.</i> (2005)

14			L'élimination de la DCO diminue de 98 % à 41 % et l'élimination de l'ammonium diminue de 98 % à 32 %	Santos <i>et al.</i> (2005)
30			Combiné avec 10 mg/L de Cu(II) : on observe un effet sur la bio-oxydation des microorganismes	Ong <i>et al.</i> (2004)
35			L'efficacité de l'élimination de la DCO diminue	Tsai <i>et al.</i> (2006)
150			IC 50 pour les méthanogènes	Li <i>et al.</i> (2007)
180				
330				
10-15	Ni 2-5		Inhibition de la nitrification	You <i>et al.</i> (2009)
8,3	Cu 173		Inhibition de la nitrification EC 50	Gernaey <i>et al.</i> (1997)
	Hg	Ag	Inhibition de la respiration IC 50	Çeçen <i>et al.</i> (2010)
10,65 (21h)	10,82(21h)	0,33 (21h)		
9,94 (12h)	10,72 (12h)	0,75 (12h)		
8,84 (8h)	9,18 (8h)	0,40 (8h)		
12,01(4h)	8,62 (4h)	0,44 (4h)		

L'inhibition de certains paramètres de croissance (Pamukoglu et Kargi, 2006 ; You *et al.* 2009 ; Pai *et al.*, 2008) ;

La mesure de la viabilité cellulaire (sur boîte) (Benka-Coker et Ekundayo, 1998) ;

La détermination de la dose qui induit la mort de 50% des organismes (EC 50), avec des organismes particuliers (*Daphnia Magna*, *Lemna Minor*, *Raphanus sativus*) (Fjallborg et Dave, 2003).

La toxicité des métaux sur les boues activées dépend du type et de la concentration en métal, du pH, de la température, de la concentration en oxygène dissous, de la présence d'autres ions, de la force ionique et aussi des paramètres de conduite du réacteur comme l'âge de boue et le temps de séjour hydraulique.

⇒ Effets de la spéciation : La toxicité des métaux, et notamment des métaux lourds, est liée non seulement à leur concentration mais aussi à leur spéciation. Les formes libres et liées sont connues pour avoir des effets toxiques sur les organismes des boues par

différents mécanismes (Pamukolu et Kargi, 2007). Semerci et Çeçen, (2007) démontrent l'importance de la spéciation du cadmium dans l'inhibition de la nitrification : les sites sensibles au cadmium sont plutôt localisés sur la surface des cellules qu'à l'intérieur. L'inhibition de la nitrification est fortement corrélée aux concentrations à l'équilibre en métal libre, labile et biosorbé.

⇒ Effets de la concentration : A faibles concentrations, certains métaux comme le cuivre ont une action positive sur les réactions biologiques par action sur le fonctionnement enzymatique des micro-organismes, tandis qu'à des concentrations élevées, ils sont inhibiteurs (Couturier et Galtier, 1999).

*Détermination des IC 50 ou EC 50.* Les résultats concernant les concentrations minimales inhibitrices sont souvent contradictoires (Xie, 2004) notamment du fait de l'hétérogénéité des indicateurs d'inhibition. Cependant, comme le soulignent Çeçen *et al.* (2010), les valeurs d'IC50 seules ne suffisent pas à expliquer le pouvoir inhibiteur d'un métal. Il est nécessaire en parallèle d'étudier la spéciation des métaux.

⇒ Effets de la taille des floes : Selon Henriques *et al.* (2005), dans les procédés dans lesquels on observe une taille des floes plus réduite, soit par le mode de fonctionnement (i.e., BRM) ou par le design (i.e., forces de cisaillement importantes), l'inhibition de la respiration par des composés solubles toxiques (i.e., Cd) est plus importante que dans les procédés dans lesquels la taille des floes est plus importante. Ce résultat est particulièrement intéressant dans la mesure où les procédés de réduction de la production de boue sont susceptibles de réduire la taille des floes et donc de modifier la toxicité des espèces métalliques. D'autre part, selon Henriques et Love (2007), le fait d'appliquer une contrainte mécanique dans les boues induit le relargage de PEC qui ne peuvent plus alors jouer leur rôle de protection contre les métaux (notamment lorsqu'ils sont liés à la cellule et non lorsqu'ils sont libres), ce qui expliquerait l'augmentation de l'inhibition de la respiration concomitante à la réduction de la taille des floes.

#### 1.2.5.3. Adaptation des microorganismes à la toxicité des métaux.

Du fait de la nécessité pour les microorganismes d'absorber certains métaux et d'en rejeter d'autres, un grand nombre de mécanismes d'interactions permettent l'adaptation des

microorganismes à des environnements changeants et hostiles (Valls et Lorenzo, 2002). Dans ce contexte, certains microorganismes résistent mieux que d'autres.

L'exposition des microorganismes aux métaux lourds génère des stratégies de détoxifications intracellulaires (Gadd et Griffiths, 1978). Le système de défense intracellulaire inclut la chélation des ions métalliques sur la surface de la cellule (Wood et Wang, 1983), la biométhylation, l'exocytose (Silver et Phung, 1996) et une résistance plasmidique (Wood et Wang, 1983).

Lorsque les microorganismes sont organisés en biofilm (comme les boues), le premier mécanisme d'élimination du métal est passif et implique des phénomènes d'échange d'ions, de complexation avec des groupes chargés négativement, de l'adsorption et de la précipitation avec les PEC (Principi *et al.*, 2006). Harrison *et al.*, 2007, ont identifié différents mécanismes de résistance et de tolérance des métaux dans les biofilms : 1) une hétérogénéité métabolique due à la structure de la population, 2) une signalisation extracellulaire affectant la physiologie du biofilm, 3) une immobilisation du métal par biosorption, 4) des réactions bioinorganiques du métal avec les métabolites du biofilm, 5) des réponses adaptatives aux espèces métalliques, 6) des réarrangements génétiques, 7) des mutations et des variations phénotypiques. Des temps de contact élevés entre le métal et les microorganismes conduisent à l'acclimatation de la biomasse (Chang *et al.*, 2004 ; Dilek *et al.*, 1998 ; Giller *et al.*, 1998). D'autre part, des études ont montré que la résistance des microorganismes aux métaux était génétiquement orientée par des déterminants chromosomiques ou plasmidiques.

⇒ *La sécrétion de métallothioprotéines* : En réponse à l'exposition à un métal toxique, certains microorganismes génèrent des protéines capables d'induire une chélation du métal : ce sont les métallothioprotéines (Valls et Lorenzo, 2002). Chez les procaryotes ces protéines ont été étudiées en détail pour une espèce de cyanobactéries *Synechococcus*, chez qui elles confèrent une résistance à  $Zn^{2+}$  et à  $Cd^{2+}$ . En réalité ce mécanisme reste marginal chez les procaryotes.

⇒ *L'acquisition de plasmides de résistance* : Lorsque les concentrations en métaux deviennent supérieures aux seuils homéostatiques ou toxiques, d'autres mécanismes plus fréquents sont mis en oeuvre comme l'exocytose et la séquestration ou la transformation en d'autres espèces chimiques. Ces mécanismes de résistance sont souvent portés par des plasmides ce qui facilite leur dispersion de cellules en cellules (Valls et Lorenzo, 2002).

⇒ *La précipitation* : Le mécanisme selon lequel des bactéries arrivent à induire la « précipitation » d'une espèce métallique est fortement répandu chez les bactéries (Valls *et al.*, 2002). Ces mécanismes sont soit enzymatiques soit purement chimiques. Les bactéries sulfato-réductrices sont par exemple capable d'immobiliser plusieurs espèces métalliques en favorisant leur précipitation à la périphérie de la cellule sous une forme oxydée de faible valence non soluble. Cette réaction est catalysée par des enzymes. Les bactéries sulfato-réductrices sont aussi capables de générer des précipités de sulfures métalliques piégés et précipités dans les polymères extracellulaires (Valls *et al.*, 2002) (Figure 1-4). Les phosphates peuvent aussi jouer un rôle dans la précipitation des métaux. Chez certaines bactéries (*Citrobacter sp.*), la précipitation de l'espèce métallique est liée à la libération de phosphore minéral à partir de molécules de phosphore organique cellulaire et ce grâce à l'activité d'une enzyme périplasmique : la phosphatase acide (Valls *et al.*, 2002).

⇒ *Les activités enzymatiques* : les bactéries possèdent un grand nombre d'activités enzymatiques qui permettent de transformer certaines espèces métalliques par oxydation, réduction, méthylation et alkylation. En dehors des activités enzymatiques liées aux points précédents (précipitation, biosorption, ...), il a été démontré que certaines bactéries sont capables de développer des activités enzymatiques spécifiques de certains métaux en particulier l'arsenic et le mercure (Valls *et al.*, 2002). L'activité enzymatique consiste alors en la transformation du métal en une forme non toxique ( $Hg^{2+}$  devient  $Hg^0$  ; As III devient As IV).

METAL	NANO			MICRO			MILLI			MOLAR	
	1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Metallothionein			Export Enzymatic transformation			Precipitation				
ORGANISMS	Eukaryotes			Gram-positives			Acidophilic chemiolythotrophs				
	Cyanobacteria			Gram-negatives			<i>Thiobacillus sp.</i>				
										Archaea	
				<i>E. coli</i>			<i>Alcaligenes sp.</i>				
			<i>Desulfovibrio sp.</i>								

Figure 1-4. Capacités bactériennes et les mécanismes de tolérance aux métaux lourds (source Valls *et al.*, 2002)

### ❖ Mise en évidence de l'impact des métaux sur la diversité des populations

Les effets des métaux sur les populations de boues activées peuvent être mesurés par des techniques de biologie moléculaire. Ainsi, Tsai *et al.* (2005) montrent que des boues activées alimentées avec un effluent contenant 5 mg/L de cadmium présentent des caractéristiques de population très différentes des boues activées natives. Les bactéries très impliquées dans l'élimination des nutriments (i.e., les bactéries nitrifiantes *Nitrosomonas communis*), les bactéries formant des floes *Zooglea ramigera* et des bactéries accumulant le phosphore (*Rubriviax gelatinosus*) disparaissent dans le réacteur alimenté avec 5 mg/L de Cd générant une diminution des activités épuratoires correspondantes.

L'application de la DGGE à des sols enrichis en eaux usées contaminées a révélé des différences dans la structure de la communauté archaea à la contamination croissante en métaux lourds (Sandaa *et al.*, 1999). Les profils de DGGE ont indiqué que les communautés bactériennes ont subi des modifications par le compost pollué en cadmium. De nouvelles bandes ont émergé dans la première phase d'incubation, et certaines bandes ont disparu dans le stade final de l'incubation (Chen *et al.*, 2010).

### 1.3. Conclusion de la première partie du Chapitre 1

Les procédés de traitement des eaux usées par boues activées conduisent à des productions importantes de boues (de l'ordre de 20 kg/habitant). Les activités industrielles et domestiques sont potentiellement la source d'une contamination des eaux usées par des micropolluants. A l'issue de l'étape de traitement des eaux usées les métaux se retrouvent dans leur grande majorité dans les boues produites (70-90 %) qui sont ensuite envoyées vers la filière boue. Au cours de cette étude nous nous sommes particulièrement intéressés aux micropolluants métalliques et une espèce a été choisie en raison de son fort niveau de toxicité sur l'homme et sur l'environnement : le cadmium. D'autre part, cette étude bibliographique a montré que les métaux lourds pouvaient être fortement toxiques, pour les populations microbiennes des boues activées et que cette toxicité était fortement dépendante de la nature du métal et de la nature des interactions entre la boue et le métal. Au cours des procédés de traitement des eaux, les interactions entre les métaux lourds et les boues activées sont complexes et liées à la nature et à la concentration du métal aussi bien qu'aux caractéristiques physiques, chimiques des boues activées.

## 2. LA STABILISATION BIOLOGIQUE DES BOUES : AMELIORATION DES PERFORMANCES DES PROCEDES ET DEVENIR DES METAUX

A l'issue de l'étape de traitements primaires et d'épuration des eaux usées, les boues primaires et secondaires entrent alors dans la filière boue. Il existe 5 grandes étapes dans la filière boue à partir des boues brutes : 1) l'épaississement, 2) la stabilisation, 3) le conditionnement, 4) la déshydratation, 5) l'élimination (figure 1-5).

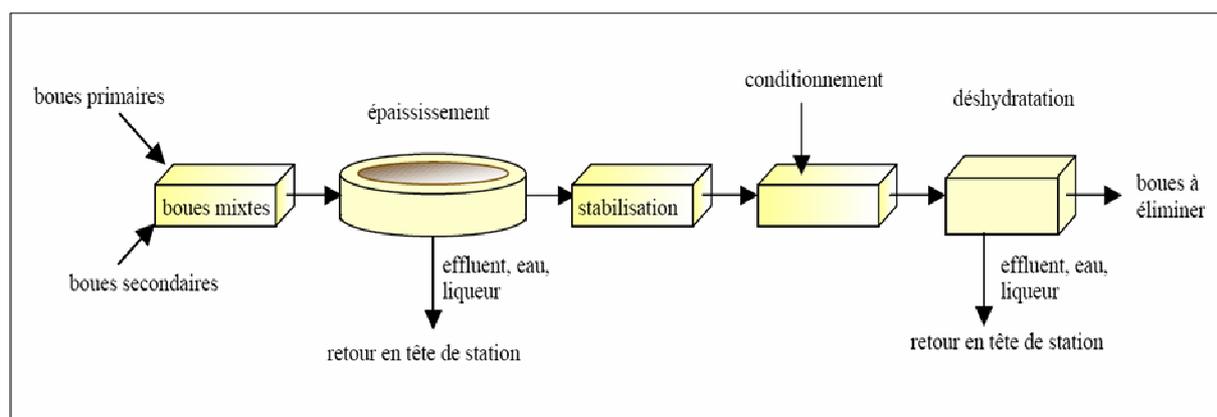


Figure 1-5. Les différentes étapes de traitement et de valorisation des boues

Parmi les différentes étapes de la filière boue, l'étape de stabilisation constitue une étape cruciale tant du point de vue de la réduction de la production de boues en volume que du point de vue de la spéciation des métaux. C'est pourquoi nous avons particulièrement concentré nos études sur cette étape de la filière boue.

L'étape de **stabilisation** a pour but de réduire le pouvoir fermentescible des boues ainsi que les nuisances olfactives. Il existe trois grands types de stabilisation : la stabilisation biologique (la **digestion aérobie ou anaérobie**, le compostage (Mata-Alvarez *et al.*, 2000)), la stabilisation chimique (chaulage, stabilisation aux nitrites, oxydation) ou la stabilisation physique (séchage poussé) (Degrémont, 1989 ; OTV, 1997). Les techniques chimiques ne conduisent pas à réduire le volume de boues produites.

Les techniques biologiques permettent de dégrader les matières organiques, et conduisent à une réduction de la matière. Lors de la digestion aérobie de boues (aération des boues), on peut obtenir des taux de réduction de la matière organique de l'ordre de 20 à 35 %. La digestion anaérobie des boues présente un double avantage : une réduction de la matière

organique des boues de l'ordre de 50 % et la possibilité de produire du biogaz (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>) réutilisable. Les digestions aérobie ou anaérobie sont actuellement utilisées pour réduire et stabiliser la production des boues. Elles présentent des avantages et des inconvénients qui sont présentés dans le tableau 1-9.

Tableau 1-9. Avantages et inconvénients des digestions aérobie et anaérobie des boues (OTV, 1997)

	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Digestion Aérobie</b>	Hygiénisation	Consommation énergétique non négligeable
	Dégradation rapide	Efficacité aléatoire
	Traitement de l'azote	Moins de dégradation de la pollution
	Réduction efficace de la matière sèche	Forte sensibilité aux variations de charges organiques et aux composés toxiques
<b>Digestion Anaérobie</b>	Production d'un gaz valorisable sous forme d'énergie	Dégradation lente
	Réduction du nombre de micro-organismes pathogènes	Absence de traitement de l'azote
	Intérêt agronomique	Démarrage des installations long
	Demande en énergie plus faible	Coûts d'investissement importants
		Chute du pouvoir calorifique des boues

## 2.1. La digestion aérobie

### 2.1.1. Principe et performances

#### →Le principe

La digestion aérobie, utilisée dans la file boue au niveau de l'étape de stabilisation, est un processus bactérien se produisant en présence d'oxygène. Ce procédé consiste, par une aération prolongée des boues, à poursuivre le développement des micro-organismes aérobies au-delà de la période de synthèse des cellules et d'épuisement de substrats jusqu'à réaliser leur auto-oxydation. Au cours de la digestion aérobie, la matière organique biodégradable est rapidement consommée. Le manque de substrat facilement biodégradable est le facteur limitant et induit la mort de certaines bactéries qui servent ensuite de substrat à d'autres bactéries pour assurer l'énergie nécessaire à la maintenance cellulaire. La consommation de substrats issus de la mort cellulaire de bactéries par d'autres bactéries porte le nom de croissance cryptique ou concept de mort régénération (Canales *et al.*, 1994 ; Ødegaard, 2004).

Parailleurs, la consommation par les cellules de leurs réserves intracellulaires afin d'assurer leur maintenance cellulaire porte le nom de respiration endogène (Dawes et Ribbons, 1964).

Les micro-organismes aérobies, placés en phase de respiration endogène, dégradent les matières organiques existant librement ou stockées dans la masse bactérienne. Cette réaction peut être présentée par l'équation suivante:



L'objectif final de l'étape de digestion aérobie est d'obtenir un « produit » stable en réduisant à la fois le volume et la masse des boues. Le résidu final doit être « minéralisé » ce qui signifie que la fraction résiduelle représente un si faible contenu énergétique qu'elle est considérée comme biologiquement stable et peut être utilisée pour l'épandage (D'antonio, 1983). Les boues traitées sont considérées comme stables si leur vitesse spécifique de consommation d'oxygène est inférieure ou égale à 1 mg O<sub>2</sub>/h/g (US EPA, 1989). Le résidu final doit avoir de bonnes propriétés de décantation et doit pouvoir être facilement épaissi et déshydraté. La digestion aérobie permet d'hygiéniser les boues, et elle a une bonne efficacité pour le traitement de l'azote. De plus, le mode de fonctionnement est plus flexible et présente moins de problèmes d'odeurs comparé au procédé de digestion anaérobie.

### → Les performances

Le procédé de stabilisation aérobie des boues urbaines a surtout été pratiqué aux Etats-Unis, en Allemagne et en Suisse. Le procédé de digestion aérobie est plutôt utilisé pour de petites installations (taille < à 20 000 m<sup>3</sup>/j) (Bernard *et al.*, 2000 ; Ding *et al* 2006, Liu *et al.*, 2010) pour lesquelles ce procédé constitue le meilleur compromis en terme de stabilisation, avec des coûts d'investissement moindres et des conditions de fonctionnement plus simples (WEF, 1992). A température ambiante, la digestion aérobie permet d'atteindre des taux de réduction des MES de l'ordre de 42-53 % et de réduction des MVS de l'ordre de 53-64 % (Bernard et Gray, 2000) pour un temps de séjour de 17 jours.

La digestion aérobie conventionnelle nécessite des ouvrages de taille importante du fait des temps de séjours élevés (15-30 jours) nécessaires pour obtenir la stabilisation des boues (Jin *et al.*, 2009). La cinétique de la digestion aérobie est plus rapide que celle de la digestion anaérobie. Par conséquent pour les petites et moyennes collectivités, les frais de fonctionnement sont moindres de ce point de vue. Cependant, du fait des coûts énergétiques

liés à la mise en œuvre d'une aération et du fait d'une impossibilité de récupération de l'énergie, contrairement au procédé de digestion anaérobie, les frais d'exploitation se révèlent au final être plus importants que dans le cas de la digestion anaérobie.

### 2.1.2. Facteurs limitant l'efficacité de la digestion

→ **Le pH** : Au cours de la digestion aérobie, le pH chute du fait de la nitrification ce qui peut éventuellement inhiber le métabolisme et dégrader la qualité de l'effluent (Anderson et Mavinic, 1993).

→ **La température** : la température affecte significativement les performances du procédé de digestion aérobie. Des températures élevées (45-70 °C) conduisent à de meilleures performances en terme d'activité microbienne (vitesses de dégradation accrue), et donc à une réduction des temps de séjour nécessaires pour un niveau de réduction de boue donné, et en terme d'hygiénisation (Jian *et al.* 2010). Cependant pour mettre en œuvre des digesteurs aérobie à des températures de 55-65 °C, la chaleur doit être apportée de manière extérieure ce qui augmente les coûts d'exploitation et limite son utilisation pour les grandes unités. La digestion aérobie thermophile (55 °C) autothermique (ATAD) est en ce sens considérée comme un procédé prometteur (Liu *et al.*, 2010 ; Jain *et al.*, 2010 ; Layden *et al.*, 2007 ; Nosrati *et al.*, 2007). L'énergie nécessaire pour maintenir des conditions thermophiles est produite par la digestion aérobie elle-même. Les conditions d'auto suffisance énergétique sont assurées à travers la chaleur générée par la bio-oxydation de la matière organique solide (Nosrati *et al.*, 2007). Ce processus est rendu possible par le maintien d'une teneur faible en matières volatiles (2 %) dans l'alimentation en boues (Sreekrishnan *et al.*, 2007). Pour des températures de l'ordre de 55-65 °C des études ont montré que l'activité hydrolytique de certaines bactéries est favorisée. Les bactéries aérobies thermophiles sont des bactéries excréant des protéases, elles appartiennent au genre *Bacillus* avec une prédominance de *Géobacillus stearothermophilus* (Hasegaw *et al.*, 2000).

→ **L'hydrolyse de la matière organique** : Les macromolécules organiques (sucres, protéines) ne peuvent pas être assimilées telles quelles, elles doivent être d'abord hydrolysées en monomères ou en petits oligomères (Confer et Logan 1998). L'étape d'hydrolyse est plus rapide qu'en anaérobie et l'activité alpha glucosidase semble être plus importante en aérobie qu'en anaérobie (Goel *et al.*, 1998). Compte tenu de la complexité de la composition de l'eau usée, une grande variété d'enzymes extracellulaires est nécessaire à l'hydrolyse complète des différents substrats. Les enzymes extracellulaires qui participent à l'hydrolyse peuvent être

classées en 2 catégories (figure 1-6): celles qui sont liées à la surface des cellules (ecto-enzymes) (Chrost, 1991) et celles libres dans le milieu (exo-enzymes) (Vetter et Demig, 1999). L'activité des ecto-enzymes est fortement liée à la diffusion du substrat à faible concentration dans la structure du floc (Hoppe *et al.*, 1988). Certaines études ont montré que les exo-enzymes sont associées aux PEC (Conrad *et al.*, 2000 ; Frølund *et al.*, 1995 ; Guellil *et al.*, 2001). Cadoret *et al.* (2002) ont montré que 5% de l'activité alpha glucosidase et 23% de l'activité protéase dans des boues activées étaient liées à la fraction facilement extractible des floes de boues activées et donc aux exo-enzymes. Confer et Logan (1997) ont montré qu'en culture libre 97% de l'activité leucine aminopeptidase (protéase) et 93% de l'activité  $\alpha$ -glucosidase se situent au niveau du contact avec la cellule (ecto enzyme) et moins de 3% de ces activités se situent dans la solution de boues. D'autre part, selon ces mêmes auteurs l'activité hydrolytique serait 5 fois plus importante au contact avec les cellules par rapport à l'activité mesurée dans la phase soluble. Le mécanisme le plus probable selon ces auteurs consisterait donc en une première dégradation des macromolécules au cours d'une hydrolyse associée aux cellules suivie d'un relargage des fragments hydrolysés dans la solution de boues, ce mécanisme se répèterait jusqu'à l'obtention de fragments suffisamment petits pour être assimilés dans les cellules.

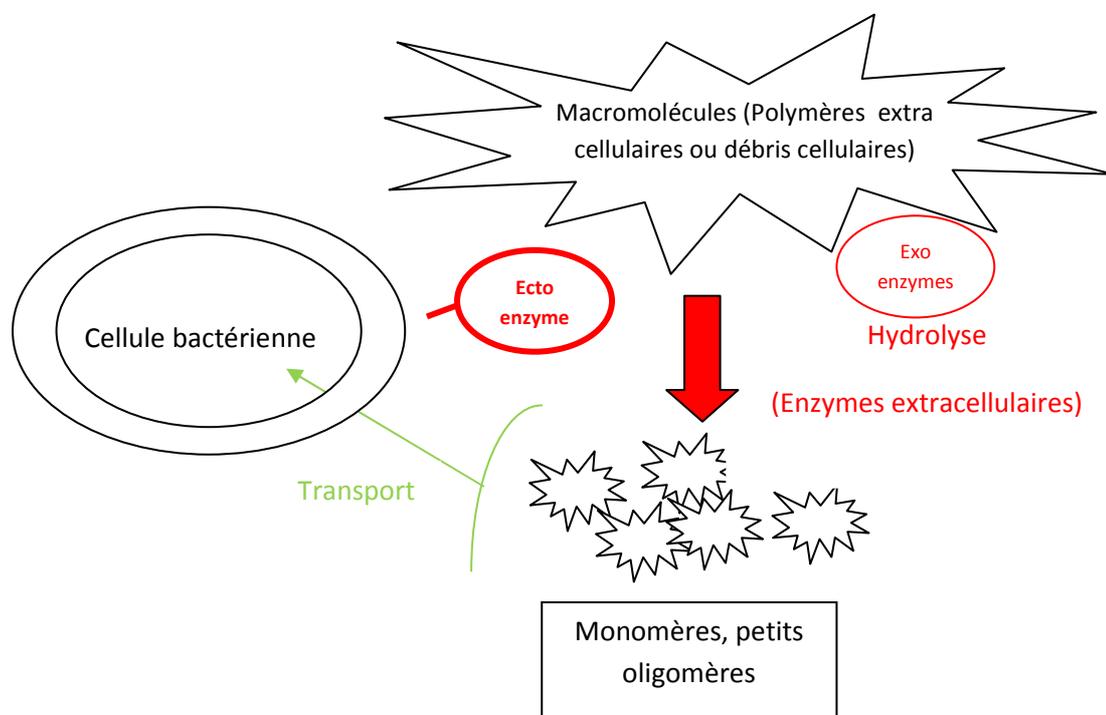


Figure 1-6. Schématisation de l'étape d'hydrolyse lors de la digestion aérobie des boues activées.

Selon Higgins et Novak (1997), l'hydrolyse simultanée des polymères extracellulaires et des cellules elles mêmes constitue un facteur limitant la vitesse et l'importance de la dégradation. La structure du floc rend difficile la diffusion des macromolécules et donc leur capacité à être accessible pour les enzymes et donc hydrolysées (Cadoret *et al.*, 2002). Une dispersion du floc de boues activées devrait donc en théorie conduire à une meilleure mise en contact des enzymes hydrolytiques et de leurs substrats. Cadoret *et al.* (2002) montrent qu'après dispersion des floccs de boues activées par des ultrasons, l'hydrolyse des protéines n'augmente pas alors que l'hydrolyse des polysaccharides augmente d'un facteur 5.

→ **La toxicité des métaux** : il existe peu d'études concernant la toxicité des métaux au cours de la digestion aérobie spécifiquement. Les mécanismes de toxicité des métaux au cours de la digestion aérobie peuvent être décrits de manière similaire à ceux décrits dans les boues activées au niveau des bassins d'aération.

### *2.1.3. Modifications de la spéciation des métaux au cours de la digestion aérobie*

Lors d'une stabilisation biologique des boues, la matière organique est dégradée, mais les éléments traces métalliques s'accumulent dans les boues en fin de digestion. Fuentes *et al.* (2008) montrent que le mode de stabilisation de la boue a un impact sur la spéciation des métaux dans la boue. Plus les boues sont minéralisées lors de l'étape de stabilisation et moins la proportion de métal disponible est importante la majorité des espèces métalliques se trouvant dans la fraction réductible et oxydable. Selon cette étude le fer, le nickel et le plomb seraient fortement liés à la fraction résiduelle (et donc fortement liés aux boues), alors que le cuivre, le cadmium et le chrome seraient associés à la fraction oxydable. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Yuan *et al.* (2011) dans le contexte d'une stabilisation thermochimique (Acétone, 593K). Ainsi, dans les boues stabilisées la biodisponibilité et la toxicité des métaux sont moindres que dans les boues activées et ce malgré un contenu global en espèces métalliques plus importants.

## 2.2. La digestion anaérobie

### 2.2.1. Principe et performances

#### →Le principe

La digestion anaérobie est un procédé traditionnel pour réduire le volume des boues (Weemaes *et al.*, 2000). Elle consiste en la transformation de la matière organique en un biogaz composé principalement de méthane et de dioxyde de carbone valorisable sous forme d'énergie (chaudière produisant de la chaleur ou de l'électricité). La méthanisation conduit à la production de 60-75 % de CH<sub>4</sub>, de 19 à 33% de CO<sub>2</sub> et de 0 à 1 % de N<sub>2</sub> (source site internet ADEME, 2011). Cette transformation est opérée par un consortium bactérien fonctionnant en anaérobiose. Dans le même temps, les micro-organismes anaérobies consomment peu d'énergie, ce qui entraîne une production de boues limitée (3 à 20 fois inférieure à un traitement aérobie). En effet, les micro-organismes anaérobies n'utilisent qu'environ 10 à 15 % de l'énergie du substrat pour leur croissance, le reste étant utilisé pour la production du biogaz. Enfin, la digestion anaérobie permet une réduction des microorganismes pathogènes (Horan *et al.*, 2003).

La digestion anaérobie est plutôt utilisée pour les installations de grande taille lorsque la production de méthane engendrée devient rentable en regard des coûts d'investissements (Liu *et al.*, 2010). Elle permet des conditions favorables à la stabilisation des boues avec une empreinte énergétique faible couplée à de bonnes performances en terme de stabilisation (Appels *et al.*, 2008). En France il existerait environ 200 unités de traitement des boues (eaux usées urbaines et industrielles confondues) (source ADEME). Processus lent en comparaison de la digestion aérobie, la digestion anaérobie nécessite des temps de séjour importants et de gros volumes de réacteurs pour obtenir une stabilisation des boues.

La digestion anaérobie se décompose en quatre étapes : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse (Tiehm *et al.*, 2001 ; Navia *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2003). L'étape d'hydrolyse est aussi considérée comme étant le facteur limitant de la digestion anaérobie (Thiem *et al.*, 2001).

### ① L'hydrolyse

La première étape de la digestion anaérobie est l'étape d'hydrolyse, étape limitante, schématiquement comparable à la figure 1-6 en digestion aérobie, mais avec des vitesses d'hydrolyse plus lentes qu'en aérobie. Au cours de cette étape les molécules organiques de haut poids moléculaire comme les polysaccharides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques sont hydrolysés en monomères. Cette étape est généralement lente tandis que l'acidogénèse, l'étape suivante est 30 à 40 fois plus rapide (Moletta, 1993). Les bactéries impliquées dans l'étape d'hydrolyse ont un métabolisme de type anaérobie strict ou facultatif (Archer et Kirsop, 1990), elles sont phylogénétiquement très hétérogènes. Les vitesses de croissance des bactéries hydrolytiques sont rapides et le facteur limitant est l'hydrolyse de la matière particulaire. La majorité des enzymes hydrolytiques actives sont associées au floc (Goel *et al.*, 1998).

### ② L'acidogénèse

Au cours de l'étape d'acidogénèse, les monomères issus de l'étape précédente sont transformés en acides gras volatils, en alcools, en acides organiques, hydrogène, dioxyde de carbone. Les bactéries anaérobies strictes du genre *Clostridium* constituent une fraction importante de bactéries acidogènes mais les genres bactériens *Bacteroides*, *Bacillus*, *Pelobacter*, *Acetobacterium* et *Ulyobacter* et *Enterobacteriaceae* sont aussi souvent présents (Moletta, 1993). L'étape d'acidogénèse est rapide et en condition de surcharge organique on observe une accumulation d'intermédiaires en particulier d'hydrogène et d'acétate qui peuvent avoir une action inhibitrice sur les microorganismes acétogènes et méthanogènes et peuvent conduire à un arrêt de la digestion anaérobie (Thiele, 1991).

### ③ L'acétogénèse

Au cours de l'étape d'acétogénèse, les différents composés issus des phases précédentes sont transformés en précurseurs directs du méthane : l'acétate, l'hydrogène et le gaz carbonique. Il existe deux voies possibles pour cette transformation. Trois espèces participent à l'étape d'acétogénèse : 1) les bactéries acétogènes syntrophes productrices obligées d'hydrogène, 2) les bactéries homoacétogènes productrices d'acétate divisées en deux groupes selon l'origine de l'acétate et 3) les bactéries sulfato réductrices (BSR) qui utilisent comme accepteur terminal d'électrons le sulfate  $\text{SO}_4^{2-}$  qu'elles réduisent en sulfure ( $\text{S}^{2-}$ ) et le sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) et le thiosulfate ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) qui sont transformés en sulfure. En présence d'une concentration non

limitante en sulfate, les BSR sont en compétition avec des micro-organismes méthanogènes pour les substrats communs : hydrogène, CO<sub>2</sub>, acétate.

#### ④ La méthanogenèse

Au cours de l'étape de méthanogenèse les produits de l'acétogenèse (acétate, formate, CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>) sont transformés en méthane, H<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub>. Les méthanogènes sont des micro-organismes anaérobies stricts qui appartiennent au domaine des *Archaea* (ou encore *Archées*). Il existe deux types d'*Archaea* méthanogènes : les archées hydrogénophiles (résuisant le dioxyde de carbone avec l'hydrogène pour former du méthane et de l'eau) et les archées acétoclastes (transformant l'acétate en méthane et gaz carbonique).

#### ➔ Les performances

En digestion anaérobie classique mésophile, pour un temps de séjour hydraulique moyen de 20 jours, le rendement de conversion de la matière organique en biogaz et de l'ordre de 25 à 60% (Parkin *et al.*, 1986 ; Bhattacharaya *et al.*, 1996 ; Dumas *et al.*, 2010). Cependant, de tels temps de séjours sont en réalité insuffisants pour atteindre une dégradation totale de la matière organique potentiellement biodégradable. Ainsi dans des conditions de fonctionnement classiques 45 à 70 % de la DCO restent non méthanisées. Cette DCO « réfractaire » est composée de PEC organisés dans la matrice du floc de boues, dans lesquels les protéines représentent une forte proportion. La biodégradation de cette fraction est possible à condition de favoriser l'hydrolyse de ces composés. Pour ce faire plusieurs solutions peuvent être envisagées comme l'allongement de la durée de la digestion ou la mise en place de prétraitements. Ekama *et al.* (2007) ont montré qu'il était nécessaire de porter le temps de séjour à 60 jours pour atteindre une méthanisation complète de la DCO biodégradable de la boue).

#### 2.2.2. Facteurs limitant l'efficacité de la digestion anaérobie

Les bactéries de la digestion anaérobie sont très sensibles et peuvent être inhibées par différents paramètres : le pH, l'alcalinité, la concentration en ammoniacque, la concentration en hydrogène, en sodium, en potassium, en métaux lourds, en acides gras volatils notamment (Appels *et al.*, 2008).

**→La température :**

La digestion anaérobie peut être conduite à différentes températures soit en conditions mésophiles (30-40 °C), soit en conditions thermophiles (50-60 °C). En Europe la plupart des digesteurs sont conduits à une température de 35 °C (De Baere *et al.*, 2000).

**→Le pH :**

Un pH acide inhibe la méthanogénèse et provoque une modification de l'équilibre calco-carbonique provoquant l'ionisation des AGV qui deviennent alors inhibiteurs. L'étape de méthanogénèse conduit à la formation d'ions bicarbonates qui peuvent précipiter avec les ions calcium pour former du carbonate de calcium (Batstone *et al.*, 2002). Les précipités de carbonates de calcium forment la calcite dont la charge de surface varie avec le pH. La modification du pH peut conduire à une modification de la spéciation des métaux et à la formation de complexes hydroxydes et/ou carbonates.

**→L'ammoniaque :**

L'ammoniaque est nécessaire à la digestion anaérobie à des concentrations inférieures à 200 mg/L (Liu et Sung, 2002). Pour des concentrations supérieures au g/L, l'ammoniaque devient au contraire inhibiteur (Chen *et al.*, 2008). L'ammoniac est produit par la dégradation biologique de la matière organique (en particulier les protéines et l'urée). L'inhibition de la flore anaérobie est liée à la diffusion passive de l'ammoniaque dans la cellule provoquant la modification du pH intracellulaire, l'augmentation des besoins pour la maintenance, l'inhibition de réactions enzymatiques (Chen *et al.*, 2008). Les bactéries méthanogènes sont les moins tolérantes à l'ammoniaque : elles sont inhibées dès 4,2 g/L. Siles *et al.* (2010) montrent même que des concentrations plus faibles (620 mg d'ammoniaque libre/L) inhibent la production de méthane lors d'une digestion anaérobie thermophile. L'inhibition de la flore anaérobie par l'ammoniaque est fortement dépendante de la concentration, du pH (des valeurs élevées accentuent l'inhibition) (Chen *et al.*, 2008).

**→Le sulfite :**

Au cours de la digestion anaérobie le sulfate est réduit en sulfite par les bactéries sulfato-réductrices. Il existe deux formes d'inhibition due à la réduction des sulfates : 1) l'inhibition due à la compétition pour le substrat entre les bactéries sulfato réductrices et les

méthanogènes, 2) l'inhibition due à la toxicité des sulfites envers différents groupes de bactéries (Chen *et al.*, 2008).

### → La toxicité des métaux

Les métaux lourds peuvent être inhibiteurs pour la digestion anaérobie (tableaux 1-10 et 1-11). Les métaux identifiés comme étant particulièrement toxiques sont : le Cr, le Fe, le Co, le Cu, le Zn, le Cd et le Ni (Chen *et al.*, 2008). Les étapes d'acidogénèse et de méthanogénèse de la digestion anaérobie des boues sont affectées par la présence de Cu, Cr et Zn (Hickey *et al.*, 1989 ; Lin, 1993 ; Yenigun *et al.*, 1996 ; Yu *et al.*, 2001 ds Lin *et al.*, 2008).

La complexité du processus de dégradation anaérobie fait que les métaux peuvent se trouver sous des formes différentes au sein du procédé : 1) précipités sous forme de sulfites, carbonates ou hydroxydes, 2) sorbés à la fraction particulaire des boues, 3) formant des complexes en solution avec de la matière organique (Chen *et al.*, 2008) 4) sous forme libre. Les différentes études montrent que c'est le métal libre qui est toxique. Cependant, certains éléments traces métalliques sont impliqués dans les réactions enzymatiques des étapes d'acidogénèse et de méthanogénèse (Kida *et al.*, 2001), il est donc nécessaire de maintenir un certain niveau de concentration en certains éléments traces métalliques si l'on veut maintenir un bon rendement de production de méthane (notamment Co, Zn, Ni).

Tableau 1-10. Concentrations inhibitrices IC50 pour la méthanogénèse et l'acidogénèse (mg/L) pour différentes espèces métalliques

Métal	Acidogénèse			Méthanogénèse	
	Lin <i>et al.</i> , 1993	Yenigun <i>et al.</i> , 1996	Zheng <i>et al.</i> , 2004	Lin <i>et al.</i> , 1992	Karri <i>et al.</i> , 2006
Cr	17	Na	Na	14,7	/
Cu	0,9	2-8	364	12,5	20,7 (Méthanogène acétoclaste) 8,9 (méthanogène hydrogénotrophe)
Zn	3,5	7-18	>364	16	/

Selon Lin *et al.* (2008), lorsque la biomasse est en contact avec une concentration en cuivre égale à 6,5 mg/L, la production de H<sub>2</sub> est réduite de 50 %. Cependant, à de faibles concentrations en Cu (3 mg/L), la production d'hydrogène est stimulée de 10-20 %. Les concentrations en cuivre inhibant à 50 % l'étape d'hydrolyse, d'acidogénèse et de méthanogénèse d'après les études bibliographiques sont présentées dans le tableau 1-11.

Tableau 1-11. Concentrations inhibant en cuivre à 50 % l'hydrolyse, l'acidogénèse et la méthanogénèse (en mg/L) (Lin *et al.*, 2008)

Hydrolyse		Acidogénèse		Méthanogénèse	
6,5	350	0,9	2-8	364	12,5

### 2.2.3. Modifications de la spéciation des métaux

La digestion anaérobie modifie la spéciation des métaux par différents mécanismes chimiques et biologiques : adsorption par chimie sorption, précipitation chimique ou biologique, complexation intracellulaire ou extracellulaire sur des composés organiques ou inorganiques (Couturier, 2002).

La digestion anaérobie cause une augmentation du contenu en métaux lourds par unité de masse sèche (Chipasa *et al.*, 2003). Les concentrations sont 10 à 20 fois plus importantes dans la boue finale après digestion anaérobie (Karvelas *et al.*, 2003). Les résultats de cette étude montrent que l'augmentation de la teneur en une espèce métallique dans les boues digérées n'est pas proportionnelle à leur concentration initiale dans l'influent.

A l'issue de l'étape de digestion anaérobie, Hanay *et al.* (2008) montrent que les espèces représentées en plus forte concentration sont le fer, le Zn et le Mn. Certains métaux comme le Cd, le Mn, le Pb et le Fe se retrouvent dans la fraction résiduelle. Cu et Cr sont plus fortement représentés dans la fraction oxydable et le Ni dans la phase échangeable même si sa concentration reste inférieure à la norme européenne et donc potentiellement mobilisable.

En conditions d'anaérobiose, le principal mécanisme d'accumulation des métaux dans les boues est la précipitation avec les ions sulfate (Jong et Parry, 2003 ; La *et al.*, 2003), phosphate (Van Hullebusch *et al.*, 2003) ou carbonate (alors qu'en aérobie c'est plutôt la biosorption). La réduction des sulfates en sulfites contribue largement à favoriser le mécanisme de précipitation des métaux en anaérobiose à cause de la faible solubilité des sulfites métalliques (Jong et Parry, 2003 ; La *et al.*, 2003 ; Quan *et al.*, 2003 ; Van der Veen *et al.*, 2007). Van Hullebusch *et al.* (2005) montrent que le Co et le Ni ont tendance à s'adsorber ou à précipiter avec des sulfites de fer. Dans les réacteurs anaérobies, la plupart des métaux se retrouvent dans la fraction oxydable (cf protocole BCR) liés soit aux sulfites, soit à la matière organique (Van der Veen *et al.*, 2007). Au cours de la digestion anaérobie les ions sulfure sont le principal agent précipitant chimique des métaux, ce qui conduit à la formation de sulfates métalliques non solubles. Les carbonates conduisent aussi à des précipités. La

précipitation peut également être d'origine biologique : elle est alors liée à la production de sulfures par les enzymes bactériennes, ce qui conduit à la précipitation de métaux à la surface cellulaire (Couturier, 2002).

### 2.3. Amélioration des performances de digestion aérobie et anaérobie : les prétraitements

Sur la ligne boue, les principaux prétraitements appliqués en vue d'améliorer les digestions aérobie et anaérobie sont les traitements par « **désintégration** » qui permettent d'obtenir une hydrolyse accrue de la matière organique particulaire. La lyse des boues (c'est-à-dire la solubilisation du floc et/ou la lyse cellulaire des bactéries) puis la croissance cryptique générée au cours des digestions peut être obtenue par des procédés de désintégration physiques, chimiques ou par combinaison des deux. Parmi ces procédés on s'intéressera notamment à ceux qui apparaissent comme les plus prometteurs au sens de leur occurrence dans la bibliographie (Carrère *et al.*, 2010 ; Khanal *et al.*, 2007) et de leur application à l'échelle industrielle en amont d'une digestion aérobie ou anaérobie : le **traitement thermique** (basse et haute température), la **sonication** (Bougrier *et al.*, 2005 ; Salsabil *et al.*, 2009).

Ces prétraitements agissent à différents niveaux : 1) ils permettent de solubiliser la matière organique des flocons qui devient plus accessible et donc plus biodégradable, 2) ils libèrent aussi les enzymes extracellulaires hydrolytiques induisant ainsi une augmentation de leurs activités, 3) ils induisent intrinsèquement une réduction des boues en provoquant la lyse des bactéries des flocons de boues activées.

Sur la file boue, les prétraitements peuvent être appliqués aux boues primaires, secondaires ou à leur mélange. Il est à priori plus intéressant d'utiliser les prétraitements sur les boues secondaires plus lentement biodégradables (Carrère *et al.*, 2010)..

L'action attendue des prétraitements sur les procédés de digestion est soit une augmentation des vitesses soit une augmentation de la biodégradabilité intrinsèque (augmentation du rendement de production de biogaz et réduction de la production de boues) conduisant ainsi à une augmentation de la productivité de la digestion.

Différents paramètres peuvent être utilisés pour mesurer l'efficacité de la désintégration des boues. Ces paramètres se répartissent en trois catégories : les paramètres chimiques (i.e., augmentation de matière organique ou minérale dans la phase soluble), physiques (i.e., modification de la taille des particules), et biologiques (i.e., lyse cellulaire).

Dans cette étude bibliographique, nous nous sommes particulièrement intéressés aux modifications des propriétés chimiques, physiques, biologiques et aussi aux modifications de la spéciation des métaux induites par le prétraitement.

### 2.3.1. La sonication

#### 2.3.1.1. Principe

La sonication est l'un des procédés de désintégration le plus utilisé pour favoriser l'étape d'hydrolyse lors de la stabilisation des boues. Les ultrasons induisent (notamment à faible fréquence) la formation de bulles de cavitation dans la phase liquide. Ces bulles grossissent puis éclatent brutalement lorsqu'elles atteignent une taille critique. Ce phénomène a pour conséquence une augmentation locale de la température et de la pression à l'interface gaz-liquide ainsi que de la turbulence et des contraintes de cisaillement élevées dans la phase liquide (Khanal *et al.*, 2007). Dans ces conditions extrêmes, des espèces oxydantes très réactives (radicaux OH ; HO<sub>2</sub> ; H) et du peroxyde d'hydrogène sont formés. La désintégration des boues suite à un traitement par sonication serait donc liée à 3 phénomènes : les forces de cisaillement, la décomposition thermique des substances volatiles hydrophobes des boues, et l'effet oxydant des radicaux générés (Wang *et al.*, 2005 ; Bougrier *et al.*, 2005). Les données de la littérature indiquent que le traitement par ultrason est efficace sur la solubilisation des boues activées lorsqu'il est utilisé dans des conditions de faible fréquence (20 kHz-40 Hz) (Carrère *et al.*, 2010) et de forte intensité (Gonze *et al.*, 2003 ; Salsabil, 2009 ; Zhang *et al.*, 2009).

Lors d'un traitement par ultrasons la dose appliquée peut s'exprimer sous la forme de l'énergie spécifique ES définie comme l'énergie nécessaire par kg de boues (exprimées en matières sèches) pour atteindre un certain degré de désintégration. L'énergie spécifique est fonction de la puissance des ultrasons, de la durée de la sonication, du volume de boues soniquées et de la concentration en matières sèches dans la boue (équation 1).

$$Es = \frac{P \times t}{V \times [MS]} \quad \text{Eq.1}$$

Avec :

Es l'énergie spécifique en kW/kgMS, P la puissance en kW, t la durée de la sonication en secondes, V le volume des boues en L, [MS] la concentration en matières sèches en kg/L.

### 2.3.1.2. Modifications des propriétés des boues après sonication

#### ➔ **Modification des propriétés chimiques de la boue**

Le traitement par ultrasons induit une solubilisation de la matière organique (protéines, sucres, substances humiques « like » des floccs de boues activées (Gonze *et al.*, 2003 ; Bougrier, 2005 ; Laurent, 2009) (tableau 1-12). Le niveau de solubilisation reflète alors l'efficacité du traitement. Il est proportionnel pour une énergie spécifique donnée à la concentration des boues (Gonze *et al.*, 2003). La fréquence de travail est aussi un paramètre important : la désintégration est plus efficace aux basses fréquences (Thiem *et al.*, 2001).

Il existe un seuil énergétique entre 1000 et 16 000 kJ /kgMS permettant d'obtenir une solubilisation des boues dépendant notamment de la concentration des boues (Carrère *et al.*, 2010). La plupart du temps l'efficacité de la solubilisation est mesurée par la concentration de la DCO dans la phase soluble selon l'équation 2.

$$\text{Solubilisation}_{\text{composé}}(\%) = \frac{\text{Composé}_T - \text{composés}_i}{\text{Composé}_{T_i} - \text{composés}_i} \times 100 \quad \text{Eq.2}$$

Avec :

- solubilisation composé : taux de solubilisation du composé (%)
- composé<sub>T</sub> : concentration dans la fraction soluble après traitement (mg/L)
- composé<sub>i</sub> : concentration initiale dans la fraction soluble (mg/L)
- composé<sub>T<sub>i</sub></sub> : concentration totale initiale (mg/L)

Khanal *et al.* (2007) observent une relation linéaire entre la solubilisation de la DCO et l'énergie spécifique jusqu'à 35 000 kJ/kg MS, au-delà la solubilisation n'est plus significativement améliorée. Pour Salsabil (2008), il est possible d'améliorer significativement la solubilisation jusqu'à des doses de 100 000 kJ/kg TS. Suite à un traitement par ultrasons, les différentes études montrent que l'on observe une augmentation des concentrations en protéines, DCO, substances de type humique, et polysaccharides en solution. L'ordre de solubilisation généralement observé pour des gammes de traitement allant jusqu'à 200 000 kJ/kgMS est le suivant : substances type humique >

protéines>polysaccharides (Laurent *et al.*, 2009b ; Salsabil *et al.*, 2009 ; Bougrier *et al.*, 2005). Compte tenu de cet ordre de solubilisation, le matériel solubilisé serait donc fortement extracellulaire.

L'efficacité de la solubilisation peut aussi être évaluée par le degré de désintégration qui permet une meilleure comparaison des résultats de différentes études (Bougrier 2005). Le degré de désintégration (DD) est calculé selon l'équation 3:

$$DD (\%) = \frac{DCO_s - DCO_{s0}}{DCO_{sNAOH} - DCO_{s0}} \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Avec DD le degré de désintégration,  $DCO_0$  la DCO soluble de l'échantillon traité ( $\text{mgO}_2/\text{L}$ ),  $DCO_{s0}$  la DCO soluble de l'échantillon non traité ( $\text{mgO}_2/\text{L}$ ),  $DCO_{NAOH}$  la DCO soluble de l'échantillon désintégré à la soude (24h, 1 M) (Gonze *et al.*, 2003) (désintégration supposée totale) ( $\text{mg O}_2/\text{L}$ ).

Tableau 1-12. Solubilisation de la matière organique suite à un traitement par ultrasons

Type de boues	Dose de traitement	Solubilisation	Référence
Boues secondaires (CAS)	F = 41 kHz T = 150 min	DD DCO = 23,7 %	Thiem <i>et al.</i> , 2001
Boues secondaires (CAS) 38 gMS/L	F = 20 kHz T = 120 min	18 % pour la DCO	Kim <i>et al.</i> , 2003
Boues secondaires (CAS) 1.2-3.2 gMS/L	F = 20 kHz P = 260 W T = 20 min	DD DCO : 9-20 %	Gonze <i>et al.</i> , 2003
Boues secondaires (CAS) 4.8 gMS/kg	40 000 kJ/kg	DD DCO 12 %	Rai <i>et al.</i> , 2004
Boues SBR	F = 20 kHz I = 230 W/cm <sup>2</sup>	DD DCO 45 %	Wang <i>et al.</i> , 2005
Boues secondaires (CAS)	F = 205 kHz I = 1000 W/L T = 5 min	Relargage protéines et polysaccharides	Sears <i>et al.</i> , 2005
Boues secondaires épaissies 18 gMS/L	P = 225 W F = 20 kHz Es = 15 000 kJ/kg MS	DCO : 32 % de solubilisation Azote organique : 40 %	Bougrier <i>et al.</i> , 2005
Boues industrielles 8 gMS/L	P = 1000 W F = 205 kHz T = 5 min	30 % d'augmentation de la DCO soluble	Dewil <i>et al.</i> , 2006
Boues mixtes	F = 25 kHz	609 % d'augmentation de la DCO	Zhang <i>et al.</i> ,

Type de boues	Dose de traitement	Solubilisation	Référence
	I = 0.5 W/mL T = 30 min	soluble 560 % d'augmentation des protéines en solution 1640 % d'augmentation des acides nucléiques	2007
Boues secondaires épaissies 17,8 gMS/L	P = 60 W F = 20 kHz Es = 108 000 kJ/kgMS	Solubilisation DCO 10 % Solubilisation azote total : 19,6 %, Solubilisation du phosphore total : 12 % DD DCO 47 %	Salsabil <i>et al.</i> , 2009
Boues activées 4 gMS/L	Es de 0 à 163 300 kJ/kgMS	Solubilisation DCO : 22,4 % Solubilisation protéines : 42,6 %, Solubilisation substances type humique : 62 % Solubilisation polysaccharides : 14.7 % Solubilisation MES : 39,9 %	Laurent <i>et al</i> 2009b

Les ultrasons provoquent une solubilisation de la matière organique mais aussi de la matière minérale des boues (Bougrier *et al.*, 2005 ; Laurent *et al.*, 2009b) dans une plus faible proportion. Le traitement par ultrasons génère notamment le relargage d'espèces ioniques en solution (Laurent, 2009) et en particulier d'ions phosphate, calcium et magnésium, agent pontant de la structure du floc.

### → Modification des propriétés physico-chimiques de la boue

Les travaux de Laurent (2009) montrent que le traitement par ultrasons provoque une modification des propriétés chimiques des phases solubles et particulières des boues. La sonication induit une diminution du caractère hydrophobe des boues, une légère diminution de la capacité d'échange cationique mais ne modifie pas significativement la valeur du pH. La capacité d'échange protonique diminue dans la phase particulière alors qu'elle augmente dans la phase soluble avec la dose de traitement. La titration des phases montre une diminution des pKa associés aux fonctions protéines et substances type humique dans la phase particulière (ce qui est homogène avec l'ordre de solubilisation) et une augmentation des groupements liés aux fonctions amines et hydroxyles dans la phase soluble (figure 1-7).

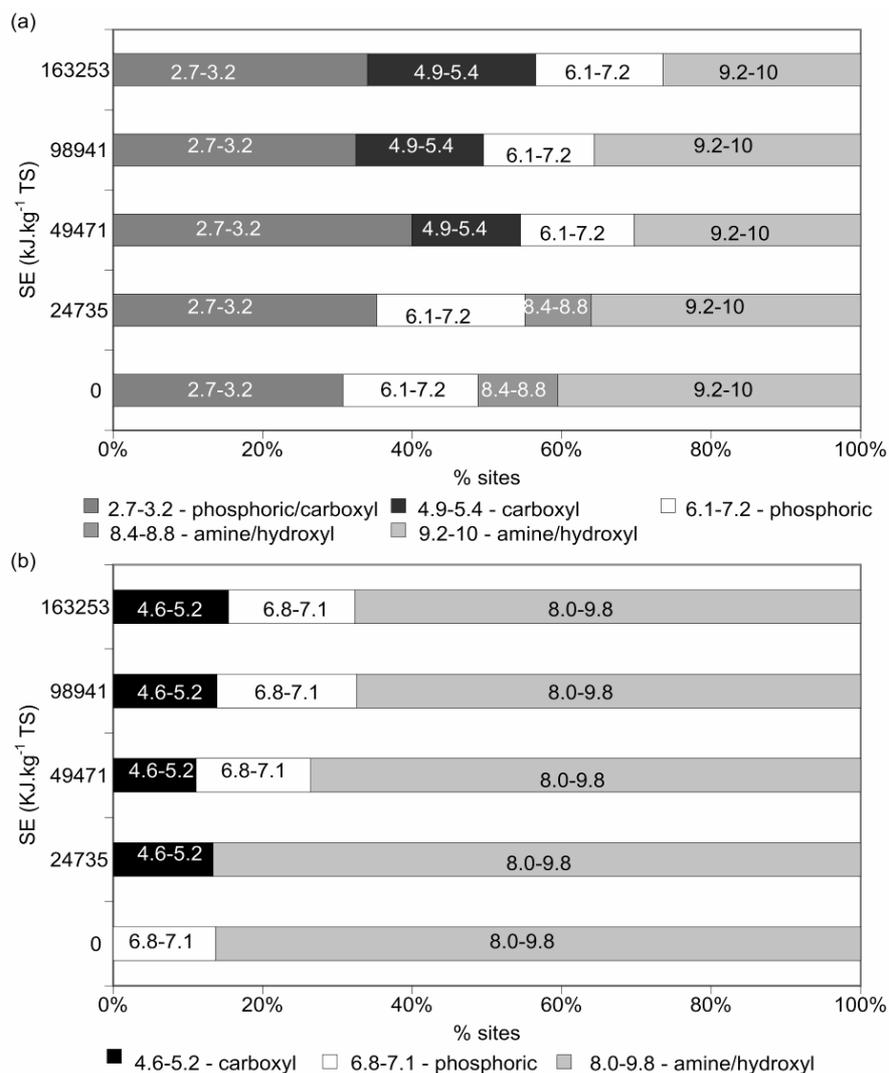


Figure 1-7. Abondance relative des quatre types de sites associés à leur pKa pour (a) la fraction particulaire (flocs) et (b) la phase soluble de boues soniquées. La contribution relative de groupements de type carboxyle augmente considérablement à la surface des flocs (Laurent, 2009).

Le traitement par ultrasons induit une altération significative des caractéristiques des boues : diminution de la taille des flocs, et donc une augmentation de la surface spécifique, modification du contenu en eau, de la porosité...et donc altère les propriétés de décantation et de filtrabilité. La sonication conduirait selon les résultats de la littérature à une diminution de la taille des flocs (Bougrier *et al.*, 2005 ; Gonze *et al.*, 2003 ; Laurent *et al.*, 2009) et à une meilleure décantabilité (diminution de l'indice de Mohlman) (Laurent *et al.*, 2009).

### ➔ Modification des propriétés biologiques : lyse cellulaire

La sonication est utilisée depuis des années pour la récupération du matériel intracellulaire en culture pure (Khanal *et al.*, 2007). Les données de la littérature concernant la lyse cellulaire sont contradictoires. Selon certains auteurs, la sonication induirait une destruction des cellules

bactériennes (Chu *et al.*, 2002) : les fortes températures et pressions induiraient une décomposition des lipides de la membrane cytoplasmique, permettant le relargage du matériel intracellulaire (Wang *et al.*, 2005). Enfin, selon Khanal *et al.* (2007) la sonication provoquerait à la fois la scission de certaines macromolécules en molécules de taille plus faible et la lyse des cellules bactériennes. Cependant, il existe peu de données tangibles permettant de valider cette dernière supposition sur les flocs de boues activées. De manière originale, Salsabil *et al.* (2009) ont étudié la perte d'intégrité membranaire suite à un traitement par ultrasons par cytométrie en flux. La sonication de boues activées à différentes énergies spécifiques (3600, 31500 et 108000 kJ/kgMS) n'a pas induit de perte de l'intégrité membranaire et la proportion de cellules intactes est restée constante, ce qui tendrait à prouver que la matière organique solubilisée lors du traitement est issue de la désintégration du floc et des PEC associés plutôt qu'à la lyse des cellules bactériennes. Ces mesures confirment aussi les résultats de Yu *et al.* (2008) selon lesquels les ultrasons permettent la déstructuration des flocs et le passage des PEC de couches internes vers des couches externes résultant en une augmentation des concentrations dans la phase soluble. Pour Li *et al.* (2009) la lyse démarre seulement quand le degré de désintégration dépasse 40 %. Ainsi, il est nécessaire de mettre en œuvre une certaine énergie pour aboutir à la lyse des cellules (Foladori *et al.*, 2007 ; Prorot *et al.*, 2008).

### → Modifications des activités enzymatiques

La sonication est un procédé utilisé à la base pour induire la libération des enzymes intracellulaires (alcool déshydrogénase, malate déshydrogénase, glucose-6 phosphate déshydrogénase, L-lactate déshydrogénase, phosphatase alcaline et beta galactosidase) et donc générer la lyse de ces mêmes cellules (Ozbek *et al.*, 2000). Ozbek et Ulgen, (2000) ont démontré toutefois que la sonication était préjudiciable à l'activité de certaines enzymes commerciales. Yu *et al.* (2008) observent au contraire une intensification de l'activité enzymatique suite au traitement par ultrasons (et non une inactivation), ce qui est en accord avec les résultats de Grönroos *et al.* (2005) selon lesquels à partir du moment où la température est contrôlée pendant le traitement par ultrasons, il n'y a pas d'inactivation des enzymes.

Il apparaît donc que le traitement par ultrasons agit en libérant les activités enzymatiques (notamment activité amylase) plutôt que sur l'hydrolyse directe des protéines (Yu *et al.*, 2008 ; Cadoret *et al.*, 2002). Les résultats de Yu *et al.* (2008) vont dans ce sens et montrent

qu'un traitement par ultrasons permet le passage des protéines, sucres et enzymes extracellulaires de l'intérieur du floc vers des zones extérieures ce qui conduit in fine à une intensification des activités enzymatiques et donc de la digestion aérobie. La majeure partie de l'activité enzymatique se situe dans la structure interne du floc avant le traitement. Selon cette étude les activités enzymatiques varient de 1,9 à 16,3  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gMVS}$ . Les activités de l' $\alpha$ -amylase, l'alkaline phosphatase et l'acide phosphatase sont plus élevées ( $> 10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gMVS}$ ) que les activités protéase et  $\alpha$ -glucosidase. Puis, lorsque l'on applique des doses croissantes d'ultrasons, la quantité de protéase, d' $\alpha$ -amylase et d' $\alpha$ -glucosidase augmente dans le surnageant. La quantité d' $\alpha$ -amylase relarguée dans le surnageant augmente plus rapidement que celles des deux autres enzymes. En ce qui concerne l'alkaline phosphatase et l'acide phosphatase leur relargage dans la phase soluble avec le traitement par ultrasons est moins évident. Cadoret *et al.* (2002) démontrent aussi que la situation dans le floc des protéases et des  $\alpha$ -amylase est différente. Ainsi, le traitement par ultrasons induit une désintégration des floccs (défloculation) et les protéines et les sucres jusque là protégés de l'attaque enzymatique deviennent plus disponibles pour l'attaque enzymatique. Finalement, la dégradation est accélérée, et la durée de la digestion peut être réduite.

### ➔ Modifications de la spéciation des métaux

#### *Potentiel de relargage :*

Le traitement par ultrasons induit une modification des propriétés chimiques, physiques de la boue et, par conséquent, à une modification de la spéciation des espèces métalliques. Les données de la littérature montrent que lors du procédé de sonication les éléments métalliques sont dans un premier temps relargués dans la phase « soluble » et les concentrations dans le gâteau de filtration sont réduites de manière importante (Kim *et al.*, 2004). D'autres études montrent que ce relargage est suivi d'une réaccumulation dans des proportions significatives (Commenges-Bernole et Marguerie, 2009). Laurent, (2009) montre que lorsque l'on applique des énergies croissantes à une boue activée, le cuivre est relargué dans la phase soluble, par contre les concentrations en cadmium dans cette même phase sont restées en dessous des seuils de détection.

#### *Potentiel de sorption :*

La modification des propriétés physiques et chimiques des boues est susceptible d'influer sur les propriétés de rétention des micropolluants et notamment des espèces métalliques lorsqu'ils

sont rajoutés dans la boue après traitement. Laurent 2009 montre que la sonication de boues activées conduit à une nette augmentation de la capacité des boues à accumuler le cadmium (due à l'augmentation de la surface spécifique et à la précipitation avec les ions phosphates). Le cuivre a plutôt tendance à se complexer avec la matière organique dissoute lors du traitement (solubilité apparente), la sorption sur les boues ne devient significative que lorsque la capacité de complexation en phase aqueuse est saturée. De même, Commenges-Bernole et Marguerie (2008) démontrent qu'un traitement par ultrasons augmente de 45% la capacité de fixation des métaux par les boues, du fait d'une restructuration des boues qui rend accessible les sites de fixation.

A ce jour, il n'existe pas de données dans la littérature permettant de savoir si un prétraitement par ultrasons va rendre les boues plus sensibles aux micropolluants métalliques.

#### 2.3.1.3. Amélioration des performances de réduction de boue en amont d'une digestion

Il existe des exemples d'application de prétraitement par ultrasons en amont d'une digestion anaérobie à l'échelle industrielle et notamment en Allemagne (Neis *et al.*, 2008).

Le prétraitement par ultrasons induit une amélioration des performances de réduction de boues par 1) la solubilisation de la matière organique particulaire 2) la lyse cellulaire et donc une réduction de boues intrinsèques (Salsabil *et al.*, 2009 ; Salsabil *et al.*, 2010 ; Yu *et al.*, 2008). Les performances de la sonication sont le plus souvent exprimées par rapport à la solubilisation de la matière en terme de DCO, polysaccharides...Cependant, il est bon de s'intéresser à la réduction de boue induite par le traitement lui-même et représenté par le paramètre de solubilisation des matières sèches ou des matières volatiles (Salsabil *et al.* 2010, Erden *et al.*, 2010). Peu d'auteurs prennent en compte la part relative du prétraitement dans la réduction de boue en amont d'une digestion aérobie ou anaérobie. Pourtant cette part s'avère non négligeable dans la performance globale.

Cette réduction de boue intrinsèque au prétraitement représente, dans le cas des ultrasons, une proportion non négligeable dans la réduction de boue globale induite par ce type de prétraitement et peut représenter jusqu'à 53,5% de la réduction de boue totale (Salsabil *et al.*, 2010).

Le prétraitement des boues par ultrasons permet d'améliorer les digestions aérobie et anaérobie en termes de réduction de la production de boues (tableau 1-13). Cependant les aspects mécanistiques de cette amélioration sont incomplètement élucidés.

### → Digestion aérobie :

Le traitement par ultrasons pourrait agir :

- sur l'accessibilité des enzymes et du substrat, pour Yu *et al.* (2008), le prétraitement par ultrasons permet d'augmenter les activités enzymatiques en les « libérant » de la structure du floc (ce qui constitue un facteur limitant de leur efficacité). Pour Prorot *et al.* (2008) le traitement par ultrasons ne permettrait pas d'améliorer la biodégradabilité intrinsèque des boues mais favorise l'accessibilité à la matière dégradabile.
- sur les vitesses de dégradation, Chang *et al.* (2011) montrent qu'un traitement par ultrasons (397 kJ/gMS) en amont d'une digestion thermophile aérobie permet de réduire la durée de la digestion de 15 jours à 3 jours pour un taux d'élimination des matières volatiles de 55 %.
- sur l'amélioration de la biodégradabilité intrinsèque des boues

En conclusion, l'effet des ultrasons se situerait plus au niveau de l'amélioration de l'accessibilité de la matière et donc de l'accélération des vitesses plus qu'au niveau de l'augmentation de la biodégradabilité intrinsèque.

### → Digestion anaérobie :

L'utilisation de la sonication en amont d'une digestion anaérobie permet 1) une augmentation de la production de biogaz lors de la digestion (Bougrier *et al.*, 2005 ; Neis *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2007) et 2) une réduction de la durée de la digestion de 20 j à 8 j (Zhang *et al.*, 2007). La sonication induisant une diminution de la taille des floes, favorise l'hydrolyse (Neis *et al.*, 2000), l'étape d'acidogénèse peut ainsi démarrer directement puis l'étape de méthanogénèse (Quarmby *et al.*, 1999). Ainsi, l'amélioration de la digestion anaérobie serait due à une meilleure accessibilité de la matière organique plutôt qu'à une réelle augmentation de la biodégradabilité intrinsèque (Prorot, 2009 ; Salsabil *et al.* 2009). Cependant, d'autres auteurs pensent qu'au contraire les ultrasons induisent une augmentation réelle de la biodégradabilité de la matière organique solubilisée (Bougrier, 2005).

Un bon compromis entre amélioration de l'efficacité et performances énergétiques semble être atteint pour les énergies spécifiques au pallier de solubilisation (i.e., entre 1000 et 16 000 kJ /kgMS). L'amélioration de la production de biogaz varie de 24 % à 40 % en batch et de 10 à 45 % en réacteur continu et semi-continu (Carrère *et al.*, 2010). Salsabil (2008) montrent une amélioration de 35 % de production de biogaz pour une dose de 200 000 kJ/kgMS.

Tableau 1-13. Amélioration des performances des digestions aérobies et anaérobies par un prétraitement aux ultrasons. (En partie de Carrère *et al.*, 2010)

Prétraitement US	Amélioration digestion aérobie	Amélioration digestion anaérobie	Référence
Durée : 10 min Densité : 3 kW/ L Fréq : 20 kHz	Réduction MES : 42,7% (dt 11.8 % du au pré- traitement lui- même) contre 20,9% pour le témoin Durée digestion : 10,5 j		Yu <i>et al</i> 2008
9690 Kj/kgMS	Réduction MO: 36 % contre 22,75 % pour le témoin Réacteur Fed batch 30 j		Erden <i>et al.</i> , 2010
108 000 kJ /kgTS Ponctuel	Réduction MVS : 61,3% pour le test contre 39,3% pour le control Mode batch	Réduction MVS : 73,6% pour le test contre 38,5% pour le control Mode batch	Salsabil <i>et al.</i> , 2009
200 000 kJ /kgTS Ponctuel	Réduction MES : 76 % pour le test contre 57 % pour le control Mode batch	Réduction MVS : 86,2% pour le test contre 72 % pour le control Mode batch	Salsabil <i>et al.</i> , 2010
397 Kj/gMS	Fed batch, 60-65°C Réduction MVS : 55% (3j) 71% (15j)		Chang <i>et al.</i> , 2011
31 kHz 3,6 kW, 64 s Boues mixtes TRH: 22 jours 37 °C		Continu, Augmentation de l'élimination de VS de 45,8% <sup>a</sup> à 50,3% (+9 %)	Tiehm <i>et al.</i> , 1997
9 kHz 200 W, 30 min Boues mixtes (25 g MS L <sup>-1</sup> ) 11 jours à 36 °C		Batch, L'augmentation de la production de CH <sub>4</sub> de 210 <sup>a</sup> à 345 mL g <sup>-1</sup> VS <sub>in</sub> (+64%)	Wang <i>et al.</i> , 1999

TRH: 8 jours 37 °C 41 kHz -150 min Boues activées (SRT: 16 jours)	Semi-continu, Augmentation de l'élimination de VS de 21,5% <sup>a</sup> à 33,7% (+36 %)	Tiehm <i>et al.</i> , 2001
Boues activées 100 jours 35 °C (9,38 g MS L <sup>-1</sup> ) 20 kHz 0,33 W mL <sup>-1</sup> , 20 min	Batch, Augmentation de la production de CH <sub>4</sub> de 143 <sup>a</sup> à 292 g kg <sup>-1</sup> TS <sub>in</sub> (+104 %)	Chu <i>et al.</i> , 2002
Boues activées 33 jours 37 °C (54 g MS L <sup>-1</sup> ) 20 kHz 200 W, 30 min	Batch, Augmentation de la production de biogaz (+138 %)	Onyeche <i>et al.</i> , 2002
Boues mixtes 28 jours 35 °C 20 kHz 180 W, 60 s	Batch, Augmentation de la production de biogaz (+24 %)	Bien <i>et al.</i> , 2004
Boues activées 16 jours 35–37 °C (27 g MS L <sup>-1</sup> ) 20 kHz, 7000 and 15000 kJ kg <sup>-1</sup> MS	Batch, Augmentation de la production de biogaz (+40 %)	Bougrier <i>et al.</i> , 2005
Boues activées TRH: 20 jours 5000 kJ kg <sup>-1</sup> MS	Semi-continu Augmentation de la production de biogaz (+36 %)	Braguglia <i>et al.</i> , 2008
Boues activées 50 jours 37 °C (17,1 g MS L <sup>-1</sup> ) 20 kHz 108000 kJ kg <sup>-1</sup> MS	Batch, Augmentation de la production de biogaz (+84 %)	Salsabil <i>et al.</i> , 2009
Boues activées 35 jours 36 °C (2,14%MS) 20 kHz 9690 kJ kg <sup>-1</sup> TS	Batch, Augmentation de la production de biogaz (+44 %)	Erden et Filibeli, 2009
Boues activées 30 kWh m <sup>-3</sup>	Batch, Augmentation de la production de biogaz (+42 %)	Perez-Elvira <i>et al.</i> , 2009
Boues activées TRH: 20 jours 30 kWh m <sup>-3</sup>	Continu, Augmentation de la production de biogaz (+37 %) Augmentation de l'élimination de VS (+25 %)	Perez-Elvira <i>et al.</i> , 2009

Sonication de 25 % de boues activées des STEP de 330000 EqH	Augmentation de la production de biogaz (+30 %)	Neis <i>et al.</i> , 2009
TRH: 22.5, 29–33 °C Boues mixtes (1.5% MVS) 20 kHz W cm <sup>-2</sup> , 1,5 s	Digesteur de forme ovoïde 5000 m <sup>3</sup> Augmentation de la production de biogaz (+45 %)	Xie <i>et al.</i> , 2007

A : rendement de la digestion aérobie sans prétraitement

### 2.3.2. Le traitement thermique

#### 2.3.2.1. Principe

Le traitement thermique des boues est utilisé depuis de nombreuses années pour l'amélioration de la déshydratabilité des boues : il permet de réduire le contenu en eau libre et en eau liée dans les boues par déstructuration des floccs et lyse cellulaire (Neyens et Bayens, 2003).

Dans le contexte de l'utilisation de la température comme facteur d'amélioration des digestions aérobies ou anaérobies différentes stratégies peuvent être envisagées : a) l'utilisation de basses températures (55 °C, 60-70 °C, 90 °C) et b) l'utilisation de hautes températures (>100 °C).

Les traitements thermiques basses températures agissent en favorisant l'étape d'hydrolyse lors d'une phase assez longue de traitement aérobie ou anaérobie notamment par le développement d'une flore thermotolérante du genre *Bacillus* connue pour sa capacité à sécréter des protéases (Carrère *et al.* 2010). Les traitements thermiques haute température permettent eux la désagrégation de la structure des floccs et le relargage de l'eau liée ce qui conduit à une solubilisation importante de la boue et à une amélioration de sa déshydratabilité.

#### 2.3.2.2. Modification des propriétés des boues

##### → Modification des propriétés chimiques des boues

Les performances de solubilisation (tableau 1-14) dépendent plus de la température de traitement que de sa durée (Salsabil, 2008) et sont liées à la fois à la désorption, à la déstructuration du flocc (Paul *et al.*, 2006) et à la lyse cellulaire (Prorot, 2008) dès les basses températures. Le traitement thermique agit particulièrement sur la solubilisation de la matière organique plus que sur la matière minérale (Bougrier *et al.*, 2008). Pour des températures inférieures à 75°C, l'ordre de solubilisation de la matière organique est le suivant : substances humiques>protéines>polysaccharides, et au-delà de 95 °C ce sont les protéines qui sont les

plus solubilisées (Laurent, 2009, Bougrier *et al.*, 2008). Pour les plus faibles températures, la déstructuration des floccs induirait principalement la solubilisation des PEC (substances type humique principalement), pour des températures plus élevées la lyse cellulaire induirait le relargage de protéines (Bougrier *et al.*, 2008).

Tableau 1-14. Effets du traitement thermique sur la solubilisation des boues

Type de boues	Température de traitement	Temps de traitement	Solubilisation	Référence
Boues activées 15 gDCO/L	170 °C	1h (TSH = 5j)	- Augmentation de l'abattement de la DCO de 30 % à 60 % - Augmentation d'abattement de la matière organique de 30 % à 60 % - Augmentation du volume de biogaz de 100 % (composition non précisée)	Li et Noike, 1992
Boues mixtes 70 % primaires 30 % secondaires	130 °C	60 min TSH = 20j	Solubilisation de la DCO de 60 %	Carballa <i>et al.</i> , 2004
Boues activées 17gMS/L	170 °C	60 min	Solubilisation de la DCO de 57 %	Valo <i>et al.</i> , 2004
Boues activées 4 gMS/L	20°C à 120°C	120 min	- Solubilisation substances type humique>protéines, >polysaccharides - 28 % de solubilisation des MES	Laurent, 2009

Le traitement thermique conduit également à la production de composés réfractaires comme la mélanoidine (Dwyer *et al.*, 2008), produit dans les dernières étapes de la réaction de Maillard (réaction entre les protéines et les polysaccharides). A haute température, on observe aussi des réactions de caramélisation (entre polysaccharides) (Bougrier *et al.*, 2008).

Les données concernant les modifications des propriétés chimiques lors d'un traitement thermique ont été développées par Laurent (2009) (Figure 1-8). Lors d'un traitement thermique entre 20 et 120 °C, le caractère hydrophobe diminue mais de manière moins importante que lors de la sonication ou de l'ozonation, procédés qui eux induisent une destruction des flocs. La capacité d'échange cationique des boues augmente jusqu'à 75 °C puis diminue. Le traitement thermique n'induit pas de modification du pH des boues traitées. Lorsque la température augmente, la capacité d'échange protonique totale diminue (probablement en conséquence de réarrangements moléculaires, réaction de maillard notamment). Dans le même temps, la capacité d'échange protonique de la phase soluble augmente, conséquence directe de la solubilisation de la matière. Lorsque la température dépasse 75 °C, on observe l'apparition d'une fonction chimique supplémentaire dans la phase particulaire des boues qui correspond aux groupements phosphoriques potentiellement rendus accessibles par la déstructuration du floc. Au-delà de 45 °C, on observe dans la phase soluble des boues traitées une augmentation de la contribution relative des pKa associés à la fonction amine et/ou hydroxyle, qui concorde avec un fort taux de solubilisation des protéines.

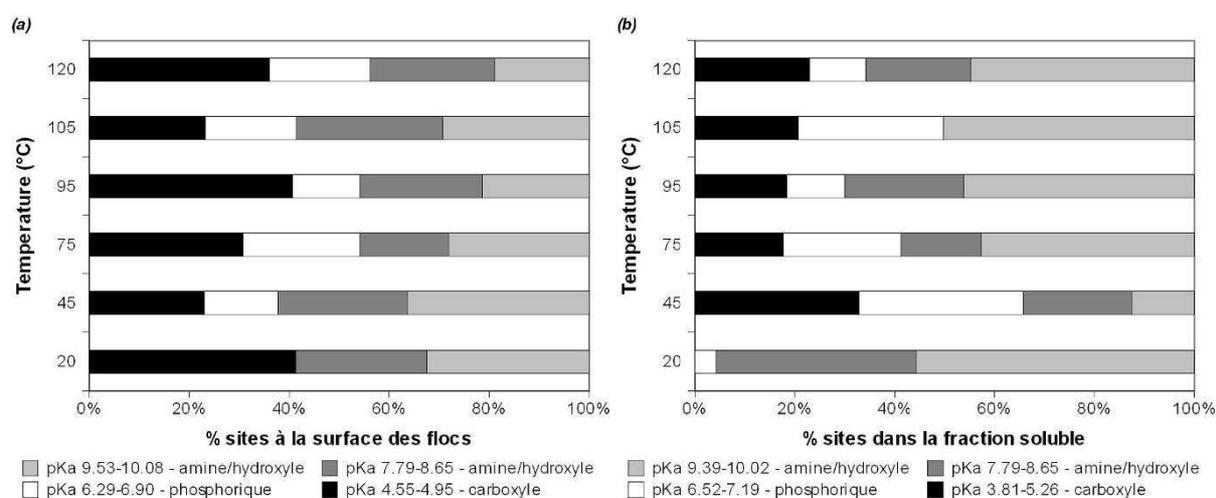


Figure 1-8. Contributions relatives des types de sites associés à leur pKa pour (a) la fraction particulaire (flocs) et (b) la phase aqueuse de boues traitées thermiquement. La répartition des différents groupements évolue de manière significative (Laurent, 2009).

### ➔ Modification des propriétés physiques de la boue

A basse température (<45 °C), le traitement thermique induit une défloculation et une moindre stabilité des flocs du fait de leur déstructuration et de la désorption des PEC (Paul *et al.*, 2006). Les propriétés de surface sont modifiées ; les flocs sont plus électronégatifs et

moins hydrophobes. Cependant, la taille des floes n'est pas significativement affectée (Paul *et al.*, 2006).

Au-delà de 45 °C, on observe une diminution drastique de la taille des floes de 653 à 178  $\mu\text{m}^2$ , diminution qui évolue avec la température de manière plus modérée (Laurent, 2009). Le traitement thermique ne provoquerait pas réellement une désintégration de la structure du floe mais seulement une défloculation des grosses particules (Laurent, 2009 ; Paul *et al.*, 2006).

### → Modifications des propriétés biologiques de la boue :

#### Lyse cellulaire

La solubilisation importante des protéines en traitement thermique laisse supposer une lyse cellulaire mise en évidence dès 80 °C pour Prorot, (2008) et dès 60 °C pour Yan *et al.*, (2008). Selon les données de la littérature, le traitement thermique permet la destruction de la paroi cellulaire et le relargage de protéines (Neyens et Bayens, 2003) démontrée et confirmée par Prorot (2008) par la technique de cytométrie en flux.

#### Activités enzymatiques

Les activités enzymatiques peuvent être affectées par la température. Selon Dumas *et al.* (2010), des conditions aérobies thermophiles (65 °C) génèrent une augmentation de la dégradation de la matière organique attribuée à l'intensification de l'activité hydrolytique. L'étape aérobie thermophile permet selon Hasegawa *et al.* (2000) le développement d'une flore particulière appartenant au genre *Bacillus*. Ces bactéries sont connues pour excréter des protéases et peuvent survivre à des conditions anaérobies thermophiles.

### → Modifications de la rétention des métaux

Potentiel de relargage : Au cours du traitement thermique, le cuivre est relargué dans la phase soluble de manière croissante jusqu'à 75 °C puis décroissante ensuite. Aucune variation significative du contenu en cadmium dans la phase soluble n'a été observée pour des températures variant de 20 °C à 120 °C (Laurent, 2009). Pour des faibles températures de traitement (30 °C à 45 °C), Morgan-Sagatsume et Allen (2005) ont observé le relargage d'Al, Mn, Ba, Fe, Zn et Ti.

Potentiel de sorption : Pour des températures croissantes (20 à 120 °C), la meilleure disponibilité des sites de surfaces est contrebalancée par une diminution de la quantité des sites disponibles pour la fixation des métaux (Laurent, 2009). Le traitement thermique conduit à une augmentation, puis à une diminution de la capacité de rétention du cadmium en fonction de la température sans pour autant modifier les constantes d'affinité. Pour les températures inférieures à 95 °C, la rétention du cadmium augmente du fait de l'augmentation de la surface spécifique (liée à la diminution de la taille des floes) et l'augmentation de la concentration en ions  $\text{PO}_4^-$  qui favorisent la précipitation. Pour des températures plus élevées, la diminution du nombre total de sites de fixations disponibles ainsi que la diminution de la concentration en ions orthophosphates conduisent à une diminution de la capacité de rétention du cadmium. Dès 45 °C, la rétention du cuivre dans les boues est limitée pour des concentrations inférieures à 300  $\mu\text{g/L}$  par l'affinité de cet élément avec la matière organique solubilisée.

#### 2.3.2.3. Amélioration des performances de digestion

Les données de la littérature indiquent qu'il existe un seuil de température au-delà duquel on observe clairement une amélioration de la biodégradabilité intrinsèque des boues (autour de 150 °C) (Bougrier *et al.*, 2008 ; Dohanyos *et al.* ; 2004). Pour des températures comprises entre 90° C et 200 °C Bougrier *et al.* (2007) montrent qu'il existe un lien entre la solubilisation de la DCO induite par le prétraitement et l'augmentation de la biodégradabilité.

##### **a) Le traitement thermique à basses températures :**

Le traitement thermique basses température peut être réalisé 1) en continu en conditions thermophiles ou hyper-thermophiles en aérobie ou en anaérobie (on parle alors de digestion aérobie thermophile, procédé ATAD) (Dumas *et al.*, 2010), ou 2) peut être réalisé en une étape plus ou moins longue en amont de la digestion (Carrère *et al.*, 2010). L'utilisation des basses températures semble un bon compromis énergie/efficacité (Paul *et al.*, 2006 ; Dumas *et al.*, 2010 ; Héry *et al.*, 2010).

*En discontinu* : 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 (Prorot, 2008) Pour Salsabil *et al.* (2010) au contraire, la mise en œuvre de prétraitements batch basses températures (40 °C, 60 °C, 90 °C pendant 60 minutes), en amont d'une digestion anaérobie

permettent d'améliorer les rendements de la production de biogaz (par rapport au témoin non traité) de 18 % et 23 % pour les 2 températures 60 et 90 °C. En aérobie et en anaérobie, la réduction de boue augmente avec la température de traitement (tableau 1-15). Cependant dans cette étude les prétraitements thermiques basses température restent moins efficaces que les prétraitements par ultrasons ou par ozonation (Salsabil *et al.*, 2010).

*En continu* : D'autres auteurs en revanche démontrent que l'utilisation des basses températures peut conduire à une amélioration de la biodégradabilité à condition d'augmenter les temps de contact par rapport aux procédés haute température. La mise en place d'un prétraitement aérobie ou anaérobie thermophile (55 °C) ou hyper-thermophile (60-70 °C) en amont d'une digestion anaérobie permet d'améliorer la digestion anaérobie de boues primaires et secondaires (Carrère *et al.*, 2010). Selon Dumas *et al.* (2010), une digestion aérobie thermophile (65 °C) en amont d'une digestion anaérobie mésophile (35 °C) permet d'augmenter la biodégradabilité intrinsèque des boues de 20 à 40 % et l'élimination de la DCO de 30 %. Les conditions thermophiles génèrent une augmentation de la dégradation de la matière organique attribuée à l'intensification de l'activité hydrolytique. L'étape aérobie thermophile permet selon Hasegawa *et al.* (2000) le développement d'une flore particulière appartenant au genre *Bacillus*. Ces bactéries sont connues pour excréter des protéases et peuvent survivre à des conditions anaérobies thermophiles.

Tableau 1-15. Amélioration des performances de la digestion aérobie et anaérobie suite à un prétraitement thermique basse température

Mode de mise en oeuvre		Amélioration digestion aérobie	Amélioration digestion anaérobie	Référence
Traitement basse température 55 °C procédé ATAD	Continu	50,4 % d'élimination des MVS après 264 h de traitement		Liu <i>et al.</i> , 2010
ATAD 55 °C 60 °C	Continu	24h de traitement Elimination de 21 % des MS, 27 % de la MO, 27 % des MES ; 33 % des MVS		Jain <i>et al.</i> , 2010
Digestion aérobie chauffée continue hyper thermophile (65 °C)	Continu	180j d'expérimentation Amélioration de 30 % de la biodégradabilité de la DCO	Elimination des MVS de 61 % contre 44 % pour une digestion anaérobie seule	Dumas <i>et al.</i> , 2010
40 °C, 1h	Batch	62,5 %	69,5 %	Salsabil <i>et al.</i> ,

		d'élimination des MES contre 59 % pour le témoin Batch	d'élimination des MES contre 66 % pour le témoin Batch	2010
60 °C, 1h	Batch	65 % d'élimination des MES contre 59 % pour le témoin Batch	73 % d'élimination des MES contre 66 % pour le témoin Batch	Salsabil <i>et al.</i> , 2010
90 °C, 1h	Batch	68 % d'élimination des MES contre 59 % pour le témoin Batch	76,5 % d'élimination des MES contre 66 % pour le témoin Batch	Salsabil <i>et al.</i> , 2010

En conclusion, le bénéfice des basses températures résiderait plus dans l'augmentation des vitesses de dégradation par l'augmentation de l'activité hydrolytique (et donc des temps de séjour dans le digesteur anaérobie) et par la désorption de matière organique suite à la déstructuration du floc (Paul *et al.*, 2006) que dans l'augmentation intrinsèque de la biodégradabilité. Ainsi, pour être efficaces les traitements basses températures doivent être longs (plusieurs jours).

#### **b) Hautes températures :**

De nombreuses références attestent de l'utilisation des hautes températures en prétraitement ponctuel pour l'amélioration de la digestion anaérobie. A notre connaissance, ce prétraitement n'est pas utilisé en amont d'une digestion aérobie. Ces différentes études conduisent à une amélioration de la réduction de la production de boue et à une augmentation du volume de biogaz produit. Par ailleurs, la production de méthane est linéairement corrélée à la DCO soluble ce qui atteste de l'augmentation intrinsèque de la biodégradabilité (Carrère *et al.*, 2008). Les traitements hautes températures agissent donc à la fois sur l'amélioration de la biodégradabilité intrinsèque et sur l'intensification de l'étape d'hydrolyse (Carrère *et al.*, 2010). Un bon compromis en termes de rendement semble se situer dans la gamme de température de 160-180 °C pour un temps de traitement de 30 à 60 min. Par comparaison aux traitements basses températures, la durée du traitement est courte (tableau 1-16). Au-delà de cette gamme de température, la biodégradabilité intrinsèque diminue et cette diminution est généralement attribuée aux réactions de Maillard qui conduisent à la formation de composés

réfractaires (Bougrier *et al.*, 2008 ; Muller *et al.*, 2004). Les traitements thermiques hautes températures en amont d'une digestion anaérobie génèrent quelques inconvénients : une augmentation de la fraction inerte soluble et une coloration de l'effluent de sortie (Dwyer *et al.*, 2008), une possible augmentation de l'inhibition de la digestion anaérobie par les ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Batsone *et al.*, 2010). Ce type de procédé fait l'objet d'une commercialisation (Cambi et *BioTHELYS*).

Tableau 1-16. Amélioration des performances de la digestion anaérobie suite à un prétraitement thermique haute température

Substrat	Conditions (Temps/ Température)	conditions de digestion anaérobie	Résultats	Référence
Boues activées	175 °C 30 min	CSTR, TRH: 15 jours 35 °C	Augmentation de la production $\text{CH}_4$ (+62%) Solubilisation de la DCO de 40 % Augmentation de la biodégradabilité (abattement de la matière organique de 26 % à 48 %)	Haug <i>et al.</i> , 1978
Boues primaires	175 °C 30 min	CSTR, TRH: 15 jours 35 °C	Production de $\text{CH}_4$ 252 mL g <sup>-1</sup> DCO <sub>in</sub> (pas d'effet)	
Boues mixtes	175 °C 30 min	CSTR, TRH: 15 jours 35 °C	Augmentation de la production $\text{CH}_4$ (+14%)	
Boues activées	175 °C 60 min	Batch, 25 jours 35 °C	Augmentation de la conversion de la DCO en $\text{CH}_4$ de 48 % à 68 % (+42 %) Augmentation de l'abattement de la DCO de 30 % à 60 %	Stuckey et Mc Carty, 1978
Boues activées	175 °C 60 min	CSTR, TRH: 5 jours 35 °C	Augmentation du volume de biogaz de 108 <sup>a</sup> à 216 mL g <sup>-1</sup> DCO <sub>in</sub> (+100%) (composition non précisée) Augmentation d'abattement de la matière organique de 30% à 60% Augmentation de l'abattement de la DCO de 30 % à 60 %	Li et Noike. 1992
Boues activées (industrielles)	180 °C 60 min	Batch, 8 jours 37 °C	Augmentation de la production $\text{CH}_4$ (+90 %)	Tanaka <i>et al.</i> , 1997
Boues	160 °C	STEP 45000	Augmentation de la production	Fjordside,

Substrat	Conditions (Temps/Température)	conditions de digestion anaérobie	Résultats	Référence
activées		PE CSTR, TRH: 15 jours	de biogaz (+60 %)	2001
Boues mixtes	121 °C 60 min	CSTR, TRH: 20 jours 36 °C	Augmentation de la production de biogaz de 350 <sup>a</sup> à 420 mL g <sup>-1</sup> MV <sub>in</sub> soluble (+20 %)	Bayenbruch et kopplow, 2003
Boues activées	121 °C 30 min	Batch, 7 jours 37 °C	Augmentation de la production de biogaz de 3657 <sup>a</sup> à 4843 L m <sup>-3</sup> boues <sub>in</sub> (+32 %)	Kim <i>et al.</i> , 2003
Boues mixtes digérées	170 °C 60 s, 0,8 MPa	Batch 20 jours	Augmentation de la production de biogaz (+49 %)	Dohanyos <i>et al.</i> , 2004
Boues activées	170 °C 60 min	Batch, 24 jours 35 °C	Augmentation de la production de biogaz (+45 %) augmentation de l'abattement en Matière organique de 59 % solubilisation optimale à pH 10 par l'ajout de KOH	Valo <i>et al.</i> , 2004
Boues activées	170 °C 60 min	CSTR, TRH: 20 jours 35 °C	Augmentation de la production de CH <sub>4</sub> de (+61 %)	
Boues activées	175 °C 40 min	Fixed film reactor, HRT: 2.9 jours 37 °C	Réduction du volume des boues de 65 %	Graja <i>et al.</i> , 2005
Boues activées	170 °C 30 min	Batch, 24 jours 35 °C	Augmentation de la production de CH <sub>4</sub> de (+76 %)	Bougrier <i>et al.</i> , 2006
Boues activées	170 °C 30 min	CSTR, TRH: 20 jours 35 °C	Augmentation de la production de CH <sub>4</sub> de (+51%)	Bougrier <i>et al.</i> , 2006
Boues mixtes	140 °C, 1 min 0,6 MPa	STEP 100000 eqH digestion bi-étage 55–53 °C	Augmentation de la production de biogaz de (+18 %)	Zabranska <i>et al.</i> , 2006
Boues activées (aération prolongée)	160 °C 30 min	STEP 62000 PE TRH: 15 jours 35 °C	Augmentation de l'élimination de MS de de 25 % <sup>a</sup> à 45 %	Chauzy <i>et al.</i> , 2007

<b>Substrat</b>	<b>Conditions (Temps/ Température)</b>	<b>conditions de digestion anaérobie</b>	<b>Résultats</b>	<b>Référence</b>
Boues activées	170 °C 30 min, 7 bar	Batch	Augmentation de la production de CH <sub>4</sub> de (+50 %)	Fernandez- Polanco <i>et al.</i> , 2008
Boues activées	170 °C 30 min, 7 bar	Continu TRH: 12 jours	Augmentation de la production de biogaz de (+40–50 %)	
Boues activées (Eaux usées d'une raffinerie de pétrole brute)	200 °C 30 min, 20 MPa	UASB bi- étage TRH: 3.8 jours 35 °C digestion des liquides après prétraitement (batch 33 jours sans prétraitement)	Augmentation de la production de CH <sub>4</sub> (+15 %)	Yang <i>et al.</i> , 2010
Boues activées	Micro-onde 175 °C	Batch, 18 jours 33 °C	Augmentation de la production de CH <sub>4</sub> (+31 %)	Eskicoglu <i>et al.</i> , 2009
Boues activées	80 °C 5 à 60 min	-	Diminution de l'intégrité membranaire des cellules Diminution de l'activité membranaire Corrélation entre lyse cellulaire et solubilisation	Prorot <i>et al.</i> , 2008

## 2.4. Conclusion de la deuxième partie du Chapitre 1

Les procédés classiques de traitement des eaux usées par boues activées conduisent à la production de quantités très importantes de boues. La stabilisation biologique des boues, comme la digestion aérobie ou anaérobie, est largement utilisée pour réduire la masse totale de boues. Les étapes de digestion aérobie et anaérobie permettent tout à la fois de réduire la masse et le volume de boues produites et conduisent à un produit final stable. Le facteur limitant de l'efficacité des digestions aérobies et anaérobies est l'étape d'hydrolyse des macromolécules en monomères ou petits polymères. Les boues secondaires en particulier sont plus difficiles à digérer que les boues primaires (Laffite-Trouque and Forster, 2002 ; Li and Noike, 1992) et nécessitent des temps de digestion plus longs de l'ordre de 30 à 60 jours.

Pour lever ce goulot d'étranglement, il est possible de mettre en place un certain nombre de prétraitements qui ont pour objectifs de faciliter l'hydrolyse des macromolécules et ou la lyse cellulaire. Les prétraitements permettent d'augmenter la biodégradabilité et /ou les cinétiques de dégradation des boues conduisant à de meilleurs rendements de réduction de la production de boues et à une éventuelle diminution du temps de séjour hydraulique dans les digesteurs. Ainsi, l'amélioration de l'étape d'hydrolyse doit inévitablement conduire à la réduction de la production de boues. Par ailleurs, pour des raisons réglementaires (exigences accrues en terme de concentrations de sortie en azote conduisant à des âges de boues faibles et donc à des quantités de boues produites élevées, exigences accrues aussi en terme de stabilisation et économiques) et pour des raisons économiques (augmentation de la production de méthane, réduction des temps de séjour dans les méthaniseurs), la mise en oeuvre des prétraitements sur la file boue est fortement d'actualité (Carrère *et al.*, 2010).

Cependant, au cours de cette étude bibliographique, nous avons montré que ces traitements étaient susceptibles de modifier les propriétés physiques, chimiques et biologiques de la boue. Notamment, les activités enzymatiques, les populations microbiennes, la rétention des métaux, se trouvent impactées de manière non négligeable.

L'objectif du travail de thèse sera donc d'évaluer dans quelle mesure, suite à un prétraitement, la sensibilité des boues à un élément métallique (le cadmium) se trouve modifiée au cours de l'étape de stabilisation biologique.

## 2.5. Références bibliographiques

### A

**ADEME (1995)** *Les micropolluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines*. Paris : ADEME Editions, 209 p.

**Abdel-Shafy H., Hegemann W., Guldner C. (1996)** *Fate of heavy metals via chemical-biological upgrading of sewage sludge treatment plants*. *Environmental Management and Health*, 7, (3), pp. 28–36.

**Alonso Alvarez E., Callejon Mochon M., Jimenez Sanchez J.C. [et al.] (2002)** *Heavy metal extractable forms in sludge from wastewater treatment plants*. *Chemosphere*, 47, (7), pp. 765–775.

**Alonso E., Villar P. Santos A. et Aparicio I. (2006)** *Fractionation of heavy metals in sludge from anaerobic wastewater stabilization ponds in southern Spain*, *Waste Management*, 26 (11), pp.1270–1276.

**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, pp. 143–169.

**Anderson B.C. et Mavinic D.S. (1993)** *Behaviour and control of nutrients in the enhanced aerobic digestion process: pilot scale studies*. *Environmental Technology*, 14, pp. 301–318.

**Anderson C.W.N., Brooks R.R., Stewart R.B. et Simocock R. (1998)** *Harvesting a crop of gold in plants*, *Nature*, 395, (6702), pp. 553–554.

**Appels L., Baeyens J., Degrève J. et Dewil R. (2008)** *Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge*. *Progress in Energy and Combustion Science*, vol. 34, (6), pp. 755–781.

**Archer D.B., et Kirsop B.H. (1990)** *The microbiology and control of anaerobic digestion*. In *Anaerobic Digestion, a Waste Treatment Technology*. Wheatley, A. (ed.). London: Elsevier, pp. 43-91.

**Arican B., Gokcay C.F. et Yetis U. (2002)** *Mechanistics of nickel sorption by activated sludge*. *Process Biochemistry*, 37, (11), pp. 1307–1315.

### B

**Babel S. et Dacera D.M. (2006)** *Heavy metal removal from contaminated sludge for land application: a review*. *Waste Manage* 26, pp. 988–1004.

**Baralkiewicz D. et Siepak J. (2001)** *Slurry sampling for electrothermal atomic absorption spectrometric determination of chromium, nickel, lead and cadmium in sewage sludge*. *Analytica Chimica Acta*, 437, (1), pp. 11–16.

**Barjenbruch M. et Kopplow O. (2003)** *Enzymatic, mechanical and thermal pre-treatment of surplus sludge*, Adv. Environ. Res., 7, (3), pp. 715–720.

**Batstone D.J., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhnyi S., Pavlostathis S.G., Rozzi A., Sanders W., Siegrist H. et Vavilin V. (2002)** (IWA Task Group on Modelling of Anaerobic Digestion Processes) Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1). IWA Publishing, London.

**Battistoni P., Fava G. et Ruello M. L. (1993)** *Heavy metal shock load in activated sludge uptake and toxic effects*. Wat. Res., 27, (5), pp. 821–827.

**Baudu M., Delage F., Dagot C. [et al.] (2000)** *Influence of some parameters on adsorption rate and toxicity of cadmium in activated sludge*. Toxicol. Environ. Chem., 74, (3-4), pp. 131–145.

**Benka-Coker M.O. et Ekundayo J.A. (1998)** *Effects of heavy metals on growth of species of Micrococcus and Pseudomonas in a crude oil/mineral salts medium*. Bioresource Technol., 66, pp. 241–245.

**Bernard S. et Gray N.F. (2000)** *Aerobic digestion of pharmaceutical and domestic wastewater sludges at ambient temperature*. Water Research, 34, pp. 725–734

**Bhattacharya S.K., Madura R.L., Walling D.A. et Farrel J.B. (1996)** *Volatile solids reduction in two phase and conventional anaerobic sludge digestion*, Water Res., 30, (5), pp. 1041–1048.

**Bien J.B., Malina G., Bien J.D. et Wolny L. (2004)** *Enhancing anaerobic fermentation of sewage sludge for increasing biogas generation*, J. Environ. Sci. Health Part A-Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng., 39, (4), pp. 939–949.

**Bodzek D., Janoszka B. et Dobosz C. [et al.] (1997)** *Determination of polycyclic aromatic compounds and heavy metals in sludges from biological sewage treatment plants*. Journal of Chromatography A, 774, 1-2. pp. 177–192.

**Borrok D., Fein J.B. et Kulpa C.F. (2004)** *Proton and Cd adsorption onto natural bacterial consortia: Testing universal adsorption behavior*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2004, 68, (15), pp. 3231–3238.

**Bougrier C., Albasi C., Delgenès J.P. et Carrère H. (2006a)** *Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability*, Chem. Eng. Process., 45, (8), pp. 711–718.

**Bougrier C., Carrère H. (dir.)**. *Optimisation du procédé de méthanisation par mise en place d'un traitement physicochimique Application au gisement de biogaz*. 276 p. Thèse de doctorat, Génie des Procédés. Montpellier : Université de Montpellier II, (2005).

**Bougrier C., Carrère H. et Delgenès J.P. (2005)** *Solubilisation of waste-activated sludge by ultrasonic treatment*, Chem. Eng. J., 106 (2), pp. 163–169.

**Bougrier C., Delgenes J.P. et Carrère H. (2006b)** *Combination of thermal treatments and anaerobic digestion to reduce sewage sludge quantity and improve biogas yield*, *Process Saf. Environ. Protect.*, 84, (B4), pp. 280–284.

**Bougrier C., Delgenès J.P. et Carrère H. (2008)** *Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge samples solubilisation, physical properties and anaerobic digestion*. *Chemical Engineering Journal*, 139, (2), pp. 236–244.

**Boswell C.D., Dick R.E. et Macaskie L.E. (1999)** *The effect of heavy metals and other environmental conditions on the anaerobic phosphate metabolism of Acinetobacter johnsonii*, *Microbiol.* 145, pp. 1711–1720.

**Bragato G., Leita L., Figliolia A. [et al.] (1998)** *Effects of sewage sludge pre-treatment on microbial biomass and bioavailability of heavy metals*. *Soil and Tillage Research*, 46, (1-2), pp. 129–134.

**Braguglia C.M., Mininni G. et Gianico A. (2008)** *Is sonication effective to improve biogas production and solids reduction in excess sludge digestion?*, *Water Sci. Technol.*, 57, (4), pp. 479–483.

**Brown M. et Lester J. (1979)** *Metal removal in activated sludge: The role of bacterial extracellular polymers*. *Water Research*, 13, (9), pp. 817–837.

**Brown M.J. et Lester J.N. (1982)** *Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge. I. Effects of metal concentration*. *Wat Res*, 16, (1), pp. 1539–1548.

**Bruins M.R., Kapil S. et Oehme F.W. (2000)** *Microbial resistance to metals in the environment*. *Exocitology and Environmental Safety*, 45, pp. 198–207.

**Bruus J.H., Nielsen P.H. et Keiding K. (1992)** *On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering*. *Water Res.*, 26, (12), pp. 1597–1604.

**Bura R., Cheung M., Liao B., Finlayson J., Lee B.C., Droppo I.G., Leppard G.G. et Liss S.N. (1998)** *Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix*, *Water Sei. Technol.*, 37, pp 325–333.

## C

**Cadoret A., Conrad A. et Black J.C. (2002)** *Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, pp.179–186

**Canales A., Pareilleux A., Rols J.L., Goma C. et Huyard A. (1994)** *Decreased sludge production strategy for domestic wastewater treatment*. *Water Sci. Technol.*, 30, (8), pp. 96–106.

**Caravelli A., Giannuzzi L. et Zaritzky N. (2008)** *Reduction of hexavalent chromium by Sphaerotilus natans a filamentous microorganism present in activated sludges*. *Journal of Hazardous Materials*, 156, (1-3), pp. 214–222.

**Carballa M., Omil F. et Lema J.M., (2004)** *Improvement of anaerobic digestion operation and digested sludge characteristics using a chemical and a thermal pretreatment.* In: Anaerobic Digestion 10th World Congress, Sept 2004. Montreal, Quebec, Canada. vol. II, pp. 1004–1009.

**Carrère H., Dumas C, Battimelli A., Batstone D.J., Delgenes J.P., Steyer J.P. et Ferrer I. (2010)** *Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review.* J Hazard Mater, pp. 183:1–15

**Carrère H., Bougrier C., Castets D. et Delgenes J. P. (2008)** *Impact of initial biodegradability on sludge anaerobic digestion enhancement by thermal pretreatment.* Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering. 43, (13), pp. 1551–1555.

**Çeçen F., Semerci N. et Geyik A.G., (2010)** *Inhibition of respiration and distribution of Cd, Pb, Hg, Ag and Cr species in a nitrifying sludge.* J Hard Mater., 178, pp. 619–627.

**Chang I.S., Groh J.L., Ramsey M.M., Ballard J.D. et Krumholz L.R. (2004)** *Differential expression of *Desulfovibrio vulgaris* genes in response to Cu(II) and Hg(II) toxicity.* Appl. Environ. Microbiol., 70, pp. 1847–1851.

**Chang T.C., You S.J., Damodar R.A. et Chen. Y.Y. (2011)** *Ultrasound pre-treatment step for performance enhancement in an aerobic sludge digestion process.* Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers .42, pp. 801–808

**Chang W.C., Hsu C.H., Chiang S.M. [et al.] (2007)** *Equilibrium and kinetics of metal biosorption by sludge from a biological nutrient removal system.* Environmental Technology, 28, (4), pp. 453–462.

**Chauzy J., Cretenot D., Bausseon A. et D.S. (2007)** *Anaerobic digestion enhanced by thermal hydrolysis: First reference BIOTHELYS® at Saumur, France. Facing sludge diversities: challenges, risks and opportunities.* Antalya, Turkey.

**Chen Y., Jiang W.J., Liang D.T. et Tay J.H. (2008)** *Biodegradation and kinetics of aerobic granules under high organic loading rates in sequencing batch reactor.* Applied Microbiology and Biotechnology, 79, pp. 301–308.

**Cheng M.H. (1973)** *Interaction of heavy metals in the activated sludge process.* pp. Thèse de doctorat, Chicago (USA): Illinois Institute of Technology.

**Cheng M.H., Patterson J.W. et Minear R.A. (1975)** *Heavy metals uptake by activated sludge.* Journal of the Water Pollution Control Federation, 47, (2), pp. 362–376.

**Chipasa K.B. (2003)** *Accumulation and fate of selected heavy metals in a biological wastewater treatment system.* Waste Management, 23, (2), pp. 135-143.

**Chrôt R.J. (1991)** *Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes,* In: Microbia/enzymes in aquatic environments Chrôt R. J. (Ed.), Springer-Verlag, New York, pp. 29–59.

**Chu C.P., Lee D.J., Chang B.V., You C.S. et Tay J.H., (2002)** “Weak” ultrasonic pre-treatment on anaerobic digestion of flocculated activated biosolids, *Water Res.*, 36, (11), pp. 2681–2688.

**Commenges-Bernole N. et Marguerie J. (2009)** Adsorption of heavy metals on sonicated activated sludge. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, (1), pp. 83–87.

**Comte S., Baudu M. ; Guibaud, G;** (dir.). *Intéractions entre des exopolymères extraits de biomasses épuratoires et les métaux*. 106 p. Thèse de doctorat, Chimie et Microbiologie de l'Eau. Limoges : Université de Limoges, (2005).

**Comte S., Guibaud G. et Baudu M. (2006)** Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, (1-2), pp. 237–245.

**Comte S., Guibaud G. et Baudu M. (2007)** Effect of extraction method on EPS from activated sludge: An HPSEC investigation. *Journal of Hazardous Materials*, 140, (1-2), pp. 129–137.

**Confer D.R. et Logan B.E. (1998)** Location of protein and polysaccharide hydrolytic activity in suspended and biofilm wastewater cultures. *Water Research*, 32, (1), pp. 31–38.

**Confer D.R. et Logan B.E. (1997)** Molecular weight distribution of hydrolysis products during biodegradation of model macromolecules in suspended and biofilm cultures. 1. Bovine serum albumin. *Water Res.*, 31, (9): pp. 2127–36.

**Conrad A., Cadoret A. et Block J.C. (2000)** Extracellular enzymatic activities in activated sludge flocs., International Specialist Conference: Extracellular polymeric substances: The construction material of biofilms, Mülheim (D)

**Cornu S., Neal C., Ambrosi J.P. [et al.] (2001)** The environmental impact of heavy metals from sewage sludge in ferralsols (São Paulo, Brazil). *The Science of the total environment*, 271, (1-3), pp. 27–48.

**Couturier C. (2002)** Effets de la digestion anaérobie sur les micropolluants et germes pathogènes. Solagro, 5p.

**Couturier, C. et Galtier, L. (1999)** Etat des connaissances sur le devenir des germes pathogènes et des micropolluants au cours de la méthanisation des déchets et des sous produits organiques, ADEME, 98 p.

## **D**

**Dagot C., Pons M.N., Casellas M., Guibaud G., Dollet P. et Baudu M. (2001)** Use of image analysis and rheological studies for the control of settleability of filamentous bacteria: application in SBR reactor. *Water Science and Technology*, 43, (3), pp. 27–33.

**Dawes E.A. et Ribbons, D.W. (1964)** *Some aspects of the endogenous metabolism of bacteria*. *Bacr Rev.*, 28, pp. 126–149

**De Philippis R. et Vincenzini M. (1998)** *Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications*. *FEMS. Microbiology Reviews*, 22, pp.151-175

**Decho A.W. (2000)** *Microbial biofilms in intertidal systems: an overview*. *Continental Shelf Research*, 20, (10-11), pp. 1257–1273.

**Degrémont. (1989)** *Mémento technique de l'eau*, 9ème Edition, Tome 1 et 2, Editions Lavoisier, Paris.

**Dewil R., Baeyens J. et Goutvrind R. (2006)** *Use of ultrasonics in the treatment of waste activated sludge*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 14, (1), pp. 105–113.

**De baere L. (2000)** *Anaerobic digestion of solid waste: state-of-the-art*. *Water Sci. Technol.*, 41 3, pp. 283–290.

**Dilek F.B., Gokcay C.F. et Yetis U. (1998)** *Combined effects of Ni(II) and Cr(VI) on activated sludge*. *Water Res.*, 32, pp. 303–312.

**Ding W.C., Li D.X., Zeng X.L. et Long T.R. (2006)** *Enhancing excess sludge aerobic digestion with low intensity ultrasound*, *Journal of Cent. South univ. technology*, 13, (4), pp. 408–411.

**Dohanyos, M., Zabranska, J., Kutil, J. et Jenicek, P. (2004)** *Improvement of anaerobic digestion of sludge*, *Water Science and Technology*, 49, (10), pp. 89–96.

**Dumas C., Perez S., Paul E. et Lefebvre X. (2010)** *Combined thermophilic aerobic process and conventional anaerobic digestion: Effect on sludge biodegradation and methane production*. *Bioresource Technol.*, 101, pp. 2629–2636.

**Dwyer J., Starrenburg D., Tait S. [et al.] (2008)** *Decreasing activated sludge thermal hydrolysis temperature reduces product colour, without decreasing degradability*. *Water Research*, 42, (18), pp. 4699–4709.

**D'Antonio G. (1983)** *Aerobic digestion of thickened activated sludge*. *Water Research*, 17, pp. 1525–1531.

## **E**

**Ekama G.A., Sötemann S.W. et Wentzel M.C. (2007)** *Biodegradability of activated sludge organics under anaerobic conditions*, *Water Res.*, 41, (1), pp. 244–252.

**Erden G., Demir O., et Filibeli A. (2010)** *Disintegration of biological sludge: Effect of ozone oxidation and ultrasonic treatment on aerobic digestibility*. *Bioresour Technol.* 101, pp. 8093–8098.

**Erden G. et Filibeli A. (2009)** *Ultrasonic pre-treatment of biological sludge: consequences for disintegration, anaerobic biodegradability, and filterability*, J. Chem. Technol. Biotechnol., 85, (1), pp. 145–150.

**Eriksson L et B Alm, (1991)** *Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties*. Water Sci. Technol., 24, (7), pp. 21–28.

**Eskicioglu C., Kennedy K.J. et Droste R.L.,(2009)** *Enhanced disinfection and methane production from sewage sludge by microwave irradiation*, Desalination, 248, (1–3), pp. 279–285.

## **F**

**Fernandez-Polanco F., Velazquez R., Perez-Elvira S.I., Casas C., del Barrio D., Cantero F.J., Fdz-Polanco M., Rodriguez P., Panizo L., Serrat J. et Rouge P. (2008)** *Continuous thermal hydrolysis and energy integration in sludge anaerobic digestion plants*, Water Sci. Technol., 57, (8), pp. 1221–1226.

**Fjällborg B. et Dave G. (2003)** *Toxicity of Copper in sewage sludge*, Envir. Inter., 28, pp. 761–769.

**Fjordside C. (2001)** *An operating tale from Næstved Sewage Treatment Plant*, Municipal wastewater treatment Nordic Conference, Copenhagen (Denmark).

**Flemming H.C. et Wingender J. (2001)** *Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs). Part I. Structural and ecological aspects*. Water Sci. Technol., 43, (6), pp. 1–8.

**Foladori P., Laura B., Gianni A. [et al.] (2007)** *Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry-Fecal indicators, wastewater and activated sludge*. Water Research, 41, (1), pp. 235–243.

**Frølund B., Griebe T. et Nielsen P.H. (1995)** *Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix*. Applied Microbiology and Biotechnology, 43, (4), pp. 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, (8), pp. 1749–1758.

**Fuentes A., Lloréns M., Sáez J., Soler A., Aguilar M.L., Ortuño J.F. et Meseguer V.F. (2008)** *Comparative study of six different sludge by sequential extraction of heavy metals*. Bioresource Technology, 99, pp. 517–525.

## **G**

**Gadd G. M. et Griffiths A.J. (1978)** *Microorganisms and heavy metal toxicity*. Microbial Ecology, 4, pp. 303–317.

**Gagnon C. et Saulnier I. (2003)** *Distribution and fate of metals in the dispersion plume of a major municipal effluent*. Environmental Pollution, 124, (1), pp. 47–55.

**Geebelen W., Adriano D.C., van der Lelie D., Mench M., Carleer R., Clijsters H. et Vangronsveld J (2003)** *Selected bioavailability assays to test the effect of amendment-induced immobilization of lead in soils.* Plant and Soil, 249, pp. 217–228.

**Gernaey K., Verschuere L., Luyten L., and Verstraete W. (1997)** *Fast and sensitive acute toxicity detection with an enrichment nitrifying culture.* Water Environ. Res.69, pp.1163–1169.

**Giller K.E., Witter E. et McGrath S.P. (1998)** *Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review.* Soil Biol Biochem., 30, pp. 1389–1414.

**Goel R., Mino T., Satoh H. et Matsuo T. (1998)** *Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor.* Water Research, 32, (7), pp.2081–2088.

**Gomez Palacios J.M., De Apodaca A.R., Rebollo C. et Azcarate J. (2002)** *European policy on biodegradable waste: A management perspective.* Water Science and Technology, 46, n°10. pp. 311–318.

**Gonze E., Pillot S., Valette E. [et al.] (2003)** *Ultrasonic treatment of an aerobic activated sludge in a batch reactor.* Chemical Engineering and Processing, 42, (12), pp. 965–975.

**Gould M.S., and Genetelli E.J. (1984)** *Effects of complexation on heavy metal binding by anaerobically digested sludges.* Water Res., 18, pp. 123–126.

**Graja S., J. Chauzy, Fernandes P., Patria L. and Cretenot D. (2005)** *Reduction of sludge production from WWTP using thermal pretreatment and enhanced anaerobic methanisation,* Water Sci. Technol., 52, (1–2), pp. 267–273.

**Grönroos A., Kyllönen H., Korpijärvi K. [et al.] (2005)** *Ultrasound assisted method to increase soluble chemical oxygen demand (SCOD) of sewage sludge for digestion.* Ultrasonics Sonochemistry, 12, (1-2), Spec. Iss., pp. 115–120.

**Guellil A, Boualam M., Quiquampoix H., Block J.-C. et Ginestet P. (2001a)** *Hydrolysis of wastewater colloidal matter by the extracellular enzymes extracted from activated sludge flocs,* Water Sci. Technol., 43, pp.33–40.

**Guibaud G., baudu M., Dollet P. [et al.] (1999)** *Role of extracellular polymers in cadmium adsorption by activated sludges.* Environmental Technology, 20, (10), pp. 1045–1054.

**Guibaud G., Bordas F., Saaid A. [et al.] (2008)** *Effect of pH on cadmium and lead binding by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 63, (1), pp. 48–54.

**Guibaud G., Comte S., Bordas F. [et al.] (2005)** *Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel.* Chemosphere, 59, (5), pp. 629–638.

**Guibaud G., Tixier N., Bouju A. [et al.] (2004)** *Use of a polarographic method to determine copper, nickel and zinc constants of complexation by extracellular polymers extracted from activated sludge.* *Process Biochemistry*, 39, (7), pp. 833–839.

**Guibaud G., Tixier N., Bouju A. [et al.] (2003)** *Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb.* *Chemosphere*, 52, (10), pp. 1701–1710.

## H

**Hanay O., Hasar H., Kocer N.N. et Aslan S. (2008)** *Evaluation for agricultural usage with speciation of heavy metals in a municipal sewage sludge.* *B. Environ. Contam. Tox.*, 81 (1), pp. 42–46.

**Harrison J.J., Ceri H. et Turner R.J. (2007)** *Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms.* *Nat Rev Microbiol.*, 5, pp. 928–938.

**Hasegawa S., Shiota N., Katsura K. et Akashi A. (2000)** *Solubilization of organic sludge by thermophilic aerobic bacteria as a pretreatment for anaerobic digestion.* *Water Science and Technology*, 41, (3), pp.163–169.

**Haug R.T., Stuckey D.C., Gossett J.M. et Mac Carty P.L. (1978)** *Effect of thermal pretreatment on digestibility and dewaterability of organic sludges,* *J. Water Pol. Control Fed.* (January), pp. 73–85.

**Henriques D.S. et Love N.G. (2007)** *The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins.* *Water Res.*, 41, pp. 4177–4185.

**Henriques D.S., Holbrook R.D., Kelly R.T. et Love N.G. (2005)** *The impact of floc size on respiration inhibition by soluble toxicants-A comparative investigation.* *Water Res.*, 39, pp. 2559–2568.

**Héry M., Sanguin H., Perez Fabiel S., Lefebvre X., Vogel T.M., and Paul E. et alfenore S. (2010)** *Monitoring of bacterial communities during low temperature thermal treatment of activated sludge combining DNA phylochip and respirometry techniques.* *Water Research*, 44, pp. 6133–6143.

**Hickey R.F., Vanderwielen J. et Switzenbaum M.S. (1989)** *The effect of heavy metals on methane production and hydrogen and carbon monoxide levels during batch anaerobic sludge digestion.* *Water Research*, 23, pp. 207–219.

**Higgins M.J. et Novak J.T. (1997)** *Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation,* *J. Environ. Eng.*, 123, pp. 479–485.

**Hoppe H.-G., Kim S.-J. et Gocke K. (1988)** *Microbial decomposition in aquatic environments: combined process of extracellular enzyme activity and substrate uptake.,* *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, pp.784–790.

**Horan N.J., Fletcher L., Betmal S.M., Wilks S.A. et Keevil C.W. (2003)** *Die-off of enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic batch digestion*. Water Research, 38, 1113–1120.

**Hu C.W., Chao M.R., Wu K.Y., Chang-Chien G.P., Lee W.J., Chang L.W. et Lee W. S. (2003)** *Characterization of multiple airborne particulate metals in the surroundings of a municipal waste incinerator in Taiwan*. Atmospheric Environment, 37, pp. 2845–2852.

### I

**IARC (1987)** *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC, Monographs Volumes 1-42*, Lyon, 440 pp

### J

**Jain R., Pathak A., Sreekrishnan T.R. et Dastidar M.G. (2010)** *Autoheated thermophilic aerobic sludge digestion and metal bioleaching in a two-stage reactor system*. J. Environ. Sci., 22, pp. 230–236.

**Jin Y.Y., Li H., Mahar R.B., Wang Z.Y. et Nie Y.F. (2009)** *Combined alkaline and ultrasonic pretreatment of sludge before aerobic digestion*. Journal of Environmental Sciences, 21, pp. 279–284.

**Johnson K.J., Szymanowski J.E.S., Borrok D. [et al.] (2007)** *Proton and metal adsorption onto bacterial consortia: Stability constants for metal-bacterial surface complexes*. Chemical Geology, 239, (1-2), pp. 13–26.

**Jong T. et Parry D.L. (2003)** *Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs*. Water Res., 37, pp. 3379–3389.

**Jorand F., Zartarian F., Thomas F. [et al.] (1995)** *Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs*. Water Research, 29, (7), pp 1639–1647.

### K

**Karvelas M., Katsoyiannis A. et Samara C. (2003)** *Occurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment process*. Chemosphere, 53, (10), pp. 1201–1210.

**Kazi, T. G., Jamali, M. K., Siddiqui, A., Kazi, G. H., Arain, M. B. et Afridi, H. I. (2006)** *An ultrasonic assisted extraction method to release heavy metals from untreated sewage sludge samples*. Chemosphere, 63, pp. 411–420.

**Keevil CW. (2004)** *The physico-chemistry of biofilm-mediated pitting corrosion of copper pipe supplying potable water*. Water Sciences and Technology, 49, pp. 91–98

**Khanal S.K., Grewell D., Sung S. [et al.] (2007)** *Ultrasound applications in wastewater sludge pretreatment: A review*. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37, (4), pp. 277–313.

**Kida K., Shigematsu T., Kijima J., Numaguchi M., Mochinaga Y., Abe N. et Morimura S. (2001)** *Influence of Ni<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> on methanogenic activity and the amounts of coenzymes involved in methanogenesis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, (6), pp. 590–595.

**Kim D.W., Cha D.K., Wang J. [et al.] (2002)** *Heavy metal removal by activated sludge: Influence of nocardia amarae*. *Chemosphere*, 46, (1), pp. 137–142.

**Kim Y.U., Ha J., Yoon K.Y. [et al.] (2004)** *Effect of ultrasound on sludge from water treatment plant*. *Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers and Short Notes and Review Papers*, 43, (10), pp. 7362–7363.

**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, (3), pp. 271–275.

## L

**La H.J., Kim K.H., Quan Z.X., Cho Y.G. et Lee S.T. (2003)** *Enhancement of sulfate reduction activity using granular sludge in anaerobic treatment of acid mine drainage*. *Biotechnol Lett.*, 25, 6, pp. 503–508.

**Lafitte-Trouque S. et Forster C.F. (2002)** *The use of ultrasound and  $\gamma$ -irradiation as pre-treatments for the anaerobic digestion of waste activated sludge at mesophilic and thermophilic temperatures*. *Bioresource Technol.*, 84, pp. 113–118.

**Laurent J., Dagot, C; Casellas, M; (dir.).** *Modifications de la répartition d'espèces métalliques (Cd, Cu) induites par des prétraitements physique (ultrasons), chimique(ozone) et thermique au sein des procédés à boues activées*. 237 p. Thèse de doctorat, Chimie et Microbiologie de l'Eau. Limoges : Université de Limoges, (2009).

**Laurent J., Jaziri K., Guignard R., Casellas M. et Dagot C. (2011)** *Comprehensive insight of the performances of excess sludge reduction by 90°C thermal treatment coupled with activated sludge at pilot scale: COD and N removal, bacterial populations, fate of heavy metals*. *Process Biochem.*, doi:10.1016/j.procbio.2011.06.007.

**Laurent J., Casellas M. et Dagot C. (2009a)** *Heavy metals uptake by sonicated activated sludge: Relation with floc surface properties*. *Journal of Hazardous Materials*, 162, (2-3), pp. 652–660.

**Laurent J., Casellas M., Pons M.N. et Dagot C. (2010)** *Cadmium biosorption by ozonized activated sludge: The role of bacterial flocs surface properties and mixed liquor composition*. *Journal of Hazardous Materials*, 183, (1-3). pp. 256-263.

**Laurent J., Casellas M., Pons M.N. et Dagot C. (2009b)** *Flocs surface functionality assessment of sonicated activated sludge in relation with physico-chemical properties*. *Ultrasonics sonochemistry*, 16, (4), pp. 488–494.

**Layden N.M., Mavinic D., Kelly S. Harlan G., Moles R. et Bartlett J. (2007)** *Autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD) – Part I: Review of origins, design, and process operation*. Journal of Environmental Engineering and Science, 6, (6), pp. 665–678.

**Lazzari L., Sperti L., Bertin P. [et al.] (2000)** *Correlation between inorganic (heavy metals) and organic (PCBs and PAHs) micropollutant concentrations during sewage sludge composting processes*. Chemosphere, 41, (3), pp. 427–435.

**Lead J.R. Hamilton-Taylor J. et Davison W. (1998)** *The effect of sequential extractions of suspended particulate matter on trace metal sorption and microbial cell stability*. The Science of the Total Environment 209, pp.193–199.

**Lee C., Kim J., Shin S.G. et Hwang S. (2008)** *Monitoring bacterial and archaeal community shifts in a mesophilic anaerobic batch reactor treating a high-strength organic wastewater*. FEMS Microbiology Ecology, 65, 3, pp. 544–554.

**Lehne G., Müller J.A. et Schwedes J. (2001)** *Mechanical disintegration of sewage sludge*, Journal of Water Science and Technology, 43, (1), pp. 19–26.

**Li H., Jin Y.Y., Rasool B.M., Wang Z.Y. et Nie Y.F. (2009)** *Effects of ultrasonic disintegration on sludge microbial activity and dewaterability*. J. Hazard. Mater., 161, pp. 1421–1426.

**Li Y.Y. et Noike T. (1992)** *Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by thermal pretreatment*. Water Science and Technology, 26, (3-4), pp. 857–866.

**Li F., Du P., Chen W. et Zhang S. (2007)** *Preparation of silica-supported porous sorbent for heavy metal ions removal in wastewater treatment by organic-inorganic hybridization combined with sucrose and polyethylene glycol imprinting*. Anal. Chim. Acta., 585, pp. 211–218.

**Lin C.Y., Wu C.C. et Hung C.H. (2008)** *Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures*. International Journal of Hydrogen Energy. 33, (1), pp. 43–50

**Lin C.Y. (1992)** *Effect of heavy metals on volatile fatty acid degradation in anaerobic digestion*. Water Res., 26, 2, pp. 177–183.

**Lindberg B. (1990)** *Components of bacterial polysaccharides*. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 48, pp.279–318

**Liu H. et Fang H.H.P. (2002)** *Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data*. Biotechnology and Bioengineering, 80, pp. 806–11.

**Liu S.G., Song F.Y., Zhu N.W., Yuan H.P. et Cheng J.H. (2010)** *Chemical and microbial changes during autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD) of sewage sludge*. Bioresource Technology, 101, pp. 9438–9444.

**Liu J.C., Lee C.H., Lai J.Y., Wang K.C., Hsu Y.C. et Chang B.V. (2001)** *Extracellular polymers of ozonized waste activated sludge*, Water Science & Technology, 44, (10), pp. 137–142.

**Liu T. et Sung S. (2002)** *Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens*. Water Science and Technology, 45, (10), pp. 113–120.

**Lopez A., Lazaro N., Priego J.M. [et al.] (2000)** *Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by Pseudomonas fluorescens 4F39*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 24, (2), pp. 146–151.

## M

**Macaskie L., Dean A., et Cheetham A. (1987)** *Cadmium accumulation by a Citrobacter sp.: The chemical nature of the accumulated metal precipitate and its location on the bacterial cells*. J Gen Microbiol., 133, (3), pp. 539–544.

**Madoni P. Davoli D. et Guglielmi L. (1999)** *Response of SOUR and AUR to heavy metal contamination in activated sludge*. Water Res., 33, pp. 2459–2464.

**Mata-Alvarez J., Macé S. et Llabrés P. (2000)** *Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives*. Bioresource Technology, 74, (1), pp. 3–16.

**Miquel G. (2003)** *La qualité de l'eau et de l'assainissement en France*. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.

**Moletta R. (1993)** *La digestion anaérobie : du plus petit au plus grand*, Biofutur, janvier, pp. 16–25.

**Morgan-Sagastume F. et Allen D. (2005)** *Physicochemical properties and stability of activated sludge flocs under temperature upshifts from 30 to 45°C*. Journal of Colloid and Interface Science, vol. 281, (1), pp. 136–145.

**Muller W., Frommert I. et Jörg R. (2004)** *Standardized methods for anaerobic biodegradability testing*. Review Environmental Science Biotechnology. 3, (2), pp. 141–158.

## N

**Navia, R., Soto, M., Vidal, G., Bornhardt, C. et Diez, M. C. (2002)** *Alkaline pretreatment of kraft mill sludge to improve its anaerobic digestion*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 69, pp. 869–876.

**Neis U. (2000)** *Ultrasound in water, wastewater and sludge treatment*. Water 21, vol. APR, pp. 36–39.

**Neis U., Nickel K. et Lunden A. (2008)** *Improving anaerobic and aerobic degradation by ultrasonic disintegration of biomass*, J. Environ. Sci. Health Part A-Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng., 43, (13), pp. 1541–1545.

**Nelson P.O., Chung A.K., et Hudson M.C. (1981)** *Factors affecting the fate of heavy metals in the activated sludge process.* Journal of the Water Pollution Control Federation, 53, (8) pp. 1323–1333.

**Neyens E. et Baeyens J. (2003)** *A review of thermal sludge pre-treatment processes to improve dewaterability.* Journal of Hazardous Materials, 98, (1-3), pp. 51–67.

**Nielsen P.H. et Keiding K. (1998)** *Disintegration of activated sludge flocs in presence of sulphide,* Water Research, 32, (2), pp 313–320

**Nies D.H. (2003)** *Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes.* FEMS Microbiology Reviews, 27, pp. 313-339.

**Nosrati M., Sreekrishnan T.R. et Mukhopadhyay S.N. (2007)** *Energy audit, solids reduction and pathogen inactivation in secondary sludges during batch thermophilic aerobic digestion process.* Journal of Environmental Engineering, 133, (5), pp. 477–484.

## O

**Ødegaard H. (2004)** *Sludge minimization technologies - An overview.* Water Science and Technology, 49, (10), pp. 31–40.

**Ong S.A., Toorisaka E., Hirata M. et Hano T. (2010)** *Adsorption and toxicity of heavy metals on activated sludge.* ScienceAsia 36, pp. 204–209.

**Ong S.A, Lim P.E., Seng C.E., Hirata M. et Hano T. (2005)** *Effects of Cu(II) and Cd(II) on the performance of sequencing batch reactor treatment system.* Process Biochem 40, pp. 453–60.

**Onyeché T.I., Schäfer O., Bormann H. [et al.] (2002)** *Ultrasonic cell disruption of stabilised sludge with subsequent anaerobic digestion.* Ultrasonics, 40, (1-8), pp. 31–35.

**OTV. (1997)** *Traiter et valoriser les boues.* Ouvrage collectif n°2, Editions Lavoisier, Cachan.

**Ozbek B. Ulgen K.O. (2000)** *The stability of enzymes after sonication.* Process Biochem., 35, (9), pp. 1037–1043.

**Ozbek B., Kutlu O. et Ulgen M. (2000)** *The stability of enzymes after sonication.* Process Biochemistry, 35, pp. 1037–1043.

## P

**Pagnanelli F., Mainelli S., Bornoroni L. [et al.] (2009)** *Mechanisms of heavy-metal removal by activated sludge.* Chemosphere, 75, (8), pp. 1028–1034.

**Pagnanelli F., Moscardini E, Giuliano V. et Toro, L. (2004)** *Sequential extraction of heavy metals in river sediments of an abandoned pyrite mining area. Pollution detection and affinity series.* Environ. pollut., 132, pp.189–201.

**Pai T.Y., Leu H.G., Chiang C.F., Tzeng C.J. et Wang S.C. (2008)** *Simulating transformation of nitrogen components in sewer system when oxygen and flow velocity changed,* International Journal of Applied Science and Engineering, 6, pp. 1–9.

**Pamukoglu M.Y. et Kargi F. (2006)** *Batch kinetics and isotherms for biosorption of copper (II) ions onto pre-treated Powdered Waste Sludge (PWS).* J. Hazardous Mater., 138, pp. 479–484.

**Pamukoglu Y. et Kargi F. (2007)** *Biosorption of copper(II) ions onto powdered waste sludge in a completely mixed fed-batch reactor: Estimation of design parameters.* Bioresour. Technol., 98, pp. 1155–1162.

**Parkin G.F. et Owen W.F. (1986)** *The fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludge,* J. Environ. Eng. 112, pp. 867–920.

**Patterson J.W., Allen H.E. et Scala J.J. (1977)** *Carbonate precipitation for heavy metal pollutants.* Journal of the Water Pollution Control Federation, 49, (12), pp. 2397–2410.

**Paul E., Camacho P., Lefebvre D. [et al.] (2006)** *Organic matter release in low temperature thermal treatment of biological sludge for reduction of excess sludge production.* Water Science and Technology, 54, (5), pp. 59–68.

**Paul E., Camacho P., Spérandio M. et Ginestet P. (2005)** *Technical and economical evaluation of a thermal, and two oxidative techniques for the reduction of excess sludge production,* 1<sup>st</sup> International Conference on Engineering for Waste Treatment, Albi (France), 17-19 May.

**Perez Cid B., Fernandez Albores A., Fernandez Gomez E. [et al.] (2001)** *Use of microwave single extractions for metal fractionation in sewage sludge samples.* Analytica Chimica Acta, 431, (2.), pp. 209–218.

**Perez-Elvira S., Fdz-Polanco M., Plaza F.I., Garralon G. et Fdz-Polanco F. (2009)** *Ultrasound pre- treatment for anaerobic digestion improvement,* Water Sci. Technol., 60 (6), pp. 1525–1532.

**Planquart P., Bonin G., Prone A. [et al.] (1999)** *Distribution, movement and plant availability of trace metals in soils amended with sewage sludge composts: Application to low metal loadings.* Science of the Total Environment, 241, (1-3), pp. 161–179.

**Principi P., Villa F., Bernasconi M. et Zanardini E. (2006)** *Metal toxicity in municipal wastewater activated sludge investigated by multivariate analysis and in situ hybridization.* Water Res., 40, (1), pp. 99–106.

**Principi P., Villa F., Giussani B., Zanardini E., Cappitelli F. et Sorlini C. (2008)** *The effect of copper on the structure of the ammonia-oxidizing microbial community in an activated sludge wastewater treatment plant.* Microb. Ecol., 57, pp. 215–220.

**Prorot A., Dagot, C; Leprat, P** (dir.). *Approche comparative des effets microbiologiques et chimiques de traitements d'hydrolyse de boues urbaines dans le cadre de la réduction de leur production*. 203 p. Thèse de doctorat, Biologie, Sciences, Santé. Limoges : Université de Limoges, (2008).

**Prorot A., Eskicioglu C., Droste R. [et al.]** (2008) *Assessment of physiological state of microorganisms in activated sludge with flow cytometry: Application for monitoring sludge production minimization*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35, (11), pp. 1261–1268.

## Q

**Quan Z.X., La H.J., Cho Y.G., Hwang M.H., Kim I.S. et Lee X.** (2003) *Treatment of metal contaminated water and vertical distribution of metal precipitates in an upflow anaerobic bioreactor*. *Environ. Technol.*, 24, pp. 369–376.

**Quarmby J., Scott J., Mason A. [et al.]** (1999) *The application of ultrasound as a pre-treatment for anaerobic digestion*. *Environmental Technology*, 20, (11), pp. 1155–1161.

## R

**Rai C.L., Struenkmann G. et Mueller J. Rao P.G.** (2004) *Influence of ultrasonic disintegration on sludge growth reduction and its estimation by respirometry*. *Environmental Science and Technology*, 38, (21), pp. 5779–5785.

**Rudd T., Sterritt R.M. et Lester J.N.** (1984) *Complexation of heavy metals by extracellular polymers in the activated sludge process*. *Journal WPCF*, 56, pp. 1260–1268

## S

**Salsabil M.R., Laurent J., Casellas M. et Dagot C.** (2010) *Techno-economic evaluation of thermal treatment, ozonation and sonication for the reduction of wastewater biomass volume before aerobic or anaerobic digestion*. *Journal of Hazardous Materials*, 174, pp. 323–333.

**Salsabil M.R., Prorot A., Casellas M. et Dagot C.** (2009) *Pre-treatment of activated sludge: Effect of sonication on aerobic and anaerobic digestibility*, *Chem. Eng. J.*, 148 (2–3), pp. 327–335.

**Salsabil R., Casellas M. ; Dagot, C** (dir.). *Etude comparative des digestions aérobie et anaérobie de boues biologiques urbaines traitées par procédés physique, chimique et thermique : application pour la réduction de la production de boues*. 334 p. Thèse de doctorat, Chimie et Microbiologie de l'Eau. Limoges : Université de Limoges, (2008).

**Sandaa R.A., Torsvik V., Enger Ø., Daae F.L., Castberg T. et Hahn D.** (1999) *Analysis of bacterial communities in heavy metal contaminated soils at different levels of resolution*. *FEMS Microbiol. Eco.*, 30, pp. 237–251.

**Santarsiero A., Veschetti E., Donati G. [et al.]** (1998) *Heavy Metal Distribution in Wastewater from a Treatment Plant*. *Microchemical Journal*, 59, (2), pp. 219–227.

**Santos A., Alonso E. et Riesco P. (2005)** *Influence of cadmium on the performance of an activated SBR sludge treatment.* Environmental Technology, 26, pp. 127–134

**Scancar J., Milacic R., Strazar M. [et al.] (2000)** *Total metal concentrations and partitioning of Cd, Cr, Cu, Fe, Ni and Zn in sewage sludge.* Science of the Total Environment, vol. 250, n°1-3. pp. 9–19.

**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, (4), pp. 389–399.

**Semerci N., et Çeçen F. (2007)** *Importance of cadmium speciation in nitrification inhibition.* Journal of Hazardous Materials, 17, pp. 503–512.

**Siles J.A., Brekelmans J., Martin, M.A., Chica A.F. et Martin A. (2010)** *Impact of ammonia and sulphate concentration on thermophilic anaerobic digestion.* Bioresources Technology, 101, pp. 9040–9048.

**Silver S., et Phung L.T. (1996)** « *Bacterial heavy metal resistance: New surprises* », Annual Reviews in Microbiology, 50, pp. 753–789.

**Smith J.J., Qunitero E.J. et Geesey G.G. (1990)** *A sensitive chromatographic method for the detection of pyruval groups in microbial polymers from sediments.* Microbial Ecology, 19, pp.137–147.

**Sobeck D.C. et Higgins M.J. (2002)** *Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation.* Water Research, 36, (3), pp. 527–538.

**Sörme L. et Lagerkvist R. (2002)** *Sources of heavy metals in urban wastewater in Stockholm.* Science of the Total Environment, 298, (1-3), pp 131–145.

**Sörme L., Lindqvist A. et Söderberg H. (2003)** *Capacity to influence sources of heavy metals to wastewater treatment sludge.* Environmental Management, 31, (3), pp. 421–428.

**Sponza D. (2002)** *Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady- and unsteady-state activated sludge systems.* Process Biochem., 37, pp. 983–998.

**Sreekrishnan T.R., Nosrati M. et Narayanan R. (2007)** *An energyefficient process for treatment of sewage sludge.* In: Proceedings of the Moving Forward: Wastewater Biosolids Sustainability: Technical, Managerial and Public Synergy, Moncton, Canada. June. pp. 24–27.

**Stuckey D.C. et Mc Carty P.L. (1978)** *Thermochemical pretreatment of nitrogenous materials to increase methane yield,* Biotechnol. Bioeng. Symp. 8, pp. 219.

**Stumm W., et Bilinski H. (1973)** *Trace metals in natural waters: Difficulties of interpretation arising from our ignorance on their speciation.* 6th International Conference on Advances In Water Pollution Research. Jerusalem, Israël.

**Su M.C., Cha D.K., et Anderson P.R. (1995)** *Influence of selector technology on heavy metal removal by activated sludge: Secondary effects of selector technology.* Water Research, 29, (3), pp. 971–976.

**Suh Y.J. et Rousseaux P. (2002)** *An LCA of alternative wastewater sludge treatment scenarios.* Resources, Conservation and Recycling, 35, n°3. pp. 191–200.

**Sutherland W. (1990)** *Biotechnology of microbial exopolysaccharides.* University of Edinburgh. Cambridge Studies in Biotechnology (N°. 9)

### T

**Tan R., Miyanaga K., Toyama K., Uy D. et Tanji Y. (2010)** *Changes in composition and microbial communities in excess sludge after heat-alkaline treatment and acclimation,* Biochemical Engineering Journal, 52, pp. 151–159..

**Tanaka S., Kobayashi T., Kamiyama K.I. et Bildan L.N.S. (1997)** *Effects of thermochemical pretreatment on the anaerobic digestion of waste activated sludge,* Water Sci. Technol., 35, (8), pp. 209–215.

**Tessier A., Campbell P.G.C. et Bisson M. (1979)** *Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals.* Anal. Chem., 51, pp. 844–851.

**Thiele J. H. (1991)** *Mixed-culture interactions in methanogenesis. Mixed cultures in biotechnology.* G. Zeikus et E. A. Johnson. New York, Mc Graw Hill: pp. 261–292.

**Tiehm A., Nickel K. et Neis U. (1997)** *The use of ultrasound to accelerate the anaerobic digestion of sewage sludge.* Water Science and Technology, 36, (11), pp. 121–128.

**Tiehm A., Nickel K., Zellhorn M. et Neis U. (2001)** *Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization,* Water Research, 35, (8), pp. 2003–2009.

**Tsai Y.P., You S.J., Pai T.Y. [et al.] (2005)** *Effect of cadmium on composition and diversity of bacterial communities in activated sludges.* International Biodeterioration and Biodegradation, 55, (4), pp. 285–291.

**Tsai Y.P., You S.J., Pai T.Y., Chen K.W. (2006)** *Effect of Cd(II) on Different Bacterial Species Present in a Single Sludge Activated Sludge Process for Carbon and Nutrient Removal.* Journal Envir. Engrg., 132, pp. 173–180.

### U

**Urbain V., Block J. et Manem J. (1993)** *Bioflocculation in activated sludge: An analytic approach.* Water Research, 27, (5), pp. 829–838.

**Ure, A.M., Quevauviller, Ph., Muntau, H. et Griepink, B. (1993)** *Speciation of heavy metal in soils and sediments. An account of the improvement and harmonisation of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities.* Int. J. Environ. Anal. Chem., 51, pp.135–151.

**US Environmental Protection Agency (US EPA) (1989)** *Standards for the Disposal of Sewage Sludge*; Proposed Rule. 40 CFR Parts 257 and 503. Fed. Regist., 54, 23 (February 6).

## V

**Vallee B.L. et Ulnier D.D. (1972)** *Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead*. Annu Rev Biochem., 41, pp. 91–128

**Valls M. et de Lorenzo V. (2002)** *Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution*. FEMS Microbiol. Rev. 26, pp. 327–338.

**Valo A., Carrère H. et Delgenès J.P. (2004)** *Thermal, chemical and thermo-chemical pre-treatment of waste activated sludge for anaerobic digestion*, J. Chem. Technol. Biotechnol., 79, (11), pp. 1197–1203.

**Valo A., Carrère H. et Delgenès J.P. (2004)** *Thermal, chemical and thermo-chemical pre-treatment of waste activated sludge for anaerobic digestion*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 79, (11), pp. 1197–1203.

**Van der Veen A., Feroso F.G. et Lens P.N.L. (2007)** *Bonding from analysis of metals and sulfur fractionation in methanol-grown anaerobic granular sludge*. Eng. Life Sci., 7, (5): pp. 480–489.

**Van Hullebusch E., Auvray F., Bordas F., Deluchat V., Chazal P.M. et Baudu M. (2003)** *'Role of organic matter in copper mobility in a polymictic lake following copper sulfate treatment (Courtille lake, France)'*, Environ. Technol. 24, (6), pp. 787–96.

**Van Hullebusch E.D., Utomo S., Zandvoort M.H. et Lens P.N.L. (2005)** *Comparison of three sequential extraction procedures to describe metal fractionation in anaerobic*. Talanta, 65, (2), pp. 549–558.

**Veglio' F. et Beolchini F. (1997)** *Removal of metals by biosorption: a review*. Hydrometallurgy, 44, (3), pp. 301–316.

**Vetter Y.A. et Deming J.W. (1999)** *Growth rates of marines bacterial isolates on particulate organic substrates solubilized by freely released extracellular enzymes*, Microb. Eco., pp. 37, 86–94.

**Volesky B. et Holan Z.R. (1995)** *Biosorption of Heavy Metals*. Biotechnology Progress, 11, (3) pp. 235–250.

**Voutsas D., Zachariadis G., Gantidis N. [et al.] (1996)** *Evaluation of the quality of municipal and industrial wastewater sludges for agricultural purposes*. Fresenius Environmental Bulletin, 5, n°1-2. pp. 1–6.

## W

**Wang F., Wang Y. et Ji M. (2005)** *Mechanisms and kinetics models for ultrasonic waste activated sludge disintegration*. Journal of Hazardous Materials, 123, (1-3), pp. 145–150.

**Wang J., Huang C.P. et Allen H.E. (2003)** *Modeling heavy metal uptake by sludge particulates in the presence of dissolved organic matter*. Water Research, 37, (2), pp. 4835–4842.

**Wang J., Huang C.P., et Allen H.E. [et al.] (1999)** *Effects of dissolved organic matter and pH on heavy metal uptake by sludge particulates exemplified by copper(II) and nickel(II): Three-variable model*. Water Environment Research, 71, (2), pp. 139–147.

**Weemaes M., Grootaerd H., Simoens F. [et al.] (2000)** *Anaerobic digestion of ozonized biosolids*. Water Research, 34, (8), pp. 2330–2336.

**WEFWater, (1992)** Environment Federation, Alexandria.

**Wei X., Ren H.Q., Yuan L.Z., Wang E.B. (2005)** *Applying factorial experiments to study the toxicity effects of heavy metal mixture on nitrifying granules*. Chinese Journal of Environmental Engineering, 1, (5), pp. 101–104.

**Weisz N., Kepp U., Norli M., Panter K. et Solheim O.E. (2000)** *Sludge disintegration with thermal hydrolysis—cases from Norway, Denmark and United Kingdom, 1<sup>st</sup> IWA World Congress, Paris 3–7 July. Pre-prints, Book 4, pp. 288–295.*

**Wingender J., Neu TR., et Flemming HC. (1999)** *Microbial extracellular polymeric substances: characterisation, structure and function*. Berlin: Springer, 123 p.

**Wood J. M. et Wang H.-K. (1983)** *Microbial resistance to heavy metals*. Environ. Sci. Technol., 12, pp. 582A-590A.

**Workentine M.L., Harrison J.J., Stenroos P.U., Ceri, H. et Turner, R. J. (2008)** *Pseudomonas fluorescens view of the periodic table*. Environ. Microbiol., 10, pp. 238–250.

## X

**Xie R., Xing Y., Ghani Y.A., Ooi K.E. et Ng S.W. (2007)** *Full-scale demonstration of an ultrasonic disintegration technology in enhancing anaerobic digestion of mixed primary and thickened secondary sewage sludge*, J. Environ. Eng. Sci., 6, (5), pp. 533–541.

**Xie Y.F. (2004).** *Disinfection by-products in drinking water: Formation, analysis and control*. Lewish Publishers. CRC. Boca Raton, Florida, USA. pp. 26–32.

## Y

**Yan S.T., Kazuhiko M., Xing X.H. et Yasunori T. (2008)** *Succession of bacterial community and enzymatic activities of activated sludge by heat-treatment for reduction of excess sludge*. Biochem. Eng. J., 39, pp. 598–603.

**Yan S.T., Zheng H., Li A., Zhang X., Xing X.H., Chu L.B., Ding G., Sun X.L. et Jurcik B. (2009)** *Systematic analysis of biochemical performance and the microbial community of an activated sludge process using ozone-treated sludge for sludge reduction*. Bioresour. Technol., 100, pp. 5002–5009.

**Yang X., Wang X. et Wang L. (2010)** *Transferring of components and energy output in industrial sewage sludge disposal by thermal pretreatment and two-phase anaerobic process*, *Bioresour. Technol.*, 101, (8), pp. 2580–2584.

**Yenigün O, Kizilgün et Yilmazer G. (1996)** *Inhibition effects of zinc and copper on volatile fatty acid production during anaerobic digestion*. *Environ. Technol.*, 17, (11), pp. 1269–1274.

**Yin J., Tan X. J., Yen N.Q., Cui Y.B. et Tang L. (2005)** *Evaluation of heavy metal inhibition of activated sludge by TTC and INTElectron transport system activity tests*. *Wat Sci and Tech.*, 52, pp. 231–239.

**You S.J., Tsai Y.P. and Huang R.Y., (2009)** *Effects of heavy metals on the specific ammonia and nitrate uptake rates in activated sludge*. *Environ. Eng. Sci.*, 26, pp. 1207–1215.

**Yu G.H., He P.J., Shao L.M. et Zhu Y.S. (2008)** *Extracellular proteins, polysaccharides and enzymes impact on sludge aerobic digestion after ultrasonic pretreatment*. *Water Research*, 42, pp. 1925–1934.

**Yu H.Q., Tay J.H. et Fang H.H.P. (2001)** *The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up*. *Water Res.*, 35, (4), pp.1052–1060.

**Yuan J., Xu R. et Zhang H. (2011)** *The forms of alkalis in the biochar produced from crop residues at different temperatures*. *Bioresource Technology*, 102, pp. 3488–3497.

**Yuncu B., Sanin F.D., Yetis U. (2006)** *An investigation of heavy metal biosorption in relation to C/N ratio of activated sludge*. *Journal of Hazardous Materials*, 137, (2), pp. 990–997.

## Z

**Zabranska J., Dohanyos M., Jenicek P., Kutil J. et Cejka J. (2006)** *Mechanical and rapid thermal disintegration methods of enhancement of biogas production- Full scale applications*, IWA Specialized conference: Sustainable sludge management: state of the art, challenges and perspectives, Moscow, Russia.

**Zhang G., He J., Zhang P. [et al.] (2009)** *Ultrasonic reduction of excess sludge from activated sludge system II: Urban sewage treatment*. *Journal of Hazardous Materials*, 164, (2-3), pp. 1105–1109.

**Zhang P., Zhang G. et Wang W. (2007)** *Ultrasonic treatment of biological sludge: Floc disintegration, cell lysis and inactivation*. *Bioresource Technology*, 98, (1), pp. 207–210.

**Zhao L.L., Wang H.Y., Yang H.F., HE Z., Zhou Y.X., Zhang L. et Pang Z.H. (2011)** *Bacterial Diversity of the Combined Ozonation-ASBR/SBR Sludge Reduction with Simultaneous Nitrogen and Phosphorus*. *Journal of Environmental Engineering Technol.*, (2), 123–130.

**Zheng X.J. et Yu H.Q. (2004)** *Biological hydrogen production by enriched anaerobic cultures in the presence of copper and zinc*. *J. Environ. Sci. Health*, A39 1, pp. 89–101.

**Zorpas A., Constantinides T., Vlyssides A. [et al.] (2000)** *Heavy metal uptake by natural zeolite and metals partitioning in sewage sludge compost*. *Bioresource Technology*, 72, (2), pp. 113–119.

## **CHAPITRE 2 - MATERIELS ET METHODES**



## 1. MATERIELS ET DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

### 1.1. L'origine des boues

Les boues utilisées au cours de ces travaux proviennent de la station d'épuration (STEP) de Limoges d'une capacité de 285 000 équivalent-habitants (EH) et traite essentiellement des effluents d'origine domestique. Elle reçoit de manière discontinue (et pour moins de 10% du volume total entrant) les effluents de l'abattoir municipal. Une image satellite de la station est présentée Figure 2-1. Les boues ont été prélevées sur la boucle de recirculation, du bassin d'aération et au niveau du digesteur.

#### Les boues secondaires :

L'unité de boues activées dans la station d'épuration présente des temps de rétention hydraulique (TRH) et des boues de 8 h et 12 jours, respectivement. Les échantillons de boues activées, recueillis dans la zone aérobie, avait une MES de l'ordre de 3,5 g / L.



Figure 2-1. La station d'épuration de Limoges (1, Clarificateur ; 2, Recirculation des boues secondaires ; 3, Digesteurs) (d'après une image satellite google map)

Afin de s'affranchir des effets potentiels de l'évolution de leurs caractéristiques dues à un long stockage, les boues ont été utilisées maximum 24 heures après les prélèvements et conservées à 4 °C avant les expérimentations.

Tableau 2-1. Les caractéristiques moyennes des boues utilisées

	MS (g/L)	Taux de matière volatile (%)	DCO totale (mg O <sub>2</sub> /L)
Boues du Bassin d'aération (Clarificateur n°1)	3.48	64	2650
Boues de recirculation (n°2)	4.5	68	3483
Boues du digesteur (n°3)	26.5	72	26500

## 1.2. Les traitements d'hydrolyse des boues

### 1.2.1. La sonication

Les boues de recirculation sont traitées grâce à un sonicateur Sonoplus (Bandelin, HD 2200). Le générateur ultrasonique convertit la tension secteur jusqu'à une fréquence ultrasonore de 20 kHz. La sonde utilisée est une sonotrode standard d'un diamètre de 13mm de diamètre. Les volumes des échantillons à traiter aux ultrasons sont de 800 mL (mis dans des béchers de 1 L). La puissance fournie est de 100 W. Afin de pouvoir comparer les résultats avec la bibliographie, le traitement à l'ultrason est caractérisé par l'énergie spécifique fournie (Es). Cette énergie spécifique est une fonction de l'énergie fournie, du volume de l'échantillon, de sa concentration en matière sèche (équation1):

$$Es = \frac{P \times Ts}{MS \times V_{ech}} \quad (\text{Eq.1})$$

Avec :

- Es : energie spécifique (J. g<sup>-1</sup>MS)
- P : puissance fournie (W)
- Ts : temps de sonication (s)
- MS : concentration en matière sèche (g.L<sup>-1</sup>)
- Vech : volume de l'échantillon (L)

Les énergies spécifiques étudiées sont 0, 100 000 et 165 000 kJ.kg<sup>-1</sup>.MS

### 1.2.2. Le traitement thermique basse température

Les boues de recirculation sont traitées dans un bain thermostaté (ISOTEMP 120). 100 ml de boues sont introduites dans des flacons en Pyrex (100 mL) de marque Schott Duan fermés hermétiquement afin d'éviter les phénomènes d'évaporation puis sont mis dans le bain-marie. La température est maintenue constante à 95°C et le temps de traitement (temps de contact) est fixé à 2h, considéré par des études préalables comme durée optimale de traitement au regard des paramètres de solubilisation (Salsabil, 2008). 20 min environ sont nécessaires pour que la température du contenu des flacons atteigne la température recherchée.

### 1.2.3. L'ozonation

L'ozoneur utilisé est de type Trailgaz 5LO. L'ozone ( $O_3$ ) est produit par décharge électrique dans l'air comprimé. Un circuit de refroidissement assure l'absorption de l'excès de chaleur produite. Le débit de gaz est réglé sur l'appareil à  $300 \text{ L.h}^{-1}$ , la puissance fournie est de  $150 \text{ W}$  et la pression de production de l'ozone est de 0,8 bar.

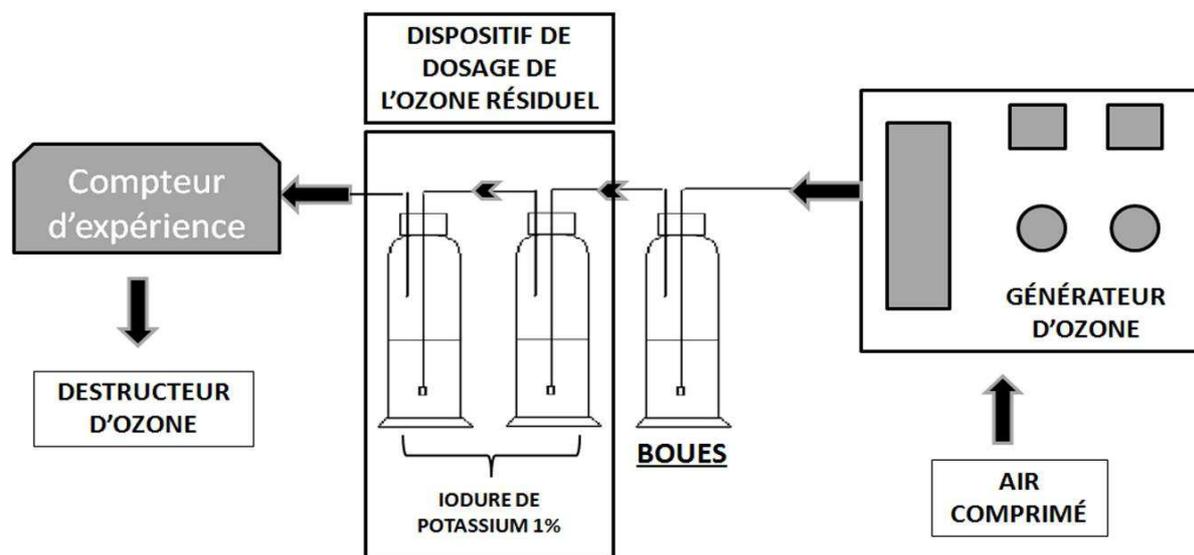


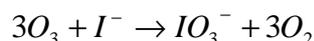
Figure 2-2. Schémas du dispositif utilisé pour le traitement des boues activées à l'ozone (source : Prorot, 2008)

Le réacteur d'ozonation (1L) est équipé d'un diffuseur à fines bulles permettant un bon transfert de l'ozone dans la boue. Le traitement des boues par l' $O_3$  est effectué sur des échantillons d'un volume de 600 mL. Afin de favoriser le transfert de l'ozone dans les boues et d'éviter un moussage visuel trop important, le flacon laveur est maintenu sous agitation continue au cours du traitement.

La concentration en ozone est mesurée en sortie de réacteur par la méthode iodométrique selon la méthode 070035D (Trailgaz Ozone SAS). L'ozone en sortie du réacteur est soumis à un barbotage successif dans deux flacons doseurs contenant chacun 400 mL d'une solution d'iodure de potassium (KI) tamponnée à pH=7 (20g KI, 7,3g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O, 3,5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pour 1L). Le volume de gaz traversant le montage est mesuré à l'aide d'un compteur de gaz monté en aval du dispositif de dosage. L'ozone résiduel est détruit par un destructeur thermique.

L'ozone présent dans le gaz réagit avec l'iodure en libérant de l'iode. Une fois l'ozonation des boues terminée, la solution de KI ayant réagi est récupérée (2 x 800 mL) et homogénéisée. 500 mL sont aliquotés puis acidifiés par l'ajout de 25 mL d'une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 4,5 mol/L. Le diiode (I<sub>2</sub>) formé est dosé par 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 de l'ozone dans la solution de KI :  $O_3 + 2I^- + H_2O \rightarrow I_2 + 2OH^- + O_2$

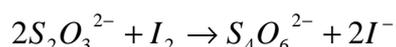
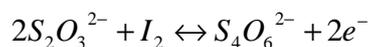
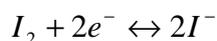


Soit globalement :  $4O_3 + 3I^- + H_2O \rightarrow I_2 + IO_3^- + 2OH^- + 4O_2$

Lors de l'acidification :  $IO_3^- + 5I^- + 6H^+ \rightarrow 3I_2 + 3H_2O$

Après cette acidification, on retrouve 4 moles d'iode libérées pour 4 moles d'ozone absorbées dans la solution soit une stœchiométrie de 1mole/mole.

Lors du dosage titrimétrique :



Ainsi, une mole de thiosulfate peut réduire ½ mole de diode libérée par ½ mole d'ozone.

- Calcul de la dose d'ozone appliquée

La dose d'ozone consommée par les boues est déterminée par différence entre l'ozone produit (déterminé lors d'un essai à blanc en absence de liquide dans le premier flacon) et l'ozone résiduel dosé lors de l'essai selon la démarche suivante :

1) Au cours de l'essai à blanc, la quantité d'ozone ayant réagi avec le KI correspond à la production d'ozone de l'appareil tandis qu'elle correspond à l'ozone résiduel n'ayant pas réagi avec les boues lors de l'ozonation de celles-ci:

$$m(\text{ozone}) = \frac{[\text{thiosulfate}] \times V_{\text{éq}} \times V_{\text{KI total}} \times M(\text{ozone})}{2 \times V_{\text{KI dosé}}} \quad (\text{Eq.2})$$

Avec :

- $m(\text{O}_3)$  : Masse d'ozone ayant réagi avec la solution de KI lors des essais à blanc (ozone produit et des essais sur les boues (ozone résiduel) (g)
- [thiosulfate] : concentration de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour le dosage (0,05 mol/L)
- $V_{\text{éq}}$  : volume équivalent de solution de thiosulfate de sodium (mL)
- $V_{\text{KI total}}$  : volume de KI présent dans les flacons doseurs lors de l'essai (800 mL)
- $M(\text{O}_3)$  : masse molaire de l'ozone (48 g/mol)
- $V_{\text{KI dosé}}$  : volume de KI aliquoté pour le dosage (500 mL)

D'où l'on obtient la concentration en ozone dans l'air ozoné selon la formule suivante :

$$C_{\text{O}_3} = \frac{m(\text{O}_3)_{\text{blanc}}}{V_{\text{blanc}}} \quad (\text{Eq.3})$$

Avec :

- $C_{\text{O}_3}$  : concentration en ozone produit dans l'air ozoné (g/L)
- $m(\text{O}_3)_{\text{blanc}}$  : masse d'ozone produite lors de l'essai à blanc (g)
- $V_{\text{blanc}}$  : volume d'air ozoné mesuré lors de l'essai à blanc (L)

## 2) Dose d'ozone transférée dans les boues

La dose d'ozone transférée dans les boues peut être calculée selon la formule suivante.

$$D = \frac{C_{O_3} \times V_{\text{essai}} - m(O_3)_{\text{résiduel}}}{V_{\text{boues}} \times [MS]} \quad (\text{Eq.4})$$

Avec :

- Dose d'ozone transférée dans les boues (g O<sub>3</sub>/g matière sèche)
- CO<sub>3</sub> : concentration en ozone produit dans l'air ozoné (g/L)
- m(O<sub>3</sub>)<sub>résiduel</sub> : masse d'ozone résiduel lors de l'ozonation des boues (g)
- V<sub>essai</sub> : volume d'air ozoné mesuré lors de l'ozonation des boues (L)
- V<sub>boues</sub> : volume de boues à ozoner (800 mL)
- [MS] : concentration en matières sèches dans les boues à ozoner (g/L)

## 1.3. Les tests de stabilisation aérobie et anaérobie

### 1.3.1. Digestion aérobie mésophile des boues en mode batch

Les essais sont réalisés dans des fioles en verre d'un volume égal à 120 mL ou 160 mL. Le volume final du milieu de culture pour la digestion aérobie est de 10 ou 13,5 mL respectivement pour les fioles de 120 mL et de 160 mL. Les milieux de culture sontensemencés à 20% (v/v) avec des boues activées pour les tests en aérobie. Le volume de boues traitées (VBT) est tel que la [COD] ne doit pas excéder 150 mg C/L pour que l'apport d'oxygène ne soit pas un facteur limitant de la réaction. Le même volume de boues non traitées est rajouté pour les séries témoins. Le milieu est tamponné à pH 7-8 par ajout de 3 g/L de NaCO<sub>3</sub> et 3 g/L de NaHCO<sub>3</sub> afin d'éviter l'acidification de celui-ci. Les fioles sont fermées (après remplissage) avec un septum en butyl puis serties. Elles sont incubées dans une enceinte thermostatée (35 °C) et agité à 120 RPM/min. Le tableau ci-dessous représente les compositions des milieux de culture mis en incubation pour les tests de biodégradation aérobie.

Trois témoins ont été ajoutés : un témoin endogène (ajout d'eau distillée seulement à l'inoculum, afin de quantifier la production de biogaz endogène : CO<sub>2</sub>) et un témoin glucose ou éthanol (ajout de la même quantité de COD en glucose/éthanol) afin de quantifier la production de biogaz maximale (composés complètement biodégradable).

Pour les séries traitées et non traitées, le cadmium est ajouté sous la forme de chlorure de cadmium. Différentes concentrations en chlorure de cadmium sont utilisées entre 0 et 100 mg/L (Tableau 2-2). Chaque essai étant réalisé en septuple voir en octuple, les valeurs présentées correspondent à la moyenne des 7 (ou 8) résultats obtenus.

Tableau 2-2. Composition des fioles lors des tests batch de digestion aérobie mésophile

Type d'échantillon	Inoculum	Boue	Métaux	Tampon
BT BNT		$V_{BT}$ tel que [COD]<150mg/L $V_{BNT}=V_{BT}$	Chlorure de cadmium > 98 % (Merck)	
Témoin négatif (respiration endogène) Eau distillée	Boues du bassin d'aération STEP 20 % vol soit 2,7 mL		- 10 concentrations différentes- : 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 40, 100 mg/L	$Na_2CO_3$ à 3 g/L et $NaHCO_3$ à 3 g/L
Témoin positif glucose Témoin positif éthanol				

### 1.3.2. Digestion anaérobie mésophile des boues en mode batch

Les digestions anaérobies des boues prétraitées ou non sont réalisées dans des fioles en verre d'un volume de 160 mL. Les fioles sont remplies à 80 % en volume avec des boues et un inoculum. L'inoculum (boues du digesteur) représente 20 % (v/v) et les boues à digérer représentent 80 %. Le volume de boues rajouté est tel que la charge soit égale à 1 g DCO/g MES. Le volume des boues traitées est égal au volume de boues non traitées. La DCO des boues est de 6 g  $O_2$ /L. Pour les deux types de boues (traitées ou non traitées), on rajoute des concentrations croissantes en cadmium. Les concentrations du cadmium ajouté dans les fioles sont 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 40, 100 mg/L. Les différents milieux sont tamponnés à pH 7-8 par ajout de solutions de  $Na_2CO_3$  et de  $NaHCO_3$  telles que leur concentration soit à 3 g/L dans les milieux (Tableau 2-3). Les proportions sont données dans le tableau ci-dessous. Chaque essai est réalisé en triplicat. Trois témoins ont été ajoutés : un témoin endogène (ajout d'eau distillée seulement à l'inoculum, afin de quantifier la production de biogaz endogène :  $CO_2 + CH_4$ ) et un témoin acétate ou éthanol (ajout de la même quantité de DCO en acétate/éthanol afin de quantifier la production de biogaz d'un composé complètement biodégradable).

Avant d'être bouchées à l'aide d'un septum de 20 mm Chromacol (spécifique à la digestion anaérobie) maintenu par une capsule métallique standard d'Interchrome et serties, les fioles sont dégazées par un bullage à l'azote afin d'éliminer l'oxygène. Elles sont ensuite mises à incuber dans une enceinte thermostatée à 35 °C sous agitation à 120 rpm/min.

Tableau 2-3. Composition des fioles lors des tests batch de digestion anaérobie mésophile

Type de mélange	Inoculum	Boue	Métaux	Tampon
BT BNT Témoin négatif (biogaz endogènes) Eau distillée Témoin positif acétate Témoin positif éthanol	Boues du digesteur STEP 20 % vol soit 25,6mL	Boues de recirculation traitées à une DCO de 6g/L Boues de recirculation non traitées $V_{BT}=V_{BNT}=95.8\text{mL}$	Chlorure de cadmium >98% (Merck)  -10 concentrations différentes- 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 40, 100 mg/L	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ à 3 g/L et $\text{NaHCO}_3$ à 3 g/L

## 2. METHODES

Les méthodes développées dans cette partie ont pour objectif dans un premier temps d'évaluer l'effet du traitement sur les caractéristiques des boues et dans un second temps d'évaluer l'impact du traitement sur la sensibilité des boues au cadmium lors de l'étape de stabilisation biologique en aérobie ou en anaérobie.

Pour chacun des traitements appliqués, les caractéristiques physiques, chimiques, biochimiques (composition de la matière et activités enzymatiques), microbiologiques (populations) ont été mesurées et comparées aux boues non traitées.

L'impact du traitement sur la sensibilité des boues au cadmium a été évalué par la mesure au début et à la fin des tests de digestion en mode batch : des performances épuratoires, de l'inhibition de l'activité respiratoire, de certaines activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme, de la spéciation du cadmium et enfin par les potentielles modifications des populations microbiennes aérobies (Bactéries) et anaérobies (Archaea).

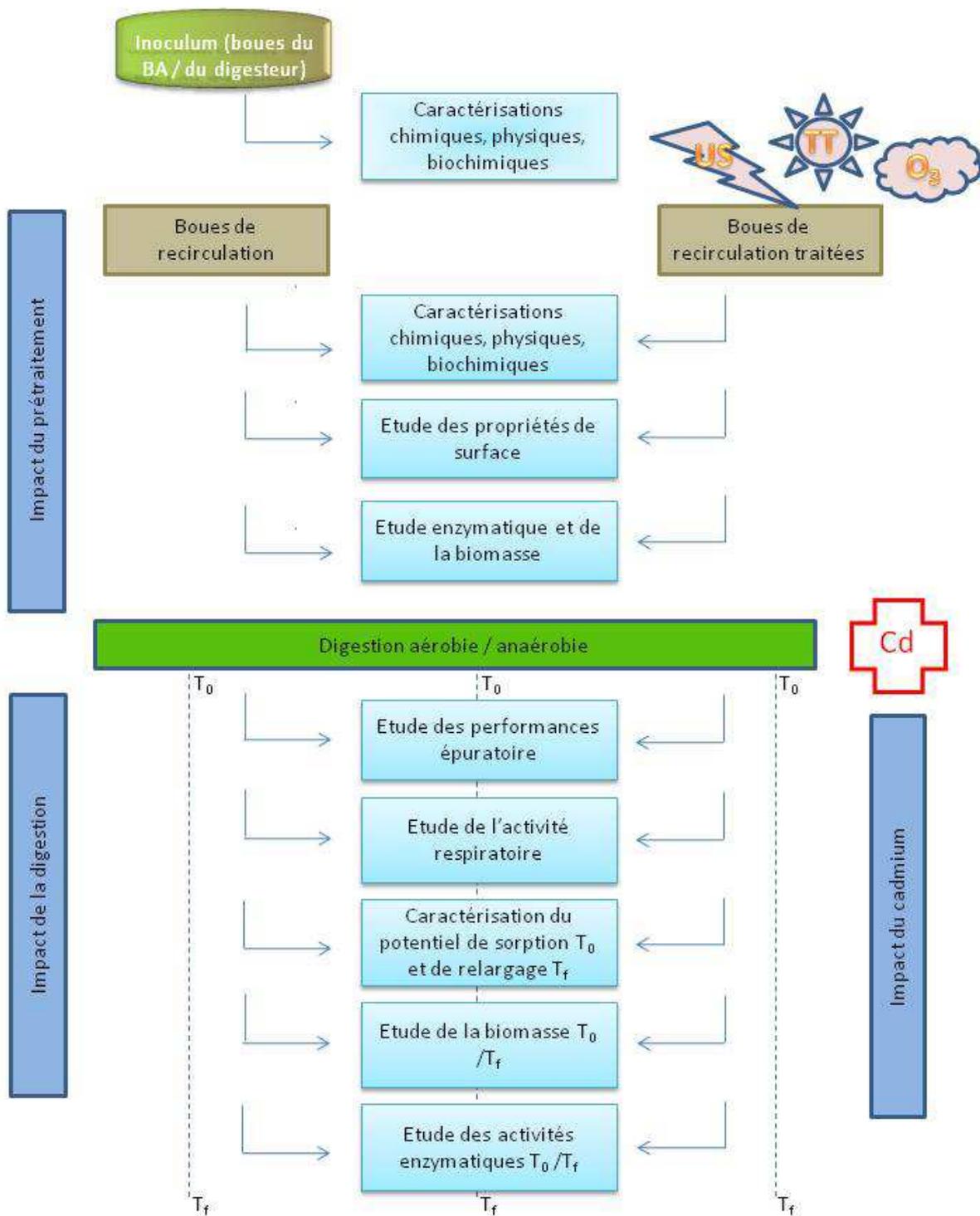


Figure 2-3. Méthodologie mise en œuvre pour la thèse

## 2.1. Séparation des phases solubles et particulaires

La séparation des phases solubles et particulaires est réalisée en fonction des mesures selon les techniques décrites dans le tableau 2-4. Pour des raisons pratiques, la méthode de séparation entre fractions soluble et particulaire n'est pas toujours la même en fonction des analyses effectuées. Dans ce manuscrit, les mots "solubilisation", "soluble" et "solubiliser" seront utilisés afin de faciliter la compréhension. Ceci permet de différencier la phase particulaire (culot de centrifugation du gâteau de filtration) du surnageant de la centrifugation ou du filtrat. En réalité, une partie de la matière considérée ici comme "soluble" ne l'est pas réellement dans la mesure où elle comporte une fraction colloïdale.

Tableau 2-4. Protocoles utilisés au cours des différentes analyses pour séparer la phase soluble de la phase particulaire

<b>Analyse / protocole</b>	<b>Séparation soluble / particulaire</b>
<i>MES / MVS des boues</i>	
<i>Titration acide-base</i>	
<i>CEP</i>	Centrifugation CR3i multifonction Jouan (6000g, 20 minutes, 4°C)
<i>Etudes enzymatiques (Lipase, protéase, glucosidases)</i>	
<i>Mesures de la DCO, du COD, des polysaccharides, des protéines et des substances de type humique</i>	
<i>pH, conductivité</i>	Filtration sur membrane en nitrate de cellulose de la marque Sartorius Stedim à 0,45 µm
<i>Analyse des espèces métalliques</i>	
<i>Chromatographie ionique (ions majeurs)</i>	Filtration à 0,22 µm

Le tableau (2-5) ci-dessous consigne les différentes mesures réalisées afin de caractériser les phases totale et soluble des échantillons. Les différentes méthodes du tableau sont développées dans les paragraphes ci-après.

Tableau 2-5. Techniques de caractérisation des propriétés physiques, chimiques et biochimiques de phases particulières et solubles des boues

Mesures	Phase(s)	Volume de boue prélevé (mL)	Type/Source	Précision sur la mesure (%)
<b>pH</b>	Totale/soluble	/	pH 730 WTW	1
<b>Conductivité</b>	Totale/soluble	/	Conductivity Meter LF538	1
<b>MS, MO, MES, MVS</b>	Totale	40	NF T 90 105	3-5
<b>DCO</b>	Totale/soluble	2	Méthode colorimétrique Hach 0-1500 mg O <sub>2</sub> /L	5
<b>Dosage des protéines</b>	Totale/soluble	1	Lowry <i>et al.</i> , 1951 modifiée par Frolund <i>et al.</i> , 1995	5
<b>Dosage des substances humiques</b>	Totale/soluble	1	Idem	5
<b>Dosage des polysaccharides</b>	Totale/soluble	1	Dubois <i>et al.</i> , 1956	10
<b>COD</b>	Soluble	5	COTmètre Phoenix 8000 Dohrmann	5-10
<b>COT</b>	Totale	2	Kit LCK 381 (Hach Lange)	10
<b>TAC</b>	Totale	25	NF T90-036	5
<b>Dosage des AGV</b>	Totale	25	NF T90-036	5
<b>Dosage des espèces ioniques par chromatographie ionique</b>	Soluble	5	Dionex DX120 AS50	15
<b>Titration potentiométrique</b>	Totale/soluble	40	721 NET Titrino	/
<b>Dosage du Cd par absorption atomique four</b>	Totale/soluble	5	Varian SpectrAA 880Z GTA 100Z	10
<b>Dosage du Cd par absorption atomique flamme</b>	Totale/soluble	5	Varian SpectrAA 220 Atomci	0.2-5
<b>Extraction du Cd à l'EDTA : capacité de soption et de relargage des boues</b>	Toale et soluble	30	-	5-10
<b>Dosage des biogaz (CO<sub>2</sub> en aérobie et CH<sub>4</sub>+CO<sub>2</sub> en anaérobie)</b>	Gazeuse	0.15	-	5
<b>Dosage enzymatique</b>	Totale/soluble	20	-	5
<b>Analyse moléculaire</b>	Totale	4	-	/

## 2.2. Caractérisation physique, chimique et biochimique des boues

### 2.2.1. *La détermination de la quantité de matière et de sa répartition*

La détermination des différentes fractions de la matière est réalisée par pesées et séchages des boues selon la méthode normalisée (AFNOR, 1997).

Pour déterminer la teneur en matière sèche totale (MS) ou en matière organique (MO), un volume connu de boues (30 mL) 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. L'eau est ainsi évaporée, il ne reste dans le creuset que la matière sèche. Durant ce séchage, les composés volatils comme les AGV sont volatilisés : ils ne sont pas comptés dans la mesure de la matière sèche. 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, la mesure est alors exprimée en g/L (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.

Les matières en suspension (MES) et les matières volatiles en suspension (MVS) sont déterminées de la même façon, sur le culot de centrifugation. Le volume d'échantillon considéré est alors le volume de boues avant centrifugation (40 mL). L'erreur sur les mesures est de l'ordre de 3 à 5 %.

### 2.2.2. *Caractérisation chimique et biochimique des boues*

#### 2.2.2.1. Dosage de la demande chimique en oxygène (DCO)

La DCO correspond à la quantité d'oxygène nécessaire afin d'oxyder chimiquement les matières réductrices contenues dans une solution. Les mesures de la DCO ont été réalisées en microtubes (ISO 15705 :2002) sur les fractions totales des boues et les surnageants de centrifugation selon la méthode colorimétrique. Celles-ci ont été effectuées en triplicat et l'erreur de mesure est de l'ordre de 5 %. Il existe plusieurs gammes de mesure qui varient en fonction de la concentration en DCO de l'échantillon et sont : 0-100, 0-1000 et 0-15000 mg O<sub>2</sub>/L.

### 2.2.2.2. Le dosage des protéines et des substances de types humiques

La teneur en protéine est déterminée par la méthode colorimétrique de Lowry *et al.* (1951) modifiée par Frølund *et al.* (1995). Ce dosage repose sur 2 réactions : 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. En parallèle, 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.

Afin de s'affranchir des interférences avec les substances de type humique, la coloration est mesurée avec et sans ajout de  $\text{CuSO}_4$  lors de l'analyse. Quand  $\text{CuSO}_4$  est omis, la coloration est due aux composés humiques et aux acides aminés chromogènes. Sans  $\text{CuSO}_4$ , la couleur développée par la BSA diminue de 20 % mais pas pour les substances de type humique. Les absorbances dues respectivement aux protéines et aux substances de type humique sont alors calculées avec les formules ci-dessous (Frølund *et al.*, 1995) :

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

$$A_{\text{blanc}} = 0,2A_{\text{protéines}} + A_{\text{humiques}}$$

$$A_{\text{protéines}} = 1,25(A_{\text{total}} - A_{\text{blanc}})$$

$$A_{\text{humiques}} = A_{\text{blanc}} - 0,2A_{\text{protéines}}$$

Avec :

- $A_{\text{total}}$  = absorbance totale avec  $\text{CuSO}_4$
- $A_{\text{blanc}}$  = absorbance totale sans  $\text{CuSO}_4$
- $A_{\text{humiques}}$  = absorbance due aux composés de type humique
- $A_{\text{protéines}}$  = absorbance due aux protéines

Les concentrations en protéines et substances de type humique sont ensuite calculées à partir de droites d'étalonnage préparées à l'aide de solution étalons de BSA (Sigma A7906 98%) et d'acides humiques (Fluka 53680) pour les protéines et les substances de type humique respectivement. Les gammes de concentrations s'étendent de 0 à 200 mg/L pour la BSA et les acides humiques.

Le protocole utilisé est présenté dans le Tableau 2-6. Les réactifs et la solution à doser sont introduits dans des tubes à essai.

Tableau 2-6. Protocole de dosage des protéines et des substances de type humique

<b>Tubes</b>	<b>Avec CuSO<sub>4</sub></b>	<b>Sans CuSO<sub>4</sub></b>
Solution C1 (mL)	5	0
Solution C2 (mL)	0	5
Echantillon à doser (mL)	1	1
Homogénéiser au vortex		
Laisser reposer 10 minutes		
Solution D (mL)	0,5	0,5
Agiter au vortex		
Laisser reposer 20 minutes à l'obscurité		
Mesurer l'absorbance à 750 nm contre un blanc réactif		

Avec :

- Solution A : 500 mL A1 + 500 mL solution A2

- A1 : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 4 % m/V : Peser 53,96 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.10H<sub>2</sub>O ou 20 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et diluer dans 500 mL de H<sub>2</sub>O distillée

-A2 : NaOH à 0,2 M : Diluer 100 mL de NaOH à 1 M dans 500 mL de H<sub>2</sub>O distillée

-B1 : CuSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O à 1 % m/V : Peser 6,39 g de CuSO<sub>4</sub> anhydre et diluer dans 1 L de H<sub>2</sub>O distillée

-B2 : tartrate double de K et Na à 2 % m/V : Peser 2 g de tartrate et diluer dans 100 mL de H<sub>2</sub>O distillée

-C1 : 98 mL A + 1 mL B1 + 1 mL B2

-C2 : 98 mL A + 1 mL de H<sub>2</sub>O distillée + 1 mL B2

-D : réactif de Folin à 1 N : diluer 2 fois le réactif à 2 N du commerce

### 2.2.2.3. Le dosage des polysaccharides

Les polysaccharides sont dosés suivant la méthode colorimétrique de Dubois *et al.* (1956). L'échantillon est mis en présence de phénol (15 %) puis d'acide sulfurique concentré (95 %). L'ajout de l'acide provoque une élévation de température, les saccharides sont hydrolysés, lors du chauffage, par l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) puis les monosaccharides sont déshydratés par l'acide phénique pour donner finalement une coloration orange. La teneur en polysaccharides est ensuite déterminée à l'aide d'une gamme étalon (gamme de 0 à 100 mg/L) préparée à l'aide d'une solution de glucose (D+ glucose, VWR Prolabo RECTAPUR 24379-363). Le protocole utilisé est présenté dans le Tableau 2-7. Les dosages ont été

effectués en triplicat et l'erreur de mesure est de l'ordre de 2 à 7 %. Les résultats sont exprimés en gramme équivalent de glucose ( $\text{g eqGluc.L}^{-1}$ )

Tableau 2-7. Protocole de dosage des polysaccharides

Echantillon à doser (mL)	1
Solution de phénol 5% m/m (mL)	1
Acide sulfurique 95% m/m (mL)	5
Laisser reposer 10 minutes	
Agiter au vortex	
Laisser reposer 20 minutes dans un bain thermostaté à 25 °C	
Mesurer l'absorbance à 490 nm contre un blanc réactif	

#### 2.2.2.4. Le dosage du carbone organique dissous (COD)

Les concentrations en COD sont réalisées à l'aide d'un COTmètre Dohrmann

Phoenix 8000 dans un intervalle de mesure allant de 0,5 à 20 mg C/L. Les échantillons filtrés (à 0,45  $\mu\text{m}$ ) sont dilués préalablement à l'eau distillée afin d'être dans cette gamme. Le principe de la mesure repose sur la minéralisation totale de la matière organique présente dans l'échantillon (4 mL) par oxydation au persulfate de sodium (1 mL à 100 g/L) sous rayonnement UV. Le  $\text{CO}_2$  dégagé par la réaction est ensuite détecté par infrarouge et permet la détermination de la quantité de carbone organique par rapport à une gamme étalon obtenue à partir d'une solution connue d'hydrogénophthalate de potassium. Avant la réaction, les formes inorganiques du carbone (carbonates, etc.) sont éliminées par acidification (0,5 mL d'acide orthophosphorique à 20%) et bullage d'azote pendant 120 secondes.

#### 2.2.2.5. Le dosage des cations et anions majeurs

Les espèces ioniques majeures ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) sont déterminées sur les échantillons préalablement filtrés à 0,22  $\mu\text{m}$  par chromatographie ionique (DIONEX, DE 120, USA).

#### 2.2.2.6. La caractérisation des fonctions chimiques dans les phases solubles et particulaires des boues

Les titrations acido-basiques ont été réalisées pour déterminer les groupements fonctionnels à la surface des floccs avant et après traitement. Il s'agit de déterminer les constantes d'acidité ( $\text{pK}_a$ ) et le nombre de sites correspondant ( $N_i$ ) à la fois à la surface des floccs et dans la phase soluble. Le nombre total de sites accepteurs de protons c'est-à-dire de groupements ionisables est appelé capacité d'échange protonique (CEP) (Laurent, 2009).

### ↳ Préparation de la biomasse et de la fraction soluble pour la titration

2 x 40 mL de boues traitées sont d'abord centrifugés. Le surnageant est récupéré pour la titration en phase soluble. Le culot est resuspendu dans 40 mL d'une solution de  $\text{NaNO}_3$  (0,01 mol/L) puis centrifugé une deuxième fois. Le surnageant est jeté et la procédure réitérée encore une fois. Après le rinçage final, le culot est une dernière fois redilué dans la solution de  $\text{NaNO}_3$  pour un volume final de 2 x 50 mL. Cette suspension est donc utilisée pour la titration de la biomasse.

### ↳ Titration de la biomasse

La suspension de biomasse (50 mL) est transférée dans une cellule thermostatée à 25 °C qui est recouverte d'un couvercle étanchéifié à l'aide de Parafilm. Ce dernier est perforé pour laisser passer la sonde pH, le dispositif d'injection des réactifs ainsi qu'un tuyau pour le bullage de l'azote. La suspension est dégazée avant la mesure pendant 30 minutes à l'azote afin d'éliminer le  $\text{CO}_2$  atmosphérique. Une pression positive d'azote est ensuite maintenue durant la mesure. Le système est maintenu sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique.

Les titrations sont réalisées dans une gamme de pH de 2,5 à 10 à  $25 \pm 1$  °C à l'aide d'un titrateur automatique 721 NET Titrino (Metrohm Ltd.). L'électrode pH est calibrée en trois points (pH 4, 7, et 10) avant chaque expérimentation. Le titrateur est programmé en mode dynamique (DET) pour le dosage. Ce mode ajoute des quantités variables de solution en fonction des variations de pH : les plus petits ajouts sont effectués lorsque les variations de pH sont les plus importantes. Les ajouts sont effectués quand la dérive du signal atteint 6 mV/min. Deux burettes interchangeables séparées de 20 mL sont utilisées : une pour l'acide, l'autre pour la base. Deux aliquots de 50 mL sont titrés pour chaque échantillon pour minimiser les interférences dues à la désintégration des boues à des pH extrêmes. Le premier est titré jusqu'à pH 2,5 avec de l'acide nitrique à 0,01 mol/L. Les données sont enregistrées et la burette changée. Un deuxième aliquot de 50 mL est alors titré avec de la soude à 0,01 mol/L jusqu'à pH 10. La durée de chaque titration est approximativement de 35 minutes. La soude et l'acide nitrique utilisés sont préparés extemporanément à partir de solutions commerciales à 1 mol/L (Laurent, 2009).

### ↳ Titration de la fraction soluble

50 mL du 1<sup>er</sup> surnageant de centrifugation issu du lavage de la biomasse sont transférés dans la cellule de titration. Le protocole utilisé est le même que pour la biomasse excepté que les

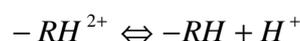
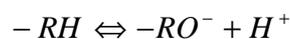
titrations à l'acide et à la base sont effectuées sur le même aliquot : la solution est d'abord titrée jusqu'à pH 2,5 avec l'acide nitrique (0,01 mol/L) et ensuite à pH 10 avec de la soude (0,01 mol/L).

↳ Analyse des données

Les données des titrations sont enregistrées sur un PC en utilisant le logiciel TiNET (Metrohm). Les courbes de titrations sont alors interprétées par un modèle non électrostatique d'adsorption des protons à l'aide du logiciel PROTOFIT9. C'est un outil pour l'analyse des données issue de dosages acido-basiques et est conçu pour l'optimisation de modèles de protonation de différents types de surfaces d'origine minérale ou biologique.

PROTOFIT peut également optimiser les constantes d'acidité à partir d'un modèle choisi parmi les quatre disponibles, ceci pour un à quatre types de sites de surface. Ces modèles incluent le modèle de la double couche (DLM : Double Layer Model), le modèle de la capacitance constante (CCM : Constant Capacitance Model), modèle Donnan Shell (DSM : Donnan Shell Model), et un modèle non-électrostatique (NEM : non-electrostatic model). Les coefficients d'activité peuvent être modélisés par les équations de Davies, Truesdell-Jones et Debye-Huckel étendue, ou peuvent être considérés comme égaux à 1. Une présentation détaillée de la modélisation de la protonation de surface ainsi que du fonctionnement du logiciel PROTOFIT sont disponibles dans les travaux de Turner et Fein (Turner et Fein, 2006).

Le modèle d'adsorption des protons non électrostatique choisi repose des réactions de surface formant des groupements monovalents positifs ou négatifs selon les équations-bilan suivantes :



Où R représente un groupement fonctionnel organique.

Le modèle est optimisé en faisant l'hypothèse que le pH est fixe à chaque étape de la titration et que la surface est à l'équilibre avec la solution. Un certain nombre de réactions d'échange de protons, de la forme de l'équation précédente, est supposé avoir lieu à la surface, avec

chacune une constante d'équilibre et un nombre de sites. La loi d'action de masse est exprimée dans le modèle nonélectrostatique comme suit (équations 5 et 6) :

$$\frac{[-RO^-][H^+]}{[-RH]} = K1 \quad (\text{Eq.5})$$

$$\frac{[-RH][H^+]}{[-RH^{2+}]} = K1 \quad (\text{Eq.6})$$

Le choix du nombre de types de sites et de leurs propriétés (acide, base, amphotère) est effectué selon la configuration offrant le meilleur ajustement entre données expérimentales et calculées avec le modèle (Laurent *et al.*, 2009).

## 2.3. Mesure des activités enzymatiques

### 2.3.1. Les protéases

Par convention, une unité d'activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme qui dégrade 1 mg d'azocaséine par minute à 28 °C ou 60 °C. Le substrat utilisé lors de ce dosage est l'azocaséine qui en présence de protéase catalyse la formation d'un groupement azur et d'une caséine (protéine du lait).

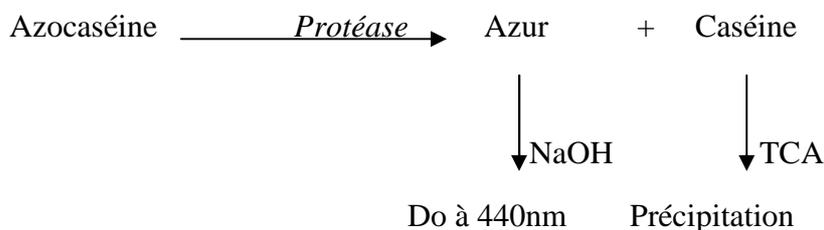


Figure 2-4. Hydrolyse de l'azocaséine par la protéase

L'échantillon est placé dans un tube Eppendorf 200µL (fraction totale, particulière ou soluble) auquel on rajoute 800 µL de substrat (0,5 % d'azocaséine dans du tampon tris-HCL à 20 mM, pH 8). Le tube est directement mis en incubation pendant 1 heure à 37 °C (température des BMP : Biological Methane Potential).

La réaction est arrêtée par ajout de 500 µL de Trichloro acide acétique (TCA) à 15 %. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, on centrifuge à 14000 rpm pendant 10 minutes et puis dans une microcuve on met 800 µL de surnageant auquel on rajoute 200 µL de NaOH à 2 M. L'absorbance est lue à 440 nm (Perez *et al.*, 2009).

### 2.3.2. Les lipases

Une unité d'activité lipase correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la formation d'1 $\mu$ mol de paranitrophénol par minute. Cette activité enzymatique est exprimée en Unité/g MES.

Le dosage s'effectue par le suivi de l'apparition du paranitrophénol (p-NPP). La lipase hydrolyse donc la liaison ester et libère le p-nitrophénol qui colore la solution au jaune. La coloration est proportionnelle à sa libération.

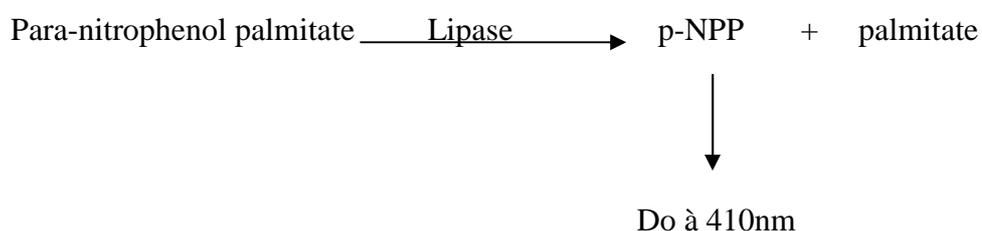


Figure 2-5. Hydrolyse du p-NPP par la lipase

Une solution de p-NPP (Sigma) à 20 mM dans de l'isopropanol est diluée 20 fois dans du tampon Tris-HCL à 20 mM, pH 8 contenant de la gomme arabique à 0.1% et du Triton X-100 à 0.5%

9 mL de cette solution finale sont mises à 37 °C pendant 10 minutes, puis 1 mL d'échantillon (fraction totale, particulière ou soluble) est rajouté. 500  $\mu$ L sont prélevés toutes les 3 minutes et mis au bain à sec 100 °C dans un Eppendorf pendant 5 minutes. L'absorbance est lue à 410 nm (Gessesse *et al.*, 2003). Les cinétiques sont suivies sur 20 min.

### 2.3.3. Alpha et bêta Glucosidases

La bêta ou alpha glucosidase catalyse les résidus terminaux non réducteurs du bêta ou alpha glucosides avec libération de glucose.

Le dosage des activités alpha et bêta glucosidase, s'effectue par le suivi de l'apparition du p-nitrophénol qui colore la solution en jaune. Ce produit est libéré lors de l'hydrolyse de la liaison ester par ces enzymes. Les glucosidases hydrolysent les polysaccharides en oligosaccharides, puis les oligosaccharides en monosaccharides.

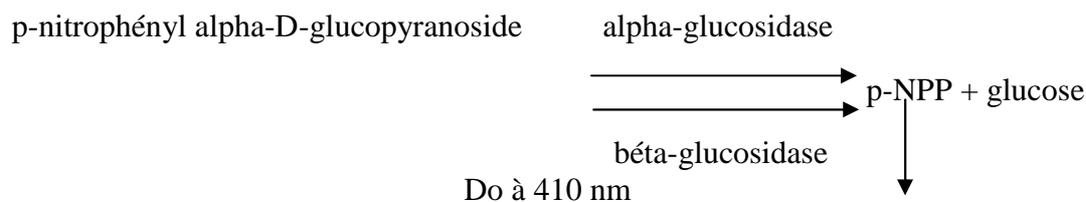


Figure 2-6. Hydrolyse du p-nitroph\u00e9nyl-D-glucoopyranoside par les gluosidases

Le m\u00e9lange r\u00e9actionnel comprend 6mL de tampon Tris HCL \u00e0 20 mM, pH 7,2 et 4mL de solution substrat \u00e0 5 % du m\u00eame tampon. Ce m\u00e9lange est mis dans un b\u00e9cher \u00e0 37 \u00b0C puis agit\u00e9 \u00e0 150 rpm apr\u00e8s avoir rajout\u00e9 10 mL d'\u00e9chantillon de boue (fraction totale, particulaire ou soluble). 1 mL est pr\u00e9lev\u00e9 toutes les 3 minutes et mis au bain \u00e0 sec 100 \u00b0C dans un Eppendorf pendant 5 minutes. L'absorbance est lue \u00e0 410 nm. Les cin\u00e9tiques sont suivies sur 20 min.

L'activit\u00e9 enzymatique (A) correspond \u00e0 la quantit\u00e9 de produit lib\u00e9r\u00e9 ( $\mu\text{mol}$ ) par minute et par millilitre d'\u00e9chantillon.

$$A = \frac{a \times V \times 10^{-3} \times 10^6}{l \times E \times v} \quad (\text{Eq.7})$$

Avec:

- A :  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$
- a : coefficient directeur ( $\text{Do min}^{-1}$ )
- V : volume r\u00e9actionnel total (mL)
- l : longueur du trajet optique dans la cuve (cm)
- E : coefficient d'absorbance molaire ( $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (pour le n-NPP  $E = 14.080$ ) (Cadoret, 2003)
- v : volume d'\u00e9chantillon (mL)

## 2.4. Le dosage des \u00e9l\u00e9ments m\u00e9talliques dans les boues

### 2.4.1. La pr\u00e9paration des \u00e9chantillons

↳ La fraction soluble

Elle est obtenue par filtration des \u00e9chantillons sur une membrane en nitrate de cellulose de porosit\u00e9 0,45  $\mu\text{m}$ . Les \u00e9chantillons sont par la suite acidifi\u00e9s avec quelques gouttes d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) concentr\u00e9 (69 %) puis stock\u00e9s \u00e0 4 \u00b0C dans des tubes en poly\u00e9thyl\u00e8ne.

↳ La fraction totale des boues

5 mL de boue sont introduits dans un tube en verre de 10 mL préalablement mis dans un bain d'acide nitrique, lavé à l'eau distillée puis séché. Les échantillons sont ensuite minéralisés à l'eau régale (2 mL HCl 37 % + 1 mL HNO<sub>3</sub> 69 %, hautement pure pour le dosage d'éléments traces) pendant 2 h à 150 °C. Une fois les échantillons refroidis, ils sont filtrés à l'aide de filtre à seringue (0,45 µm) avant analyse.

Les mesures sont effectuées sur un spectromètre d'absorption atomique flamme ou four en fonction des concentrations en éléments métallique dans l'échantillon.

#### 2.4.2. La spectrométrie d'adsorption atomique flamme (FAAS)

Un spectromètre VARIAN 220 FS est utilisé pour les gammes de concentration en cadmium allant de 0,1 à 6 mg/L. L'analyse se base sur l'absorption de photons par les atomes à l'état fondamental à une longueur d'onde spécifique de l'élément à doser. L'échantillon à l'état liquide est aspiré et injecté dans une flamme air/acétylène qui va assurer l'atomisation de l'élément, l'absorbance est mesurée et la concentration de l'élément est déterminée grâce une droite d'étalonnage. Les échantillons sont dilués à l'eau distillée si besoin. Les paramètres utilisés sont les suivants (Tableau 2-8) :

Tableau 2-8. Méthodes utilisées pour le dosage des éléments métalliques par SAA dans la flamme

Élément	Type de flamme	Longueur d'onde (nm)	Largeur de fente (nm)	Courant de la lampe (mA)	Gamme de mesure (mg/L)
Cd	Air/acétylène	228,8	0,5	4	0-5

#### 2.4.3. Spectrométrie d'adsorption atomique four (ETAAS)

Un spectromètre d'absorption atomique (Varian SpectrAA 800) à atomisation électrothermique équipé d'un système de correction de fond Zeeman a été utilisé pour mesurer les très faibles concentrations en cadmium allant de 0 à 6 µg/L. Le principe de la mesure est le même qu'en flamme, alors que l'atomisation de l'élément est dans ce cas

réalisée au sein d'un four électrothermique en graphite, permettant ainsi d'augmenter la sensibilité.

Les paramètres utilisés pour le dosage sont les suivants (Tableau 2-9) :

Tableau 2-9. Méthodes utilisées pour le dosage des éléments métalliques par ETAAS

Elément	Type de four	Longueur d'onde (nm)	Largeur de la fente (nm)	Courant de la lampe (mA)	Gamme de mesure ( $\mu\text{g/L}$ )	Modificateur de matrice
Cd	A plateforme	228,8	0,5	4	2-10	1 g/L Pa
Cu	Normal	324,8	0,5	4	10-60	NA

#### 2.4.4. Mesure de la spéciation du cadmium dans les boues

Le protocole de cette manipulation s'inspire des travaux effectués par Hu *et al.* (2003). 30 mL de ce mélange de boues traitées ou non traitées est mis en contact avec des concentrations croissantes en cadmium entre 0 et 100 mg/L jusqu'à obtention de l'équilibre (3h selon les conditions déterminées par Laurent (2009)). A l'issue de ce temps on réalise une extraction séquentielle du métal : Trois centrifugations (1600g-5min)–resuspensions sont alors réalisées et les surnageants sont recueillis séparément. La solution de resuspension est une solution d'EDTA à 1 mM (0,1N NaCl) tamponnée à pH=7. Les différentes fractions obtenues sont ensuite analysées par absorption atomique four et flamme en fonction des concentrations en éléments métalliques dans l'échantillon afin d'évaluer les quantités de cadmium relarguées et adsorbées avant et après traitement et avant et après digestion.

## 2.5. Mesure de l'action du pretraitement sur le taux de solubilisation et sur les performances épuratoires :

### 2.5.1. Taux de solubilisation après le traitement

Le calcul du taux de solubilisation permet de refléter le transfert de phase du particulaire vers le soluble du aux traitements d'hydrolyse. Le taux de solubilisation de chaque variable est déterminé par le ratio entre la différence des concentrations solubles (à l'instant t et initialement) et la concentration initiale dans la fraction particulaire. Il est donc calculé par l'équation suivante :

$$S_{composé} = \frac{Composé_s - Composé_{s0}}{Composé_{T0} - Composé_{s0}} \times 100 \quad (\text{Eq.8})$$

Avec

$S_{composé}$  = taux de solubilisation du composé (%)

$Composé_s$  = concentration du composé en phase soluble après traitement (mg composé.L<sup>-1</sup>)

$Composé_{s0}$  = concentration initiale du composé en phase soluble (mg composé.L<sup>-1</sup>)

$Composé_{T0}$  = concentration totale initiale du composé (mg composé.L<sup>-1</sup>)

### 2.5.2. Performances épuratoires

Le taux d'abattement pour un composé donné est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Abatement} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \quad (\text{Eq.9})$$

Avec  $C_i$  and  $C_f$  les concentrations initiales ( $t_0$ ) et finales ( $t_f$ ) du composé en (mg/L).

## 2.6. Mesure de l'activité respiratoire

### 2.6.1. Mesure du volume et de la composition du ciel gazeux

Au cours des tests de stabilisation aérobie et anaérobie les échanges gazeux sont mesurés par chromatographie en phase gaz (tableau 2-10). Le chromatographe utilisé est un GC-2014 (Shimadzu). Celui-ci permet le dosage de six gaz  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$  et  $CO$ . Il comporte une colonne Hayesep Q 8/100 (Alltech) d'une longueur de 3,3 m et un tamis moléculaire 15X 80/100 d'une longueur de 2 m. La température de la colonne est de 40 °C. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium. Le débit est fixé à 15 mL/min et la température du détecteur est de 150°C. La concentration des échantillons est déterminée par étalonnage externe. Le gaz étalon (Alltech) utilisé est composé de 5 % (v/v) de  $CO_2$ , 5 % de  $CO$ , de 4 % d' $H_2$ , de 4 % d' $O_2$ , de 5 % de  $N_2$  et de 4 % de  $CH_4$ . L'erreur de mesure est de l'ordre de 5 %.

Tableau 2-10. Méthodes de mesure du volume et de la composition du biogaz lors des tests de digestion en mode batch.

	<b>Volume</b>	<b>Composition</b>
Test batch aérobie	Pas de variation du volume.	Gaz mesurés : CO <sub>2</sub> et O <sub>2</sub> Volume injecté : 150 µL du ciel gazeux (une seringue SGE Removable Needle Syringe).
Test batch anaérobie	Mesure du biogaz produit par un déplacement d'eau. Une seringue est fixée à un tuyau relié à une éprouvette graduée. Celle-ci est plongée, à l'envers, dans un b�cher rempli d'eau acidifiée. Lors de la libération du biogaz par piqûre dans le septum, le niveau de l'eau dans l'éprouvette diminue. La différence de niveau est égale au volume de biogaz produit. L'erreur de mesure est d'environ 4 %.	Gaz mesurés : CO <sub>2</sub> et CH <sub>4</sub> Volume injecté : 150 µL du ciel gazeux (une seringue SGE Removable Needle Syringe).

### 2.6.2. Calcul des vitesses instantanées et modélisation de l'inhibition par le cadmium, détermination de la CI50.

#### ↳ Détermination de la vitesse instantanée

En anaérobie, la mesure des concentrations en CO<sub>2</sub> et le CH<sub>4</sub> et en aérobie la mesure de la concentration en CO<sub>2</sub> permettent de calculer les vitesses instantanées de production de biogaz (q)   l'aide de l'équation (2).

$$q_{\text{biogas}} (\text{mmolC} / j) = \frac{\Delta \text{Biogas} (t_2 - t_1) (\text{mmolC})}{\Delta (t_2 - t_1) (j)} \quad (\text{Eq.10})$$

Le tracé de q<sub>biogas</sub> en fonction du temps permet de déterminer q<sub>biogas max</sub>, la vitesse instantanée maximale pour chaque type de boues et pour chaque concentration en cadmium.

#### ↳ Modélisation de l'inhibition de l'activité respiratoire et calcul de la CI50

Le pourcentage d'inhibition de  $q_{\max}$  est calculé par l'équation (11) selon la méthode décrite par (Semerci et Cecen, 2007):

$$I(\%) = \frac{(q_{\max\text{control}} - q_{\max})}{q_{\max\text{control}}} * 100 \quad (\text{Eq.11}) \quad (\text{Semerci \& Cecen, 2007})$$

Avec avec  $q_{\max\text{control}}$  la vitesse instantanée maximale obtenue sans ajout de cadmium lors de test pour les boues traitées et non traitées et  $q_{\max}$  la vitesse instantanée maximale obtenue lors de l'ajout de concentrations croissantes en cadmium.

L'évolution de I en fonction de la concentration croissante cadmium est modélisée grâce à l'équation (12)

$$I(\%) = \left( I_{\max} \frac{[M]}{K_I + [M]} \right) \quad (\text{Eq.12}) \quad (\text{Hu et al., 2003})$$

avec  $I_{\max}$  et I respectivement le pourcentage d'inhibition maximal et le pourcentage d'inhibition observé de  $q_{\max}$ .,  $[M]$  la concentration en cadmium dans la phase soluble (mg/L),  $K_I$  la concentration en Cd causant 50 % d'inhibition de  $q_{\max}$  encore noté IC50 en mg/L. Les constantes du modèle on été déterminé mathématiquement par une méthode de régression non linéaire de type algorithme de Newton.

## 2.7. La caractérisation des populations microbiennes par la biologie moléculaire

L'étude des populations bactériennes présentes au niveau des boues activées est réalisée à l'aide d'outils de biologie moléculaire par discrimination des ADN génomiques codant pour la région 3 de l'ARNr 16S par la technique de PCR-DGGE. Cette technique a été mise au point au début de ces travaux de thèse. La démarche est présentée dans la figure 2-7.

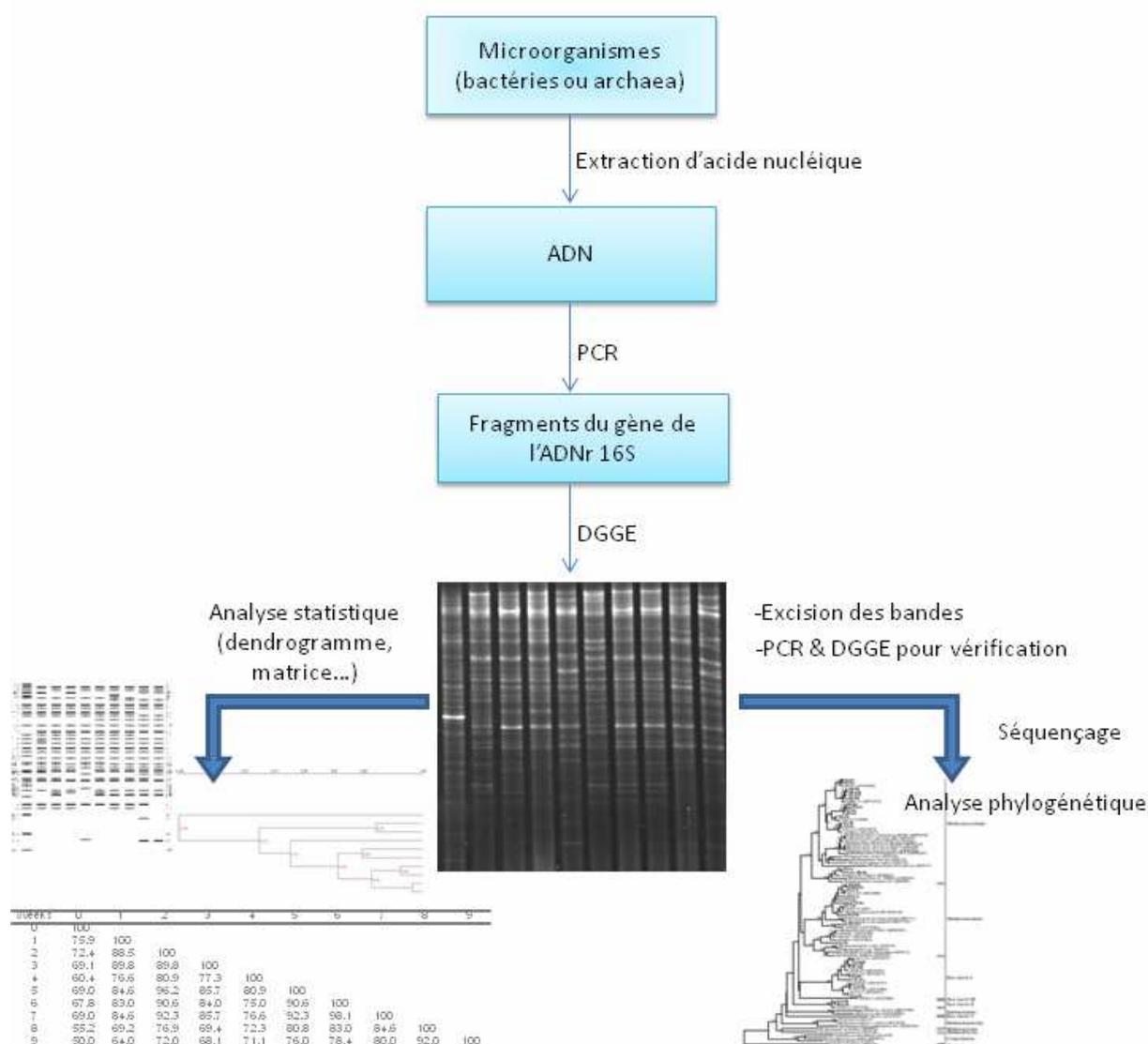


Figure 2-7. Protocole d'analyse des échantillons de boues activées par PCR-DGGE

### 2.7.1. La méthode d'extraction des ADNg totaux

L'extraction des ADN totaux est réalisée à l'aide du kit PowerSoil DNA extraction kit selon les recommandations du fabricant (Mo Bio Laboratories, Inc, Carlsbad, USA). 2 mL de boues activée du bassin d'aération ou des boues de recirculation ont été centrifugés puis stockés à -

20 °C. 0,5 mL de boues du digesteur ont été conservé à -20 °C. Le culot est récupéré après centrifugation des échantillons de boue. A ce culot ont été rajoutés les billes et le tampon (première étape du kit) afin de disperser les particules des boues et dissoudre les acides de type humique. La lyse cellulaire est initiée par l'ajout d'une solution S1 contenant un détergent qui permet de faciliter la lyse puis réalisée par action mécanique de micro-billes de zirconium dans un vibro-broyeur (Vortex Genie 2) pendant 15 min. Les inhibiteurs d'amplification par PCR (notamment les acides humiques) sont éliminés par précipitation en ajoutant la solution S2... Après une vingtaine d'étapes environ, l'ADN est ensuite récupéré à l'aide d'une solution d'élution S6. L'ADN ainsi extrait est conservé à -20 °C. Une estimation de la qualité et de la quantité d'ADNg est effectuée par simple électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% (m/v) - TAE 1X en présence de bromure d'éthidium (BET) permettant la visualisation de l'ADN sous UV. Le marqueur de taille Quick load 1Kb DNA Ladder (BioLab) est utilisé comme référence. Les extractions de l'ADN ont été réalisées en duplicats.

### *2.7.2. L'amplification par PCR de la région V3 de l'ADNr 16S*

Par la suite, les fragments des gènes codant pour l'ARN 16s ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques pour les bactéries 341F-GC (incluant une Séquence GC-clamp formée par 40 paires de bases de guanine et de cytosine) et 518R ou 907R (tableau 2-11). Les amorces utilisées pour les archaea sont 934F-GC et 1390R. Pour les bactéries nous avons choisi deux paires d'amorces, car la première 341F-GC/518R a été utilisé au début des travaux de thèse pour construire une vue globale de la communauté au sein des échantillons mais celle-ci a généré des séquences de 177 pb ce qui n'est pas suffisant pour discriminer certains fragments pour définir le phylum, la classe ou l'espèce.

Par contre, la paire d'amorce 341F-GC/907R (tableau 2-11), après amplification par PCR, génère des séquences de 566 pb. Ainsi, nous avons pu identifier les microorganismes avec des pourcentages d'identités supérieurs à 98 %.

Tableau 2-11. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN (F=Forward=sens ; R=Reverse=antisens).

Microorganismes cibles/nom des amorces	Séquences (5'-3')	Positions d'hybridation <sup>a</sup>	Longueur des amplicons (pb) <sup>d</sup>	Température d'hybridation (°C)
<b>Bactéries</b>				
<u>GC-341F*</u>	5'- <u>CGCCCGCCGCGCC</u> CCGCGCCCGTCCC <u>GCCGCCCCCGCCC</u> GCCTACGGGAGGC	341-357	194	56
	AGCAG-3'	518-534		
518R	5'- ATTACCGCGGCTG CTGG-3'			
<u>GC-341F*</u>	5'- <u>CGCCCGCCGCGCC</u> CCGCGCCCGTCCC <u>GCCGCCCCCGCCC</u> GCCTACGGGAGGC	341-357	586	56
	AGCAG-3'	907- 926		
907R <sup>b</sup>	5'- CCGTCAATTCMTT GAGTTT-3'			
<b>Archaea</b>				
<u>GC-934F</u>	5'- <u>GC-</u> AACGCGAAGAACC TTAC-3'	968-984	379	63
1390R	5'- TAGCGATTCCGACT TCA-3'	1330-1346		

<sup>a</sup> : Numérotation chez *E. coli*<sup>b</sup> : M, C/A; Y, C/T; R, A/G.<sup>c</sup> : W, A/T K, G/T.<sup>d</sup> : longueur de la séquence amplifiée ne tient pas compte de la GC clamp

\* : la séquence surlignée en noir est la GC clamp rattachée à l'extrémité 5' de l'amorce sens pour la technique DGGE uniquement (domaine à grande stabilité qui est riche en G et C afin d'éviter la séparation complète des deux brins d'ADN)

Ces amorces sont associées à différents produits constituant le « mix PCR » (Tableau 2-12). Toutes les réactions PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel total de 100 $\mu$ L.

Tableau 2-12. Composition du mix PCR pour 100 $\mu$ L de réaction

Produits	PCR-DGGE
Enzyme polymérase (taq de Qiagen)	Taq 0,5 $\mu$ L à 2,5 U 50 $\mu$ L
Master mix (Qiagen) DNTPs+tampon	0,2 mM dNTPs
Eau ultrapure (Mobio)	33 $\mu$ L
Amorce sens	8 $\mu$ L (0,5 $\mu$ M)
Amorce antisens	8 $\mu$ L (0,5 $\mu$ M)
ANDg extrait	1 $\mu$ L

Le mix contenant l'ADN extrait est ensuite déposé dans de petits tubes Eppendorf de 0,5mL eux-mêmes mis dans un amplificateur (thermocycleur de Biorad) dont les conditions opératoires sont préalablement réglées (Tableau 2-13).

Tableau 2-13. Conditions opératoires de la PCR-DGGE

Etapas	341F-GC/518R (bactéries)		341F-GC/907R (bactéries)		934F-GC/1390R (archaea)	
	Température (°C)	Durée	Température (°C)	Durée	Température (°C)	Durée
Dénaturation initiale	94	3 min	94	3 min	94	4 min
Dénaturation	94	30s	94	30s	94	45s
Hybridation	55	30s	52	30s	58	45min
Elongation	72	30s	72	50s	72	45s
Elongation finale	72	15min	72	10min	72	15min
Nombre totale de cycles	30		28		25	

La vérification du bon déroulement de l'amplification est assurée par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,3 % en présence de BET. Le marqueur de taille 100 bp DNA Ladder (BioLab) est utilisé comme référence. Les produits issus de la PCR (amplicons) sont conservés à -20 °C avant DGGE.

### 2.7.3. La discrimination par DGGE des amplicons et analyse des données

20 µL de produit PCR ont été déposés sur un gel DGGE à 8 % d'acrylamide/bis-acrylamide avec un gradient dénaturant de 40 à 60 % (urée m/v et formamide v/v) pour les bactéries (figure 2-8). Un gel à 7 % d'acrylamide/bis-acrylamide incluant un gradient dénaturant de 35 à 60 % est préparé pour la migration des amplicons d'archaea. La migration a été réalisée dans une cuve Dcode Systeme (Bio-rad) pendant 17 heures à 80 V dans du TAE 1X et à 60°C. Le gel a été coloré dans 30 mL d'une solution de TAE 1X en présence de 30 µL de GelStar (Lonza Rockland, Inc., CA, USA) pendant 20 minutes. Le GelStar tout comme le BET permet de révéler sous Ultraviolet (UV), les fragments d'ADN en s'intercalant entre leurs bases coplanaires, formant ainsi le complexe ADN-éthidium par exemple. Le gel est ensuite décoloré dans du tampon TAE 1X pendant 20 minutes puis immédiatement photographié sous UV à l'aide du transilluminateur UV GelDoc XR (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milan, Italy). Les images sont analysées et traitées à l'aide du logiciel QuantityOne de version 4.6.1 (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

#### ⇒ Calcul des similarités/dissimilarités-dendrogramme

Le niveau de similarité (lien de parenté) entre les différents profils a été défini en utilisant le coefficient de Dice comme méthode de calcul, et la matrice de similarité a été convertie en un dendrogramme par l'utilisation de la méthode UPGMA avec le logiciel QuantityOne de Bio-Rad dans sa version 4.6.1. La formule du coefficient de Dice est la suivante:

$$sim = 200 \times \frac{\sum_{i=1}^B \text{Min}(s_i, t_i)}{\sum_{i=1}^B (s_i + t_i)}$$

$$dist = 100 - sim \quad (\text{Eq.13})$$

Les dendrogrammes sont générés à partir de la matrice de similarité dissimilarité et illustrent les liens de parenté existant entre profils.

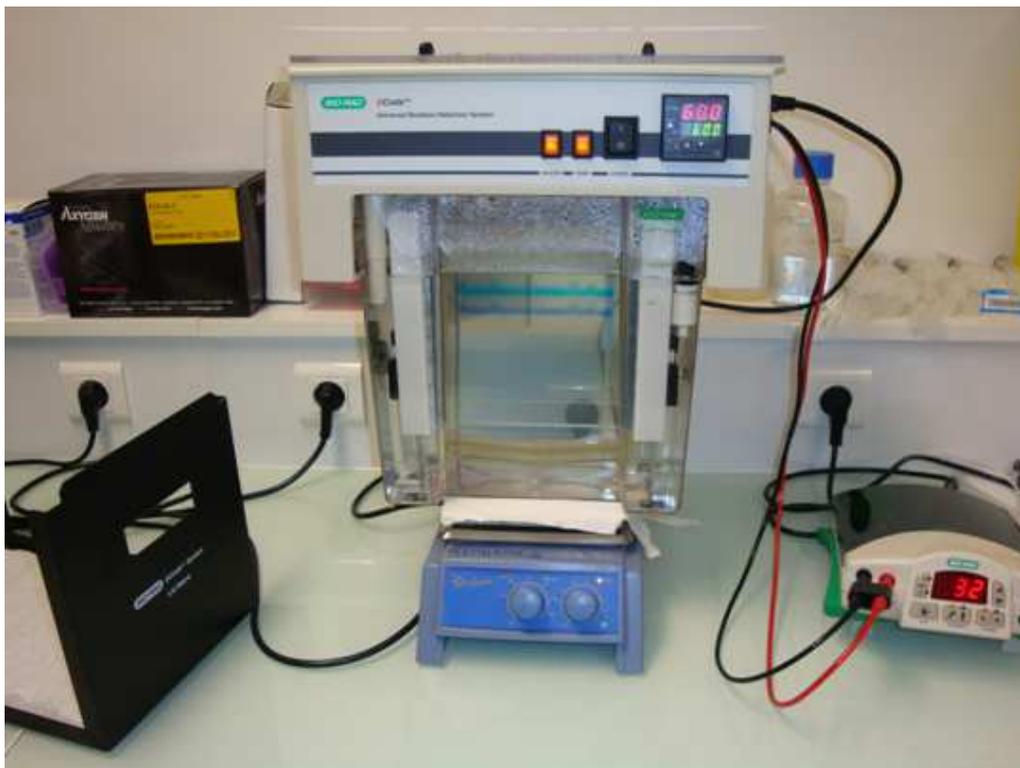


Figure 2-8. Appareil de DGGE : D-code system (Biorad)

#### 2.7.4. Séquençage de fragments d'ADN

Le séquençage de fragments d'ADN est réalisé à partir de l'excision des bandes d'intérêts d'un gel de polyacrylamide. Les bandes excisées sont incubées une nuit à 4 °C dans 50  $\mu$ L d'eau stérile. L'ADN contenu dans les mailles du gel diffuse dans l'eau et 2  $\mu$ L serviront de matrice pour une amplification par PCR. Avant séquençage, les produits PCR sont purifiés sur colonne avec le kit "QIAquick PCR purification kit" (QIAGEN, GmbH). Les fragments d'ADN sont séquencés par la firme MilleGen (Labege, France).

#### 2.7.5. Analyse phylogénétique

Les séquences obtenues sont comparées à celles disponibles dans les banques de gènes avec le programme BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les séquences les plus proches sont sélectionnées. L'alignement des différentes séquences est obtenu par ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Les arbres phylogénétiques sont construits selon la méthode du plus proche voisin (Neighbour Joining Method) (Saitou et Nei, 1987) et leur robustesse est testée par une analyse de "bootstrap" obtenue sur 1000 réplifications. Les arbres sont ensuite tracés avec le programme MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Les séquences générées au cours de ces travaux sont déposées dans la base de données NCBI.

## 2.8. Expériences effectuées

Le tableau 2-14 présente les différentes séries de tests réalisées, ainsi que les analyses effectuées pour chaque série.

Tableau 2-14. Traitements et analyses effectuées au cours de ce projet de thèse

Traitements appliqués	Métal ajouté (mg/L)	Digestion	Analyses effectuées
1 -Ultrasons 100000 kj/kg MS -Ozonation 0,108 g O <sub>3</sub> /MS -Lyse thermique 95 °C  (Juin- Juillet 2009)	/	aérobie et anaérobie (30 jours)	-Etudes des populations microbiennes, respirométrie -Répartition de la matière (MS, MES, MVS...) -Solubilisation de la matière -Composition des boues (DCO, COD, protéines, acides de type humique...)
2  Lyse thermique 90 °C  (Nov.- Déc. 2009)	Cd 0 à 61	aérobie (35 jours)	-Etudes des populations bactériennes, respirométrie -Répartition de la matière (MS, MES, MVS...) -Composition des boues (DCO, COD, protéines, acides de type humique...) -Solubilisation de la matière -Détermination du nombre de site ionisable à la surface et dans la phase soluble (capacité d'échange protonique=CEP) -Etude de l'impact du cadmium à différentes concentrations sur les populations bactériennes, sur la digestion et le prétraitement (dosages ETAAS et FAAS)
3  Ultrasons 165000 kj/kg MS  (Juin- Juillet 2010)	Cd 0 à 100	aérobie (35 jours)	-Etudes des populations bactériennes, respirométrie -Répartition de la matière (MS, MES, MVS...) Composition des boues (DCO, COD, protéines, acides de type humique...) -Solubilisation de la matière -Détermination du nombre de site ionisable à la surface et dans la phase soluble (capacité d'échange protonique=CEP) -Etude de l'impact du cadmium à différentes concentrations sur les populations bactériennes, sur la digestion et le prétraitement (dosages ETAAS et FAAS) -Etude du potentiel de sorption et de relargage (extraction à l'EDTA)

4	Ultrasons 165000 kj/kg MS (Avril- Mai 2011)	Cd 0 à 100	anaérobie (55 jours)	-Etudes des populations microbiennes, respirométrie -Répartition de la matière (MS, MES, MVS...) -Composition des boues (DCO, COD, protéines, acides de type humique...) -Solubilisation de la matière -Détermination du nombre de site ionisable à la surface et dans la phase soluble (capacité d'échange protonique=CEP) -Etude de l'impact du cadmium à différentes concentrations sur les populations microbienne, sur la digestion et le prétraitement (dosages ETAAS et FAAS) -Etude du potentiel de sorption et de relargage (extraction à l'EDTA)
5	Lyse thermique (Avril- Mai 2009)	/	Pilotes avec alternances de phase d'aération et d'anoxie (70 jours)	-Influence de l'introduction d'un traitement thermique sur les flux de cuivre et de cadmium dans un pilote de traitement des eaux usées à boues activées. -Aperçu complet des performances de réduction des boues en excès avec un traitement thermique à 90 °C couplé avec des boues activées à l'échelle pilote: élimination de la DCO et de N, Suivi des populations bactériennes, et devenir des métaux lourds



## 2.9. Références bibliographiques

### A

**AFNOR (1996)** Norme NF T90-036 / NF EN ISO 9963-1 : *Détermination de l'alcalinité ; titre alcalimétrique (TA) et titre acalmétrique Qualité de l'eau*, T2, pp. 115-125

**AFNOR. (1997)** Qualité de l'eau - *Dosage des matières en suspension - Méthode par centrifugation*, NF T 90-105.

### C

**Cadoret A., Block J.C. (dir.)** *Activités enzymatiques extracellulaires des agrégats bactériens de stations d'épuration d'eaux usées urbaines*. 216 p. Thèse de doctorat, Chimie et Microbiologie de l'Eau. Nancy : Université Henri Poincaré, Nancy 1, (2003).

### D

**Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. [et al.] (1956)** *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. Analytical Chemistry, 28, pp. 350-356.

### F

**Frølund B., Griebe T., Nielsen P.H. (1995)** *Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix*. Applied Microbiology and Biotechnology, 43, (4), pp. 755-761.

### G

**Gessesse A, Dueholm T, Petersen SB, Nielsen PH (2003)** *Lipase and protease extraction from activated sludge*. Water Research, 37, 3652–3657.

### H

**Hu, C.-W., Chao, M.-R., Wu, K.-Y., Chang-Chien, G.-P., Lee, W.-J., Chang, L.W., Lee, W. - S. (2003).** *Characterization of multiple airborne particulate metals in the surroundings of a municipal waste incinerator in Taiwan*. Atm. Environment, 37, pp. 2845–2852.

### I

**ISO (2002).** *ISO 15705 - Water quality - Determination of the chemical oxygen demand index (ST-COD) -Small-scale sealed-tube method*. Geneva (Switzerland): ISO, 18 p.

### L

**Laurent J., Dagot, C; Casellas, M; (dir.)**. *Modifications de la répartition d'espèces métalliques (Cd, Cu) induites par des prétraitements physique (ultrasons), chimique(ozone) et thermique au sein des procédés à boues activées*. 237 p. Thèse de doctorat, Chimie et Microbiologie de l'Eau. Limoges : Université de Limoges, (2009).

**Lowry E.H., Rosebrough N.J., Lewis Far R.A. [et al.] (1951)** *Protein measurement with the folin phenol reagent*. Journal of biological chemistry, 193, pp. 265-275.

**P**

**Perez-Fabiel S., Lefebvre X. ; Paul E.** (dir.). *Etude de la biodégradabilité de boues secondaires soumises à un traitement thermique à 65°C et du couplage digestion anaérobie et digestion thermophile aérobie pour la réduction de boues.* 197 p. Thèse de doctorat Science des procédés. Toulouse: INSA de Limoges, (2009).

**Prorot A., Dagot, C.; Leprat, P** (dir.). *Approche comparative des effets microbiologiques et chimiques de traitements d'hydrolyse de boues urbaines dans le cadre de la réduction de leur production.* 203 p. Thèse de doctorat, Biologie, Sciences, Santé. Limoges : Université de Limoges, (2008).

**S**

**Saitou, N. and Nei, M. (1987)** *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.* Mol. Biol. Evol., 4, pp. 406–425.

**Salsabil, R., Casellas, M ; Dagot, C** (dir.). *Etude comparative des digestions aérobie et anaérobie de boues biologiques urbaines traitées par procédés physique, chimique et thermique : application pour la réduction de la production de boues.* 334 p. Thèse de doctorat, Chimie et Microbiologie de l'Eau. Limoges : Université de Limoges, (2008).

**Semerci, N., and Çeçen, F. (2007).** *Importance of cadmium speciation in nitrification inhibition.* Journal of Hazardous Materials, 17, pp. 503–512.

**T**

**Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011)** *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.* Mol Biol Evol.

**Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994)** *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice,* Nucleic Acids Res., 22, pp. 4673-4680.

**Turner B.F., Fein J.B. (2006)** *Protofit: A program for determining surface protonation constants from titration data.* Computers and Geosciences, vol. 32, n°9. pp. 1344-1356.

**CHAPITRE 3 – COMPARAISON DES EFFETS DE 3  
PRETRAITEMENTS PAR DESINTEGRATION (THERMIQUE,  
CHIMIQUE, ULTRASONS) SUR LES PERFORMANCES ET  
LES COMMUNAUTES MICROBIENNES LORS DE L'ETAPE  
DE STABILISATION AEROBIE.**



**Contexte :** La stabilisation est une étape importante pour le traitement et le rejet des boues d'épuration. Les boues produites à l'état liquide peuvent être stabilisées par des procédés de traitements chimiques ou biologiques (digestion aérobie ou anaérobie). La stabilisation des boues par voie aérobie consiste, par une aération prolongée, à provoquer le développement de micro-organismes aérobies jusqu'à dépasser la période de synthèse des cellules et réaliser leur propre auto-oxydation (respiration endogène). La réduction des solides volatils des boues constitue l'un des principaux critères d'évaluation de cette digestion. Le taux de réduction des matières volatiles varie entre 15 et 25 % en fonction de la température du temps de séjour et de la nature de la boue notamment. Pour des raisons économiques, la digestion aérobie des boues biologiques a été utilisée en particulier dans les stations d'épuration de taille moyenne et de petite taille. Au cours de la digestion aérobie des boues, la proportion importante de microorganismes dans des floes de boues biologiques facilite l'adsorption des composés. Après adsorption, les composés biodégradables (particulaires ou solubles), subissent une hydrolyse pour produire des substances facilement assimilables par les bactéries. L'hydrolyse microbienne de grandes molécules organiques est donc l'étape limitante du procédé.

Différentes stratégies sont actuellement développées pour améliorer la réduction des boues lors de la digestion aérobie. Les procédés dits de désintégrations et notamment le traitement thermique, l'ozonation, et la sonication, mis en œuvre en amont de l'étape de digestion, conduisent à une amélioration significative du taux de réduction de la production de boue. Ces procédés agissent en facilitant l'étape d'hydrolyse soit par la génération de molécules de faible poids moléculaires soit par la libération des enzymes hydrolitiques et la solubilisation de la matière organique.

Les processus de désintégration des boues agissent différemment sur la structure cellulaire des boues. Prorot *et al.* (2008) ont montré qu'après un traitement thermique et une ozonation, les parois cellulaires des boues sont plus perméables qu'après une sonication (où les boues « explosent » mais ne sont pas préalablement perméabilisées). Ainsi, l'impact de ces différents procédés de désintégration sur la communauté microbienne devrait être différent. Selon Yan *et al.* (2008), lors d'un traitement par ozonation, la désintégration des cellules survient lorsque la dose d'ozone est supérieure à 0,02 g O<sub>3</sub>/g TSS.

Connaître et suivre l'évolution des espèces microbiennes au cours d'un procédé constitue une clé d'entrée fondamentale pour en maîtriser l'efficacité. Dans ce contexte, nous nous sommes particulièrement attachés à démontrer que de la technique de PCR-DGGE pouvait être un

outil efficace pour suivre l'évolution d'une communauté microbienne lors de la mise en œuvre de procédés de réduction de la production de boues.

**Suivi de l'évolution des communautés microbiennes par PCR-DGGE :**

Ces dernières années, plusieurs techniques d'empreintes moléculaires ont été utilisées afin d'identifier les structures des communautés microbiennes d'environnements divers. A partir de ces nouvelles techniques, Wagner et Loy (2002) ont mis en évidence une grande diversité bactérienne dans l'environnement où les phyla prépondérants sont les Proteobacteria (alpha, beta et gamma), les Bacteroidetes et les Actinobacteria avec également la présence de différentes espèces d'Eucarya et d'Archaea (Barns et al, 1996) (Figure 3-1). La composition et la répartition de ces communautés microbiennes sont fonctions des paramètres physico-chimiques, hydrauliques et du procédé.



Les techniques moléculaires pour l'étude des populations nécessitent la mise en œuvre de 3 étapes (Figure 3-2).



Figure 3-2. Les différentes étapes de l'étude des populations par biologie moléculaire (méthodes indirectes)

→Extraction de l'ADN total :

Les études métagénomiques commencent par l'extraction de l'ADN de tous les microorganismes présents dans un échantillon d'un environnement donné. L'extraction des acides nucléiques comporte quelques spécificités liées principalement à la charge en microorganismes et donc d'ADN dans l'échantillon. L'isolement de l'ADN pur à partir de l'eau usée est souvent compliqué, du fait de l'abondance des polysaccharides et des polyphénols dans certains échantillons difficiles à éliminer à l'aide des kits standard d'extraction d'ADN (Koonjul *et al.*, 1999).

●Extraction de l'ADN dans les eaux usées : Pour les échantillons environnementaux, l'efficacité des méthodes d'extraction d'ADN est déterminée par le taux d'extraction d'ADN et la réduction des inhibiteurs du produit PCR (Jiang *et al.*, 2005). Le degré de pureté de l'ADN extrait des eaux usées joue un rôle important dans la sensibilité et l'utilisation d'outils moléculaires tels que la PCR et l'hybridation sur ADN microarrays (Lemarchand *et al.*, 2005).

●Extraction de l'ADN dans les sols ou dans les boues : Plusieurs méthodes ont été mises au point pour l'extraction d'ADN métagénomique à partir des sols pollués (Zhou *et al.*, 1996 ; Burgmann *et al.*, 2001 ; Kauffmann *et al.*, 2004 ; Bertrand *et al.*, 2005). Dans tous les cas, l'acide humique a été considéré comme étant un inhibiteur majeur de la PCR : des concentrations inférieures à 10 ng peuvent inhiber la réaction (Tsai et Olson, 1992).

Actuellement, il existe des kits commerciaux très performants présentant de hauts rendements d'extraction destinés aux échantillons environnementaux récalcitrants (boues activées) et présentant une forte charge en substances type humique à savoir le "Powersoil DNA isolation kit" de MOBIO.

### → Amplification des ADN 16S

L'étape suivante est l'amplification par PCR. La PCR nécessite l'utilisation de plusieurs réactifs : l'ADN génomique, l'enzyme polymérase, les désoxyribonucléotides (DNTP), les deux amorces et le tampon (solution de fonctionnement optimale de l'enzyme) (figure 3-3). Les amorces utilisées lors de la PCR peuvent être soit :

- universelles : elles ciblent les domaines bactérie, archée ou eucaryote.
- ou spécifiques : elles visent des gènes dont la séquence est plus ou moins conservée parmi le groupe, genre ou espèce phylogénétique ciblé.

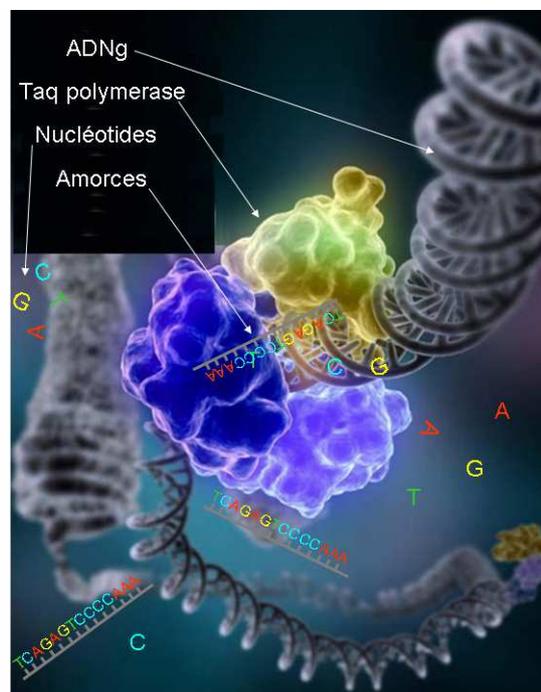


Figure 3-3. Les composants de la PCR

Dans l'étude de la diversité de la microflore des écosystèmes, l'ADN ribosomique 16S est majoritairement employé comme cible moléculaire. Ce gène code pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr) et est essentiellement utilisé en raison de sa structure, très conservée chez toutes les bactéries. En effet, il est constitué d'une succession de domaines conservés, sites de complémentarité pour les amorces universelles utilisées pour le séquençage de ce gène, et d'autres portions de séquences propres à un groupe de bactéries, nommées séquences signatures (espèce, genre, famille). Le choix de l'ARN 16S plutôt que 23S ou 5S est d'ordre technique (taille du gène, nombre d'informations) et, surtout, les banques de données de séquences du gène 16S sont aujourd'hui très développées. Enfin, l'identification est fiable : les résultats obtenus par séquençage du gène 16S sont similaires à ceux obtenus avec le génome entier. Une amorce universelle est choisie, courte chaîne nucléotidique de 15 à 25 nucléotides, complémentaire de la séquence d'ADN connue à amplifier et située juste en amont de la zone à séquençer. Cette amorce est nécessaire à l'accrochage de l'ADN polymérase. Cet outil moléculaire d'identification a révolutionné l'écologie microbienne (Dabert *et al.*, 2002).

Le choix des amorces PCR est important pour toute expérience ultérieure telle que la DGGE afin d'isoler des organismes spécifiques. Un grand nombre d'amorces différentes ciblant le gène 16S a été publié. Ces amorces peuvent être universelles (Baker *et al.*, 2003) ou spécifiques. La paire d'amorces 341F/907r, est une amorce largement utilisée "universelle" pour les bactéries, et a été utilisée pour les ADN qui une fois amplifiés seront déposés sur des gels DGGE par exemple (Muehling *et al.*, 2008). Certaines de ces amorces sont résumées dans le tableau (3-1) ci-dessous. *In fine*, notre choix s'est porté sur les paires d'amorces 341F-GC/518R ou 341F-GC/907R et arcGC-934F/1330R spécifiques aux bactéries et aux archaea respectivement, en raison du fait que le pourcentage de microorganismes que l'on peut cibler, à ce jour, à l'aide de ces amorces reste supérieur par rapport aux amorces utilisées dans la littérature (tableau 3-1).

Tableau 3-1. Les amorces principales amorces utilisées pour l'amplification des ADN 16S pour les populations de bactéries et d'archaea

Microorganismes cibles/nom des amorces	Séquences (5'-3')	Organismes cibles à ce jour (%)	Positions d'hybridation <sup>a</sup>	Longueur des amplicons (pb) <sup>d</sup>	Température d'hybridation (°C)	Références
<b>Bactéries</b>						
<u>GC-341F*</u>	5'- <u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGC</u> <u>CCGTCCCGCCGCCCCGCCC</u>	93	341-357			<b>Yan <i>et al.</i>, 2008</b> <b>Dar <i>et al.</i>, 2004</b>
518R	<u>GCCTACGGGAGGCAGCAG-3'</u> 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	87.3	518-534	194	56	<b>Muyzer <i>et al.</i>, 1993</b>
<u>GC-341F*</u>	5'- <u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGC</u> <u>CCGTCCCGCCGCCCCGCCC</u>	93	341-357			<b>Chan <i>et al.</i>, 2003</b>
907R <sup>b</sup>	<u>GCCTACGGGAGGCAGCAG-3'</u> 5'- CCGTCAATTCMTTGGAGTTT -3'	89.2	907- 926	586	56	<b>Muehling <i>et al.</i>, 2008</b> <b>MacCracken <i>et al.</i>, 2001</b>

**Bactéries**

<u>GC-968F</u>	5'- <u>GC-</u> AACGCGAAGAACCTTAC-3'	61.5	968-984			<b>Nübel <i>et al.</i>, 1997</b>
				379	63	
1330R	5'-TAGCGATTCCGACTTCA- 3'	26	1330-1346			<b>Nübel <i>et al.</i>, 1997</b>

**Archaea**

934F	5'- AGGAATTGGCGGGGGAGCA	91.2 (1997)	-			<b>Wu <i>et al.</i>, 2001</b>
1390R-GC	-3' 5'- <u>CGCCCGGGGCGCGCCCGG</u> <u>GCGGGGCGGGGGCACGGGC</u> GGTGTGTGCAA-3'	85	-	456	58	<b>Wagner <i>et al.</i>, 2009</b> <b>Wagner <i>et al.</i>, 2011</b>

**Archaea**

GC-arc344F*	5'- <u>GCCCGCCGCGCGGGCGGG</u> <u>CGGGGCGGGGGCACGGGGG</u> <u>GACGGGGYGCAGCAGGCGC</u>	52	344-363			<b>Yu <i>et al.</i>, 2009</b> <b>Bano <i>et al.</i>, 2004</b>
519R <sup>c</sup>	GA-3' 5'- GWATTACCGCGGCKGCTG-3'	54	519-534	191	56	<b>Lane, 1991</b>

<b>Méthanogènes</b>		5'-					
0357F	<u>CGCCCGCCGCGCGCGGCCGG</u>						
	<u>GCGGGCGGGGGCACGGGGG</u>	44	340-357				<b>Tabatabaei <i>et al.</i>, 2009</b>
	<u>GCCCTACGGGGCGCAGCAG-</u>			334	58		<b>Watanabe <i>et al.</i>, 2004</b>
	3'						
0691R	5'-GGATTACARGATTTAC-	23.5	707-691				
	3'						
<b>Archaea universel</b>		5'-					
PARCH340F	<u>CGCCCGCCGCGCGCGGCCGG</u>						
	<u>GCGGGCGGGGGCACGGGGG</u>	10	340-357				<b>Tabatabaei <i>et al.</i>, 2009</b>
	<u>GCCCTACGGGCYGCASCAG-</u>			179	60		<b>Watanabe <i>et al.</i>, 2004</b>
	3'						
PARCH519R	5'-TTACCGCGGCKGCTG-3'	96	533-519				

<sup>a</sup> : Numérotation chez *E. coli*

<sup>b</sup> : M, C/A; Y, C/T; R, A/G.

<sup>c</sup> : W, A/T K, G/T.

<sup>d</sup> : longueur de la séquence amplifiée ne tient pas compte de la GC clamp

\* : la séquence surlignée en noir est la GC clamp rattachée à l'extrémité 5' de l'amorce sens pour la technique DGGE uniquement (domaine à grande stabilité qui est riche en G et C afin d'éviter la séparation complète des deux brins d'ADN)

\* :F, Forward (sens) ; R, Reverse (antisens)

### Justification du choix de la technique de PCR DGGE pour cette étude :

A l'issue de l'étape de la PCR on obtient des fragments de même taille mais de séquences différentes. L'enjeu consiste alors à étudier les variations dans la séquence pour établir la diversité.

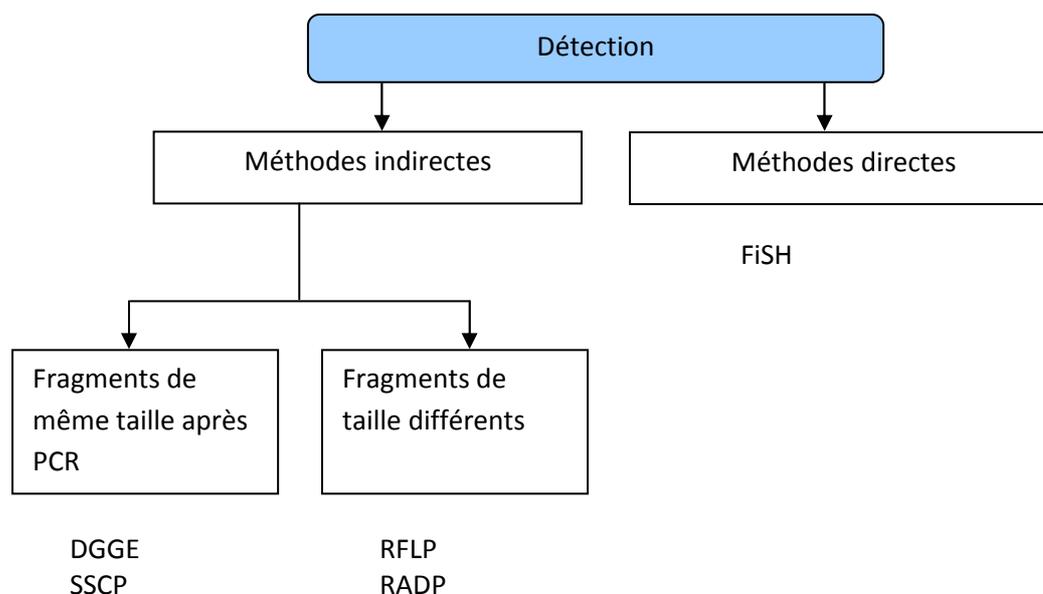


Figure 3-4 . Stratégies de l'analyse des communautés microbiennes.

Les méthodes indirectes sont celles qui nécessitent une étape d'amplification par PCR avant de passer à la technique d'analyse des populations. Parmi les nombreuses techniques moléculaires d'analyse de la biodiversité, on citera : la DGGE, la SSCP, la RFLP, la RADP etc (figure 3-4). Les principaux avantages et inconvénients des méthodes explicitées ci-dessus sont résumés dans le tableau ci-après. Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi de développer l'utilisation de la technique de DGGE pour le suivi des populations de bactéries et d'archaea. Celle-ci est la plus adéquate pour l'analyse des échantillons de boues activées de part sa rapidité et permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillon sans passer par le clonage, (tableau 3-2).

Tableau 3-2. Les principaux avantages et inconvénients des techniques de biologie moléculaire citées ci avant

	Avantages	Inconvénients
<b>DGGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Peu coûteuse</li> <li>-Détection des empreintes génétiques de population bactérienne (sous forme de bandes)</li> <li>- Détection des microorganismes viables mais non cultivables</li> <li>-Culture mixte comme les boues activées</li> <li>-Suivi simple et rapide de la variabilité spatio-temporelle des populations microbiennes</li> <li>-Relativement facile d'avoir une vue globale des espèces dominantes d'un écosystème donné</li> <li>-Méthode adéquate pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillon</li> <li>-Séquençage possible sans clonage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Lourde à mettre au point à l'apprentissage (nécessite un personnel expérimenté)</li> <li>-Le nombre de bande correspond relativement au nombre d'espèces dominantes</li> <li>-Pas de mise en évidence des populations minoritaires</li> <li>-Analyse de séquences de taille &lt;600 pb (avec 95% de polymorphisme détecté)</li> <li>-Non quantitative</li> <li>-Une séquence peut être représentée par des bandes multiples (hétéroduplex)</li> </ul>
<b>SSCP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Détection des empreintes génétiques de population bactérienne (sous forme de bandes)</li> <li>-Détection des microorganismes viables mais non cultivables</li> <li>-Souvent utilisé pour les cultures pures</li> <li>-Ne nécessite pas l'insertion d la GC clamp</li> <li>-Pas de gradient sur gel</li> <li>-Séquençage possible sans clonage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Aussi lourde que la DGGE à mettre au point</li> <li>-Analyse de séquences dont la taille varie entre 200 et 400 pb (à 300 pb environ 90% des mutations sont détectées)</li> <li>-Une séquence peut être représentée par des bandes multiples (hétéroduplex)</li> </ul>

<b>T-RFLP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Procédure relativement simple et rapide mais qui coûte chère</li> <li>-L'abondance des espèces peut être estimée à l'aide de la force du signal de fluorescence</li> <li>-Permet une comparaison entre les différents essais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-L'hétérogénéité de la taille des fragments rend l'analyse phylogénétique moins sûre</li> <li>-Séquençage impossible</li> <li>-Pas de réels avantages en comparaison à la DGGE qui reste la méthode la plus utilisée.</li> <li>-Les profils sont moins riches que la DGGE et la SSCP</li> </ul>
<b>RADP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pas de nécessité de créer des amorces spécifiques</li> <li>-Pas de besoin d'équipement spécifique</li> <li>-Bandes d'intérêts peuvent être excisées sur gel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pas d'information phylogénétique</li> <li>-Problème de reproductibilité</li> <li>-Séquençage possible après clonage</li> </ul>
<b>FISH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Méthode simple et facile si les sondes sont disponibles</li> <li>-Permettent la visualisation directe des microorganismes non cultivables</li> <li>-Méthode quantitative</li> <li>-Quantification de groupes microbiens spécifique</li> <li>-Détection différentielle / préférentielle de microorganismes actifs</li> <li>-Destinée pour une utilisation de routine</li> <li>-Outil robuste pour la détection et la quantification des AOB des biofilms et des floccs des boues activées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Bonne connaissance de l'écosystème à étudier et les microorganismes à détecter (avec la combinaison d'autres techniques moléculaires)</li> <li>-Pas de nouvelles bactéries</li> <li>-La création d'une nouvelle sonde et l'optimisation des conditions d'hybridation sont très difficiles et nécessitent beaucoup d'expériences et de dévouement</li> <li>-La quantification est fastidieuse et complexe (Analyse d'image)</li> </ul>

La technique de la DGGE permet de discriminer des fragments d'ADN de tailles identiques (200-700 bp), mais de compositions en bases nucléotidiques différentes (substitution de bases) (Muyzer *et al.*, 1993). La technique PCR-DGGE a été validée en Allemagne, par Muyzer *et al.* (1993) afin d'étudier la diversité des populations microbiennes issues de différents écosystèmes. Depuis sa mise en place, cette technique reste la plus efficace pour la détection et la caractérisation des bactéries et des champignons provenant des déchets industriels, du sol et des boues activées (Kowalchuk *et al.*, 2002 ; Smit *et al.*, 1999 ; Vainio et Hantula, 2000 ; Yan *et al.*, 2007 ; Kreuzinger *et al.*, 2003).

Les Amplicons (produits PCR) obtenus possèdent la même taille et ils ne peuvent donc pas être séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. La différence de mobilité électrophorétique des amplicons est fonction de leurs températures de fusion (température à laquelle les doubles brins de l'ADN se dissocient : c'est-à-dire 50% de l'ADN sous forme double brin et 50% de l'ADN sous forme simple brin). Une modification de séquence entraîne donc une modification de température de fusion. Cette modification est mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'un gradient d'agent dénaturant (formamide, urée). Le pourcentage d'agents dénaturants est prédit soit à partir de l'analyse bibliographique ou après plusieurs essais de mise au point. Les produits PCR avec leurs différentes séquences (de même taille) passent progressivement sous la forme de simple brin au fur et à mesure de leur migration au sein du gel Figure 3-5. Plus les acides nucléiques sont riches en G et C, moins ils seront dénaturés facilement. Une des amorces utilisées possède une extrémité 3' très riche en GC (*GC clamp*) qui permet d'éviter (i) la dénaturation complète de la séquence sous l'effet des agents dénaturants et (ii) leurs sorties du gel d'électrophorèse.

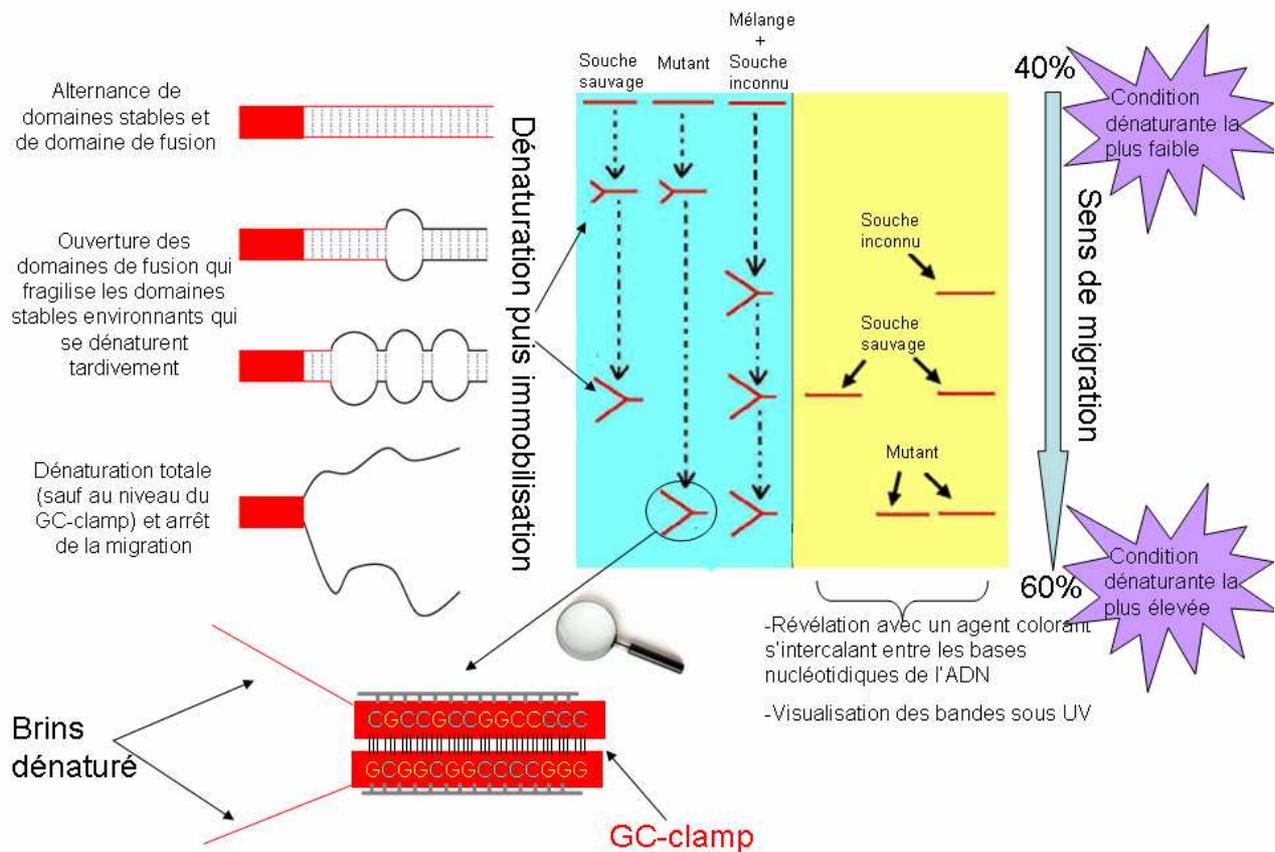


Figure 3-5. Schéma du principe de la DGGE

**Objectifs :** Les objectifs de cette étude ont été de comparer les activités des communautés microbiennes et les changements potentiels de ces communautés au cours de la digestion aérobie de boues pré-traitées. Trois types de procédés de désintégration ont été appliqués aux boues avant l'étape de digestion aérobie: la sonication (100 000 kJ/kg MS), l'ozonation (0,108 gO<sub>3</sub>/gMS) et le traitement thermique (95 °C, 2h). Les modifications potentielles des communautés bactériennes après le prétraitement et après l'étape de digestion aérobie ont été suivies par la technique de PCR-DGGE.

Les résultats de ces investigations sont présentés sous la forme d'une publication acceptée dans la revue Environmental Technology.

---

**REFERENCES**

**Baker G.C., Smith J.J. et Cowan D.A. (2003)** Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55, pp. 541-555.

**Bano N., Ruffin S., Ransom B. et Hollibaugh J.T. (2004)** Phylogenetic composition of Arctic Ocean archaeal assemblages and comparison with Antarctic assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, pp. 781–789.

**Barns S.M., Delwiche C. F., Palmer J.D. et Pace N.R. (1996)** Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 93, pp. 9188–9193.

**Bertrand H., Poly F., Va, V.T., Lombard N., Nalin R., Vogel T.M. et Simonet P. (2005)** High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. *Journal of Microbiological Methods*. 62, pp. 1-11.

**Bürgmann H., Pesaro M., Widmer F. et Zeyer J. (2001)** A strategy for optimising quality and quantity of DNA extracted from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 45, pp. 7–20.

**Dabert P., Delgenès J.P., Moletta R. et Godon J.J. (2002)** Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics. *Reviews Environ. Sci. Biotechnol.* 1, pp. 39-49.

**Dar S.A., Kuenen J.G. et Muyzer G. (2005)** nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, pp. 2325- 2330.

**Delong E.F. et Pace N.R. (2001)** Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.* 50, (4), pp. 470-478.

**Jiang J., Alderisio K.A., Singh A. [et al.] (2005)** Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Appl Environ Microbiol.*, 71, pp.1135–1141.

**Kauffmann I.M., Schmitt J. et Schmid R.D. (2004)** DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts. *Appl Microbiol Biotechnol* 64, pp. 665–670.

**Koonjul P.K., Brandt W.F., Farrant J.M. et Lindsey G.G. (1999)** Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucl. Acids Res.* 27, 915-916.

**Kowalchuk G.A., Buma D.S., de Boer W., Klinkhamer P.G..L. et van Veen J.A. (2002)** Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, pp. 509–520.

**Kreuzinger N., Farnleitner A., Wandl G., Hornek R. et Mach R. (2003)** *Molecular biological methods (DGGE) as a tool to investigate nitrification inhibition in wastewater treatment.* *Water Science and Technology*, 47, pp. 165-172.

**Lane D.J. (1991)** 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Stackebrandt E. & Goodfellow M., eds) John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 115-1745.

**Lemarchand K., Berthiaume F., Maynard C., Harel J., Payment P., Bayardelle P., Masson L. et Brousseau R. (2005).** Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays. *J. Microbiol. Methods*, 63, pp.115-126.

**Muehling M., Woolven-Allen J., Murrell J.C. et Joint I. (2008)** Improved-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *The ISME Journal* 2, pp. 379-392.

**Muyzer G., EC Waal D. et Uitterlinden A.G. (1993)** *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, pp. 695–700.

**Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. (1997)** PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, (8), pp. 3327-3332.

**O’Flaherty V., Collins T. et Mahony T. (2006)** The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5, pp. 39-55.

**Prorot A., Eskicioglu C., Droste R. [et al.] (2008)** Assessment of physiological state of microorganisms in activated sludge with flow cytometry: Application for monitoring sludge production minimization. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35, (11), pp. 1261–1268.

**Sekiguchi Y., Kamagata Y. et Harada H. (2001)** Recent advances in methane fermentation technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, pp. 277-282.

**Smit E., Leeftang P., Glandorf B., van Elsas J.D. et Wernars K. (1999)** Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding

18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, pp. 2614–2621.

**Tabatabaei M., Zakaria M.R., Rahim R.A., Wright A.D.G., Shirai Y., Abdullah N., Sakai K., Ikeno S., Mori M., Kazunori N., Sulaiman A., Hassan M.A. (2009)** PCR-based DGGE and FISH analysis of methanogens in an anaerobic closed digester tank for treating palm oil mill effluent. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12, (3), pp. 12-25.

**Tsai Y.L. et Olson B.H. (1992)** Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, pp. 2292-2295.

**Vainio E.J. et Hantula J. (2000)** Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis. *Mycological Research*, 104, pp. 927-930.

**Wagner A.O., Malin C., Lins P. et Illmer P. (2011)** Effects of various fatty acid amendments on a microbial digester community in batch culture. *Waste Management*, 31, (3), pp. 431-437.

**Wagner M. et Loy A. (2002)** Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr Opin Biotechnol.* 13, (3), pp. 218– 27.

**Wagner, A. O., et al. (2009)** Application of Denaturing High-Performance Liquid Chromatography in Microbial Ecology: Fermentor Sludge, Compost, and Soil Community Profiling, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, (4), pp. 956-964.

**Watanabe T., Asakawa S., Nakamura A., Nagaoka K. et Kimuram M. (2004)** DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiol. Lett.*, 232, pp. 153–163.

**Wu J.H., Liu W.T., Tseng I.C. et Cheng S.S. (2001)** *Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system.* *Microbiology*, 147, pp. 373–382.

**Yan S.T., Kazuhiko M., Xing X.H. et Yasunori T. (2008)** *Succession of bacterial community and enzymatic activities of activated sludge by heat-treatment for reduction of excess sludge.* *Biochem. Eng. J.*, 39, pp. 598–603.

**Zhou J., Bruns M.A. et Tiedje J.M. (1996)** DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, pp. 316–322.

# COMPARING THE EFFECTS OF THREE PRE-TREATMENT DISINTEGRATION TECHNIQUES ON AEROBIC SLUDGE DIGESTION: BIODEGRADABILITY ENHANCEMENT AND MICROBIAL COMMUNITY MONITORING BY PCR–DGGE

Kais Jaziri, Magali Casellas, Christophe Dagot

Environmental Technology, Volume 33 (10-12), pp. 1435-1444, Available online 17<sup>th</sup> October 2011. DOI: 10.1080/09593330.2011.632653

<sup>a</sup>Groupement de Recherche Eau Sol Environnement, EA 4330, Site de l'ENSIL, Parc ESTER Technopôle, 16 rue Atlantis, 87068 Limoges Cedex, France

## Abstract

The objectives of this work were to compare and investigate the effect of three activated sludge disintegration processes before aerobic sludge digestion on 1) aerobic biodegradability enhancement and 2) microbial community evolution with the Polymerase chain reaction-Denaturent gel gradient electrophoresis (PCR–DGGE) technique. The comparison of 3 disintegration processes: thermal treatment (95°C, 2h), sonication (100,000 kJ/kgTS) and ozonation (0.108 gO<sub>3</sub>/gTS) showed that the disintegration processes acted differently according to the composition of the soluble phase and to the DNA damage. Thermal treatment led to significant protein solubilisation and to DNA modification. Sonication and ozonation resulted in similar soluble phase compositions and did not lead to any DNA modifications. During activated sludge aerobic digestion, intrinsic biodegradability enhancement was observed for thermal and ozone activated sludge pre-treatments. The analysis of the DGGE patterns at the end of aerobic digestion showed that population diversity was affected by both the aerobic digestion and by the pre-treatment. The dissimilarity percentages measured at the end of aerobic digestion in the control sample and in the treated sludge were equal to 22, 25 and 20% for thermal treatment, sonication and ozonation respectively. This study indicated that PCR-DGGE, used for the comparison of disintegration processes before and after aerobic digestion, could be a useful tool.

**CHAPITRE 4 –ANALYSE DES EFFETS D’UN  
PRETRAITEMENT THERMIQUE BASSE TEMPERATURE  
SUR LA SENSIBILITE AU CADMIUM DE BOUES ACTIVEES  
LORS DE L’ETAPE DE STABILISATION BIOLOGIQUE:  
MESURE DES ACTIVITES RESPIRATOIRES ET DES  
ACTIVITES ENZYMATIQUES IMPLIQUEES DANS LE  
METABOLISME**



**Contexte :** L'étude bibliographique a démontré que le traitement thermique basse température pouvait constituer une alternative attractive pour augmenter les rendements de réduction de la production de boue en amont de l'étape de stabilisation aérobie (Salsabil *et al.*, 2010), ou anaérobie (Héry *et al.*, 2010, Bougrier *et al.*, 2006). Camacho (2001) a montré qu'au-delà de 60 °C, il était possible d'initier un processus de solubilisation significatif. La mise en place d'un traitement de désintégration par élévation de la température a pour objectif de faciliter l'étape d'hydrolyse de la matière organique. Le traitement thermique agit par destructuration du floc, lyse cellulaire et libération des enzymes enchassées dans la matrice de boues activées (Prorot *et al.*, 2011 ; Laurent *et al.*, 2011 ; Yan *et al.*, 2008). Après adsorption, les composés biodégradables (particulaires ou solubles), subissent une hydrolyse pour produire des substances facilement assimilable par les bactéries. Cette étape implique plusieurs enzymes extracellulaires: estérases, carbohydrases, lipases et protéases utilisées pour convertir les molécules de haut poids moléculaire (colloïdes, les molécules d'acides humiques et des composés de particules) en molécules plus simples. Ces molécules simples peuvent ainsi traverser la membrane cellulaire comme nutriments pour les microorganismes. Cependant, à ce jour, il existe peu d'information concernant les conséquences d'un traitement basse température sur l'activité métabolique des organismes : activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme et activité respiratoire.

**Objectifs :** L'objet de ce chapitre est donc d'étudier les conséquences de l'introduction d'un traitement thermique basse température (90 °C, 2h) sur l'activité métabolique des organismes et en particulier lorsque ces derniers sont soumis à la présence d'un élément toxique. L'élément toxique choisi est le cadmium. Le cadmium est un métal toxique pour l'homme et pour l'environnement. Sa toxicité est connue depuis les années 50, et porte principalement sur des atteintes au niveau du foie et des reins. D'autre part, il a été démontré que des formes inorganiques du cadmium conduisent à la formation de tumeurs malignes chez l'animal.

Du fait d'une probable « fragilité » accrue des boues après traitement thermique, on peut s'interroger sur les potentiels effets d'une exposition au cadmium. Afin de mettre en exergue les potentiels effets de l'exposition des boues au cadmium sur les activités respiratoires et enzymatiques les concentrations en cadmium utilisées varient de 1 à 100 mg/L.

L'activité respiratoire a été mesurée au cours du processus de stabilisation aérobie et présentée en terme de profils CO<sub>2</sub>, plus stables que ceux de l'O<sub>2</sub>.

La matrice de boues activées est constituée de matière organique (80 % environ pour les boues testées) issue des eaux usées et des bactéries et de matière minérale. Cette matière organique étant principalement constituée de lipides, protéines, d'acides humiques et glucides. Les activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme de dégradation (enzymes hydrolytiques principalement) ont donc potentiellement un rôle crucial dans l'efficacité de la digestion. Ainsi, les principales activités hydrolytiques (lipases, protéases, glucosidases) ont été étudiées afin d'évaluer le potentiel effet du traitement thermique sur les activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme.

Ce travail a fait l'objet d'une publication qui vient d'être soumise en Novembre 2011.

## REFERENCES

**Bougrier C., Delgenes J.P. and Carrère H. (2006)** *Combination of thermal treatments and anaerobic digestion to reduce sewage sludge quantity and improve biogas yield*, Process Saf. Environ. Protect., 84, (B4), pp. 280–284.

**Camacho P. (2001)** *Excess sludge process reduction by physical or chemical and biological coupling. (Etude de procédés de réduction de la production de boues par couplage de traitement physique ou chimique et biologique)*. Ph.D. thesis, Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse, France.

**Héry M., Sanguin H., Perez Fabiel S., Lefebvre X., Vogel T.M. and Paul E. et alfenore S. (2010)** *Monitoring of bacterial communities during low temperature thermal treatment of activated sludge combining DNA phylochip and respirometry techniques*. Water Research, 44, pp. 6133–6143.

**Laurent J., Casellas M., Carrère H. and Dagot C. (2011)** *Effects of thermal hydrolysis on activated sludge solubilization; surface properties and heavy metals biosorption*. Chemical Engineering Journal, 166,(3), pp. 841-849.

**Prorot A., Laurent J., Dagot C. et Leprat P. (2011)** *Sludge disintegration during heat treatment at low temperature: A better understanding of involved mechanisms with a multiparametric approach*. Biochemical Engineering Journal, 54, (3), pp. 178-184.

**Salsabil M.R., Laurent J., Casellas M. and Dagot C. (2010)** *Techno-economic evaluation of thermal treatment, ozonation and sonication for the reduction of wastewater biomass volume before aerobic or anaerobic digestion*. Journal of Hazardous Materials, 174, pp. 323–333.

**Yan S.T., Kazuhiko M., Xing X.H. and Yasunori T. (2008)** *Succession of bacterial community and enzymatic activities of activated sludge by heat-treatment for reduction of excess sludge*. Biochemical Engineering Journal, 39, pp. 598–603.

# ANALYSIS OF THE EFFECTS OF LOW THERMAL TREATMENT ON ACTIVATED SLUDGE SENSITIVITY TO CADMIUM DURING AEROBIC BATCH TESTS EXPERIMENTS: RESPIROMETRIC AND ENZYMATIC ACTIVITIES MEASUREMENTS

Kais Jaziri <sup>a</sup>, Magali Casellas <sup>a</sup>, Julien Laurent <sup>b</sup>, Christophe Dagot <sup>a</sup>

Submitted November 2011.

<sup>a</sup> Groupement de Recherche Eau Sol Environnement, EA 4330, Site de l'ENSIL, Parc ESTER Technopôle, 16 rue Atlantis, 87068 Limoges Cedex, France

<sup>b</sup> Institut de Mécanique des FLuides et des Solides, FRE 3240 ENGEES-CNRS, Université de Strasbourg, 2 rue Boussingault, 67000 Strasbourg, France

## Abstract

The effects of low thermal treatment on activated sludge sensitivity to cadmium were assessed through respirometric (CO<sub>2</sub> production basis) and enzymatic activities (lipase, protease, glucosidase) measurement. Low thermal sludge pre-treatment (90°C, 2h) was used previous to aerobic digestion in order to enhance sludge reduction. Different cadmium concentrations were added (from 1 to 100 mg/L) at the beginning of aerobic sludge digestion. Cadmium effect on CO<sub>2</sub> production was noticeable from 5 mg/L, for treated and non treated sludge. A saturation-type relationship was used to put in relation qCO<sub>2max</sub> inhibition and the respective metal concentration of cadmium. Thermally pre-treated sludge was submitted to more important inhibition compared to untreated sludge for cadmium concentrations above 10 mg/L. The maximum values of inhibition level (I<sub>max</sub>) were respectively equal to 72% and to 40.2% respectively for thermally treated and untreated sludge. The assessment of cadmium concentration which inhibited 50% of qCO<sub>2max</sub> (K<sub>I</sub> or IC50) revealed that there were no real differences between treated and non treated sludge because the concentration value was slightly above 3 mg/L in both cases. In the conditions of the experiment, most of the cadmium being in a particulate form, the toxicity level of cadmium in regard to CO<sub>2</sub> production could be related to the total metal concentration. The effect of low thermal treatment on enzymatic activities sensitivity to cadmium was also studied. The main enzymatic activities implicated in aerobic

sludge biodegradation were investigated: lipase, protease and glucosidase. Heat treatment led to better enzymatic residual activity during aerobic digestion compared to non treated sludge. It was not possible to evidence any cadmium inhibition on these enzymatic activities.

**Keywords:** Low thermal treatment; activated sludge aerobic batch test; respirometry; enzymatic activities; Heavy metals

**CHAPITRE 5 – EFFETS D’UN PRETRAITEMENT  
THERMIQUE BASSE TEMPERATURE (90°C, 2H) SUR LA  
DIVERSITE DES POPULATIONS BACTERIENNES, SUR LES  
PERFORMANCES DE REDUCTION DE BOUE : RESULTATS  
OBTENUS SUR LA BOUCLE DE RECIRCULATION AU  
NIVEAU DE LA FILE EAU ET AU NIVEAU DE L’ETAPE DE  
STABILISATION SUR LA FILE BOUE**



**Contexte :** Dans ce chapitre nous nous sommes particulièrement intéressés à la mise en œuvre d'un prétraitement thermique basse température (90°C, 2h) soit sur la boucle de recirculation d'un procédé à boues activées classique soit en amont de l'étape de stabilisation aérobie des boues (Figure 5-1).

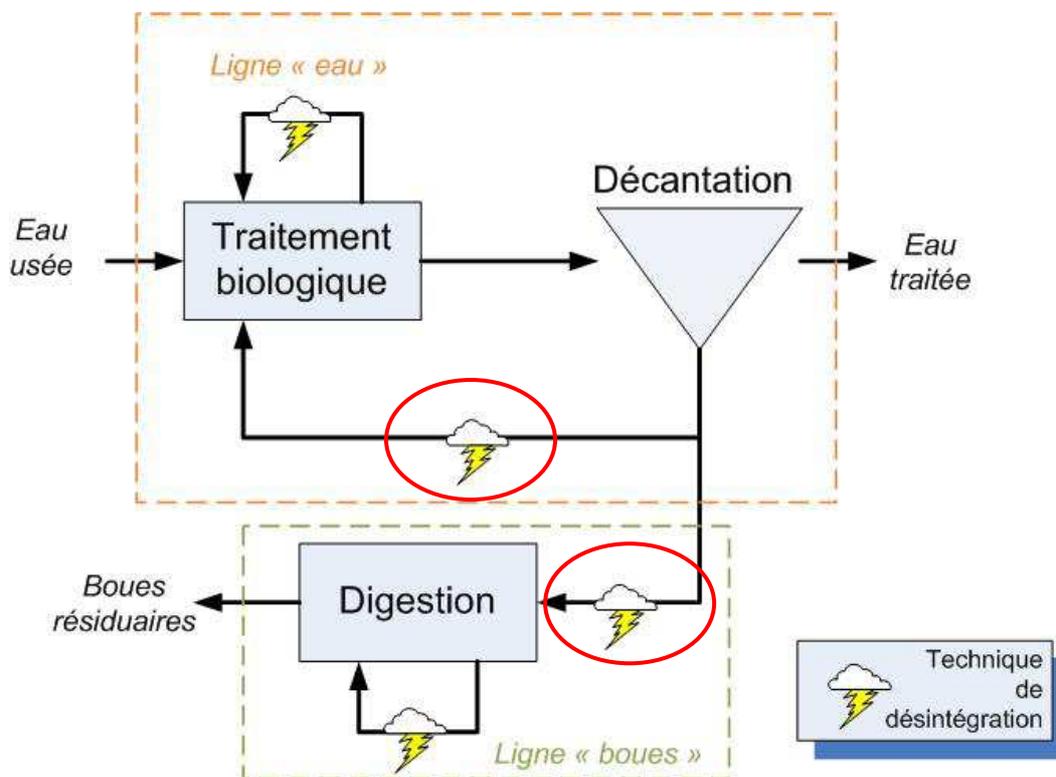


Figure 5-1. Positionnement du prétraitement thermique lors des études sur la file eau et sur la file boue

Au cours de cette étude, nous avons cherché à évaluer d'une part les performances de réduction de boues mais aussi les potentielles perturbations induites par la mise en œuvre d'un prétraitement thermique soit sur le fonctionnement du procédé en lui-même soit sur les populations microbiennes. La possibilité d'utiliser la PCR-DGGE, outil de biologie moléculaire, pour suivre l'évolution des communautés microbiennes dans un procédé et pour l'évaluation des effets du prétraitement, du procédé (digestion aérobie) et des métaux a été explorée.

### **Apports de la technique de PCR-DGGE à la mise en évidence de l'effet des prétraitements ou des métaux sur les populations microbiennes**

L'analyse PCR-DGGE des amplicons donne un profil complexe sur gel, qui peut être très sensible à la dynamique spatio-temporelle. Cette technique est couramment utilisée dans la caractérisation des empreintes moléculaires de la communauté bactérienne et pour analyser la

population bactérienne dans des environnements différents et la dynamique de la population (Muyzer *et al.*, 1997 ; Benlloch *et al.*, 2002). L'analyse reste reproductible, fiable, relativement facile à utiliser, rapide, permet le screening d'échantillons multiples et reste un outil de dépistage relativement peu coûteux. Certains travaux ont fait appel à cette technique afin de mettre en évidence l'impact des procédés ou de micropolluants notamment les métaux.

→ Des études précédentes utilisées avec succès ont montré que cette technique permettait de révéler l'impact des procédés de réduction de la production des boues sur les communautés microbiennes (Tableau 5-1). Par exemple, le traitement thermique des boues conduit à une augmentation de populations spécifiques qui sont les bactéries thermophiles appartenant à la classe des *Bacillis* (Yan *et al.*, 2008). Récemment, Tan *et al.* (2010) ont démontré qu'il y avait un changement dans les consortiums microbiens après un traitement thermique-alcalin à 60 °C et pH 7 et que les bactéries dominantes appartenaient à l'espèce *Bacillus* thermotolérante. Ils ont aussi montré qu'un traitement thermique associé à une solution alcaline de pH élevé (13) présente des modifications plus prononcées de la population bactérienne comparée au traitement à 60 °C seul. L'analyse DGGE a révélé un pourcentage de dissimilarité de 40 % de la population bactérienne en comparant un réacteur alimenté ou non avec des boues traitées à l'ozone (Yan *et al.*, 2009).

Yan *et al.* (2009), ont montré qu'à des doses supérieures à 0.02g O<sub>3</sub>/g MES, les changements de la communauté s'accroissent avec la disparition des bandes DGGE. D'autre part, l'analyse DGGE a révélé un pourcentage de dissimilarité de 40 % au cours de la stabilisation biologique des boues ozonées par comparaison à des boues non traitées.

Tableau 5-1. Récapitulatif des procédés affectant les populations microbiennes démontré par PCR-DGGE

Type de prétraitement	Type de mise en œuvre	Durée du test	Effets sur la biomasse	Référence
NaOH 10 M pH7, pH 11, pH 13 60 °C (24h)	Fed batch : acclimatation par remplacement tous les deux jours de la moitié du volume par des boues traitées	8 jours	pH 11 : conditions optimales en terme de réduction de boues mais modifications importantes des populations Genre Bacteroidetes et protobacteries prédominants	Tan <i>et al.</i> , 2010

	continu (procédé ATAD : digestion aérobie autothermal thermophilique)	234 heures	Apparition d'espèces thermophiles et disparition d'espèces moins thermotolérantes	Liu <i>et al.</i> , 2010
pH≈7 NaOH 3N 35 °C, concentration de lactosérum ajoutée telle que DCO soluble =5mg/L	Batch (CSTR : réacteur anaérobie complètement agité en mode batch) traitement des eaux usées enrichies de perméat de lactosérum en poudre	33 jours	Prédominance de l'espèce <i>Aeromonas</i> au début du procédé ainsi que diverses espèces de <i>Clostridium</i> . La population bactérienne est significativement modifiée au cours du temps.	Lee <i>et al.</i> , 2008
Thermique 90 °C (1h/jour)	procédé à boues activées incluant un traitement thermique au niveau de la boucle de recirculation. Alternance de phase d'oxygénation et d'anoxie	65 jours	Disparition de certaines souches dominantes notamment les nitrifiantes mésophiles ainsi que l'apparition/intensification d'autres bactéries thermophile et/ ou thermotolérantes	Laurent <i>et al.</i> , 2011
Ozonation (0.15 g O3/g MES) 300 ml de boues de recirculation traitée/ jour	procédé à boues activées incluant un traitement à l'ozone au niveau de la boucle de recirculation.	122 jours	le pilote traité présente des différences de l'ordre de 40 avec le pilote témoin. au début du procédés certaine bactérie telles que <i>Sphaerotilus sp.</i> , <i>Unclassified nitrosomonas...</i> étaient prédominantes. Il y a eu apparition d'autres espèces pour le piloté traité.	Yan <i>et al.</i> , 2009

→ Les effets des métaux sur les populations de boues activées peuvent aussi être mesurés par des techniques de biologie moléculaire. Ainsi, Tsai *et al.* (2005) montrent que des boues activées alimentées avec un effluent contenant 5 mg/L de cadmium présentent des caractéristiques de population très différentes des boues activées natives. Les bactéries très impliquées dans l'élimination des nutriments (i.e., les bactéries nitrifiantes *Nitrosomonas communis*), les bactéries formant des floes *Zooglea ramigera* et des bactéries accumulant le phosphore (*Rubriviax gelatinosus*) disparaissent dans le réacteur alimenté avec 5 mg/L de Cd générant une diminution des activités épuratoires correspondantes.

L'application de la DGGE à des sols enrichis en eaux usées contaminées par des métaux lourds a révélé des différences dans la structure de la communauté archaéa relatives à la contamination croissante en métaux lourds (Sandaa *et al.*, 1999). De même, dans un compost pollué en cadmium, de nouvelles bandes ont émergé dans la première phase d'incubation, et certaines bandes ont disparu dans le stade final de l'incubation (Chen *et al.*, 2010).

**Objectifs :** L'objectif de ce chapitre sera donc d'étudier dans quelle mesure l'introduction d'un procédé de désintégration sur la file eau ou sur la file boue impacte les performances du procédé en termes de dépollution et en termes de diversité microbienne. Les performances des procédés ont été évaluées dans les deux cas (file eau et file boue) et comparées à celles de boues non pré-traitées. La diversité des populations bactériennes a été suivie par la technique de PCR-DGGE. Dans le cas de la mise en place du PRPB en amont de l'étape de stabilisation aérobie, une attention particulière a été portée à la potentielle modification de la sensibilité des boues à un élément toxique le Cadmium.

Ce travail a fait l'objet de deux publications l'une acceptée dans *Process Biochemistry*, (doi:10.1016/j.procbio.2011.06.007) et l'autre est soumise en Novembre 2011.

## REFERENCES

**Benloch S., Lopez-Lopez A., Casamayor E.O., Ovreas L., Goddard V., Daae F.L., Smerdon G., Massana R., Joint I., Thingstad F., Pedros-Alio C., Rodriguez-Valera F. (2002)** *Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern.* *Environ Microbiol.*, 4, pp. 349-360.

**Chen J.M., Zhou Y.Y., Chen D.Z. et Jin X.J. (2010)** *A newly isolated strain capable of effectively degrading tetrahydrofuran and its performance in a continuous flow system.* *Bioresources Technology*, 101, (16), pp. 6461–6467.

**Laurent J., Jaziri K., Guignard R., Casellas M. et Dagot C. (2011)** *Comprehensive insight of the performances of excess sludge reduction by 90°C thermal treatment coupled with activated sludge at pilot scale: COD and N removal, bacterial populations, fate of heavy metals.* Process Biochem., doi:10.1016/j.procbio.2011.06.007.

**Lee C., Kim J., Shin S.G. et Hwang S. (2008)** *Monitoring bacterial and archaeal community shifts in a mesophilic anaerobic batch reactor treating a high-strength organic wastewater.* FEMS Microbiology Ecology, 65, 3, pp. 544–554.

**Liu S.G., Song F.Y., Zhu N.W., Yuan H.P. et Cheng J.H. (2010)** *Chemical and microbial changes during autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD) of sewage sludge.* Bioresource Technology, 101, pp. 9438–9444.

**Muyzer G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H. et Wawer C. (1997)** *Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology.* Molecular Microbial Ecology Manual 3.4.4, pp. 1–27.

**Sandaa R.A., Torsvik V., Enger Ø., Daae F.L., Castberg T. et Hahn D. (1999)** *Analysis of bacterial communities in heavy metal contaminated soils at different levels of resolution.* FEMS Microbiol. Eco., 30, pp. 237–251.

**Tan R., Miyanaga K., Toyama K., Uy D. et Tanji Y. (2010)** *Changes in composition and microbial communities in excess sludge after heat-alkaline treatment and acclimation.* Biochemical Engineering Journal. 52, pp.151–159.

**Tsai Y.P., You S.J., Pai T.Y. et Chen K.W. (2005)** *Effect of cadmium on composition and diversity of bacterial communities in activated sludges.* International Biodeterioration and Biodegradation, 55, (4), pp. 285–291.

**Yan S.T., Kazuhiko M. Xing X.H. et Yasunori T. (2008)** *Succession of bacterial community and enzymatic activities of activated sludge by heat-treatment for reduction of excess sludge.* Biochemical Engineering Journal, 39, pp. 598–603.

**Yan S.T., Zheng H., Li A., Zhang X., Xing X.H., Chu L.B., Ding G., Sun X.L. et Jurcik B. (2009)** *Systematic analysis of biochemical performance and the microbial community of an activated sludge process using ozone-treated sludge for sludge reduction.* Bioresources Technology, 100, pp. 5002–5009.

# COMPREHENSIVE INSIGHT OF THE PERFORMANCES OF EXCESS SLUDGE REDUCTION BY 90°C THERMAL TREATMENT COUPLED WITH ACTIVATED SLUDGE AT PILOT SCALE: COD AND N REMOVAL, BACTERIAL POPULATIONS, FATE OF HEAVY METALS

Julien Laurent<sup>a,b, \*\*</sup>, Kais Jaziri<sup>a, \*\*</sup>, Romain Guignard<sup>a</sup>, Magali Casellas<sup>a</sup>,  
Christophe Dagot<sup>a</sup>

**Process Biochemistry, Volume 46, Issue 9, September 2011, pp. 1808–1816.  
doi:10.1016/j.procbio.2011.06.007**

<sup>a</sup>Groupement de Recherche Eau Sol Environnement, EA 4330, Site de l'ENSIL, Parc ESTER Technopôle, 16 rue Atlantis, 87068 Limoges Cedex, France

<sup>b</sup>Institut de Mécanique des Fluides et des Solides, CNRS FRE 3240, 2 rue Boussingault, 67000 Strasbourg, France

\*\* Authors contributed equally to the work

## Abstract

A continuous lab-scale activated sludge process coupling thermal (90°C) sludge disintegration of a part of return sludge was investigated. The objective was a comprehensive characterization of the process, including both operational (sludge reduction efficiency, pollution removal, fate of micropollutants, cost analysis) and more fundamental aspects (microbial community evolutions). Thermal disintegration effectively decreased sludge production by 30% when comparing results with control reactor running in parallel. However, the solubilization of sludge compounds and the decrease of VSS concentration in the aeration tank led to a higher organic load in the reactors. This affected the overall treatment performances: COD and TSS removal efficiencies were decreased by 15%. The loss of nitrification efficiency was evidenced in the treated line and was linked with bacterial community modifications (evidenced by PCR-DGGE techniques). The similarity percentage between the control and the thermally treated sludge was equal to 59% after 9 weeks. Moreover, the fate of heavy metals (Cd, Cu) was also affected, due to sludge physico-chemical characteristics modifications: the release of copper in the treated effluent increased

and the heavy metals sludge contents was increased. A simple energy balance showed that thermal treatment could be economically viable as soon as sludge global handling cost exceeds 72€/ wet ton.

*Keywords:* thermal treatment, activated sludge, pilot, PCR, DGGE, heavy metals

# LOW THERMAL TREATMENT IMPACT ON THE EFFECTIVENESS OF AEROBIC SLUDGE DIGESTION UNDER CADMIUM EXPOSURE.

Kais Jaziri, Thibault Stalder, Magali Casellas, Christophe Dagot,<sup>a</sup>

Submitted on November 2011

Groupement de Recherche Eau Sol Environnement, Université de Limoges, 16 rue Atlantis, Parc Ester Technopôle, 87068 Limoges Cedex, France

## Abstract

A low thermal treatment (90°C, 2h) was applied to activated sludge and led 1) to organic matter solubilisation, 2) to lipase, protease, alpha and beta-glucosidase enzymatic activity decrease by 41.3%, 45.4%, 91.4% and 51.5% respectively and 3) to modifications of the bacteria population (dissimilarity percentage of 52.6% compare to the control). Thermally treated and non treated sludge were aerobically stabilised during 36 days and were exposed to increasing cadmium chloride concentrations from 0 to 100 mg/L. Low thermal treatment affected total solids and nutrient removal under cadmium exposure compared to non treated sludge. The thermal treatment also impacted the nature of the populations during aerobic digestion and led to 1) uncultured bacterium bacteroides HQ910926 disappearance, 2) a decrease of the level of cadmium sensitivity for some species (uncultured Nitrospirae sp.) and 3) an increase of the level of cadmium sensitivity for some others (uncultured Proteobacteria).

**Keywords:** *Aerobic batch test; thermal treatment minimization sludge process; biodegradability; cadmium; PCR-DGGE*

## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Les boues d'épurations constituent un déchet inévitablement généré par le traitement de l'eau. D'un point de vue structurel, les boues doivent être considérées 1) comme de véritables systèmes colloïdaux dont la forte stabilité est déterminée par la nature des propriétés de surface des colloïdes, par les interactions entre les particules et 2) comme un système réactif, siège de réactions enzymatiques et microbiennes. Les quantités de boues produites dépendent notamment de la nature et des caractéristiques physico-chimiques des eaux résiduaires, du type de traitement biologique mis en œuvre de la qualité des étapes de stabilisation et de séparation des boues.

L'étape de stabilisation des boues consiste à assurer la réduction du caractère fermentescible des boues organiques, pour éviter les nuisances, notamment l'émission de mauvaises odeurs, et minimiser les risques sanitaires.

Si la stabilisation aérobie des boues permet d'atteindre 15 à 25 % de réduction des matières organiques, rendement faible en comparaison des performances obtenues en digestion anaérobie (45 à 50 %), il est possible d'en améliorer les performances lorsqu'elle est conduite en conditions thermophiles (45 °C, 60 °C) ou si un prétraitement dit de désintégration est introduit en amont.

Ces prétraitements ont pour conséquences une modification structurelle des boues, une sélection des écosystèmes microbiens initialement présents et des réactions intrinsèques.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de différents prétraitements en vue de l'amélioration de l'étape de stabilisation aérobie. Les différents travaux menés sur le sujet ont démontré que la mise en œuvre de procédés dits de désintégrations provoquaient d'une part une amélioration de la réduction de la production de boues (Salsabil, 2008) mais d'autre part des modifications importantes de la structure physique et chimique des boues conduisant notamment à une modification du comportement des espèces métalliques (Laurent, 2009). Ces dernières observations nous ont donc amenés à compléter ces travaux, afin d'expliquer certaines hypothèses en qualifiant les modifications potentielles de l'impact de certains micropolluants (dans notre cas les métaux lourds) sur 1) l'activité de la biomasse pré-

traitée et sur 2) l'évolution de la diversité de cette même biomasse au cours du procédé de digestion ensuite.

L'objet de ce travail de recherche a donc consisté principalement à évaluer les effets de prétraitements sur le degré de sensibilité des boues à l'exposition à des espèces métalliques toxiques lors de l'étape de stabilisation.

Le plan de travail décrit dans le manuscrit rapporte les développements sur le choix des prétraitements, le choix d'un métal et le choix des mesures à réaliser. Trois prétraitements ont été choisis : le traitement thermique à basse température (95 °C, 2h), la sonication (100 000 kJ/kg MS) et l'ozonation (0.108 gO<sub>3</sub>/g TS). Les choix des doses de traitement ont été effectués en tenant compte du bon niveau de performance de réduction de boue obtenu en regard de la littérature et des études antérieures menées au laboratoire. Le métal choisi dans le cadre de cette étude est le cadmium et ce pour différentes raisons : les études préalables menées sur ce métal dans le laboratoire, sa forte toxicité pour les boues, son caractère fortement particulaire qui conduit à le retrouver plutôt dans les boues que dans les eaux de sortie, et enfin une réglementation stricte concernant sa présence dans les boues avant épandage. Ainsi, les performances du procédé, la mesure de l'activité respiratoire et des activités enzymatiques après le prétraitement et au cours de l'étape de digestion aérobie, et surtout le suivi de l'évolution des populations microbiennes par la technique de PCR-DGGE sont présentés. Concernant cette dernière technique, il s'agissait, en outre, de démontrer l'intérêt de l'utilisation de cette technique pour le suivi et le contrôle des performances des procédés.

Dans un premier temps (partie résultat chapitre III), trois types de procédés de désintégration (ozone, ultrasons, basses température) ont été mis en œuvre en amont de l'étape de stabilisation aérobie. Les performances obtenues ont été comparées et les modifications des populations bactériennes analysées. Les trois prétraitements ont conduit à la solubilisation des boues, mais les résultats, en termes d'amélioration de la biodégradabilité aérobie, et en termes de modification des populations diffèrent d'un prétraitement à l'autre.

- Le prétraitement thermique (95 °C, 2h) conduit à la lyse des cellules, à la solubilisation de la matière organique particulaire, en particulier les protéines. Au

cours de la digestion aérobie, la réduction des boues et la biodégradabilité ont été significativement améliorées.

- Le prétraitement par ultrasons (100 000 kJ/kg TS) n'a conduit à aucune modification du profil des communautés microbiennes mesuré par PCR-DGGE ce qui corrobore l'absence de lésions de l'ADN. Au cours de l'étape de digestion aérobie, la réduction des boues et la vitesse instantanée spécifique maximale de production de biogaz  $q_{\max CO_2}$  ont été améliorées. Néanmoins, la vitesse initiale de production de  $CO_2$   $V_i$ , et la production de  $CO_2$  n'ont pas été augmentées, démontrant ainsi que le prétraitement par ultrasons n'a pas réellement conduit à une amélioration intrinsèque de la biodégradabilité des boues.
- Une dose d'ozone significative a été appliquée (0,108  $gO_3/gTS$ ) lors du prétraitement des boues. Les taux de solubilisation des protéines, des substances « humiques-like » et des polysaccharides sont comparables à ceux obtenus lors d'un prétraitement par sonication. En dépit d'une dose d'ozone significative, les profils microbiens des boues obtenus par la technique de PCR-DGGE n'ont pas été modifiés. Au cours de la digestion aérobie, la vitesse initiale de production de  $CO_2$   $V_i$ , la vitesse instantanée spécifique maximale de production de biogaz  $q_{\max CO_2}$  et la production totale de  $CO_2$  ont été améliorées (20 %, 10 % et 5 % respectivement). Ces résultats montrent que la biodégradabilité aérobie des boues a été significativement améliorée suite à un traitement par ozonation.

D'autre part, cette étude a permis de démontrer que la technique de PCR-DGGE constituait un outil fiable permettant d'obtenir une vision globale de la variation de la population microbienne après l'introduction du procédé de désintégration des boues ou pendant la digestion. En effet, une reproductibilité de 100 % a été obtenue sur les échantillons. Les modifications de la diversité de la population ont été étudiées au début et à la fin de la digestion aérobie. L'étude des profils de DGGE obtenus a prouvé que: 1) le procédé de digestion aérobie conduisait à lui seul à une modification de la diversité de la population (65,5 % seulement de similarité entre le début et la fin de la digestion) ce qui correspondait à une diminution du nombre de bandes de 31 à 23, 2) l'application, même sur une courte durée, d'un prétraitement de désintégration a conduit à une modification des profils des communautés microbiennes à la fin de l'étape de digestion. Les pourcentages de dissimilarités mesurés à la fin de la digestion aérobie dans l'échantillon de contrôle et dans les boues traitées sont égaux à 23, 25 et 20 % pour le

traitement thermique, la sonication et l'ozonation respectivement. Ces écarts peuvent être attribués notamment à la disparition de certaines espèces par rapport aux boues non pré-traitées.

Pour la suite de l'étude (partie résultat chapitre IV) seul le traitement thermique basse température (90 °C, 2h) a été retenu notamment pour sa facilité de mise en œuvre. L'objet de ce chapitre était d'étudier l'impact de la mise en œuvre d'un tel prétraitement sur la sensibilité des boues au cadmium lors de l'étape de stabilisation aérobie. Les effets du cadmium sur l'activité métabolique des boues pendant la digestion aérobie ont été évalués par la mesure de l'activité respiratoire et notamment la production de CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) et à travers les principales activités enzymatiques impliquées dans la biodégradation des boues à savoir les activités lipase, protéase et glucosidase.

- Comme attendu, sans addition de cadmium, le traitement thermique à basse température (90 °C, 2h) a conduit à une augmentation de la production de CO<sub>2</sub> qui pourrait être expliquée par une meilleure accessibilité du substrat.
- Une inhibition de la respiration a été perceptible pour les boues traitées et non traitées à partir de 5 mg / L de cadmium. Une relation de type saturation a été utilisée pour corréler l'inhibition (I%) de l'activité respiratoire qCO<sub>2</sub>max à la concentration en cadmium. Les constantes du modèle KI (ou CI50) et I<sub>max</sub> ont été déterminées à partir des données expérimentales par une méthode de régression non linéaire (algorithme de Newton). Les résultats ont montré que les boues pré-traitées thermiquement ont été soumises à une inhibition plus importante de la respiration en comparaison des boues non traitées pour des concentrations de cadmium supérieures à 10 mg / L. Ces résultats ont été confirmés par la détermination mathématique de I<sub>max</sub> à partir du modèle, avec des valeurs de I<sub>max</sub> respectivement égales à 72 % et 40,2 % pour les boues traitées thermiquement et non traitées. Le calcul de la CI50 (la concentration de cadmium qui inhibe 50 % de qCO<sub>2</sub>max) a révélé qu'il n'y avait pas de différence réelle entre les boues traitées et non traitées, la valeur de concentration est légèrement supérieure à 3 mg/L dans les deux cas. Dans les conditions de l'expérience, il a été démontré que le cadmium est principalement sous forme particulaire dans les boues. Après traitement thermique, l'accumulation du cadmium dans la phase particulaire serait lié à un niveau de précipitation important avec la matière minérale solubilisée plutôt qu'à une

augmentation de la capacité de sorption des boues. Ainsi, il semblerait que le cadmium précipité serait potentiellement plus toxique que le cadmium adsorbé sur les EPS.

- Dans une deuxième étape, l'impact de l'exposition au cadmium sur les activités protéase, lipase et glucosidase a été étudié. Le prétraitement thermique a conduit à une diminution drastique des principales activités enzymatiques résiduelles (soit la lipase, la protéase et glucosidases) par comparaison aux boues non traitées. L'ensemble des activités résiduelles a diminué passant de 91,4 % à 41,3 %. Après l'étape de digestion aérobie, et excepté dans le cas de l'alpha-glucosidase, le prétraitement thermique a conduit à de meilleures activités enzymatiques résiduelles en comparaison des boues non traitées. Il n'a pas été possible de mettre en évidence une inhibition du cadmium sur les activités protéase, la lipase et glucosidase, que les boues soient traitées ou non traitées, ce qui signifie que la biodégradation aérobie n'est pas affectée à ce niveau.

Dans la dernière partie (Chapitre V), nous nous sommes attachés à comparer les effets de l'introduction d'un traitement thermique basse température soit sur la boucle de recirculation de la file eau soit en amont de l'étape de digestion aérobie. La technique de PCR-DGGE a été utilisée dans ce travail pour suivre en particulier l'impact de l'introduction d'un tel traitement sur la diversité des populations microbiennes.

- Un traitement thermique basse température (90 °C) introduit sur la boucle de recirculation d'un procédé à boues activées a permis de réduire de manière efficace la production de boues biologiques (30,4 % diminution). Cependant, la qualité de l'eau traitée a été affectée en termes de teneur en MES, DCO et élimination de l'azote. La diminution des rendements d'élimination de la DCO ou de l'azote est principalement liée dans ce cas à une augmentation du ratio F/M suite au prétraitement et à un lessivage de la biomasse autotrophe. Les modifications des conditions de fonctionnement (F/M, âge de boues) liées à l'introduction du traitement thermique ont conduit à une modification des populations bactériennes qui a été confirmée par PCR-DGGE. Après 9 semaines de fonctionnement, le pourcentage de similarité des profils de DGGE obtenus sur les boues du réacteur témoin et sur les boues du réacteur traité thermiquement a diminué jusqu'à 59 %. Ce changement a pu être lié à la perte de la capacité de nitrification dans la ligne traitée thermiquement 'ligne de traitement' (disparition de certaines bandes) et à l'apparition de "nouveaux groupes" probablement liés au développement de bactéries thermophiles. L'étude de la spéciation des métaux

lourds a montré que le traitement thermique induisait de fortes modifications : la fuite du cuivre avec les effluents traités a été fortement augmentée (de 13 % à 40 % de la sortie totale), alors que l'accumulation de cadmium dans les boues en excès a été presque doublée.

- Le même prétraitement thermique a été mis en œuvre en amont de l'étape de stabilisation aérobie. Compte tenu du niveau accru d'accumulation du cadmium observé précédemment, une attention particulière a été portée au cours de cette étude à l'effet du traitement thermique sur la sensibilité des boues au cadmium. La mise en œuvre d'un prétraitement thermique a également conduit à une modification importante de la diversité de la population de bactéries. L'analyse des profils de DGGE a révélé un pourcentage de dissimilarité de 53,6 % entre les boues traitées et non traitées. Les boues traitées thermiquement et non traitées ont été stabilisées dans des conditions aérobies mésophiles et ont été exposées à des concentrations croissantes en  $\text{CdCl}_2$  allant de 0 à  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ . Au cours de la digestion aérobie des boues pré-traitées, l'élimination des MES et des glucides n'a pas été affectée par l'exposition au cadmium. En revanche, l'élimination des substances « humiques like » et des protéines s'est révélée être sensible dans ces conditions à l'ajout de cadmium. Cela pourrait être mis en relation avec une dénaturation des enzymes suite au traitement thermique comme vu dans le chapitre II. Les modifications des populations bactériennes au cours de la digestion des boues traitées et non traitées et après exposition à des doses croissantes de cadmium ont aussi été quantifiées. Nos résultats ont démontré que les changements des communautés bactériennes permettent de suivre les modifications imposées comme le traitement thermique ou l'ajout de cadmium. Un traitement thermique basse température a conduit à des modifications importantes à la fois de la nature de la microflore et de la sensibilité des bactéries au cadmium. En effet, il a été démontré que pour certaines espèces le traitement thermique permettait de diminuer le niveau de sensibilité au cadmium et pour d'autres, de l'augmenter.

### PERSPECTIVES

Les résultats de cette étude ont montré que le fait d'introduire un prétraitement thermique pouvait modifier le comportement des boues lors de l'étape de stabilisation aérobie si ces dernières étaient exposées à un produit toxique comme le cadmium. En particulier, ce travail a démontré que l'activité respiratoire des boues traitées thermiquement était plus fortement inhibée et que l'on pouvait s'attendre à une modification plus importante de la flore avec notamment des espèces dont le seuil de résistance au cadmium était accru. En revanche, il n'a pas été possible de mettre clairement en évidence un réel effet du traitement sur 1) la sensibilité au cadmium des activités métaboliques mesurées par les rendements épuratoires et 2) les activités enzymatiques. Dans tous les cas, le traitement thermique permet d'améliorer les rendements de conversion et de maintenir à un niveau plus élevé les activités enzymatiques pendant la digestion. Enfin ce travail a permis pour la première fois en laboratoire de démontrer que l'outil de PCR-DGGE pouvait être un outil efficace pour le suivi global des populations au cours des procédés. Cependant, cet outil ne peut trouver sa pleine et complète utilisation que s'il est possible de relier une perte de fonction avec une espèce spécifique. Cet aspect a été traité en partie dans cette thèse mais il nécessiterait au laboratoire un approfondissement à travers notamment la réalisation de banques de clones permettant d'avoir une vision encore plus précise des espèces contenues dans les boues.

Ces résultats montrent qu'il est possible de sélectionner un certain type de flore susceptible de véhiculer des gènes de résistance aux métaux. D'autre part lorsque l'on sait que la résistance aux métaux est aussi souvent fortement couplée à la résistance aux antibiotiques (Torrice, 2011), sélectionner des espèces résistantes peut s'avérer doublement dangereux. Cette question nécessiterait d'être traitée en utilisant des outils de la biologie moléculaire afin de réaliser une étude des gènes de résistance portés par la flore ainsi sélectionnée.

D'autre part, il s'avère que le cadmium est d'autant plus toxique dans les boues thermiquement traitées qu'il est précipité avec la matière minérale beaucoup plus que sorbé sur les EPS. On peut donc dans un second temps s'interroger aussi sur la capacité de la boue ainsi produite à « relarguer » l'espèce métallique. Plus largement, une ouverture à ce travail consisterait à s'interroger sur la qualité des boues produites en terme de potentiel de relargage soit de gènes de résistance comme vu précédemment, soit de micropolluants (métalliques comme dans cette étude) ou de manière plus contemporaine à des micropolluants organiques

prioritaires faisant actuellement l'objet de réglementation dans les eaux. Leur étude dans les boues est certainement une perspective ambitieuse.

Dans le futur, une attention particulière devrait être accordée aux processus de minimisation des boues dans le contexte du rejet des substances prioritaires dans les écosystèmes aquatiques (Cadre européen de directive) et dans le choix des options d'élimination des boues (Terres agricoles d'épandage).

### **REFERENCES**

**Laurent J., Casellas M. ; Dagot C.** (dir.). *Modifications de la répartition d'espèces métalliques (Cd, Cu) induites par des prétraitements physique (ultrasons), chimique (ozone) et thermique au sein des procédés à boues activées.* 237 p. Thèse de doctorat, Chimie et Microbiologie de l'Eau. Limoges : Université de Limoges, (2009).

**Salsabil R., Casellas M. ; Dagot, C** (dir.). *Etude comparative des digestions aérobie et anaérobie de boues biologiques urbaines traitées par procédés physique, chimique et thermique : application pour la réduction de la production de boues.* 334 p. Thèse de doctorat, Chimie et Microbiologie de l'Eau. Limoges : Université de Limoges, (2008).

**Torrice M,** *Spreading resistance during wastewater treatment,* Chemical and Engineering News, 28 mars (2011).

## Résumé

La production de boues en France représente plus de 1 million de Tde MS/an et 15 à 20 million T/an en Europe et leur élimination pérenne devient de plus en plus problématique du fait des contraintes réglementaires, environnementales, économiques, et sociales. Depuis plusieurs années, des procédés visant à réduire la production ou le volume de boues ont été développés notamment en amont de l'étape de stabilisation. Cependant, ces traitements ont des conséquences sur la structure physique, chimique et microbiologique de la boue pouvant à terme modifier le comportement des micropolluants. Dans ce travail, l'impact de l'introduction d'un procédé de réduction de la production de boue sur i) la flore microbienne, ii) sur les activités enzymatiques et respiratoires et iii) sur la sensibilité à un micropolluant a été étudié. Le micropolluant choisi est le cadmium du fait de son occurrence potentielle dans les boues et de sa forte toxicité. L'évolution des populations microbiennes a été mesurée par PCR-DGGE.

Dans un premier temps trois types de procédés de désintégration (ozone, ultrasons, basses températures) ont été mis en œuvre en amont de l'étape de stabilisation aérobie. L'étude des profils de DGGE obtenus a prouvé que: 1) le procédé de digestion aérobie conduisait à lui seul à une modification de la diversité de la population (65,5 % seulement de similarité entre le début et la fin de la digestion) 2) l'application, même sur une courte durée, d'un prétraitement de désintégration a conduit à une modification des profils des communautés microbiennes à la fin de l'étape de digestion. Ces écarts ont été attribués notamment à la disparition de certaines espèces par rapport aux boues non prétraitées.

Plus particulièrement, les boues non traitées et traitées thermiquement (90 °C, 2h) ont été stabilisées dans des conditions aérobies mésophiles et ont été exposées à des concentrations croissantes en CdCl<sub>2</sub> allant de 0 à 100 mg.L<sup>-1</sup>. Une inhibition de la production de CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) a été mesurée pour les boues traitées et non traitées à partir de 5 mg.L<sup>-1</sup> de cadmium. Une relation de type saturation a été utilisée pour corréler l'inhibition (I%) de l'activité respiratoire qCO<sub>2</sub>max à la concentration en cadmium. Les boues prétraitées thermiquement ont subi une inhibition de la respiration plus importante en comparaison des boues non traitées, pour des concentrations de cadmium supérieures à 10 mg.L<sup>-1</sup>. Ce résultat a été mis en relation avec une accumulation accrue du cadmium dans la phase particulaire, liée à un niveau de précipitation important avec la matière minérale solubilisée. D'autre part, le prétraitement thermique permet d'améliorer les rendements de conversion et de maintenir à un niveau plus élevé les activités enzymatiques pendant la digestion. Le traitement thermique basse température a conduit à des modifications importantes à la fois de la nature de la microflore et de la sensibilité des bactéries au cadmium. Pour certaines espèces, le traitement thermique permet de diminuer le niveau de sensibilité au cadmium et pour d'autres, de l'augmenter.

**Mots clés :** PCR-DGGE, digestion aérobie, boues activées, cadmium, activité respiratoire, activités enzymatiques, traitement thermique, sonication, ozonation.