



UNIVERSITÉ  
LAVAL



Pavillon Adrien Pouliot  
Génie Civil et Génie des Eaux  
1065 avenue de la Médecine  
G1V0A6, Québec, Canada

Institut National de Sciences Appliquées,  
Département Génie des Procédés  
135 Avenue de Rangueil  
31077 Toulouse, France

# Rapport de Stage

Stage effectué du 2 juillet 2012 au 21 septembre 2012

Présenté par Mathilde Burguière

## *Fractionnement des Carbohydrates et des Lipides*

Maître de stage Peter Vanrolleghem  
Tuteur INSA: Nicolas Dietrich

Stage 4<sup>ème</sup> année GPE  
INSA Toulouse



JOHN MEUNIER



Université   
de Montréal



## Résumé

---

Le Canada bien que bénéficiant de ressources hydriques en grande quantité, est contraint de traiter ses eaux usées afin de préserver l'environnement. J'ai effectué mon stage au sein du groupe de recherche primEAU à l'Université Laval. Cette équipe étudie en détail la décantation primaire, étape essentielle dans une station d'épuration des eaux usées. La finalité du projet est d'une part améliorer les connaissances générales de la dynamique d'un décanteur primaire, et d'autre part en modéliser le fonctionnement afin d'optimiser la conception des décanteurs. Le modèle obtenu doit être compatible avec les modèles déjà existants ASM (Activated Sludge Model) et ADM (Anaerobic Digestion Model). Un dernier objectif est d'étudier l'influence de l'ajout de produits chimiques sur la performance de la décantation.

Pour mener à bien ses recherches, l'équipe utilise un pilote de décanteur primaire, construit et financé par l'entreprise John Meunier. L'appareil est installé à la station d'épuration Est de Québec et il reçoit les mêmes effluents que le décanteur réel. Une telle étude nécessite de nombreuses manipulations et séries d'échantillonnages au cours desquelles on étudie de nombreux paramètres tels que la taille et la vitesse de chute des particules, les matières en suspension, les taux de lipides, sucres, acides gras volatils, etc.

Mon stage s'est principalement focalisé sur le fractionnement des sucres totaux dans les eaux usées et les boues issues de la décantation. Un protocole avait déjà été mis en œuvre par un ancien stagiaire, cependant, les derniers résultats obtenus étaient incohérents. Dans un premier temps, une recherche bibliographique a été effectuée pour vérifier que le protocole actuel était couramment utilisé. Ensuite, une série de mesures a été réalisée pour estimer la qualité des résultats obtenus (stabilité et justesse de la droite d'étalonnage).

L'établissement d'un protocole fiable est une étape qui peut être longue mais qui est indispensable pour l'obtention de données correctes qui serviront à l'établissement du modèle.

---

Mathilde Burguière

## *Remerciements*

---

Je tiens tout d'abord à remercier Peter Vanrolleghem de m'avoir acceptée dans son équipe, et ainsi de m'avoir donnée l'opportunité de travailler dans une équipe de recherche et de découvrir le Québec.

Je remercie également Ludiwine Clouzot (post doctorante) et Sylvie Leduc (professionnelle de la recherche), pour leur soutien et leurs explications.

Je remercie également Giulia Bachis (Etudiante en doctorat) de m'avoir permis de travailler dans son projet, et pour le temps qu'elle m'accordée lors de mes premières manipulations dans le laboratoire.

Je remercie Michel Bisping (Responsable des laboratoires de recherche et d'enseignement), pour ses conseils avisés (la préparation compliquée de la solution de phénol). Je le remercie également d'avoir répondu à mes questions.

Je remercie Denis Dufour pour sa visite détaillée et instructive de la STEP EST de Québec.

Je remercie Perrine Pasquier-Meunier, pour ses conseils d'ancienne stagiaire, avant mon départ au Canada.

Merci aux relations internationales de l'INSA pour leur soutien financier.

Pour finir, je remercie l'ensemble du groupe de recherche modelEAU pour leur accueil.

---

*Mathilde Burguière*

## *Nomenclature*

---

ADM : Anaerobic Digestion Model  
ASM : Activated Sludge Model  
DCO : Demande Chimique en Oxygène  
MeS : Matières en Suspension  
MVeS : Matières Volatiles en Suspension  
SOP : Standard Operating Protocol

## Liste des figures

---

Figure 1 Université Laval.....	1
Figure 2 Pavillon Adrien Pouliot.....	1
Figure 3 Mise en place du nouveau modèle se basant sur des modèles existants.....	4
Figure 4 Fractionnement du projet, paramètres clés à déterminer.....	5
Figure 5 Montage Soxhlet.....	7
Figure 6 Soxtec 2043.....	8
Figure 7 Protocole actuel du dosage des sucres totaux.....	8
Figure 8 Protocole pour la mise en place droite d'étalonnage.....	10
Figure 9 Courbe d'étalonnage au glucose du 17/08/12.....	13
Figure 10 Courbe d'étalonnage au glucose du 21/08/12.....	13
Figure 11 Courbe d'étalonnage au glucose du 30/08/12.....	14
Figure 12 Courbe d'étalonnage au glucose du 11/09/12.....	14

## Listes des tableaux

---

Tableau 1 Etude de la justesse.....	15
Tableau 2 Analyse : Entrée décanteur primaire 21/08/12 9h30.....	15
Tableau 3 Analyse : Sortie décanteur primaire 21/08/12 9h30.....	16
Tableau 4 Analyse : Entrée décanteur primaire 21/08/12 11h30.....	16
Tableau 5 Analyse : Sortie décanteur primaire 21/08/12 11h30.....	16
Tableau 6 Analyse : Entrée décanteur primaire 11/09/12 11h30.....	16
Tableau 7 Bilan matière sur le pilote 11/09.....	17

## Sommaire

---

<b>1. Présentation du contexte du stage .....</b>	<b>1</b>
1.1. L'Université Laval .....	1
1.2. Le groupe de recherche modelEAU.....	1
1.3. primEAU.....	2
1.4. Les stations d'épuration de Québec.....	2
1.5. John Meunier.....	2
<b>2. Introduction générale.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Objectifs.....</b>	<b>4</b>
3.1. Les objectifs du projet primEAU .....	4
3.2. Les objectifs de mon stage .....	6
<b>4. Matériels et méthodes .....</b>	<b>6</b>
4.1. L'extraction des lipides.....	6
4.2. Le dosage des sucres totaux.....	8
4.2.1 Recherche bibliographique préliminaire.....	8
4.2.2 Réalisation du dosage des sucres totaux.....	9
➤ Préparation de la solution de phénol.....	9
➤ Préparation de la gamme étalon.....	10
➤ Préparation des échantillons à analyser.....	10
4.3. Mesure des MeS.....	11
4.4. Mesure de la DCO .....	11
4.5. Mesure du rapport DCO/MeS.....	12
<b>5. Résultats.....</b>	<b>12</b>
5.1. Courbe étalon de glucose .....	12
5.1.1 Les droites obtenues.....	12
5.1.2 Analyse de la qualité des mesures .....	14
➤ Etude de la justesse .....	14
➤ Ecart des mesures .....	15
5.2. Analyse des eaux usées.....	15
5.3. Analyse avec modification du protocole.....	16
5.4. Bilan .....	17
<b>6. Conclusion.....</b>	<b>19</b>
<b>7. Bibliographie .....</b>	<b>20</b>
<b>8. Annexe.....</b>	<b>21</b>
3.1 Interférence.....	21
3.2 Limite de détection .....	21
3.3 Limite de quantification .....	21
3.4 Fidélité .....	22
3.5 Réplicabilité .....	22
3.6 Reproductibilité.....	22
3.7 Justesse .....	22
5.1 Matériel.....	22
5.2. Équipement .....	23

➤ Eau déminéralisée.....	23
➤ Solution mère (20g/L de glucose).....	23
➤ Solution phénol 5% (m/v).....	23
<b>6.4. Acide sulfurique concentré de type ACS .....</b>	<b>24</b>
<b>7.1. Conditions d'opération.....</b>	<b>24</b>
<b>7.2. Étapes de manipulations.....</b>	<b>24</b>
7.2.1 Préparation des tubes .....	25
7.2.2 Préparation des échantillons pour la courbe étalon.....	25
7.2.3 Préparation des échantillons d'eau usée .....	26
7.2.4 Préparation des échantillons de boues.....	27
7.2.5 Fractionnement des échantillons.....	27
7.2.6 Lecture au spectrophotomètre.....	28
<b>7.3. Ajouts dosés.....</b>	<b>29</b>
<b>7.4. Étalonnage .....</b>	<b>30</b>



## 1. Présentation du contexte du stage

### 1.1. L'Université Laval

L'Université Laval est actuellement l'une des plus grandes universités du Canada. Elle fut la première université francophone en Amérique du Nord, créée en 1663 par Mgr François de Montmorency-Laval, sous l'appellation le Séminaire de Québec. Ce n'est qu'en 1752, que l'université devient Université Laval, elle devient ainsi l'une des plus grands établissements supérieurs de l'époque. A partir des années 60, la recherche se développe de façon fulgurante. Actuellement, elle compte 257 groupes de recherches et possède un budget de 280 millions de dollars. Elle possède 79 chaires de recherche du Canada et 37 centres de recherche. Ses recherches sont



Figure 1 Université Laval



Figure 2 Pavillon Adrien Pouliot

variées, elles s'étendent à divers domaines tels que : la neuroscience, l'optique, l'environnement, la génomique.

Elle est classée parmi les 7 premières universités du Canada. Elle propose plus de 392 programmes d'étude et accueille plus de 44000 étudiants dont 4000 étudiants provenant de 110 pays.

L'université est implantée dans un cadre remarquable, elle dispose de nombreux parcs et propose une quantité de services aux étudiants, structure idéale pour les études<sup>1</sup>.

### 1.2. Le groupe de recherche modelEAU

modelEAU a été créé en février 2006 par Peter Vanrolleghem, suite à la chaire de recherche du Canada en modélisation de la Qualité de l'Eau qui lui a été décernée. L'équipe est composée de 15 étudiants gradués (doctorats et maîtrises), de trois post doctorants et de deux professionnels de recherche. Souvent de nombreux stagiaires intègrent pour quelques mois cette équipe dynamique et chaleureuse.

L'objectif du groupe de recherche modelEAU est l'amélioration de la qualité des données relatives aux systèmes d'eau, tels que les eaux en bassins versants, rivières urbaines, réseaux d'égout, et le développement de nouveaux modèles et logiciels.

<sup>1</sup> : <http://www2.ulaval.ca/accueil.html>

Le groupe travaille sur plusieurs projets simultanément tels que :

- primEAU : modélisation dynamique de la décantation primaire ;
- monEAU : station de mesure automatisée de la qualité de l'eau ;
- alEAU : contrôle du système d'injection de coagulant-floculant dans les décanteurs primaires et leur modélisation.

### *1.3.primEAU*

Le projet primEAU, projet dans lequel je suis impliquée, est dirigé par le professeur Peter Vanrolleghem et codirigé par le professeur Paul Lessard. Ce projet est en lien direct avec la thèse de doctorat de Giulia Bachis. L'objectif est de mettre en place un modèle mathématique de décantation primaire, étape prépondérante dans le traitement des eaux usées. Ce nouveau modèle doit pouvoir être connecté aux modèles standard de type ASM et ADM. Ces modèles simulent respectivement les procédés biologiques à boues activées et la digestion anaérobie. Ils sont couramment utilisés dans le traitement de l'eau usée. L'établissement d'un tel modèle sera utile pour l'amélioration de l'opération et conception des décanteurs primaires (partie détaillée dans les objectifs du projet 2.1.1). Le projet primEAU utilise un pilote, mis à sa disposition par John Meunier, qui se situe dans la station Est de Québec. L'eau d'entrée est prélevée en amont des décanteurs primaires de la station et pompée vers le pilote.

### *1.4.Les stations d'épuration de Québec*

Les deux stations de la ville de Québec (Est et Ouest) traitent les eaux usées de la ville avant que ces dernières soient rejetées dans le Saint Laurent. Plus de 400 millions de litres d'eau sont traités par jour. Les eaux subissent plusieurs étapes de traitement avant d'être rejetées dans l'environnement. Tout d'abord, un dégrilleur permet de retenir les déchets plus volumineux, ensuite les eaux subissent une étape de dessablage dans laquelle les grosses particules tombent au fond du bassin. Ensuite, la décantation a lieu et les matières en suspension décantent au fond du bassin. Après, les eaux passent à travers des biofiltres où les matières organiques sont biodégradées. Pour accélérer ce phénomène naturel, des coagulants et floculants pouvant être ajoutés. Pour finir les eaux sont désinfectées par traitement UV et sont ensuite rejetées dans le fleuve.

Les eaux sortant de la station sont soumises à des normes définies par le Ministère des Affaires Municipales, des Régions et de l'occupation du Territoire (MAMROT)<sup>2</sup>

### *1.5.John Meunier*

John Meunier la une filiale canadienne de l'entreprise française Veolia et représente un des partenaires financiers du projet primEAU. Elle assure aussi son suivi technique à travers des réunions semestrielles qui se tiennent entre l'équipe de recherche primEAU et les industriels, afin de suivre l'avancée des opérations.

---

<sup>2</sup> : [http://www.ville.quebec.qc.ca/environnement/eau/traitement\\_eaux\\_usees.aspx](http://www.ville.quebec.qc.ca/environnement/eau/traitement_eaux_usees.aspx)

## 2. Introduction générale

Le traitement des eaux est devenu un enjeu majeur pour la sauvegarde de l'environnement. L'augmentation des activités humaines et de la population ont mis en évidence qu'il est nécessaire d'avoir une meilleure gestion de l'eau, à savoir, réduire la consommation de l'eau et la traiter, afin d'obtenir des rejets de qualité satisfaisante.

Le Canada, bien que bénéficiant de nombreuses ressources en eau douce (environ 7% des réserves mondiales), doit impérativement maîtriser sa consommation en eau. En effet, plusieurs phénomènes (pénuries périodiques d'eau, conflits au niveau d'accès de cette ressource) ont montré qu'il existe des lacunes dans la gestion des eaux. La ville de Québec n'est pas épargnée, et pour mieux gérer cette ressource, en 1992, la ville s'est dotée de stations d'épuration<sup>3</sup>.

Jusqu'en 1992, les eaux de la ville de Québec étaient directement rejetées dans le fleuve Saint-Laurent et dans la rivière Saint-Charles après un passage dans un dégrilleur. Ce simple traitement a causé des dommages sur les eaux du fleuve, la ville s'est alors équipée de stations d'épuration (Est et Ouest). Les eaux de la ville sont traitées dans l'une ou l'autre des stations. Plus de 400 millions de litre d'eau sont traités par jour. Les eaux subissent plusieurs étapes de traitement avant d'être rejetées dans l'environnement. Tout d'abord, un dégrillage permet de retenir tous les gros déchets, ensuite les eaux subissent une étape de dessablage, déshuilage et dégraissage. S'ensuit une étape de décantation, étape très importante pour la séparation des matières solides. Ensuite, l'eau est traitée par biofiltration. Les boues primaires sont après envoyées vers des épaisseurs, pour finir elles sont incinérées. Les eaux traitées, quant à elles, sont traitées par traitement UV et sont rejetées dans le fleuve.

Dans le but d'améliorer les capacités de traitement de la station d'épuration et de réduire les coûts, il est intéressant d'étudier de façon précise la décantation, étape prépondérante du traitement. Ainsi, c'est dans cet objectif que s'inscrit la thèse de Giulia Bachis et le projet de l'équipe primEAU. Cette dernière souhaite développer un modèle pouvant se connecter aux modèles de type ASM et ADM déjà existant, en prenant en compte de nouveaux facteurs. Pour mener à bien, la compagnie John Meunier, la filiale de Veolia au Canada, a installé un pilote à la station, modèle en taille réduite du décanteur primaire réel.

Grâce à ce pilote, de nombreuses analyses ont été menées afin de déterminer informations différentes. Ainsi, des bilans de matières, la distribution de la vitesse de chute et la taille des particules ont été étudiées. Le taux d'acides gras volatils, de lipides, et de carbohydrates doit également être étudiés. Au cours de mon stage je vais étudier plus spécifiquement le fractionnement des carbohydrates et des lipides. Ces diverses analyses nécessitent la mise au point du protocole d'essai, afin d'obtenir des résultats exploitables.

---

<sup>3</sup> : <http://www.ec.gc.ca/eau-water/>

### 3. Objectifs

#### 3.1. Les objectifs du projet primEAU

Le projet primEAU est dirigé par Peter Vanrolleghem, le co-directeur est le professeur Paul Lessard. Ce projet est le sujet du doctorat de Giulia Bachis. primEAU a trois objectifs principaux :

- améliorer les connaissances de la dynamique des décanteurs primaires, afin d'optimiser leur conception.
- développer un nouveau modèle pour les clarificateurs primaires, modèle transposable aux modèles ASM/ADM déjà existants.
- étudier l'ajout de produit chimique, afin de maximiser la DCO présente dans le digesteur anaérobie des boues qui serviront à la production de méthane.

Augmenter la concentration en DCO dans les boues issues du décanteur primaire aura pour conséquence de produire plus de biogaz, et par conséquent plus d'électricité. À long terme, la station pourrait devenir auto-suffisante en énergie. Ainsi, il est nécessaire de connaître de façon détaillée les caractéristiques du décanteur et plusieurs facteurs, tels que les vitesses de chute des particules, et voir quels phénomènes physico-chimiques peuvent l'influencer.

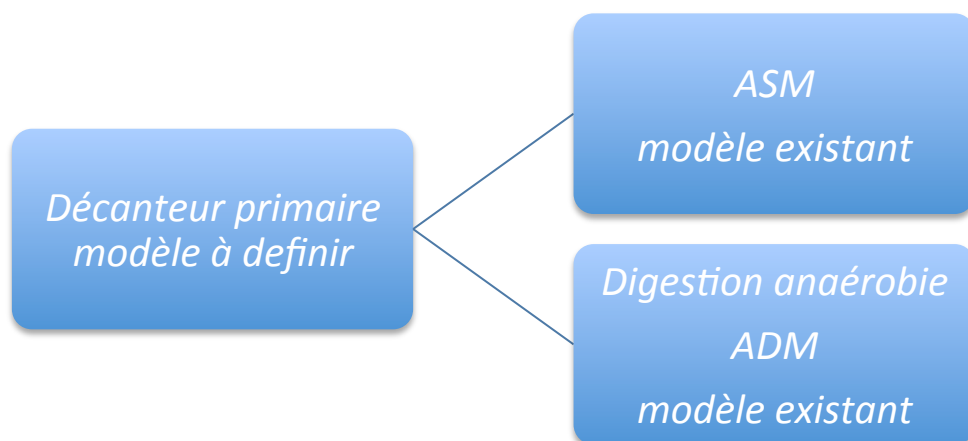
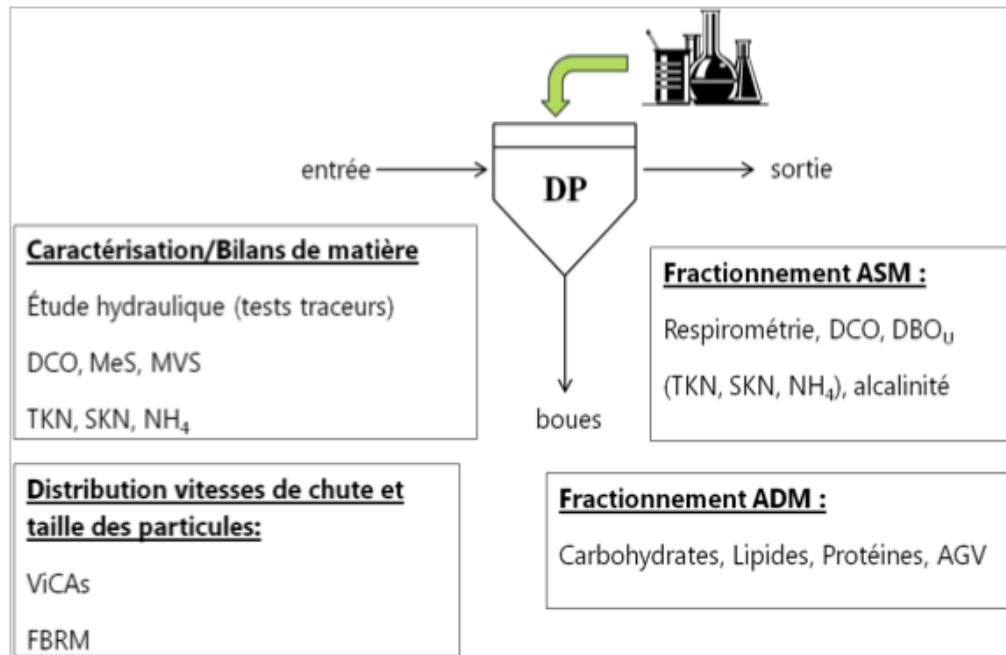


Figure 3 Mise en place du nouveau modèle se basant sur des modèles existants

L'établissement d'un tel modèle doit permettre une amélioration des performances du décanteur et ainsi de réduire les coûts de traitements.

Puisque la connexion avec les modèles ASM/ADM demande la connaissance de différentes variables, plusieurs analyses sont nécessaires afin de pouvoir développer le modèle. Ci-dessous un schéma récapitulant les différents paramètres qu'il est nécessaire de connaître :



**Figure 4 Fractionnement du projet, paramètres clés à déterminer**

Le projet a été lui-même fractionné, pour le rendre le plus optimal possible. Une partie de l'équipe a travaillé plus spécifiquement sur les bilans de matières des effluents en entrée et sortie du décanteur primaire. Les études sont finies, les protocoles pour ces tests-ci sont validés (étude de la répétabilité, reproductibilité, justesse des manipulations). Plusieurs tests traceurs ont également été réalisés pour étudier l'hydraulique du système.

Une étudiante à la maîtrise, Imen Bel Hadj, était en charge de l'étude de la distribution des vitesses de chute et de la taille des particules, secondée par la stagiaire Virginie Lauret. Pour mener à bien leurs projets, elles ont utilisé le FBRM, outil permettant de déterminer la distribution des tailles des cordes des particules, et le protocole ViCAs (Vitesse de Chute en Assainissement), développé par l'INSA de Lyon, qui permet de déterminer la vitesse de chute des particules en fonction de la concentration de ces dernières. Ces méthodes se sont avérées très efficaces en conditions normales. Il faudra ultérieurement les analyser sous l'influence de l'ajout de produits chimiques.

L'étude des caractéristiques propres au fractionnement ASM ont été étudié (ou en cours d'étude) par différents stagiaires et des protocoles de mesures ont été mis au point, notamment l'analyse par respirométrie et la mesure de la DBO ultime.

Pour la partie ADM, une étude sur les acides gras volatils a été menée (protocoles réalisés par des stagiaires), les résultats obtenus sont encourageant. Dans le cas des sucres et des lipides, il était nécessaire de vérifier et de réadapter les protocoles, c'est la partie dont j'ai été en charge.

Enfin, l'équipe primEAU travaille également en collaboration avec une équipe de recherche de l'Université de Montréal, qui étudie plus spécifiquement les micropolluants. Un modèle pour les micropolluants pourra ainsi être développé et ajouté à ce modèle original.

### *3.2. Les objectifs de mon stage*

Au cours de mes trois mois de stage, dans un premier temps j'ai dû vérifier le rapport DCO/MeS des eaux du décanteur primaire. En effet, les rapports obtenus auparavant présentaient des incohérences, peut-être à cause d'erreurs d'analyses

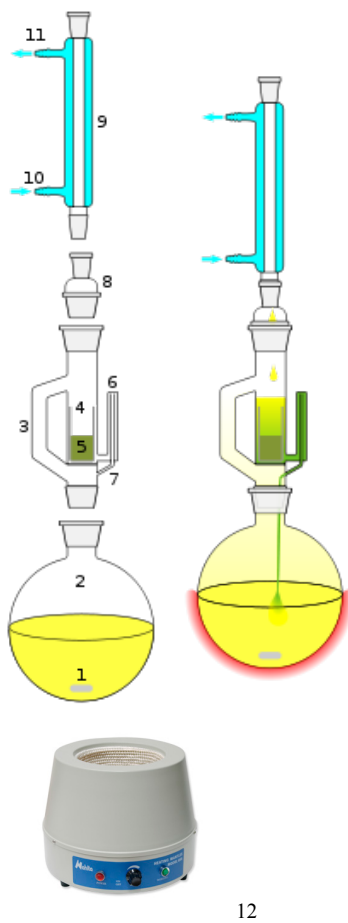
De plus, il a fallu retravailler sur le protocole du dosage des sucres. Ce dosage avait été étudié par des précédents stagiaires mais il avait montré dernièrement des résultats incohérents. J'ai dû donc vérifier que le protocole utilisé donne des résultats valides qui pourront ensuite être utilisés par Giulia Bachis, lors de l'établissement de son modèle. Je devais également travailler sur la mesure des lipides. Le protocole existant était long à mettre en place et il ne permettait qu'une seule analyse par jour. Un nouvel appareil devait permettre d'accélérer cette mesure, donc j'aurais dû adapter l'ancien protocole sur cette nouvelle machine. Cependant, suite à une erreur de fabrication de l'appareil permettant l'extraction des lipides, je n'ai pas pu l'utiliser. Ainsi, je ne me focaliserai que sur les recherches bibliographiques que j'ai effectuées sur cet instrument. En conséquence, pendant mon stage, je me suis essentiellement concentrée sur le dosage des sucres et sur l'amélioration du SOP (protocole rédigé de façon normalisée) correspondant à cette manipulation.

## **4. Matériels et méthodes**

### *4.1. L'extraction des lipides*

Un nouvel appareil permettant l'extraction des lipides a été livré courant juillet. Le protocole d'analyse repose sur la méthode par Soxhlet. L'échantillon à analyser est dans un premier temps acidifié, puis filtré. On récupère le filtre qui est placé dans une cartouche en cellulose. La cartouche est ensuite transférée dans le corps du Soxhlet dans lequel se fait l'extraction à l'hexane.

Le montage Soxhlet est montré ci-dessous :



- 1 Billes à ébullition
- 2 Ballon contenant le solvant (hexane)
- 3 Retour de distillation
- 4 Corps en verre
- 5 Cartouche de cellulose
- 6 Haut du syphon
- 7 Sortie du syphon
- 8 Adaptateur d'expansion
- 9 Condenseur
- 10 Entrée eau refroidissement
- 11 Sortie eau refroidissement
- 12 Chauffe ballon

Figure 5 Montage Soxhlet

La cartouche est placée comme indiqué sur le montage. L'hexane, présent dans le ballon, va chauffer, s'évaporer et se condenser dans le réfrigérant. Il va ensuite retomber dans le ballon emportant avec lui les lipides se trouvant dans la cartouche. Une fois les cycles d'extraction terminés, on récupère le contenu du ballon à l'aide de l'évaporateur rotatif. Il ne reste ensuite dans le ballon que les lipides, on peut ainsi déterminer leur masse.

Avec le nouvel appareil, le Soxtec 2043, l'extraction ne dure que 40 minutes (avant cette étape prenait plusieurs heures) et on peut réaliser 6 extractions simultanément, ce qui est un gain de temps énorme. De plus, l'ajout d'hexane se fait de façon automatique, ainsi au niveau de la sécurité la manipulation est plus sûre.

L'appareil est constitué d'une unité de contrôle qui vérifie la température et qui automatise l'ajout de solvant.



Figure 6 Soxtec 2043

## 4.2. Le dosage des sucres totaux

### 4.2.1 Recherche bibliographique préliminaire

Avant de commencer des expériences utilisant le protocole actuel sur le fractionnement des glucides, une recherche bibliographique est nécessaire, afin de voir si cette façon de procéder est couramment utilisée. Le protocole est basé sur la méthode de Dubois *et al.* (1957), décrite ci-dessous<sup>4</sup>.

- Dans un tube Hach vide insérer 1 ml de l'échantillon d'eau usée à analyser ;
- Ajouter 1ml de solution de phénol (5% p/v) ;
- Agiter au vortex ;
- Ajouter 5 ml de d'acide sulfurique concentré ;
- Chauffer 3min au chauffe-tube à 150°C ;
- Mettre à l'obscurité 30 min ;
- Lire l'absorbance à 487 nm ;
- Établir une courbe d'étalonnage avec du glucose, pour déterminer la concentration équivalente en glucose de l'échantillon étudié.

Figure 7 Protocole actuel du dosage des sucres totaux

Une recherche dans la littérature (serveur de thèses en ligne, Science Direct, les Techniques de l'Ingénieur...), a validé que le protocole employé jusqu'à présent était fréquemment utilisé. Cette méthode est relativement simple à mettre en place, de plus, le phénol est un réactif à prix abordable (en comparaison à l'antrone, autre réactif, qui peut

<sup>4</sup> Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances



être utilisé pour le dosages des carbohydrates). En outre, cette technique n'est pas spécifique à un seul sucre, et l'absorbance peut rester stable pendant plusieurs heures après la manipulation.

Cependant il peut exister des variantes au niveau des temps et technique de chauffe, par exemple 30 min à 25, 30°C au bain-marie, ou encore des longueurs d'onde de 490 nm. Dans l'ensemble, les manipulations étaient semblables<sup>5</sup>.

De plus, en analysant les résultats des anciens stagiaires, deux facteurs d'erreurs majeurs sont ressortis:

*- la solution de phénol*

Elle est préparée en grande quantité et est conservée pendant 6 mois. Lors des dernières manipulations, elle était périmée et était instable. Ainsi d'une manipulation sur l'autre, les valeurs des équations des droites d'étalonnage étaient très différentes. Il a donc fallu faire une nouvelle solution de phénol (étape expliquée dans la partie 4.2.2)

*- l'ajout d'acide sulfurique*

Plusieurs articles scientifiques expliquent que l'ajout d'acide sulfurique constitue une étape clé de cette manipulation<sup>6</sup>. Il doit se faire très rapidement, puisque la réaction qui se produit entre le phénol et l'acide sulfurique est quasi-instantanée. Idéalement l'ajout de l'acide sulfurique dans chaque tube devrait se faire au même temps. Pour réduire ce type d'erreur, on utilise désormais une dispensette pour le verser de manière rapide et homogène. Précédemment, l'ajout d'acide sulfurique était fait à l'aide d'une pipette et d'une poire à pipeter. Cela ralentissait énormément la manipulation et augmentait le risque d'erreur (notamment de grands écarts observés entre les triplicatas d'un même échantillon).

#### 4.2.2 Réalisation du dosage des sucres totaux

Vérifier le protocole pour le dosage des sucres et compléter le SOP a constitué un point clé de mon stage. Je vais donc particulièrement détailler cette partie.

➤ *Préparation de la solution de phénol*

La préparation de la solution de phénol à 5% (masse/volume) est une étape très délicate du protocole, mais le SOP existant ne la décrivait que de façon succincte. Ainsi dans les premières manipulations la solution obtenue n'était pas homogène. Le phénol, élément sous forme de cristaux, ne dissolvait pas correctement dans l'eau déminéralisée. La courbe étalon résultant de cette solution n'était pas exacte.

Une nouvelle solution de phénol a alors été préparée à l'aide de Michel Bisping, le technicien responsable du laboratoire, qui a l'expérience nécessaire pour effectuer cette manipulation de façon correcte.

La méthode la plus facile, pour dissoudre le phénol et travailler de façon la plus précise possible, consiste à travailler directement avec un flacon de phénol plein (50g). Nous en

<sup>5</sup> Thèse Anthony Massé (2004)

<sup>6</sup> The Phenol-Sulfuric Acid Test effective Alternative for Carbohydrate Analysis (Larry Benefield 1976)

préparons une grande quantité, puisque cette solution peut se conserver environ 6 mois à l'obscurité et dans la chambre froide (4°C). Dans un premier temps, il faut chauffer dans un bécher 200 ml d'eau déminéralisée au micro-onde, afin d'avoir de l'eau bouillante. Ensuite, les autres étapes se font sous une hotte car le phénol est corrosif et toxique. Pour plus de sécurité, il faudrait travailler à deux personnes. Après il faut bien mélanger le phénol et l'eau bouillante, le but étant d'obtenir un mélange liquide (cela peut être un peu long à cause des cristaux de phénol). Pour obtenir une solution parfaitement homogène, on peut transvaser le mélange eau/phénol dans une fiole jaugée de 1L à l'aide d'un entonnoir (de préférence en verre et avec grosse embouchure). La solution peut alors être mélangée à l'aide d'un barreau aimanté. Ensuite, il faut compléter avec de l'eau déminéralisée jusqu'au trait de jauge. En dernier, ce mélange est transvasé dans le contenant spécifique pour la solution, recouvert de papier aluminium, car la solution est sensible à la lumière. La solution peut se conserver 6 mois à 4°C à l'obscurité.

➤ *Préparation de la gamme étalon*

Afin de déterminer la concentration en sucre des échantillons d'eaux usées, il est nécessaire d'établir une droite étalon. Il faut préparer plusieurs solutions de glucose de concentration connue.

La manipulation devient alors :

- Dans un tube Hach vide et propre insérer 1 ml de l'échantillon d'eau usée à analyser ;
- ajouter 1ml de solution de phénol (5% p/v) ;
- agiter au vortex ;
- ajouter 5 ml de d'acide sulfurique concentré ;
- chauffer 3 min au chauffe-tube à 150°C ;
- mettre à l'obscurité 30 min ;
- lire l'absorbance à 487 nm ;
- tracer la droite d'étalonnage.

**Figure 8 Protocole pour la mise en place droite d'étalonnage**

L'établissement de cette droite est une étape primordiale pour obtenir des données utilisables. Au cours de mon stage, j'ai vérifié si le protocole était correct et s'il était nécessaire de faire la courbe étalon au cours de chaque analyse, ou bien si la vérifier avec deux ou trois points lors de chaque mesure suffisait.

➤ *Préparation des échantillons à analyser*

Les échantillons d'eau usée sont souvent trop chargés pour pouvoir les analyser tels qu'ils sont. Il faut alors les diluer à l'aide de l'eau de sortie du décanteur filtrée afin de ne pas changer la matrice. Les eaux d'entrée du décanteur primaire sont en général diluées par deux. Pour les boues, il faut diluer par 200-250. Pour ce qui est des eaux de sortie, il n'est pas nécessaire de les diluer.

#### 4.3. Mesure des MeS

On s'intéresse aux matières en suspension (MeS) de chaque échantillon, mesure qui nous donne une indication sur la quantité de particules solides insolubles présentes dans l'eau<sup>7</sup>.

Il s'agit de filtrer l'échantillon étudié à l'aide d'un Büchner. Les filtres utilisés, de 45 mm de diamètre et de 1,5 µm de diamètre de pores, sont conditionnés la veille de la mesure. Ils sont placés sur le Büchner et on verse de l'eau distillée dessus. Ensuite, ils sont placés à l'étuve à 105°C pendant deux heures. Après, afin qu'ils refroidissent dans des conditions sèches, ils sont mis quinze minutes au dessiccateur, et pesés dans des coupelles. Ce poids-là constituera la masse initiale ( $m_0$ ). À noter que pour chaque échantillon des triplicatas sont réalisés.

Lors de l'étape suivante, on filtre un volume de l'échantillon étudié. Il faut choisir un volume suffisant pour obtenir un résidu sur le filtre entre 2,5 et 200 mg, tout en faisant attention de ne pas saturer le filtre. Il faut relever le volume précis que l'on filtre ( $V$ ). Les filtres sont ensuite mis à l'étuve, et au dessiccateur, et de nouveau pesés ( $m_1$ ). C'est la différence de masse avant et après filtration qui donne la valeur en MeS (mg/L) :

$$MeS = \frac{m_1 - m_0}{V}$$

Les MVeS peuvent être mesurées après cette étape (il est nécessaire de conditionner les filtres à 550°C au préalable, au lieu de 105°C si on ne fait que les MeS), on place alors les filtres dans un incinérateur à 550°C pendant 30 min.

On pèse de nouveau les filtres ( $m_2$ ) et la différence rapportée au volume donne la valeur des MVeS. La balance utilisée pour les pesées est précise à 0,0001 g.

$$MVS = \frac{m_1 - m_2}{V}$$

#### 4.4. Mesure de la DCO

La demande chimique en oxygène (DCO) se définit comme la quantité d'oxygène consommée par les matières oxydables d'un échantillon. Elle permet de caractériser la charge polluante d'un échantillon.

Il est nécessaire de suivre la DCO et de la contrôler. L'objectif du projet primEAU est d'augmenter la concentration en DCO des boues. Il est donc essentiel de savoir quelle en est la teneur des eaux dans le décanteur primaire.

Une méthode colorimétrique est utilisée, avec des tubes Hach pré-remplis d'une solution digestive de dichromate de potassium. Pour les eaux chargées (0 et 1500mg/L), on étudie l'augmentation de la concentration des ions  $CR^{3+}$ .

La méthode consiste à introduire 2 ml de la solution étudiée dans des tubes. Après, nous agitons ce mélange et le chauffons à 150°C pendant environ 2 heures. Ensuite, après un repos à l'obscurité de 30 minutes, nous mesurons l'absorbance de ces tubes, en faisant

---

<sup>7</sup> SOP TSS (Pujadas 2010)

attention à la gamme de longueur d'onde choisie. Des programmes sont préenregistrés dans le spectrophotomètre, une courbe d'étalonnage n'est par conséquent pas nécessaire<sup>8</sup>.

#### 4.5. Mesure du rapport DCO/MeS

Il est important d'étudier le rapport DCO/MeS, afin de vérifier que les mesures de la DCO, bien que simples à mettre en œuvre, soient réalisées de façon correcte. Les valeurs du rapport DCO soluble/MeS sont environ 1,4 d'après les données de la station Est de Québec. Généralement la DCO soluble est mesurée après filtration avec filtres de taille de pores de 0,45  $\mu\text{m}$ , tandis que pour la mesure des MeS on utilise les filtres de porosité de 1,5  $\mu\text{m}$ . Or pour comparer de façon cohérente la DCO et les MES d'un même échantillon, il faut que les filtres utilisés pour les deux mesures soient les mêmes. Nous avons donc décidé d'étudier non pas la DCO soluble, mais la DCO « filtrée », à savoir, la mesure de la DCO de l'échantillon considéré après filtration par un filtre de porosité de 1,5  $\mu\text{m}$ . Dans un premier temps, il a fallu déterminer si de tels filtres n'influençaient pas la mesure de la DCO. Pour cela, on a filtré de l'eau déminéralisée et on a mesuré l'absorbance. Après cette vérification, on a pu conclure que les filtres ont une légère augmentation sur la DCO (environ 3%). La méthode a donc été approuvée, et elle sera utilisée quand on voudra calculer le rapport DCO (filtrée)/Mes.

## 5. Résultats

### 5.1. Courbe étalon de glucose

#### 5.1.1 Les droites obtenues

Pour déterminer la concentration en sucres totaux présents dans les eaux usées, il faut établir une courbe étalon. Afin de vérifier si cette dernière était stable je l'ai donc réalisée à plusieurs reprises.

Voici les différentes droites obtenues :

---

<sup>8</sup> SOP DCO (Wipliez 2010)

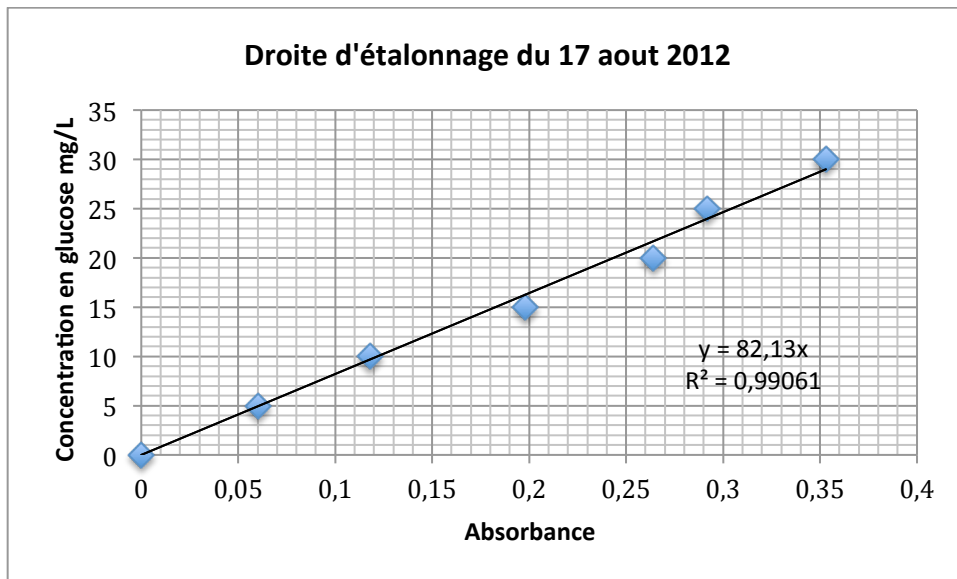


Figure 9 Courbe d'étalonnage au glucose du 17/08/12

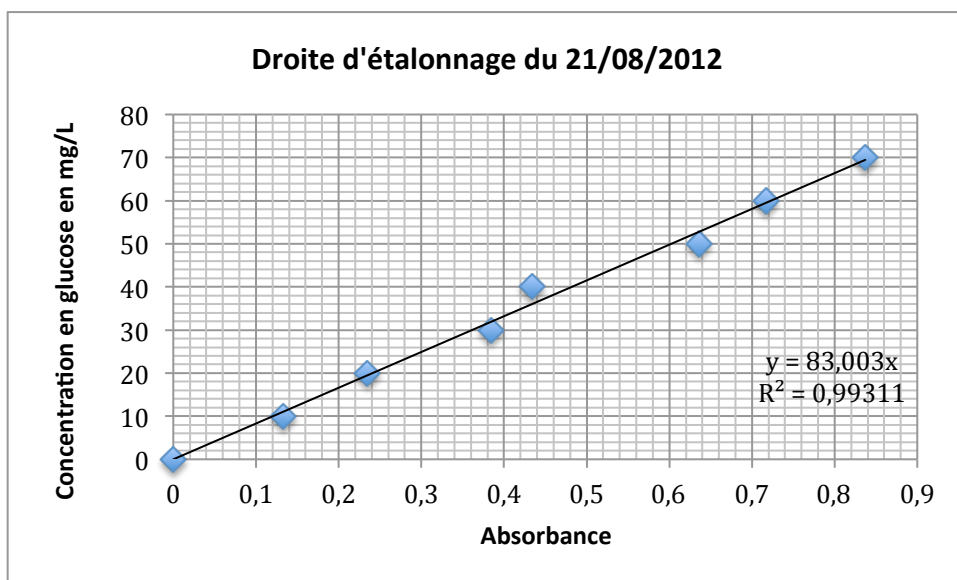


Figure 10 Courbe d'étalonnage au glucose du 21/08/12

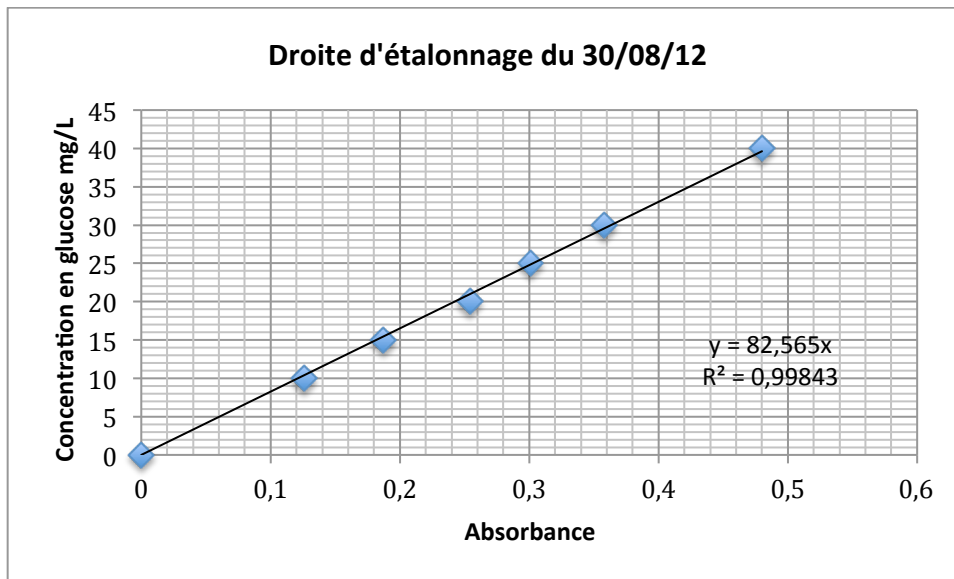


Figure 11 Courbe d'étalonnage au glucose du 30/08/12

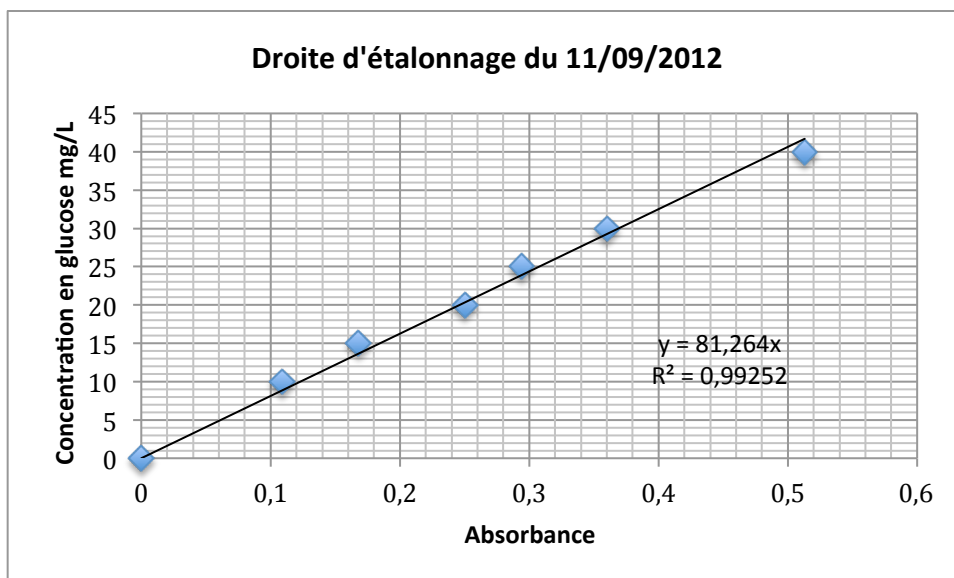


Figure 12 Courbe d'étalonnage au glucose du 11/09/12

### 5.1.2 Analyse de la qualité des mesures

#### ➤ Etude de la justesse

D'après les mesures, on relève que la qualité de la mesure est élevée mais qu'elle est meilleure à partir de concentration en glucose supérieure à 20 mg/L. Pour réaliser ces mesures on ne prélève qu'1 ml de la solution à analyser, donc plus la concentration est faible, plus l'erreur sur la manipulation a de l'importance et on obtient ainsi des résultats moins précis.

Concentration de glucose en mg/L	$\Delta x$ %
Entre 5 et 15 mg/L	5,63
Entre 20 et 25 mg/L	3,63
Entre 40 et 70mg /L	4,30

**Tableau 1 Etude de la justesse**

La méthode semble juste, le protocole actuel peut donc être utilisé pour effectuer les mesures voulues.

Cependant, les écarts observés peuvent s'expliquer par des erreurs de manipulations, qui peuvent survenir assez facilement lorsqu'on prélève des volumes très faibles comme dans ce protocole (50  $\mu$ L). Il faut aussi tenir compte de l'instabilité de la solution de glucose, qui nous oblige à la refaire fréquemment. On a constaté qu'une même solution de glucose est stable une semaine. Pour toute nouvelle série d'échantillonnage, il sera nécessaire de retracer une droite d'étalonnage pour contrôler que la solution de phénol (possibles instabilités) n'a pas évolué au cours du temps.

➤ *Ecart des mesures*

Les pentes des courbes sont proches les unes des autres, l'écart relatif obtenu entre la pente la plus élevée et la pente la plus faible est de 2,09%, ce qui est correct.

Pour plus de précisions, on pourra à chaque analyse, vérifier la courbe d'étalonnage avec seulement deux ou trois points de mesure et si l'écart entre la valeur obtenue et la valeur existant ne dépasse pas 10%, on pourra continuer à utiliser la même courbe.

### 5.2. Analyse des eaux usées

Plusieurs mesures de sucres totaux ont été effectuées sur les eaux d'entrée et de sortie du décanteur primaire. Dans les analyses précédentes, on trouvait de grands écarts entre les différentes mesures d'un même échantillon. Au cours des expériences, on trouvait qu'homogénéiser les échantillons influençait peu la valeur finale. Dans un premier temps, les échantillons étaient mélangés juste à l'aide d'un couteau.

Entrée diluée	Absorbance	C° glc mg/L
E1	0,308	51
E2	0,378	63
E3	0,356	59
E moy	0,347	58
Écartype	0,029	4,85

**Tableau 2 Analyse : Entrée décanteur primaire 21/08/12 9h30**

Sortie	Absorbance	C° glc mg/L
S1	0,168	14
S2	0,179	15
S3	0,178	15
<b>Smoy</b>	0,175	14,5
<b>Ecartype</b>	0,0050	0,41

**Tableau 3 Analyse : Sortie décanteur primaire 21/08/12 9h30**

Entrée diluée	Absorbance	C° glc mg/L
<b>E1</b>	0,283	47
<b>E2</b>	0,276	46
<b>E3</b>	0,384	64
<b>E moy</b>	0,314	52
<b>Ecartype</b>	0,049	8,20

**Tableau 4 Analyse : Entrée décanteur primaire 21/08/12 11h30**

Sortie	Absorbance	C° glc mg/L
S1	0,155	13
S2	0,148	12
S3	0,153	13
<b>Smoy</b>	0,152	12,6
<b>Ecartype</b>	0,00294	0,24

**Tableau 5 Analyse : Sortie décanteur primaire 21/08/12 11h30**

On remarque que pour les entrées parmi les triplicatas, il y a toujours une valeur très éloignée. L'effluent en entrée est très chargé, donc il doit être dilué par deux pour l'analyse. Ensuite juste 1mL de l'échantillon dilué est prélevé pour chaque triplicata, ceci peut expliquer les écarts observés, étant donné l'hétérogénéité des eaux d'entrée. Le mélange au couteau n'est peut-être pas suffisant, et de nouveaux tests avec utilisation de l'homogénéisateur vont être effectués.

Pour la sortie qui est moins chargée les résultats obtenus sont satisfaisants, l'écart-type est de moins de 1%, et les valeurs sont peu dispersées.

### 5.3. Analyse avec modification du protocole

Lors de cette manipulation, on a mélangé non plus manuellement à l'aide du couteau mais avec un homogénéisateur.

Entrée diluée	Absorbance	C° glc mg/L
<b>E1</b>	0,264	43
<b>E2</b>	0,288	47
<b>E3</b>	0,27	44
<b>E moy</b>	0,274	44,5
<b>Ecartype</b>	0,010	1,66

**Tableau 6 Analyse : Entrée décanteur primaire 11/09/12 11h30**



En homogénéisant, on obtient des valeurs plus proches pour un même triplicata. L'écart relatif entre la plus grande et la plus faible valeur est de 8,3%, alors qu'en mélangeant avec un simple couteau, l'écart est d'environ 20%.

#### 5.4. Bilan

Pour réaliser un bilan matière sur le pilote, nous avons tout d'abord prélevé le débit d'entrée (à 10h), et nous avons attendu 1h avant de prélever la sortie et les boues. Cet intervalle de temps correspond environ au temps de rétention du pilote. En effet, son volume est de 4,85 m<sup>3</sup> et le débit ce jour-là était fixé à 4 m<sup>3</sup>. Ainsi, on peut dire que l'on étudie le même effluent en entrée et en sortie. Par contre, en réalisant un bilan directement sur le pilote, un soucis se pose au niveau du soutirage des boues, la pompe ne fonctionne pas en continue. Il faut donc faire une hypothèse sur le débit de soutirage des boues. On a prélevé seulement 1L de boues, ce qui est faible comparé au débit d'entrée du pilote, ainsi, on peut dire que le débit d'entrée et le débit de sortie sont les mêmes.

$$\text{Accumulation des boues dans le décanteur} = Q(\text{MeS}'_e - \text{MeS}'_s) - \text{Soutirage Boues}$$

$$- Q = 4 \text{ m}^3/\text{h}$$

$$- \text{MeS}' : \text{kg}/\text{m}^3$$

$$- \text{Soutirage Boues} = \text{Nul}$$

	MeS (kg/h)	MVeS (kg/h)	Sucres (kg/h)	DCO (kg/h)
<b>Entrée</b>	0,78	0,67	0,178	1,364
<b>Sortie</b>	0,53	0,43	0,071	1,189
<b>Accumulation des boues dans le décanteur</b>	0,25	0,24	0,108	0,175
<b>Fraction éliminée %</b>	68	64	40	87

**Tableau 7 Bilan matière sur le pilote 11/09**

La fraction éliminée pour les MeS et les MVeS est environ de 65%, elle est beaucoup plus élevée pour les sucres.

Les matières en suspensions restantes reposent au fond du décanteur et constituent les boues du décanteur. Ces dernières vont être traitées afin d'être plus stables, ensuite elles seront épaissies. A long terme, le traitement des boues doit déboucher sur une augmentation de la DCO, les boues seront alors valorisées afin de produire du biogaz.



## 6. Conclusion

Le traitement des eaux est encore un sujet récurrent en matière d'environnement. Améliorer son rendement est devenu un enjeu primordial, tant sur le plan de la technologique que sur le plan économique. L'équipe de recherche primEAU souhaite répondre à ces objectifs, et étudie de manière spécifique l'hydraulique d'un décanteur primaire.

Au cours de mon stage, j'ai particulièrement travaillé sur le dosage des sucres totaux dans les eaux usées. J'ai du vérifier la validité du protocole existant et l'améliorer. Pendant ces 12 semaines de stage, j'ai effectué de nombreux tests en laboratoire, afin de prendre la manipulation bien en main pour réduire les erreurs, et ensuite tirer des conclusions en vue d'une amélioration.

Les réunions hebdomadaires, en équipe, obligeaient à travailler de manière efficace et régulière. Cela nous permettait de présenter notre travail, et également de suivre le travail des autres membres et ainsi d'avoir une vue globale de l'avancée du projet.

Cette expérience a été très enrichissante tant sur le plan scientifique que personnel. Tout d'abord, j'ai pu gagné de l'autonomie dans les manipulations en laboratoire, plus d'aisance et de rigueur, je manipulais des produits dangereux avec lesquels il faut être prudent tant pour sa sécurité que pour celle des personnes travaillant au laboratoire. J'ai également découvert l'ambiance d'une équipe de recherche, le travail est effectué de façon rigoureuse dans une bonne ambiance, pour arriver à cela, une bonne communication entre les membres est essentielle. L'équipe modelEAU accueille chaleureusement les stagiaires, l'intégration y est facilitée.

Sur le plan personnel, ce stage m'a permis de découvrir le Québec avec ses coutumes, de rencontrer des personnes d'origine différente, ce qui permet une excellente ouverture d'esprit.

En conclusion de ce stage, je peux dire que je suis très satisfaite de ces 12 semaines passées au sein de l'équipe primEAU et de mon séjour à Québec.

## 7. Bibliographie

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st Edition. American Public Health Association, Washington, DC. 2005.

Benefield L., Randall CW. *The Phenol-Sulfuric Acid Test effective Alternative for Carbohydrate Analysis*. Édité par Water & Sewage Works. février 1976.

Dubois M., Gilles K.A. , Hamilton J.K. , Rebers P.A. and Smith F. . *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. <http://pubs.acs.org> (accès le 15 juillet, 2012).

Environnement, Canada. <http://www.ec.gc.ca/eau-water/> (accès le 29 août, 2012).

Massé. A. «Bioréacteur à Membranes immergées pour le traitement des eaux résiduaires urbaines : spécificités physico-chimique du milieu biologique et colmatages.» Thèse, Institut National des Sciences Appliquées, 2004.

Pujadas, Maria. «SOP TSS-détermination des solides en suspension totaux et volatils.» 2010.

Wipliez, B. «SOP Détermination de la DCO : méthode colorimétrique.» 2010, rapport technique, Université Laval, Québec, QC, Canada.

ulaval. <http://www2.ulaval.ca/> (accès le 26 août, 2012).

Ville de Québec.

[http://www.ville.quebec.qc.ca/environnement/eau/traitement\\_eaux\\_usees.aspx](http://www.ville.quebec.qc.ca/environnement/eau/traitement_eaux_usees.aspx) (accès le 28 août, 2012).

## 8. Annexe

**SOP : Détermination des sucres totaux dans les eaux usées, dans la biomasse en suspension ou toute autre suspension liquide.**

### Introduction

Les glucides sont des composés organiques qui ont pour formule brute  $C_m(H_2O)_n$ . Ils sont donc composés uniquement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Les glucides sont divisés en quatre groupes chimiques : les monosaccharides, les disaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides.

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la concentration en glucides dans les eaux usées ou la biomasse. Le protocole qui suit est basé sur la méthode de Dubois pour la mesure des glucides.

### 1. Domaine d'application

Cette méthode s'applique à la détermination des sucres totaux solubles ou particuliers retrouvés dans une suspension liquide comme les eaux usées. Il est également possible de séparer la forme particulaire de la forme soluble par centrifugation pour pouvoir les mesurer distinctement.

### 2. Principe et théorie

Quand les glucides (sucres, polysaccharides...) sont en présence de phénol et d'acide sulfurique concentré, une coloration orangée apparaît. En effet, l'acide sulfurique hydrolyse les polysaccharides et le phénol déshydrate les monosaccharides, ce qui provoque une coloration orangée. La coloration s'intensifie quand la concentration en glucides de l'échantillon est plus forte. Ce mélange réactionnel absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 487 nm. Il s'agit d'une méthode colorimétrique par spectrométrie UV-Vis.

### 3. Fiabilité

#### 3.1 Interférence

L'ammonium ( $NH_4^+$ ), les nitrites ( $NO_2^-$ ) et les nitrates ( $NO_3^-$ ) à des concentrations élevées (supérieur à 500 mg/L) forment respectivement des complexes vert foncé, rouge et brun produisant ainsi une interférence positive sur le résultat de l'analyse.

Le mélange (phénol, acide sulfurique, solution étalon ou échantillon) ne doit être en aucun cas mis en contact avec du papier. La cellulose provoque des interférences sur la mesure de l'absorbance.

#### 3.2 Limite de détection

La limite de détection est de 5 mg/L de glucose d'après l'expérience.

#### 3.3 Limite de quantification

La limite de quantification est de 100 mg/L de glucose car au-delà l'absorbance est supérieure à 1, ce qui fausse la linéarité de la droite d'étalonnage. Cependant, il est possible d'analyser des solutions plus concentrées en les diluant avant de les analyser.

### 3.4 Fidélité

Aucune donnée statistique n'est disponible.

### 3.5 Réplicabilité

Aucune donnée statistique n'est disponible.

### 3.6 Reproductibilité

Aucune donnée statistique n'est disponible.

### 3.7 Justesse

Aucune donnée statistique n'est disponible.

## 4. Prélèvement et conservation

Prélever un échantillon représentatif dans un contenant en plastique ou en verre. Conserver l'échantillon à environ 4 °C et analyser dans les 48 heures suivant le prélèvement.

## 5. Appareillage

### 5.1 Matériel

Préparation échantillon

- Bêchers de 20, 50 et 100 ml
- Poire à pipeter (tiroir 126-a)
- Filtres Whatman 934-AH (125 mm)
- Büchner, erlenmeyer, joint conique, pompe
- 2 pipettes de 10 ml
- Cylindre gradué de 100 ml
- Pipette automatique ?
- Tubes à DCO Hach vides et propres ?

Dilution des boues :

- Fiole jaugée de 1 L
- 1 pipette de 5 ml avec sa poire à pipeter

Pour la courbe d'étalonnage :

- Fioles jaugées de 100 ml
- Pipette automatique (20-200 et 200-1000 µl)

- Tubes à DCO vides et propres (Hach)

Préparation solution phénol :

- Fiole jaugée de 1L
- Bêchers de 200mL
- Four à micro-ondes
- Entonnoir grosse embouchure (en verre de préférence)
- 1 barreau aimanté
- Tige en verre

### 5.2. Équipement

- Spectrophotomètre UV/Vis
- Agitateur type Vortex (Fisher Vortex Génie 2)
- Balance analytique +/- 0,0001g
- Chauffe-Tube à 150 °C
- Homogénéisateur
- Centrifugeuse (pour séparer les sucres solubles et particulaires si besoin)
- Étuve

## 6. Réactifs et étalons

- *Eau déminéralisée*
- *Solution mère (20g/L de glucose)*

Dissoudre 5g de glucose anhydre (numéro 755) dans une fiole jaugée de 250 ml avec de l'eau déminéralisée. Cette solution doit rester au frais entre chaque utilisation. Elle est utilisable pendant une semaine. Une partie peut être congelée pour des utilisations futures. La congélation permet de ralentir la dégradation des sucres dans la solution mais pas de la stopper. Pour pouvoir la conserver plusieurs mois au congélateur il faut qu'elle soit contenue dans un contenant étanche, par exemple dans des tubes en plastiques. La congélation risque de rendre la solution non homogène. Il faut donc penser à bien l'homogénéiser, en secouant la solution, avant chaque utilisation.

- *Solution phénol 5% (m/v)*

Puisque il s'agit d'une manipulation délicate, il est préférable de travailler directement dans le flacon de cristaux de phénol plein (50g, n° 1309 porte 20).

Chauffer dans un bécher 200 ml d'eau déminéralisée au four à micro-ondes, afin d'avoir de l'eau bouillante.

*Les étapes suivantes se font sous la hotte :*

Pour cette étape, pour plus de sécurité, il faut être deux personnes, l'une tient le flacon de

phénol, tandis que l'autre ajoute l'eau bouillante dans le flacon. Il faut faire couler l'eau le long d'une tige en verre, jusqu'à être à environ 4 cm du rebord du flacon. Bien mélanger le phénol et l'eau, le but est d'obtenir un mélange liquide (cela peut être un peu long car le phénol est sous forme de cristaux). Introduire le barreau aimanté dans une fiole jaugée de 1L. À l'aide d'un entonnoir à grosse embouchure, verser le mélange eau/phénol dans la fiole jaugée de 1L. Compléter avec de l'eau déminéralisée afin que la fiole soit remplie au  $\frac{3}{4}$ .

Agiter la fiole, jusqu'à obtenir une solution complètement homogène.

Ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'au trait de jauge.

Transvaser le mélange dans le contenant spécifique pour la solution et le recouvrir de papier aluminium.

Sur une étiquette, bien identifier le produit, et placer la solution dans la chambre froide. La solution peut se conserver 6 mois à 4°C à l'obscurité. L'idéal serait de la contenir dans une bouteille ambrée.

#### *6.4. Acide sulfurique concentré de type ACS*

L'acide sulfurique se trouve à la porte 20 et porte le numéro 1835 (ou sous la hotte SPD, demander avant d'utiliser). Utiliser la dispensette présente sur la bouteille pour ajouter l'acide dans les échantillons.

### **7. Protocole analytique**

#### *7.1. Conditions d'opération*

Les solutions étalons, l'acide sulfurique, la solution de phénol et les échantillons à analyser doivent être à température ambiante.

Il est très important de vérifier avant chaque manipulation que les tubes à DCO vides ne sont pas rayés ou fêlés. En effet, les tubes sont soumis à de nombreuses contraintes (chauffe-tubes à 150°C, étuve, réaction entre l'acide sulfurique et le phénol...) et il est possible qu'ils cassent. Il faut donc vérifier à chaque fois que les tubes ne soient pas fragilisés. Si l'un des tubes présente une anomalie, après avoir vérifié qu'il était bien propre, il faut le jeter dans les poubelles destinées au verre.

#### *7.2. Étapes de manipulations*

Avant de commencer les manipulations, il faut allumer le chauffe tubes afin qu'il soit à 150°C lors de l'étape de chauffage. De plus, les manipulations du phénol et de l'acide sulfurique doivent se faire sous la hotte.

Pour allumer le chauffe-tube, il faut appuyer sur le bouton ON situé à l'arrière de l'appareil. Puis il faut placer les deux boutons comme indiqués sur la photo ci-dessous :





### 7.2.1 Préparation des tubes

- Nettoyer les tubes à DCO avec de l'eau et du savon.
- Les rincer avec de l'eau distillée.
- Bien secouer les tubes pour faire partir un maximum d'eau.
- Mettre les tubes à l'étuve (située sur le comptoir au niveau du tiroir 70-a) pour les faire sécher ou les sécher à l'air comprimé (si le four est utilisé). Pour les sécher à l'air comprimé, prendre un tuyau situé dans la porte 124 et le connecter à une arrivée d'air comprimé comme montré sur la photo ci-dessous :



### 7.2.2 Préparation des échantillons pour la courbe étalon

- La gamme d'étalonnage se fait avec des solutions entre 0 et 100 mg/L de concentration en glucose. Les concentrations choisies sont présentées dans le tableau ci-dessous ainsi que le volume de solution mère à prélever avec les pipettes automatiques. Le volume prélevé doit ensuite être placé dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter le volume des fioles jaugées jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée (s'il n'y a pas assez de fioles de 100 mL disponibles, utiliser des fioles plus grandes et modifier le volume à prélever en conséquence). Réaliser de préférence en premier les analyses sur les échantillons à étudier. En fonction des valeurs d'absorbance relevées, établir la courbe d'étalonnage (il n'est pas nécessaire d'aller jusqu'à 100mg/L, il vaut peut-être mieux faire plus de points entre 0 et 50mg/L).

Concentration (mg/L)	Volume de solution mère à prélever ( $\mu\text{L}$ )
10	50
20	100
30	150
40	200
50	250
60	300
70	350
80	400
90	450
100	500

- Dans chaque tube, mettre 1mL des solutions de la gamme étalon.
- Insérer 1mL d'eau distillée dans un tube. Ce tube sera le blanc réactif.

Le reste des étapes à effectuer est décrit dans la partie « Fractionnement des échantillons ».

### 7.2.3 Préparation des échantillons d'eau usée

Pour l'analyse des eaux usées, aucune dilution n'est nécessaire pour les sorties du décanteur et du pilote. En revanche, il est nécessaire de diluer les entrées et les boues. L'entrée doit être en général diluée par 2, alors que les boues doivent être diluées entre 200 et 250 fois. La dilution ne peut se faire à l'eau distillée car cela changerait la matrice. Il faut donc diluer avec la sortie du décanteur ou du pilote. Cependant, il est nécessaire de filtrer la sortie afin de ne pas modifier la concentration des échantillons lors de la dilution.

- Nettoyer l'erlenmeyer à l'eau savonneuse puis à l'eau distillée. Ensuite le laisser sécher ou le sécher à l'air comprimé comme décrit précédemment.
- Monter le matériel pour la filtration comme montré ci-dessous :



- Prendre un filtre et le déposer dans le Büchner.
- Verser la sortie. En moyenne, 2 filtres permettent de filtrer 3 L de sortie.
- Récupérer la sortie filtrée et la placer dans des bouteilles en plastique.

Afin d'avoir les analyses les plus justes possible, il faut homogénéiser (utiliser l'homogénéisateur électrique) l'échantillon d'eau à prélever (moins d'écart entre les triplicatas). Prélever 50 mL de l'effluent d'entrée à l'aide d'une pipette de 10 ml et le placer dans le bécher de 100 mL. Bien mélanger entre chaque pipetage.

- Prélever ensuite 50 ml de la sortie filtrée et le placer dans le bécher.
- Prélever ensuite 1 ml de l'entrée diluée et le placer dans un tube. Mélanger entre chaque prélèvement. En général, les échantillons sont analysés en triplicata.
- Insérer 1mL d'eau distillée dans un tube. Ce tube sera le blanc réactif.

Le reste des étapes à effectuer est décrit dans la partie « Fractionnement des échantillons ».

#### 7.2.4 Préparation des échantillons de boues

- Dans un bécher, verser et homogénéiser un échantillon de boue à analyser (environ 20 ml).
- Pour l'analyse des boues, il est nécessaire de diluer les boues 200 ou 250 fois. Pour diluer 250 fois, prélever 4 ml de boues (homogénéisées) à l'aide d'une pipette de 5 mL et les placer dans la fiole jaugée de 1 L. Compléter ensuite jusqu'au trait de jauge avec la sortie filtrée. (La description de la filtration de la sortie est décrite dans la partie « Préparation des échantillons d'eau usée »).
- Prélever 1 ml des boues diluées et le placer dans un tube. Mélanger entre chaque prélèvement. En général, les échantillons sont analysés en triplicata.
- Insérer 1 ml d'eau distillée dans un tube. Ce tube sera le blanc réactif.

Le reste des étapes à effectuer est décrit dans la partie « Fractionnement des échantillons ».

#### 7.2.5 Fractionnement des échantillons

**N.B. Les étapes suivantes doivent être effectuées sous la hotte.**

- Ajouter 1mL de la solution de phénol 5% à l'aide de la pipette automatique dans chacun des tubes.
- Fermer les tubes.
- Agiter au vortex.
- Si un ajout dosé est effectué sur les tubes (voir la partie sur les ajouts dosés), l'ajout de la solution de glucose doit être effectué juste avant l'ajout de l'acide sulfurique pour éviter toute réaction entre la solution de glucose et l'eau usée.
- Ajouter 5mL d'acide sulfurique concentré à l'aide de la dispensette présente sur la bouteille d'acide sulfurique (**attention : cette étape peut être dangereuse, il faut**

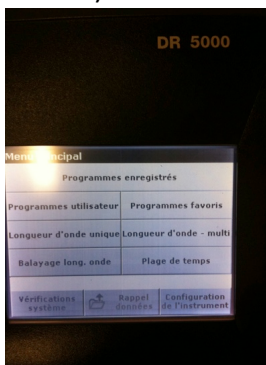
**manipuler l'acide sulfurique avec précaution et tenir les tubes par le haut pour éviter de se brûler car il se produit une réaction exothermique).** Ainsi l'ajout de l'acide sulfurique est rapide, et la réaction ayant lieu avec le phénol se fait alors très rapidement, ce qui limite les erreurs entre les triplicatas. Ne pas essuyer l'embout de la dispensette, il ne faut pas le contaminer. Avant d'utiliser la dispensette, demander la permission à la responsable du groupe SPD Sabrina Simard.

- Faire chauffer les tubes fermés 3 minutes (mesurées avec un chronomètre) dans le chauffe tube à 150 C°.
- Mettre les tubes 30 minutes à l'obscurité. Pour cela, les placer simplement dans un tiroir.
- Effectuer les mesures d'absorbance (les tubes doivent être à température ambiante lors de la lecture. Il n'est pas nécessaire de mesurer l'absorbance de suite après les 30 minutes à l'obscurité. L'absorbance reste stable plusieurs heures si les tubes sont laissés à l'obscurité).

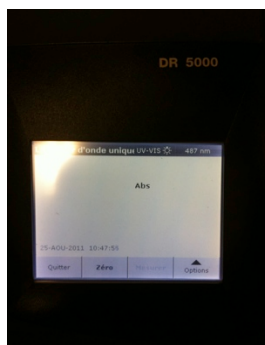
### 7.2.6 Lecture au spectrophotomètre

Le spectrophotomètre est situé au niveau du tiroir 48-a.

- Allumer le spectrophotomètre. Le bouton d'allumage est situé derrière l'appareil, à gauche. Le spectrophotomètre nécessite un petit moment pour se mettre en route. Une fois que l'écran suivant s'affiche, cliquer sur « Longueur d'onde unique » (l'écran est tactile).



- Cliquer ensuite sur « Options », puis sur  $\lambda$ . Rentrer la valeur de la longueur d'onde, soit **487 nm**, puis cliquer sur OK. L'écran suivant doit alors apparaître :



- Insérer le tube de blanc dans l'appareil. S'assurer avant que le tube soit bien propre, et le nettoyer avec un essuie-tout Kimwipe si besoin. (Il y en a toujours une boîte à côté du spectrophotomètre).
- Une fois la mesure du blanc effectuée, le bouton « Mesurer » va apparaître. Il suffit alors d'insérer tous les tubes les uns après les autres et de cliquer sur « Mesurer » en s'assurant toujours que les tubes sont bien propres et en les agitant en les reversant pour bien homogénéiser.

### 7.3. Ajouts dosés

Il peut être intéressant d'analyser également les échantillons à l'aide d'ajouts dosés. En effet, les échantillons analysés présentent des concentrations inconnues et il est donc difficile de déterminer si la concentration en sucres obtenues est la concentration réelle. Une solution peut être de réaliser des ajouts dosés. Cette technique consiste à ajouter une quantité connue de glucose et d'analyser les échantillons avec et sans cet ajout. Si la différence entre les 2 concentrations obtenues correspond bien à l'ajout effectué, alors la méthode est fiable. Un écart de 10% peut être accepté.

Pour réaliser un ajout dosé, il faut réaliser une solution de glucose à 1g/L par exemple. Une très petite quantité de cette solution sera utilisée (afin de ne pas modifier le volume à l'intérieur des tubes), c'est pourquoi il n'est pas nécessaire de réaliser un grand volume de cette solution.

- Prélever 0,1g de glucose.
- Le placer dans un bécher de 100 ml préalablement pesé.
- Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à ce que le poids ajouté soit de 100g sur la balance.
- Ajouter ensuite un barreau aimanté et placer sur un agitateur magnétique. En effet, le glucose reste souvent au fond du bécher et il faut un certain temps d'agitation avant que la solution soit bien mélangée.
- Lors du fractionnement des échantillons, introduire 20  $\mu$ L de cette solution dans chacun des tubes à analyser avec ajout dosé. Attention à ajouter la solution de glucose juste avant d'introduire l'acide sulfurique pour que la solution de glucose ne puisse pas être dégradée par l'eau usée.

Lorsque l'on ajoute 20  $\mu$ L de cette solution dans un tube, la concentration est augmentée de 20 mg/L pour la sortie, puisqu'elle n'est pas diluée. En revanche, lors de l'ajout de la même quantité, la concentration en entrée augmente de 40 mg/L puisqu'elle est diluée par 2, et la concentration des boues est augmentée de 5 g/L lorsqu'elles sont diluées par 250.

Comme les échantillons sont analysés en triplicata, pour chaque analyse comme l'entrée par exemple, il y a donc 3 tubes pour l'entrée et 3 tubes pour l'entrée avec ajout dosé.

#### 7.4. Étalonnage

Il est nécessaire de vérifier régulièrement la courbe étalon. En effet, la solution de phénol peut évoluer durant les 6 mois de son utilisation. Pour cela, il faut préparer une solution de concentration connue de glucose dans de l'eau distillée (par exemple 50 mg/L) et l'analyser. Si l'écart entre la valeur attendue et la valeur obtenue ne dépasse pas 10%, on peut continuer à utiliser la courbe. En revanche, si l'écart est trop important, il faut refaire la courbe étalon.

Voilà les dernières équations de la courbe d'étalonnage réalisée :

$$y = 91,317 x - 4,2521 \text{ (Decool Nicolas)}$$

$$y = 80,4 x + 0,03 \text{ (Perrine Pasquier-Meunier)}$$

$$y = 82,565 \text{ (Mathilde Burguière)}$$

### 8. Rangement

Pour le nettoyage des tubes et du bécher ayant contenu le phénol, un bidon de récupération spécial devra être fait en notant dessus «déchets phénol et acide sulfurique». Ce bidon sera placé sous la hotte pour son utilisation. Lorsque le bidon sera rempli demander au responsable du laboratoire de prévenir la SSP (Service de Sécurité et Prévention de l'Université Laval) pour venir récupérer les bidons.

Le bécher ayant contenu seulement de l'acide sulfurique devra être nettoyé dans le bidon « acides usés inorganiques ».

Les gants et papiers utilisés pour le nettoyage du plan de travail ne devront en aucun cas être jetés dans les poubelles communes. Il faut les mettre dans des sacs plastiques Ziploc en les fermant correctement. En attendant que les sacs plastiques soient remplis, il faut les stocker sous la hotte. On peut ensuite les jeter dans les poubelles lorsqu'ils sont remplis. Les sacs doivent être bien fermés pour éviter d'une part de laisser échapper les odeurs de phénol et d'autre part pour éviter tout contact avec de l'acide sulfurique.

Les embouts des pipettes en contact avec le phénol devront aussi être mis dans un sac Ziploc. Lorsque ce dernier sera rempli prévenir le responsable du laboratoire afin de convenir d'un endroit où les jeter.

Les autres embouts de pipette qui n'ont pas été en contact avec le phénol seront placés dans les poubelles pour le verre, de même que la pipette ayant servi à pipeter l'acide.

### 9. Remarques

Le matériel a été choisi en fonction de ce qui était disponible au laboratoire mais aussi par rapport à l'utilisation de produits dangereux tels que l'acide sulfurique concentré.

Les manipulations doivent se faire en portant une blouse (ou sarrau), des gants et des

lunettes de sécurité.

Afin de pouvoir effectuer beaucoup d'analyses, il serait bon de récupérer des tubes à DCO (Hach). Il faut en prévoir 50 pour pouvoir faire des duplicatas lors des analyses. Beaucoup de tubes ont déjà été récupérés mais il faut faire attention à ce qu'ils ne soient pas abimés. Il est donc préférable d'en récupérer régulièrement pour remplacer ceux qui ont déjà été utilisés plusieurs fois. Avant de faire une manipulation, il faut aussi vérifier que les tubes ne sont pas fendus et ne présentent aucun défaut. En effet, lors de l'étape de chauffage, ils pourraient se casser.

## 10. Références

Daniels L., Hanson R. and Phillips J.A., 1994. Chemical analysis, dans *Methods for general and molecular bacteriology*, P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood et N. R. Krieg, American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 512-554.

Herbert D., Phipps P.J. and Strange R.E., 1971. Chemical analysis of microbial cells, dans *Methods in microbiology*, J. R. Norris et D. W. Ribbons Edt, Academic Press, London et New York, p. 209-344.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. et Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 28, p350-356