



Université Laval
Pavillon Adrien Pouliot
Dép. de Génie Civil et Génie des Eaux
1065 Avenue de la Médecine
G1V 0A6 Québec, Canada

Institut National des Sciences Appliquées
Dép. de Génie des Procédés et Environnement
135 Avenue de Rangueil
31077 Toulouse, France

Rapport de stage

Perrine PASQUIER-MEUNIER

Mise en place de protocoles d'analyse des carbohydrates, lipides et acides gras volatiles sur des échantillons d'un décanteur primaire

Projet primEAU

Stage effectué du 18 juin au 23 septembre 2011

Maître de stage : Peter Vanrolleghem
Tuteur INSA : Corinne Cabassud

Stage de 4^{ème} année GPE
INSA Toulouse

Résumé

Mon stage s'est inscrit dans le cadre du projet *primeEAU*. Ce projet s'articule principalement autour de la thèse de Giulia Bachis qui a pour objectif la modélisation d'un décanteur primaire par la création d'un modèle liant les modèles ADM (Anaerobic Digester Model) et ASM (Activated Sludge Model) déjà existants.

Pour cela, un pilote des décanteurs primaires a été construit au sein de la station de traitement Est de la ville de Québec par l'entreprise John Meunier. Ce pilote reçoit le même effluent que les décanteurs primaires de la station, et permet la modélisation de la décantation.

Afin de modéliser correctement la décantation primaire, de nombreuses données sont nécessaires telles que des informations hydrauliques, la taille et la vitesse de chute des particules, la DCO, les MeS ou encore des données nécessaires aux modèles ADM et ASM. Le modèle ADM plus particulièrement nécessite des données sur le fractionnement des lipides, des carbohydrates et des AGV (Acides Gras Volatiles).

Mon stage s'est axé sur l'analyse du fractionnement de ces différentes molécules. Il était en effet nécessaire de développer des protocoles adaptés au matériel disponible et au laboratoire. Certains protocoles avaient déjà été rédigés mais nécessitaient des améliorations ou des analyses sur des échantillons réels, alors que d'autres protocoles étaient encore à l'essai et nécessitaient de nombreux tests.

Je me suis donc intéressée au développement de ces 3 protocoles, et plus particulièrement au fractionnement des carbohydrates. En effet, ce protocole avait déjà été réalisé par une précédente stagiaire, mais les tests n'avaient pas été réalisés sur des échantillons réels. J'ai donc fini de développer ce protocole.

Le fractionnement des lipides avait aussi été déjà développé par une autre stagiaire, mais du fait de la réaction à l'œuvre, la manipulation prenait plus de 9h. J'ai donc fait des recherches et trouvé des fournisseurs proposant des systèmes automatisés réduisant le temps de manipulation. L'appareil n'a pas été commandé avant la fin de mon stage, je n'ai donc pas pu développer le protocole.

Enfin, pour le fractionnement des AGV, une méthode Hach basée sur l'estérification a d'abord été essayée, mais les échantillons se situaient en-dessous des seuils de détection. Une méthode de titrage à l'aide d'acide sulfurique a alors été essayée à l'aide d'un titrateur automatique. Les tests ont été concluants mais le protocole doit encore être développé et certains problèmes informatiques doivent aussi être réglés.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Peter Vanrolleghem, mon maître de stage, pour m'avoir acceptée au sein de son équipe de recherche et m'avoir donné la chance de venir travailler au Canada, à l'Université Laval.

Un grand merci à Giulia Bachis, doctorante, pour sa disponibilité, son écoute et sa bonne humeur.

Merci aussi à Ludiwine Clouzot, post-doctorante, et Sylvie Leduc, professionnelle de recherche, pour leur aide et leur soutien.

Merci beaucoup à Cyril Garneau, professionnel de recherche, pour avoir pris le temps de m'expliquer le fonctionnement du titrateur, avoir répondu à mes nombreuses questions et m'avoir aidée face aux problèmes rencontrés.

Je remercie Michel Bisping, responsable de laboratoire, pour avoir répondu à mes questions.

Merci aussi à Imen Bel Hadj, étudiante à la maîtrise, pour m'avoir fait participer à ses travaux sur les ViCAs.

Merci beaucoup à Sovanna Tik, étudiante à la maîtrise, pour m'avoir aidée dans mon installation, m'avoir fait découvrir la ville de Québec et avoir répondu à mes nombreuses questions sur la station d'épuration.

Et merci à Elena Torfs, Lisha Guo, Janelcy Alferes, Gaëlle Jaffres, Alix-Anne Turcotti et Sovanna Tik encore, pour avoir découvert avec moi la culture québécoise.

Merci aussi aux relations internationales de l'INSA pour l'aide financière qu'ils m'ont accordé et Vincent Savignac pour ses conseils avant mon arrivée.

Enfin, je remercie l'ensemble du groupe modelEAU pour leur accueil.

Sommaire

Introduction	1
I. Les acteurs du projet primEAU	2
1) L'Université Laval	2
2) Le groupe de recherche modelEAU	2
3) Le projet primEAU.....	2
4) La station des eaux usées de la ville de Québec	2
5) L'entreprise John Meunier	3
II. Objectifs du stage	4
III. Les protocoles de fractionnement	5
1) Fractionnement des carbohydrates.....	5
<i>a) Protocole de fractionnement</i>	5
<i>b) Analyses effectuées</i>	5
2) Protocole de fractionnement des lipides.....	6
<i>a) Protocole de fractionnement</i>	6
<i>b) Travail effectué</i>	7
3) Protocole de fractionnement des acides gras volatiles	7
4) Analyse globale des entrées et sorties du pilote	9
IV. Résultats et analyse	10
1) Fractionnement des carbohydrates.....	10
2) Protocole de fractionnement des lipides.....	15
3) Protocole de fractionnement des acides gras volatiles	16
4) Analyse globale des entrées et sorties du pilote	17
Conclusion	19
Nomenclature	20
Bibliographie	21
Table des annexes	I

Introduction

Le traitement des eaux usées représente actuellement un enjeu majeur dans les stratégies à mettre en place pour la sauvegarde de l'environnement. En effet, l'Homme utilise d'énormes quantités d'eau pour ses activités, quelles soient domestiques ou industrielles. Les eaux usées récupèrent tous les rejets de nos activités, il est donc primordial de les retraiter avant qu'elles ne se dispersent dans l'environnement.

La première étape de ce retraitement est l'acheminement de ces eaux vers les stations de traitement. Dans la ville de Québec, les eaux sont véhiculées par 3022 kilomètres de conduites avant d'aboutir dans l'une des deux stations de traitement. Ces stations traitent quotidiennement près de 400 millions de litres d'eau, soit plus de 4000 litres à la seconde et de quoi remplir le Colisée trois fois par jour.

Les eaux subissent ensuite différents traitements avant d'être rejetées dans le fleuve Saint-Laurent. Ces étapes commencent par le dégrillage qui intercepte les matières grossières. Puis grâce au dessablage, déshuilage et dégraissage, tous les flottants ou les particules de la densité du sable sont enlevées. La décantation permet ensuite d'extraire la majeure partie des matières solides. Puis l'eau traverse des biofiltres qui achèvent de retirer les matières solides en plus de la pollution organique dissoute. Enfin, de juin à septembre, la désinfection par ultraviolets permet de détruire les bactéries présentes dans l'eau afin de rendre plus sécuritaire la pratique des sports aquatiques dans le Saint-Laurent. L'eau est finalement évacuée par une conduite sous-fluviale permettant la diffusion des eaux dans le fleuve.

Cependant, toutes ces opérations ont un coût, et il devient donc intéressant de pouvoir les optimiser. Pour cela, la modélisation est un outil utile permettant la compréhension et l'optimisation du procédé.

C'est dans cette optique que s'inscrit le projet primEAU. L'objectif est en effet la compréhension de la décantation primaire et la création d'un modèle à partir des modèles ASM et ADM déjà existants. Cependant, la mise en place du modèle implique la connaissance de nombreux facteurs, tels que l'hydraulique, les bilans de matière, la distribution de la vitesse de chute et de la taille des particules, ou encore le taux de lipides, de carbohydrates, ou d'acides gras volatiles (AGV). Pour cela, un pilote de la décantation primaire a été installé dans l'une de stations de traitement de la ville de Québec, qui reçoit la même eau que les décanteurs primaires.

C'est dans ce contexte que mon stage s'est inscrit, par le développement de protocoles permettant l'analyse de la concentration en lipides, carbohydrates et AGV dans les effluents du pilote de la décantation primaire.

I. Les acteurs du projet primEAU

1) L'Université Laval

L'Université Laval est la première université francophone à avoir été créée en Amérique. Mgr François de Montmorency-Laval, le premier évêque de la colonie, a fondé en 1663 à Québec le premier établissement d'enseignement de la Nouvelle-France: le Séminaire de Québec. 200 ans plus tard, en 1852, cet établissement crée l'Université Laval, la source de tout l'enseignement supérieur de langue française au Québec, au Canada et en Amérique.

Aujourd'hui, l'Université Laval compte plus de 40 000 étudiants et 11 000 employés. Les femmes sont aussi majoritaires avec 58,8% d'étudiantes contre 41,2% étudiants. Enfin, plus de 4000 étudiants d'origine étrangère étudient à l'Université Laval à chaque session.

2) Le groupe de recherche modelEAU

Le groupe de recherche modelEAU a été créé autour de la Chaire de recherche du Canada en Modélisation de la Qualité de l'Eau décernée à Peter Vanrolleghem en février 2006. modelEAU a pour objectif l'amélioration de la qualité des eaux des bassins versants, des rivières urbaines, des réseaux d'égouts et des usines de traitement des eaux usées. Pour cela, des modèles sont développés pour optimiser les systèmes. Mais l'accent est également placé sur les aspects méthodologiques de la collecte de données et l'évaluation de leur qualité, l'instrumentation, le contrôle et l'automatisation.

3) Le projet primEAU

Le projet primEAU fait partie des études en cours au sein de modelEAU. Ce projet est dirigé par le professeur Peter Vanrolleghem et fait partie intégrante du doctorat de l'étudiante Giulia Bachis avec l'aide de son co-directeur Paul Lessard. Ce projet a pour but le développement d'un modèle mathématique autour d'un décanteur primaire en liant les deux modèles ASM (Activated Sludge Model) et ADM (Anaerobic Digester Model). Pour cela, un pilote a été installé au sein de la station des eaux usées Est de la ville de Québec par l'entreprise John Meunier.

4) La station des eaux usées de la ville de Québec

Les deux STEP (stations d'épuration) de la Ville de Québec (Est et Ouest) ont été conçues suite aux consultations publiques conduites à la fin des années 80. Les effluents sont retournés au fleuve Saint-Laurent tout en respectant les normes de rejets pour permettre baignade et sports aquatiques au sein du fleuve. Une étape de désinfection est alors nécessaire. L'objectif de limiter les nuisances de voisinage a mené à la conception de stations entièrement couvertes disposant d'un système de traitement de l'air. De plus, une seule salle de contrôle située à la station Est pilote l'ensemble du réseau et les deux STEP. Le pilote du projet primEAU est installé au sein de la station d'épuration Est de Québec et reçoit le même affluent que les décanteurs primaires de la station.

5) *L'entreprise John Meunier*

L'entreprise John Meunier est la filiale Canadienne du groupe Veolia Water. C'est elle qui a principalement financé et conçu l'installation du pilote de décantation primaire nécessaire au projet primEAU. Spécialiste du traitement de l'eau potable, des eaux de procédés, des eaux usées et de la gestion des eaux d'orage, John Meunier dessert les municipalités et les industries nord-américaines depuis 1948. Au Canada et plus largement sur le continent américain, John Meunier est l'un des plus importants manufacturiers d'équipements dédiés au traitement des eaux industrielles et municipales.

II. Objectifs du stage

Le projet primEAU s'inscrit autour de la thèse de Giulia Bachis qui a pour but la modélisation d'un décanteur primaire et son optimisation par l'ajout de produits chimiques. Ce modèle va se baser sur les modèles ASM et ADM déjà existants. Cependant, afin de modéliser la décantation primaire, il est nécessaire de connaître de nombreuses données sur l'entrée, la sortie, et les boues du décanteur. Ces différentes données sont décrites dans le schéma ci-dessous :

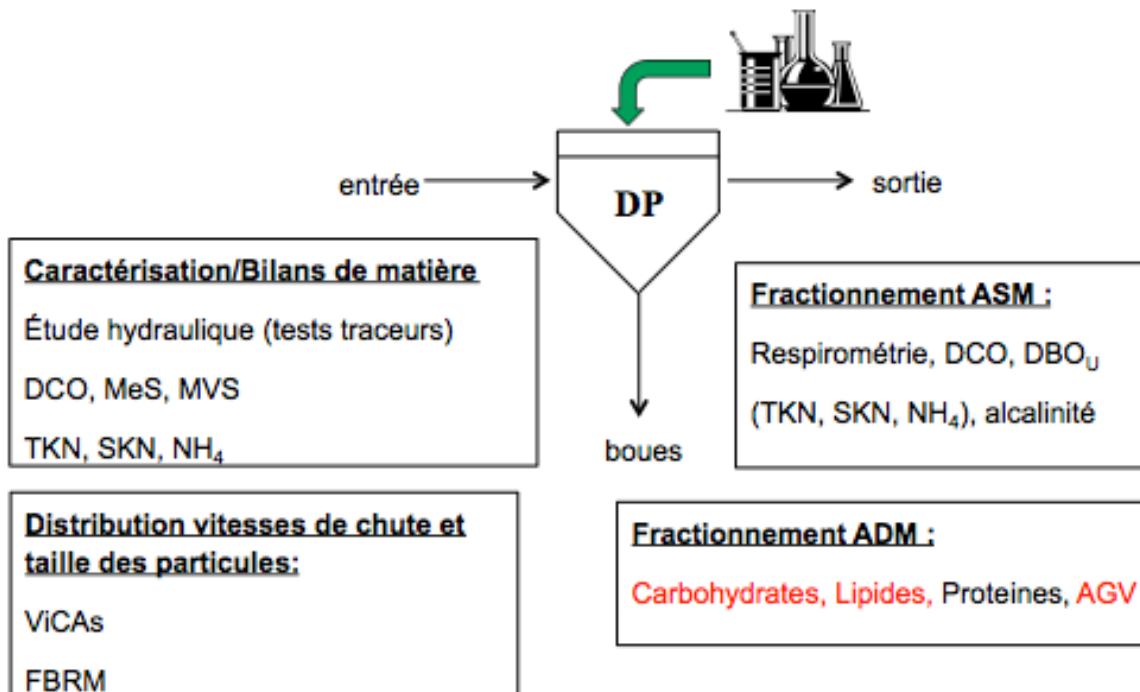


Figure 1 : Données nécessaires pour l'étude du pilote

La caractérisation du décanteur et les bilans de matière ont déjà été effectués. L'étude de la distribution des vitesses de chute et de la taille des particules est actuellement réalisée par Imen Bel Hadj, étudiante à la maîtrise. Giulia Bachis, s'occupe quant à elle de la respirométrie et de la DBO_U pour le fractionnement ASM. Pour le fractionnement ADM, le protocole pour la détermination des protéines est déjà réalisé, il reste donc l'analyse des carbohydrates, des lipides et des AGV.

Le protocole de détermination des lipides avait déjà été mis en place par une précédente stagiaire. Cependant, ce protocole était très long et prenait une journée entière de manipulation pour un seul échantillon, je devais donc trouver un moyen d'optimiser ce procédé.

L'étude des carbohydrates avait aussi été développée par une précédente stagiaire, mais les tests n'avaient été réalisés que sur des solutions de glucose, et non pas sur des échantillons réels. Je devais donc valider cette méthode avec des échantillons réels.

Enfin, aucune méthode n'avait été développée pour l'étude des AGV, il me fallait alors trouver une méthode d'analyse des acides gras volatiles.

III. Les protocoles de fractionnement

1) Fractionnement des carbohydrates

Les carbohydrates, ou sucres, sont des composés organiques de formule brute $C_m(H_2O)_n$. Le protocole développé pour le fractionnement de ces sucres est basé sur la méthode colorimétrique de Dubois qui permet l'analyse des sucres solubles et particuliers situés dans une suspension. Il est également possible d'analyser séparément les sucres solubles des sucres particuliers par centrifugation. Lorsque ces sucres sont mis en contact avec du phénol et de l'acide sulfurique concentré, une couleur jaune-orangé apparaît. Cette coloration est stable et fonction de la concentration en carbohydrates.

a) Protocole de fractionnement

La méthode de fractionnement consiste à prélever 1 mL de l'échantillon à analyser dans un tube à DCO propre et sec. Ensuite, 1 mL d'une solution de phénol 5% m/v est introduit dans ce tube, qui est ensuite mélangé au vortex. Puis 5 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés. Les tubes sont alors mis à chauffer pendant 3 min dans un chauffe-tubes à 105°C, puis placés à l'obscurité durant 30 min. Lorsque les tubes ont bien refroidi à l'obscurité, il est possible de lire l'absorbance à 487 nm, cette valeur correspondant au pic aperçu lors du balayage à différentes longueurs d'ondes du mélange réactionnel. On peut alors en déduire de l'absorbance la concentration en carbohydrates grâce à une courbe d'étalonnage réalisée à partir de différentes solutions de glucose de concentrations connues.

Il est parfois nécessaire de diluer les échantillons à analyser. En effet, la sortie du décanteur et les boues sont très concentrées en carbohydrates. Pour diluer, on utilise la sortie du décanteur filtrée. En effet, il n'est pas possible d'utiliser de l'eau distillée car cela changerait la matrice des solutions. La sortie est alors filtrée sur des filtres à MeS (Filtres Whatman 934-AH 125 mm), puis l'entrée est diluée 2 fois et les boues 250 fois à l'aide de cette solution filtrée.

b) Analyses effectuées

Ce protocole avait été réalisé par Marion Muselli, une stagiaire précédente. Cependant, tous les tests avaient été effectués sur des solutions de glucose et d'eau distillée, et non sur des échantillons réels. Je devais donc m'occuper de finaliser ce protocole afin de pouvoir l'utiliser pour analyser les différents échantillons provenant des décanteurs et du pilote. Les analyses effectuées sont présentées ci-dessous :

- Ajouts dosés :

La concentration en carbohydrates des échantillons réels nous étant inconnue, il était important d'avoir un moyen d'évaluer la précision et la justesse de la méthode. Pour cela, des ajouts dosés ont été effectués. Ces ajouts consistaient à introduire une quantité connue d'une solution de glucose dans les échantillons réels. En analysant la concentration sans ajout dosé et avec ajout, on doit retrouver le même écart que la quantité ajoutée. Une différence de 10% est néanmoins acceptée.

- Analyse de la courbe d'étalonnage :

Afin de déterminer les concentrations en carbohydrates à partir de l'absorbance, il est nécessaire d'avoir une courbe d'étalonnage. Il faut donc que cette courbe soit juste et précise, ou une erreur entacherait tous nos résultats. C'est pourquoi la courbe d'étalonnage doit être vérifiée régulièrement à l'aide d'une solution de glucose de concentration connue. Si l'écart entre la concentration obtenue et la concentration réelle est supérieur à 10%, il est nécessaire de refaire la courbe d'étalonnage.

- Test de stabilité des échantillons :

Il était nécessaire de savoir pendant combien de temps l'absorbance était stable et pouvait être lue. Pour cela, l'absorbance des mêmes échantillons d'entrée et de sortie avec et sans ajout dosé a été lue à différents temps.

- Test d'homogénéisation :

Les échantillons d'entrée et de boues de décanteur étant très hétérogènes, les concentrations obtenues après calcul variaient beaucoup pour un même échantillon. Des tests ont donc été effectués avec un mixeur et un homogénéisateur après différents temps de mélange afin d'essayer de rendre les échantillons plus homogènes lors des prélèvements.

2) Protocole de fractionnement des lipides

a) Protocole de fractionnement

Le protocole de fractionnement des lipides est basé sur une méthode d'extraction par soxhlet. L'échantillon à analyser est acidifié à pH=2, puis il est filtré. Le filtre est ensuite récupéré et introduit dans une cartouche en cellulose. Cette cartouche est placée au four à 105°C pendant 25 min. Une fois que la cartouche a refroidi, elle est mise dans le soxhlet comme le montre le schéma ci-dessous.

Légende du schéma :

- 1- Billes à ébullition
- 2- Ballon en pyrex de 250 ml rempli de 100 ml de solvant
- 3- Retour de distillation
- 4- Corps en verre
- 5- Cartouche de cellulose
- 6- Haut du siphon
- 7- Sortie du siphon
- 8- Adaptateur d'expansion
- 9- Condenseur
- 10- Entrée de l'eau de refroidissement
- 11- Sortie de l'eau de refroidissement

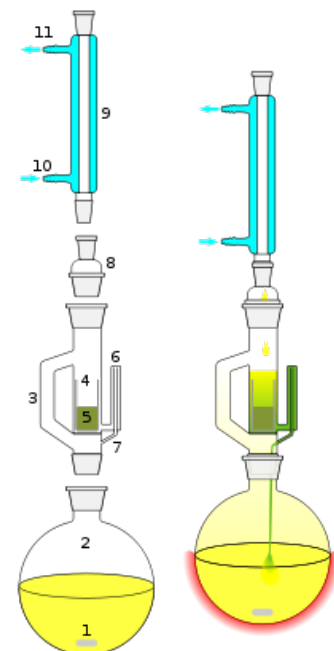


Figure 2 : Schéma de l'extraction soxhlet

Au dessus du soxhlet est placé un réfrigérant, et en-dessous se trouve un ballon. Ce ballon a été pesé à vide au préalable. On place alors de l'hexane dans le ballon que l'on chauffe grâce à un chauffe-ballon. L'hexane va s'évaporer et se condenser dans le réfrigérant. Il va alors retomber dans le soxhlet, solubilisant ainsi les lipides se trouvant dans la cartouche de cellulose. Une fois que l'hexane atteindra le niveau du haut du siphon, une vidange va se produire, c'est-à-dire que tout l'hexane va retomber dans le ballon, entraînant ainsi les lipides. Cela s'appelle un cycle. Un cycle dure 3 min, et il est nécessaire d'avoir 20 cycles par heure pendant 5 heures. Une fois l'extraction terminée, on récupère le ballon et on évapore le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif. Il est alors possible de peser le ballon contenant les lipides. La différence de masse du ballon avant et après extraction donnera la masse de lipides, et à partir du volume d'échantillon filtré, il sera possible de déterminer la concentration de lipides dans l'échantillon.

b) Travail effectué

Ce protocole avait été réalisé par Aurore Poli, une précédente stagiaire. Je l'ai donc refait avec les indications données, et ajouté quelques détails manquants. En revanche, le gros problème de cette analyse est sa longueur. En effet, il faut compter une journée entière pour réaliser une seule analyse. Si l'on voulait analyser l'entrée, la sortie et les boues du pilote, il faudrait compter 3 jours complets et les analyses ne seraient pas réalisées en triplicata. Il y aurait donc de grands risques d'erreurs. De plus, cette manipulation doit se faire sous la hotte, et prend beaucoup de place. Elle monopoliserait donc la hotte pour une seule extraction et empêcherait la réalisation d'autres expériences puisqu'il n'y avait pas d'autres hottes disponibles.

Il était donc nécessaire de trouver une manière plus efficace d'analyser le taux de lipides dans les échantillons, soit en optimisant le procédé, soit en trouvant une autre méthode ou d'autres appareils. Mon travail s'est donc porté sur l'amélioration de ce protocole.

3) Protocole de fractionnement des acides gras volatiles

Pour le fractionnement des acides gras volatiles, différentes méthodes ont été étudiées. En effet, au début de mon stage, nous voulions analyser les AGV par chromatographie gazeuse. Cependant, comme je n'étais là que 3 mois, je n'aurais pas eu le temps d'apprendre à utiliser cet appareil et à réaliser un protocole que n'importe qui aurait pu effectuer sans formation préalable.

Le choix s'est donc ensuite porté sur une méthode Hach basée sur l'estérification. Pour cette méthode, les réactifs sont placés dans des vials en verre et la valeur de la concentration est lue directement dans le spectrophotomètre portable, comme montré sur la photo ci-dessous. Les résultats sont donnés sur l'écran de l'appareil et sont exprimés en mg/L d'acide acétique.



Figure 3 : Matériel d'analyse pour la méthode Hach

Le protocole de cette méthode est décrit ci-dessous :

- Filtrer ou centrifuger 25 mL d'échantillon
- Prélever 0,5 mL du surnageant et ajouter 1,5 mL d'éthylène glycol et 0,2 mL d'acide sulfurique 19,2 N
- Placer au bain-marie pendant 3 min
- Refroidir à 25°C
- Rajouter 0,5 mL de chlorhydrate d'hydroxylamine, 2 mL d'hydroxyde de sodium 4,5N, 10 mL de solution sulfurique de chlorure ferrique et 10 mL d'eau déionisée
- Laisser réagir 3 min
- Lire au spectrophotomètre

Différents essais ont été menés mais ils n'ont pas été concluants comme on peut le voir dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats des tests de la méthode Hach pour l'analyse des AGV

Test	Concentration (mg/L) des triplicata		
Entrée pilote (13 juillet)	8	22	Rempli d'eau
Entrée pilote (14 juillet)	2	Rempli d'eau	3
Entrée décanteur (29 juillet)	Bouchon défectueux	21	28
Entrée décanteur (1^{er} aout)	23	9	2

En effet, nous avons d'abord rencontré un problème avec le matériel. Il nous fallait placer les échantillons au bain-marie. Or, nous n'avions pas de bain-marie adapté pour ce type de vials. Il a donc été décidé d'utiliser un bécher rempli d'eau et placé sur une plaque chauffante. Pour les 2 premiers essais, le bécher choisi était trop grand, les tubes se sont alors renversés dans le bécher et se sont remplis d'eau. Pour les tests suivants, une solution a été trouvée en attachant les tubes entre eux avec un élastique et en les plaçant dans un bécher plus étroit. Cette technique a fonctionné pour les 2 tests suivants. Lors du 3^{ème} test, un des tubes s'est rempli d'eau mais cette fois à cause d'un bouchon défectueux.

Cependant, comme on peut le voir, les valeurs des concentrations sont très différentes entre les triplicatas. En effet, les concentrations des échantillons se situaient en-dessous du seuil de détection de cette méthode. Cette technique a donc été abandonnée.

Une troisième méthode a alors été essayée. Cette technique repose sur le titrage pHmétrique des ions présents par de l'acide sulfurique à 0,05 N. Elle présente l'avantage d'avoir des seuils de détection beaucoup plus faibles, et de permettre en même temps l'analyse des taux d'ammoniac, de phosphate et de bicarbonate. De plus, un appareil

permettant le titrage automatique de 10 échantillons en même temps était déjà présent au laboratoire. Il est présenté sur la photo suivante :

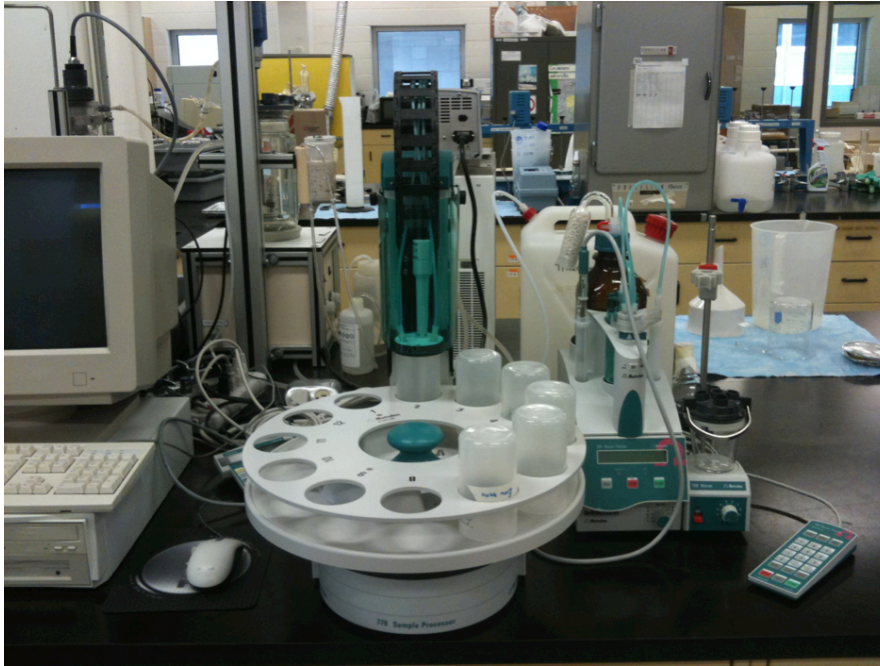


Figure 4 : Titrateur automatique présent au laboratoire

Cet appareil est composé d'un silo pouvant contenir 10 récipients où sont placés les échantillons. Le silo est l'appareil au centre de la photo. Il est relié à gauche à un ordinateur qui recevra les données une fois le titrage terminé, et à droite au titrateur proprement dit qui peut contenir soit un acide soit une base selon le titrage que l'on souhaite effectuer. C'est dans ce titrateur que l'on programme le titrage en donnant les paramètres de titration et d'arrêt, le volume de l'échantillon et les données à envoyer à l'ordinateur. Enfin, au-dessus du silo se trouve un bras automatisé contenant un agitateur et où l'on place la sonde pH et la sonde reliée à l'acide ou la base pour l'ajout lors du titrage.

Comme cet appareil n'avait pas été utilisé depuis plusieurs années, il était d'abord nécessaire de faire des essais avec des solutions connues afin de voir s'il fonctionnait bien. J'ai donc réalisé des solutions d'acétate de sodium dans de l'eau potable que j'ai titré avec de l'acide sulfurique à 0,05N. Avec cette solution, nous savions à peu près autour de quelles valeurs les pics des équivalences devaient se situer. Le but était donc de vérifier si nous obtenions bien les résultats attendus.

4) Analyse globale des entrées et sorties du pilote

Afin d'avoir un aperçu global des réactions à l'œuvre lors de la décantation primaire dans le pilote, il a été décidé de réaliser une analyse globale des entrées et sorties du pilote, en même temps. En effet, jusqu'à présent, chacun prenait ses échantillons séparément pour le développement de ses protocoles. Comme beaucoup de protocoles étaient à présent terminés, nous avons donc prélevé l'entrée, la sortie et les boues du pilote et nous avons mesuré la DCO, les MeS, ainsi que les taux de carbohydrates et de lipides afin de voir en quoi certains aspects pouvaient influencer les autres.

IV. Résultats et analyse

1) Fractionnement des carbohydrates

- Ajouts dosés :

Les tableaux suivant présentent les résultats des tests avec ajouts dosés :

Tableau 2 : Résultats des tests avec ajout dosé

Concentration (mg/L)	
Entrée décanteur	Entrée décanteur avec ajout dosé de 40 mg/L
46,1	85,4
44,9	85,9
51,4	130,9
Sortie décanteur	Sortie décanteur avec ajout dosé de 20 mg/L
17,7	38,5
19,4	42,0
18,1	41,5
Sortie décanteur filtrée	Sortie décanteur filtrée avec ajout dosé de 20 mg/L
6,3	24,1
2,3	23,5
2,5	24,4

Tableau 3 : Résultat des tests avec ajout dosé pour les boues

Concentration (g/L)	
Boues de décanteur	Boues avec ajout dosé de 5 g/L
3,2	7,9
3,0	5,6
2,4	6,7

D'après les résultats obtenus, il est tout d'abord possible de constater que les échantillons sont très hétérogènes. En effet, tous les échantillons ont été analysés en triplicata. Or, les valeurs varient beaucoup entre les différents triplicatas. Ensuite, à part un résultat pour l'entrée du décanteur, on retrouve bien les valeurs attendues pour les ajouts dosés. Cela prouve que la méthode est correcte et donne bien les résultats attendus. On constate les mêmes résultats pour l'analyse des boues de décanteur. Les triplicatas sont très différents les uns des autres avec ou sans ajouts dosés. Cependant, pour rester dans la bonne gamme d'absorbance, les échantillons doivent être dilués. Les boues notamment doivent être diluées 250 fois. Cela entraîne une grande erreur sur la mesure. En effet, pour diluer 250 fois, on prélève 4 mL que l'on dilue dans 1L de sortie filtrée. Il est cependant très difficile d'avoir un échantillon représentatif dans seulement 4 mL. Et de même, lors des ajouts dosés dans l'échantillon dilué, l'erreur est ensuite multipliée par 250 lors du calcul de la concentration. Enfin, on remarque que la sortie filtrée présente une concentration en

carbohydrates très faible, ce qui prouve que la sortie peut bien être utilisée pour les dilutions.

Afin de vérifier la validité de la courbe d'étalonnage réalisée par une stagiaire précédente, une solution de glucose de concentration connue a été analysée. Les résultats sont présentés ci-dessous :

Tableau 4 : Test avec une solution de glucose de concentration connue de 50mg/L

Concentration (mg/L) d'une solution de glucose de 50 mg/L
58,1
52,4
62,3

Il est possible de constater que les concentrations obtenues ne correspondent pas à la valeur attendue. Cette différence peut avoir différentes origines. D'abord, la courbe d'étalonnage n'a pas été réalisée par la même personne que celle qui a ensuite réalisé ces tests. Cela peut entraîner des différences de manipulation. Ensuite, la méthode utilise une solution de phénol à 5% m/v. Cette solution doit être gardée au frais et à l'obscurité. Elle peut être utilisée pendant 6 mois. Il est possible que cette solution ait évolué au cours des 6 mois, c'est pourquoi d'autres courbes d'étalonnages ont été réalisées.

- Analyse de la courbe d'étalonnage :

Les différentes courbes d'étalonnage sont présentées ci-dessous :

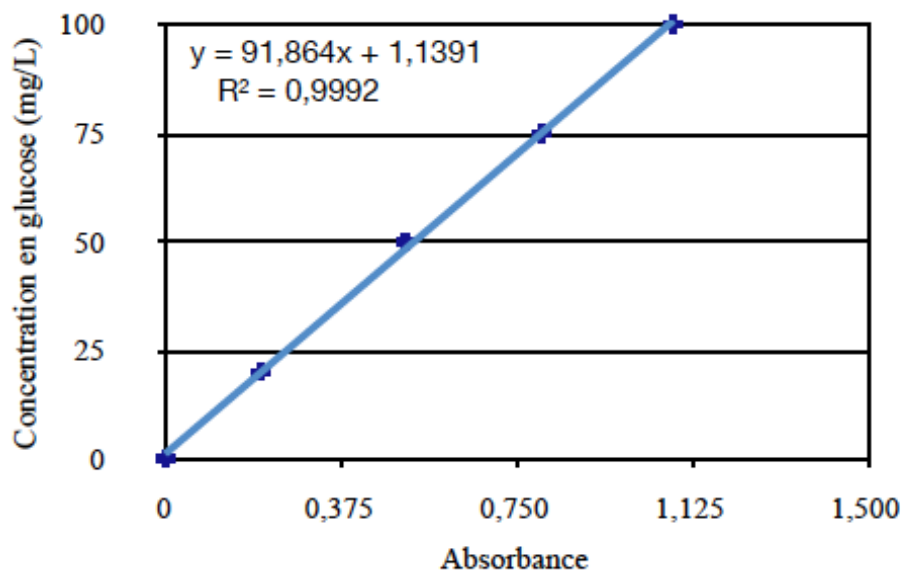


Figure 5 : Courbe d'étalonnage réalisée par une précédente stagiaire

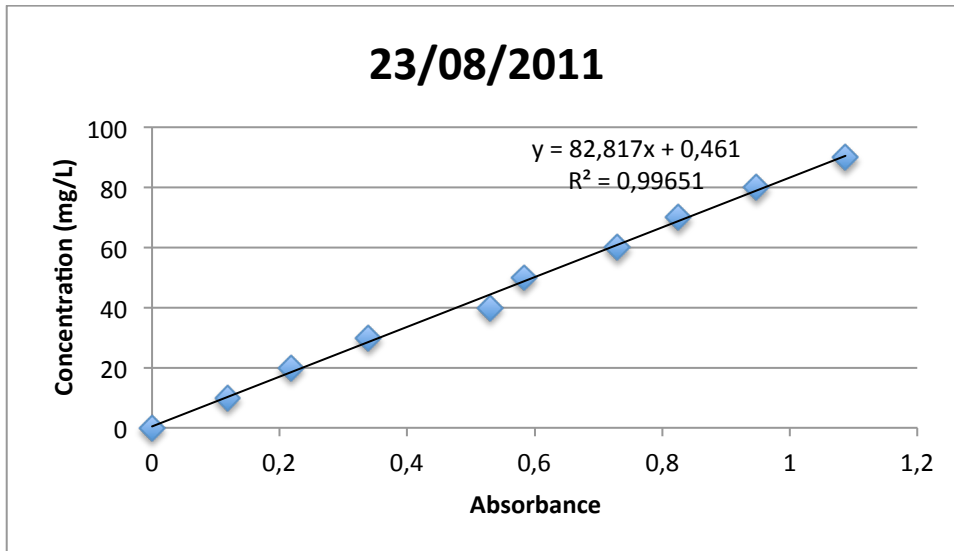


Figure 6 : 1ère courbe d'étalonnage refaite

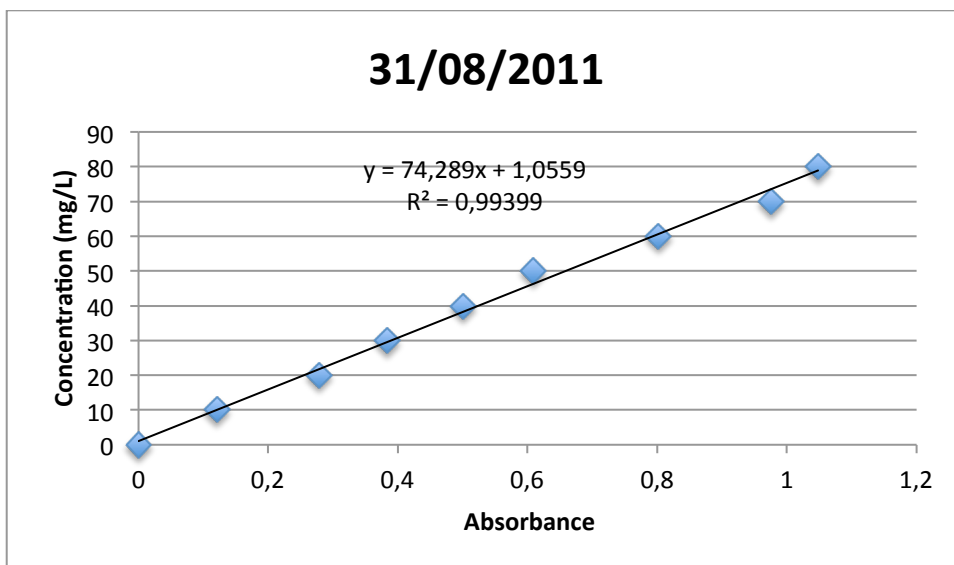


Figure 7 : 2ème courbe d'étalonnage refaite

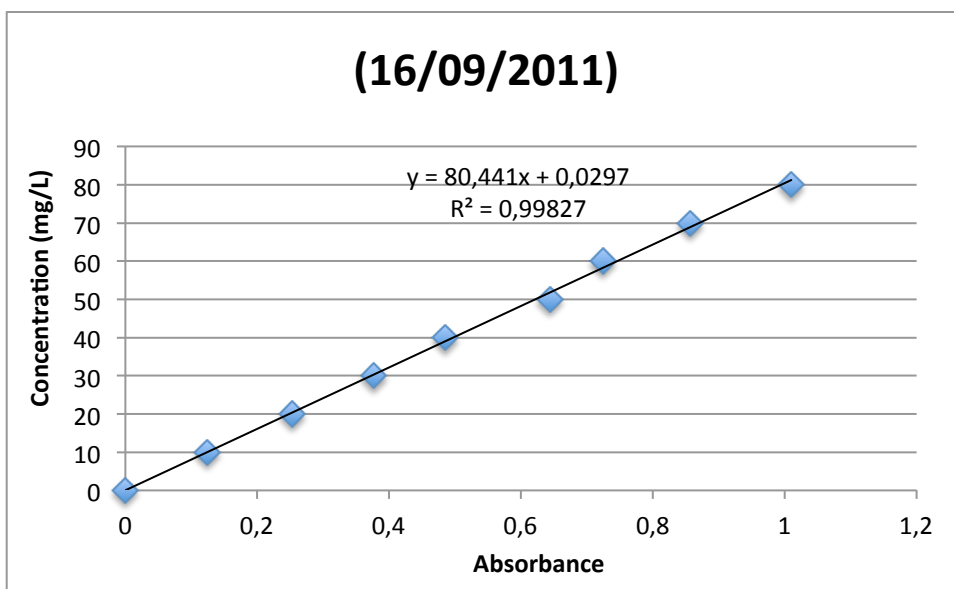


Figure 8 : 3ème courbe d'étalonnage refaite

Il est possible de constater que les courbes d'étalonnages varient beaucoup entre elles. Comme trois d'entre elles ont été réalisées par la même personne, la différence entre manipulateur ne peut pas expliquer cette variation. En revanche, les solutions de glucose sont assez instables, ce qui pourrait expliquer les différences entre les courbes. C'est pourquoi une moyenne des différentes courbes d'étalonnages a été calculée. Il est cependant nécessaire de vérifier régulièrement la justesse de cette courbe d'étalonnage avec une solution de glucose de concentration connue. Si l'écart est supérieur à 10%, il faut refaire une courbe d'étalonnage.

- Test de stabilité des échantillons :

Les tests de stabilité des échantillons sont présentés ci-dessous :

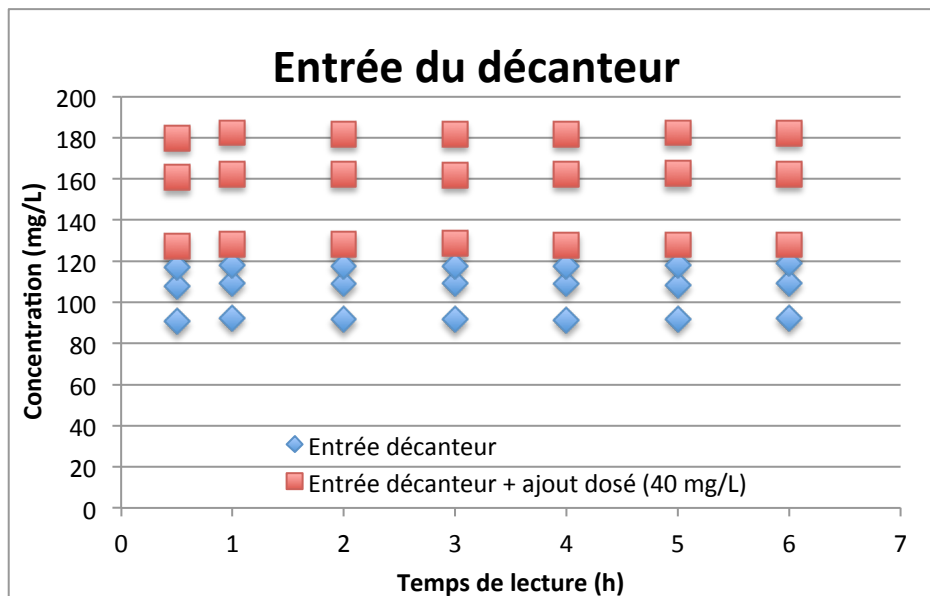


Figure 9 : Test de stabilité sur l'entrée du décanteur

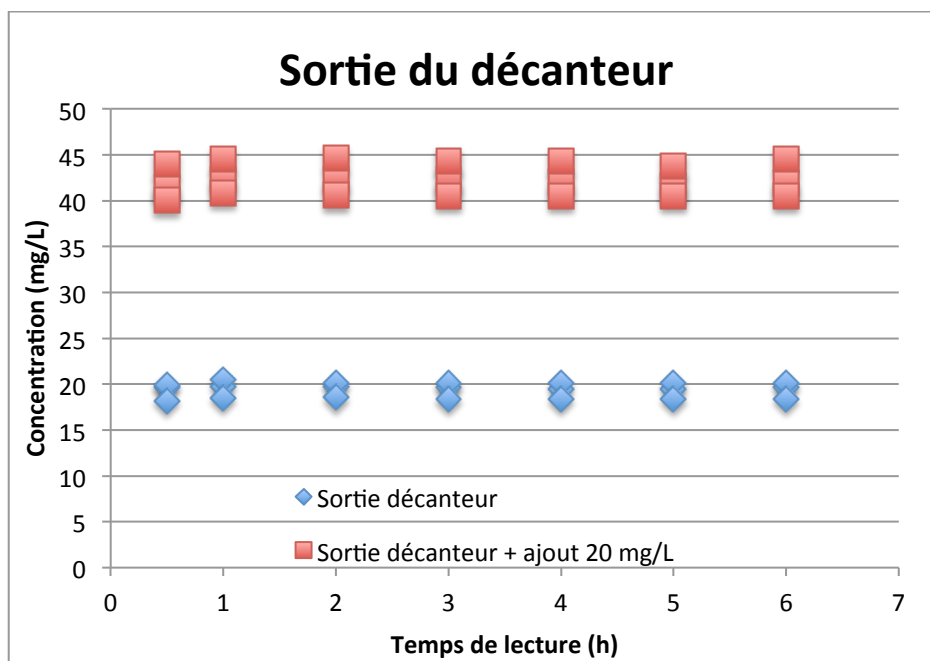


Figure 10 : Test de stabilité sur la sortie du décanteur

On constate que les échantillons sont très stables et peuvent même être mesurés après 24h sans que la valeur soit modifiée. L'absorbance évolue quelque peu entre 30 min et 1 heure mais cela n'a pas une grande incidence sur la valeur finale. Les échantillons peuvent donc être lus à n'importe quel moment après leur mise à l'obscurité et leur refroidissement.

- Test d'homogénéisation :

Des tests ont d'abord été effectués en mixant les échantillons avec un blender pendant 10 min. Les résultats sont présentés ci-dessous :

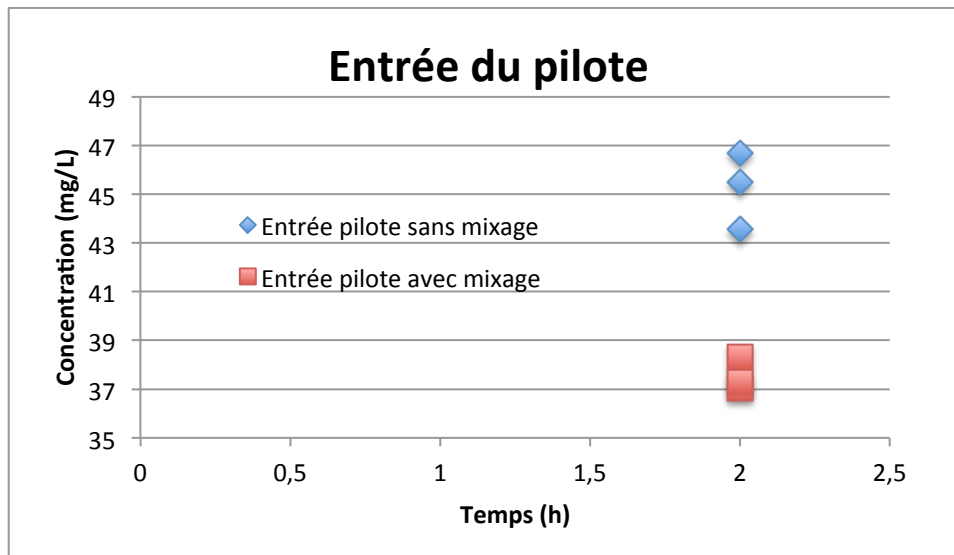


Figure 11 : Test de mixage sur l'entrée du pilote

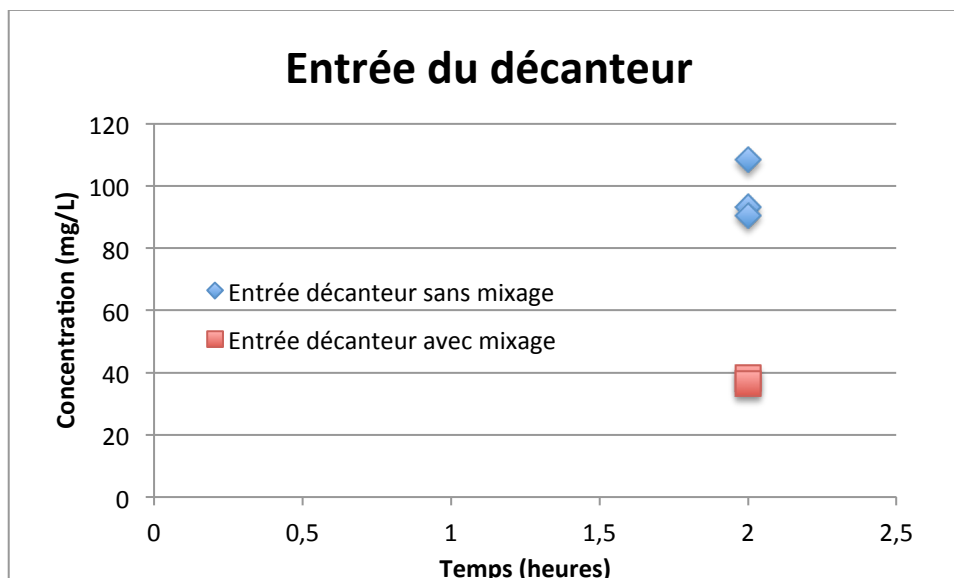


Figure 12 : Test de mixage sur l'entrée du décanteur

Il est possible de constater d'après ces graphiques que le mixage dénature les échantillons. En effet, le mélange provoque une augmentation de la température des eaux usées, changeant ainsi les concentrations. Le mixage au blender a donc été abandonné.

L'homogénéisateur a ensuite été utilisé. Cet appareil met en mouvement les particules, rendant ainsi l'échantillon plus homogène. Les résultats sont présentés ci-après :

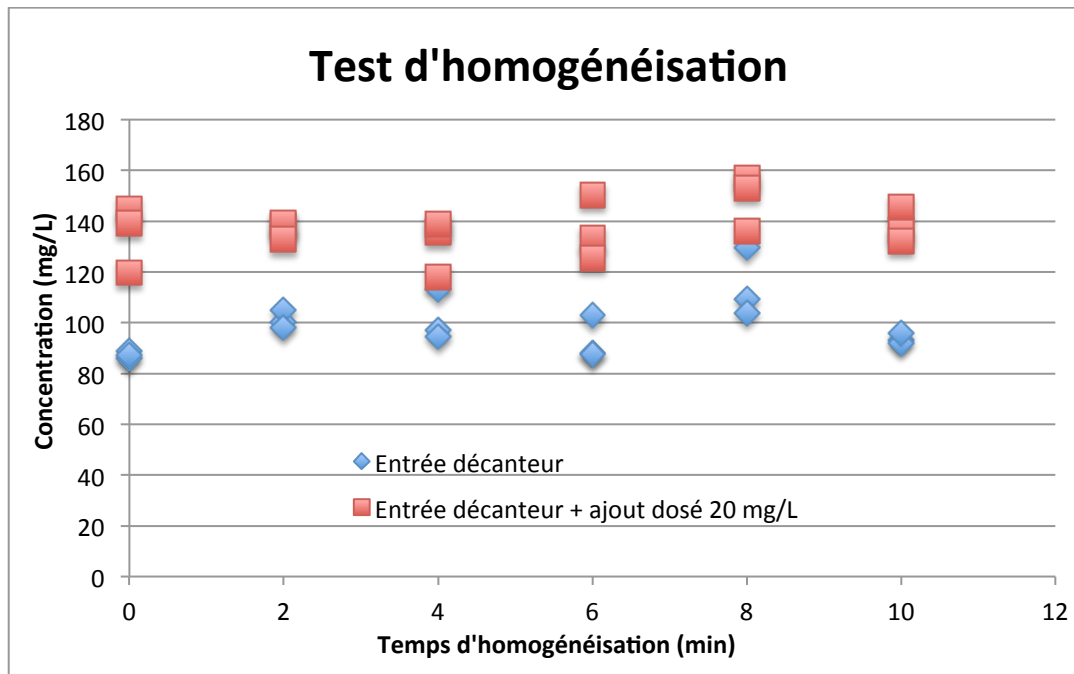


Figure 13 : Test d'homogénéisation sur l'entrée du décanteur

On constate d'après les résultats que l'homogénéisateur n'a pas d'effet sur l'homogénéité des échantillons. En effet, pour l'entrée du décanteur, l'échantillon est aussi homogène sans agitation qu'après 10 min d'homogénéisation. Cet appareil n'ayant pas d'effet probant, et son utilisation prenant assez de temps, l'homogénéisation a été abandonnée. Les échantillons sont simplement bien mélangés avant et entre chaque prélèvement.

Cependant, l'hétérogénéité entre les triplicatas peut aussi être expliquée par la manière de manipuler. En effet, l'acide sulfurique était ajouté par une pipette de 5mL et une poire à pipeter. Cette manipulation prenait beaucoup de temps. Or, selon la méthode de Dubois¹, il faut ajouter l'acide sulfurique rapidement. Il serait donc intéressant d'utiliser une dispensette d'acide sulfurique afin de voir si l'ajout rapide d'acide pourrait réduire les écarts entre les triplicatas.

2) Protocole de fractionnement des lipides

Afin d'améliorer le protocole de fractionnement des lipides, des recherches ont été menées pour trouver d'autres techniques ou d'autres appareils permettant l'optimisation du procédé. Mes recherches se sont d'abord concentrées sur des demandes de devis pour l'achat d'un banc de chauffe-ballons. En effet, il était nécessaire d'analyser l'entrée, la sortie et les boues du pilote, et cela au moins en duplicata, entraînant le besoin de réaliser 6 analyses. Or, seulement deux chauffe-ballons étaient disponibles dans le laboratoire ainsi que 5 soxhlet et 5 réfrigérants, du matériel supplémentaire était donc nécessaire. Le banc de chauffe-ballons à 6 places présentait l'avantage d'effectuer 6 analyses en même temps, ce

¹ Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.






Dubois M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith.

Division of Biochemistry, University of Minnesota, St. Paul, Minn (1957).

que nous recherchions. De plus, il pouvait rentrer sous la hotte, ce qui n'aurait pas été possible avec 6 chauffe-ballons séparés.

Cependant, au cours de mes recherches, j'ai trouvé d'autres systèmes pour une extraction soxhlet. Il existe en effet des systèmes entièrement automatisés permettant le fractionnement des lipides automatiquement ainsi que l'ajout d'hexane au cours de l'analyse, son évaporation à la fin et la réutilisation du solvant. Le choix s'est donc porté sur ce système et j'ai fait d'autres recherches afin de comparer les différents fournisseurs de ces appareils. Le résultat de ces recherches est présenté ci-après :

Tableau 5 : Tableau des différents fournisseurs d'un système automatique soxhlet

Fournisseur	Gerhardt (Lab Synergy)	Büchi	Fisher Foss Soxtec 2043	Fisher Foss Soxtec 2055	Fisher Foss Soxtec 2050
Prix (\$CAN)	22 649	23 234	16 961	21 984	26 339
Nombre de places	6	6	6	6	6
Closed solvent addition			Non	Oui	Oui
Fully automated			Non	Non	Oui
					

Les systèmes Fisher 2055 et 2050 permettaient l'ajout automatique de solvant alors que pour le 2043, une dispensette était nécessaire. Cependant, ces systèmes restent beaucoup plus rapides, sûrs et économiques en solvant que l'analyse manuelle par soxhlet.

A la fin de mon stage, l'appareil n'avait pas encore été commandé, je n'ai donc pas pu aller plus loin dans la mise en place de ce protocole. Lorsque l'appareil sera livré, il faudra encore mettre en place le protocole d'utilisation de cet appareil.

3) Protocole de fractionnement des acides gras volatiles

Lors du titrage de la solution d'acétate de sodium par l'acide sulfurique à 0,05N, la courbe suivante a été obtenue :

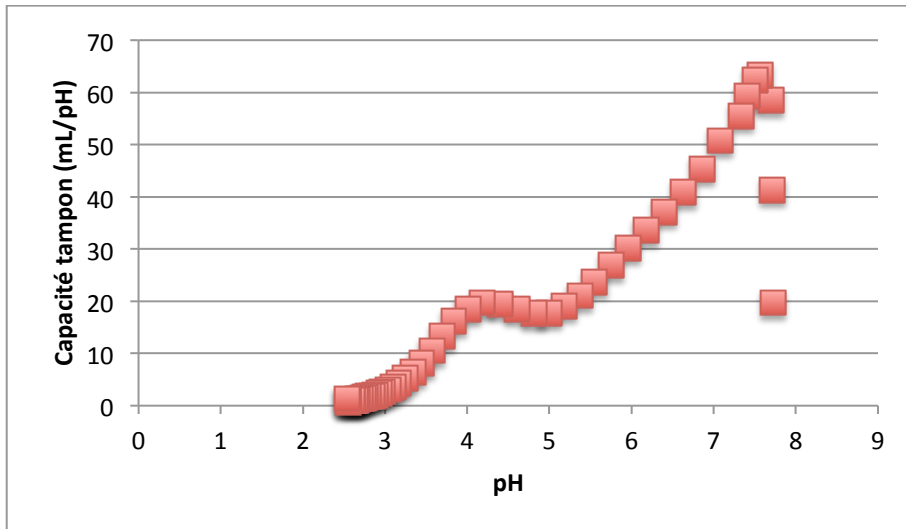


Figure 14 : Courbe du titrage de la solution d'acétate de sodium

Cette courbe de capacité tampon représente la dérivée du volume d'acide ajouté en fonction du pH. Nous avons pu observer que les pics correspondant aux équivalences étaient bien obtenus pour le pH attendu. Cette technique semble donc bien fonctionner. Cependant, le titrateur présentait un problème informatique. En effet, lors de nombreux tests, les données n'ont pas été envoyées à l'ordinateur et ont été perdues. De nombreux essais ont été effectués pour comprendre d'où provenait le problème, mais la solution n'a pas été trouvée à ce jour. L'ordinateur doit être changé et le logiciel réinstallé. Une autre stagiaire va par la suite reprendre cette étude et mettre en place le protocole d'analyse des échantillons du décanteur primaire grâce au titrateur.

4) Analyse globale des entrées et sorties du pilote

L'analyse simultanée des différents éléments en entrée, sortie et boues du pilote a donné les résultats suivants :

Tableau 6 : Résultats des tests sur l'entrée et la sortie du pilote

	MeS (mg/L)	Lipides (mg/L)	DCO (mg/L)	Carbohydrates (mg/L)	
Entrée	224	26,8	378,5	102	Ajout dosé de 40 mg/L : 207
Sortie	107		217	21,8	Ajout dosé de 20 mg/L : 60,5

Tableau 7 : Résultats des test sur les boues du pilote

	MeS (g/L)	DCO (g/L)	Carbohydrates (g/L)	
Boues	8,4	12,65	3,2	Ajout dosé de 5 g/L : 11,9

Ces résultats sont tous des moyennes des triplicatas analysés sauf pour les lipides. Il est possible de voir que le passage par le pilote permet bien un abaissement des MeS, de la DCO et des carbohydrates alors que ces mêmes études sur les boues montrent des concentrations très élevées. Il est possible de constater que les ajouts dosés sur les carbohydrates ont donné des valeurs plus élevées qu'attendu. Une erreur a peut être eu lieu lors de la manipulation. Enfin le taux de lipides n'a été analysé qu'en entrée par manque de temps. Il faudrait analyser la sortie et les boues, mais aussi l'entrée des décanteurs afin de pouvoir en tirer de réelles conclusions.

Conclusion

À l'heure de la protection de l'environnement, le traitement des eaux usées représente un enjeu majeur pour les collectivités. Cela passe par un traitement efficace de ces eaux usées avant leur rejet dans l'environnement, mais aussi par l'optimisation de ces procédés, aussi bien du point de vue énergétique qu'au point de vue de l'ajout de produits chimiques.

Le projet *primEAU* s'inscrit dans cette optique. En effet, une fois que tous les protocoles d'analyse seront prêts à être utilisés, une grande campagne d'échantillonnage pourra être menée autour du pilote installé à la STEP Est de Québec. Ces données permettront la mise en place et les tests du modèle. Au cours de cette campagne d'échantillonnage, de nombreux paramètres seront testés tels que le débit en entrée ou l'ajout de différents produits chimiques.

Le protocole d'analyse des carbohydrates est terminé et prêt à être utilisé. L'analyse des lipides est aussi prête pour le système classique. Les demandes de devis pour un système automatique sont terminées. Il reste maintenant à commander l'appareil et à mettre en place un protocole d'analyse pour ce système particulier. En ce qui concerne les AGV, le titrateur doit être testé pour trouver le problème informatique. Il faudra ensuite passer à l'analyse sur des échantillons réels.

Ce stage m'a permis de m'intégrer à un groupe de recherche et à voir de l'intérieur le fonctionnement d'une étude du point de vue de la recherche. J'ai essentiellement travaillé au laboratoire, ce qui m'a apporté une plus grande connaissance des techniques de manipulation, mais aussi une plus grande rigueur. Mais j'ai aussi effectué de nombreux prélèvements à la station d'épuration et sur le pilote. J'ai ainsi pu comprendre et observer le fonctionnement du traitement des eaux usées de l'intérieur. J'ai dû faire face à des problèmes et trouver des solutions. Enfin j'ai été durant 3 mois un membre à part entière de l'équipe de recherche *primEAU*. J'ai participé aux différentes réunions entre les membres de l'équipe, et entre les différentes équipes. J'ai pu exposer mes résultats et en discuter avec les autres chercheurs.

J'ai cependant mis du temps à être opérationnelle et j'ai eu tendance à me disperser entre les trois projets qui m'avaient été attribués. Des objectifs plus clairs et plus précis dès le début de mon stage m'auraient peut-être permis d'aller plus loin dans le travail qui m'avait été attribué.

Enfin ce stage a été très enrichissant du point de vue de la connaissance du monde de la recherche, mais aussi du domaine du traitement des eaux usées.

Nomenclature

ADM : Anaerobic Digester Model
AGV : Acides Gras Volatiles
ASM : Activated Sludge Model
DCO : Demande Chimique en Oxygène
MeS : Matières en Suspension
STEP : Station d'épuration

Bibliographie

Littérature :

Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.
M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, et Fred Smith.
Division of Biochemistry, University of Minnesota, St. Paul, Minn (1957).

Colorimetric Quantification of Carbohydrates.
Contributed by Eric Fournier
University of Alberta, Canada (2001)

Procedures Manual DR/890 Colorimeter
Hach Company
Method 8196

The rapid colorimetric Determination of Organic Acids and their Salts in Sewage-sludge
Liquor
H.A.C. Montgomery, J.F. Dymock, et N.S. Thom
Water Pollution Research Laboratory, Elder Way, Stevenage, Herts (1962).

Guide d'utilisateur du titrateur Titrino 794
C. Garneau
Université Laval

Guide d'utilisation du titrateur Titrino 794 (Metrohm)
C. Garneau et M. Pujadas
Université Laval

Optimisation d'un décanteur primaire. Mise en place d'un protocole pour mesurer la teneur
en hydrates de carbone dans les eaux usées et dans la biomasse épuratrice.
Rapport de stage
M. Muselli
Université Laval, I.U.T de Marseille

Détermination des sucres totaux dans les eaux usées, dans la biomasse en suspension ou
toute autre suspension liquide
M. Muselli
Université Laval

Détermination des solides en suspension totaux et volatils (méthode gravimétrique)
M. Pujadas et B. Wipliez
Université Laval

Détermination de la concentration en lipides dans les eaux usées (méthode soxhlet)

A. Poli

Université Laval

Protocole 5520 D. Soxhlet Extraction Method

Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edition, American Public Health Association, Washington DC (1999).

Optimisation d'un décanteur primaire. Mise en place d'un protocole d'analyse des lipides.

Rapport de stage

A. Poli

Université Laval, I.U.T de Marseille

Protocole 5560 D. Gas Chromatographic Method

Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edition, American Public Health Association, Washington DC (1999).

Sites internet :

<http://www2.ulaval.ca/>

<http://www.labsynergy.com/soxhlet-extraction-system.htm>

<http://www.buchi.fr/Systeme-d-extraction-B-811-Sta.19645.0.html>

<http://www.foss.dk/industry-solution/products/soxtec-systems>

Table des annexes

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

Détermination de la concentration en lipides dans les eaux usées (méthode soxhlet).....XIV

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

Date d'émission :		Émis par :
Codification :		
COT-ULVAL		Page 1 de 11

1. Introduction

Les carbohydrates 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 carbohydrates sont divisés en quatre groupes chimiques : les monosaccharides, les dissaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides.

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

2. 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.

3. Principe et théorie

Quand les carbohydrates (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 carbohydrates 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.

4. Fiabilité

4.1) Interférences

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.

4.2) Limite de détection

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

4.3) 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.

4.4) Fidélité

Aucune donnée statistique n'est disponible

4.5) Réplicabilité

Aucune donnée statistique n'est disponible

4.6) Reproductibilité

Aucune donnée statistique n'est disponible

4.7) Justesse

Aucune donnée statistique n'est disponible

5. 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.

6. Appareillage

6.1) Matériel

- Pipette automatique (20-200 et 200-1000 µL)
- Bêchers de 20, 50 et 100 mL
- Tubes à DCO vides (Hach)
- Pipette de 5 mL (tiroir 41-b)
- Poire à pipetter (tiroir 126-a)
- Filtres Whatman 934-AH (125 mm)
- Büchner, erlenmeyer, joint conique, pompe
- 2 pipettes de 10 mL
- 1 bécher de 100 mL

Pour les 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

6.2) Équipement

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

7. Réactifs et étalons

- **Eau déminéralisée**

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

Dissoudre 5g de glucose anhydre (numéro 955) 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 carbohydrates 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)**

Dissoudre 125g de phénol dans 2,5 L d'eau déminéralisée pour en avoir une grosse quantité. La solution peut se conserver 6 mois à 4C° et à l'obscurité. L'idéal serait de la contenir dans une bouteille ambrée.

- **Acide sulfurique concentré de type ACS (numéro 1835)**

8. Protocole analytique

- **Conditions d'opérations**

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 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 sont 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.

➤ **Etapes de manipulation**

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-ballon, 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 :



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 :



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.

Concentration (mg/L)	Volume de solution mère à prélever (μ 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 »

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.
- 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. Comme il est nécessaire de pipeter 5 fois l'entrée, il faut mélanger entre chaque pipetage afin de s'assurer une bonne homogénéisation de l'échantillon. Pour mélanger, on peut soit secouer la bouteille en plastique fermée, soit utiliser le petit couteau situé dans le tiroir 122-a. Attention à ne pas remuer en tournant le couteau, mais plutôt en l'agitant du haut vers le bas pour s'assurer que les particules ne restent pas au fond.
- 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 »

Préparation des échantillons de boues

- 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 à l'aide d'une pipette de 5 mL et le 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 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 »

Fractionnement des échantillons :

Les étapes suivantes doivent être effectuées sous la hotte.

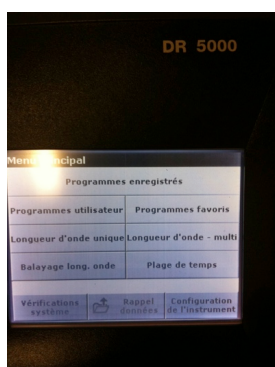
- Ajouter 1mL de la solution de phénol 5% à l'aide de la pipette automatique dans chacun des tubes.
- Fermer les tubes.
- Agiter au vortex.
- Si un ajout dosé est effectué sur les tubes (voir la partie sur les ajouts dosés), l'ajout de la solution de glucose doit être effectué juste avant l'ajout de 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 d'une pipette de 5 mL (***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***). Il serait préférable d'utiliser une dispensette pour cette opération. En effet, il est difficile de ne pas faire tomber quelques gouttes lors du prélèvement de l'acide à l'aide de la pipette, ce qui est dangereux. De plus, le prélèvement de l'acide dans chaque tube prend un certain temps ce qui peut entraîner de grosses différences entre les différents triplicatas.
- 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)

Lecture au spectrophotomètre

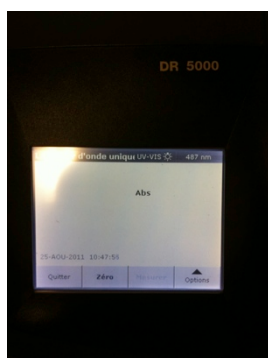
Le spectrophotomètre est situé au niveau du tiroir 48-a.



- 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. Un fois que l'écran suivant s'affiche, cliquer sur « Longueur d'onde unique » (l'écran est tactile).



- Cliquer ensuite sur « Options », puis sur λ . 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 versant pour bien homogénéiser.

➤ Ajouts dosés

Il peut être intéressant d'analyser également les échantillons à l'aide ajouts dosés. En effet, les échantillons analysés présentent des concentrations inconnues et il est donc difficile de déterminer si la concentration en sucres obtenues et la concentration réelles. 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 µL 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 µL 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.

➤ Étalonnage

Voilà la dernière équation de la courbe d'étalonnage réalisée : $y = 80,4 x + 0,03$

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.

10. 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.

11. 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.

11. 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

Détermination de la concentration en lipides dans les eaux usées

(méthode soxhlet)

	RÉALISATION	RÉVISION	APPROBATION
NOM	POLI Aurore	PASQUIER-MEUNIER Perrine	
FONCTION	Stagiaire	Stagiaire	
DATE	21-02-2011	21-07-2011	
SIGNATURE			
GESTION DES MODIFICATIONS			
RÉVISION	DATE	DESCRIPTION DE LA MODIFICATION	
01	20-04-2011	Édition du SOP	

1. Introduction

Les eaux usées sont toutes des eaux chargées de différents composés provenant des rejets de la population humaine, des activités commerciales et industrielles. Ceci contribue à polluer les milieux dans lesquels ces eaux sont déversées. C'est pourquoi, dans un souci de respect de ces différents milieux, des traitements sont réalisés sur ces effluents par le réseau d'assainissement urbain. De nombreuses particules sont présentes dans les eaux telles que des protéines, des lipides, des carbohydrates, etc. Un projet est actuellement mené pour pouvoir améliorer la décantation primaire, qui est une étape de l'assainissement, en liant les modèles ASM (Activated Sludge Model) et ADM (Anaerobic Digestion Model). Pour cela, il est nécessaire d'analyser tout ce qui se trouve dans les eaux. C'est pourquoi, un protocole sur l'extraction des lipides a été mis en place.

2. Domaine d'application

La détermination des lipides se fait par extraction solide-liquide. Cette méthode est une méthode standard appropriée pour les eaux usées. Elle peut être utilisée pour d'autre domaine comme l'agroalimentaire.

Où trouve-t-on des lipides?

Les lipides "visibles" sont les graisses animales (saindoux, graisse d'oie, beurre...) et végétales (huiles végétales, margarine, ou autres graisses végétales telles que le beurre d'arachide...). Les lipides "cachés" se situent dans de nombreux aliments : viande, charcuterie, poisson, fromage, lait, fritures...

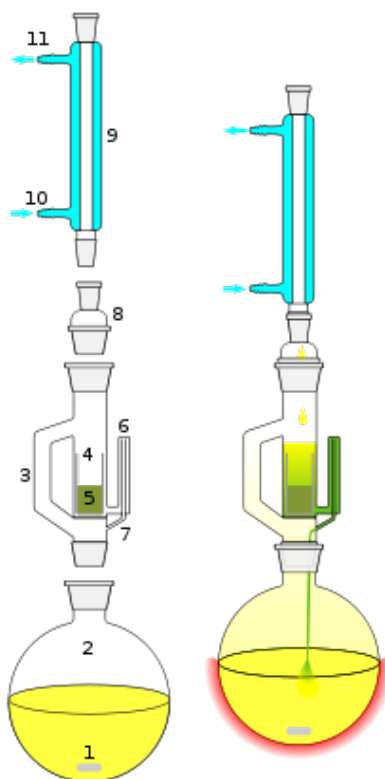
Il est aussi possible de retrouver des lipides dans les eaux de rivière par la présence d'algues par exemple.

On peut aussi trouver des lipides "visibles" et "cachés" dans les eaux usées. Ce protocole a été mis en place pour les eaux usées avec des échantillons réels prélevés à la STEP Est de la ville de Québec. D'après les résultats obtenus, il a été possible de constater qu'il y a des lipides dans les trois premières parties de la station. En effet, le dégrilleur, le dessableur déshuileur et le décanteur primaire contiennent des concentrations en lipides différentes. En entrée du déshuileur la concentration est d'environ 84 mg/L et en sortie donc en entrée du décanteur primaire on trouve en moyenne 50 mg/L. Les lipides sont encore traités dans le décanteur primaire grâce à des racleurs. En sortie du décanteur on constate qu'il n'y a plus de lipides.

Dans les boues, on observe en moyenne une concentration en lipides de 150 mg/L ce qui peut s'expliquer par une accumulation des boues.

3. Principe

Comme on peut le voir dans le schéma et la légende, un ensemble soxhlet est constitué d'un ballon monocol, d'un condenseur et d'un extracteur. Ce dernier présente un système de tubes permettant la vidange du corps en verre. A l'intérieur de la cartouche de cellulose, on y insère le solide dont on veut extraire les lipides.



Légende du schéma :

- 1- Billes à ébullition
- 2- Ballon en pyrex de 250 ml rempli de 100 ml de solvant
- 3- Retour de distillation
- 4- Corps en verre
- 5- Cartouche de cellulose
- 6- Haut du siphon
- 7- Sortie du siphon
- 8- Adaptateur d'expansion (inutile ici car toute la verrerie est en 24/40)
- 9- Condenseur
- 10- Entrée de l'eau de refroidissement
- 11- Sortie de l'eau de refroidissement

Le produit dont on souhaite extraire les matières grasses est placé dans la cartouche de cellulose, puis dans le réservoir soxhlet. Dans le ballon, on introduit quelques billes à ébullition, afin d'empêcher le solvant de monter dans le corps du soxhlet. Il est nécessaire de peser le ballon avec les billes pour avoir la masse initiale. Ensuite, le ballon est rempli de 100 ml d'hexane. A l'aide d'un chauffe ballon, le solvant est porté à ébullition. Le but de cette

méthode est d'atteindre la température d'ébullition du solvant c'est-à-dire celle de l'hexane qui est de 68°C afin que les vapeurs montent dans le tube de retour de distillation (numéro 3 sur le schéma ci-dessus) et se condensent. L'hexane retombe alors dans le réservoir contenant la cartouche de cellulose et solubilise la substance à extraire. Le réservoir se remplit, et dès que le niveau du solvant est à la hauteur du haut du siphon, (numéro 6 sur le schéma ci-dessus) le réservoir se vidange automatiquement (c'est un cycle). Le solvant et les lipides sont entraînés dans le ballon. Pour réaliser une extraction correcte, il faut régler le chauffe-ballon de manière à obtenir 20 cycles par heure pendant 5 heures. À la fin de l'extraction, l'hexane est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. On pèse alors le ballon et la différence avec la masse initiale donne la masse de lipides.

4. Prélèvement et conservation

Le prélèvement des échantillons doit se faire dans des bouteilles en verre. Ces bouteilles doivent être au préalable lavées à l'eau savonneuse et rincées à l'eau puis rincées avec le solvant (ici l'hexane) ou de l'acétone, afin d'éliminer tous résidus qui pourraient interférer avec la mesure. Pour éviter l'utilisation de l'hexane, il est aussi possible de recouvrir les bouteilles d'aluminium et de les laisser dans un four à 200 ou 250°C pendant au moins 1 heure. Les échantillons doivent être conservés dans la chambre froide à une température de 4°C. Ils doivent être renouvelés le plus souvent possible, chaque semaine si possible. Si l'analyse n'est pas faite dans les 2h suivant le prélèvement, il est nécessaire d'acidifier l'échantillon à filtrer à pH=2, à l'aide d'acide sulfurique (environ 5 ml pour 1L d'échantillon).

5. Matériel

La verrerie se trouve sur l'égouttoir au niveau de la porte 106 ou du matériel commun au dessus de la porte 7-a.

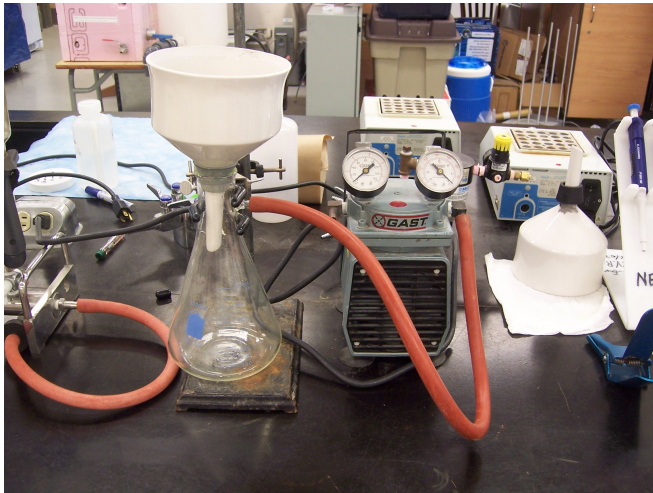
Préparation de l'échantillon :

- Papier pH (tiroir 86 b)
- 1 petit bécher pour l'acide sulfurique
- 1 pipette pasteur (porte 64-b)

Préparation de la filtration :

Le matériel nécessaire à la filtration se trouve déjà sur la paillasse, au niveau de la porte 122-a.

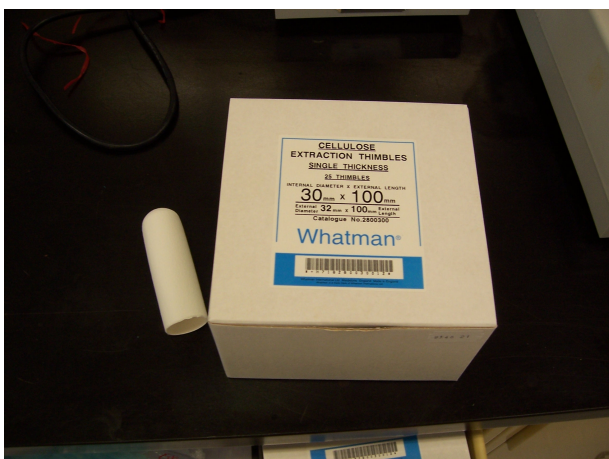
- 1 éprouvette (ou cylindre) graduée de 250 mL
- 1 fiole jaugée de 100 mL (pour la suspension de filtre)
- Erlenmeyer
- Pompe à vide
- Büchner
- Joint conique
- Papier filtre Whatman 40 (porte 120-a)
- Disques de papier de soie de diamètre 12.5 cm (papier de soie porte 125)



Préparation de la cartouche :

- 1 petit bécher pour aider à verser le contenu de la cartouche

Cartouches de celluloses catalogue n° 2800300 30 mn de diamètre interne *100mn de longueur et 32 mn de diamètre externe * 100 mn de longueur (tiroir 127 a)



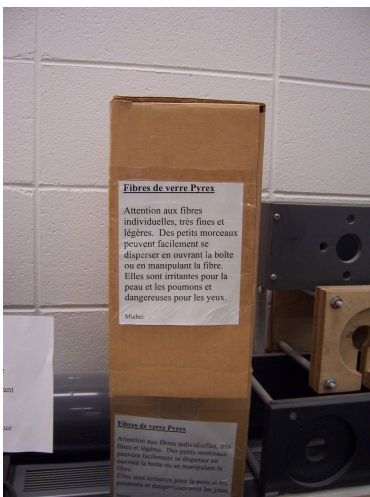
- Four à 105°C au niveau des tiroirs 69-a et 68-a (des gants se trouvent sur la pailasse pour sortir la cartouche lorsqu'elle est chaude)



- Dessiccateur (sur la paillese au niveau des portes 34-a ou 35-a)



- Laine de verre (dans un carton sur la paillese au niveau de la porte 38)

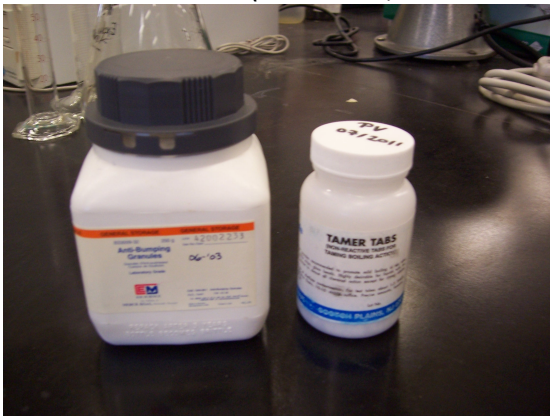


Préparation de l'extraction :

- Chauffe ballon (porte 27)
- Ballon monocol en pyrex 24/40 (tiroir 9 b)
- Extracteur soxhlet de 125 ml 24/40 (tiroir 98 a)
- Réfrigérant 24/40 (tiroir 98 a)



- Billes à ébullition (tiroir 86 b, boîte blanche avec un couvercle gris)



- Éprouvette ou cylindre gradué de 100 ml pour l'hexane
- Hotte (au niveau des portes 19-20-21)
- Tuyaux pour l'alimentation d'eau froide (porte 124)
- Dessiccateur (sur la pailleuse au niveau des portes 34-a ou 35-a)
- Indicateur de débit à bille (tiroir 98-a)



- Un statif (support).

Évaporation du solvant :

Le matériel de l'évaporateur rotatif se trouve déjà sur la pailleuse au niveau des portes 94 et 95-a.

- Évaporateur rotatif
- Pompe à vide
- Alimentation d'eau froide

- Ballon (sur l'évaporateur)
- Aspiration (Tuyau en aluminium à droite de l'évier)



6. Réactifs

Il est nécessaire d'utiliser de l'acide sulfurique pour acidifier l'échantillon (Numéro 1835).

Le solvant utilisé pour l'extraction est l'hexane, de type ACS. (Numéro 801)

Cette manipulation nécessite de rincer le matériel avec de l'acétone. Généralement, une pissette d'acétone est située sous la hotte utilisée. Pour la remplir, il faut utiliser le flacon d'acétone numéro 15.

Pour la filtration sous vide, il est conseillé de filtrer tout d'abord une suspension de filtre qui est du diatomaceous earth qui va aider la filtration de l'échantillon en augmentant la capacité du filtre, il faut donc préparer une suspension à 10 g/L de diatomaceous earth. (Numéro 605)

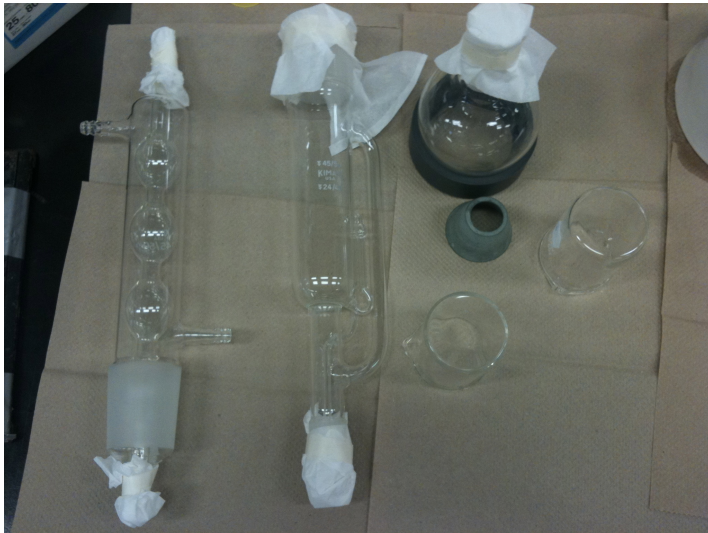
7. Protocole

Préparation du matériel :

Un jour avant il faut nettoyer toute la verrerie c'est-à-dire : 1 fiole jaugée de 100 mL (pour la solution de suspension de filtre), deux petits béchers de 50 ml (un pour aider à verser tout ce qui reste dans le Büchner après filtration, et un autre pour l'acide sulfurique), le Büchner, les 2 éprouvettes (une de 100 mL et une de 250 mL), le réfrigérant, le corps soxhlet, le ballon et l'évaporateur (rincer les extrémités avec de l'eau distillée puis avec l'acétone).

Pour être sûr que la verrerie soit très propre après l'avoir lavée avec du savon et rincée à l'eau distillée, il faut la rincer avec de l'acétone.

Une fois que la verrerie a été lavée, il est préférable de recouvrir les embouts des différents éléments avec un kimwipe. En effet, cela permettra au reste des vapeurs d'acétone de s'évaporer tout en empêchant les impuretés de rentrer dans la verrerie.



Préparation de l'échantillon :

Si cela n'a pas encore été fait, acidifier l'échantillon à filtrer à pH=2, à l'aide d'acide sulfurique (à peu près 5 ml pour environ 1L d'échantillon). Dans l'échantillon d'eaux usées, il y a des lipides liés aux particules et des lipides non liés. En acidifiant les liaisons, des lipides liés vont se casser et il ne restera que des lipides non liés.

Vérifier le pH avec du papier pH.

Préparation de la filtration sous vide :

Préparer 100mL de la solution de suspension de filtre « diatomaceous heart » de 10 g/L. Pour cela, prélever 1g à l'aide d'une spatule préalablement lavée avec du savon et rincée à l'eau distillée puis à l'acétone et déposer cette masse dans la fiole jaugée de 100 mL. Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Découper un disque de papier de soie de 12,5 cm de diamètre, puis le nettoyer avec de l'acétone pour être sûr qu'il n'y ait aucun corps gras.

Poser le disque de papier de soie dans le Büchner.

Poser au-dessus un papier filtre Whatman 40.

Humidifier le papier filtre et le disque de papier de soie avec de l'eau distillée.

Allumer la pompe à vide pour que le papier et le filtre soient bien étalés dans le Büchner.

Filtrer la solution de suspension puis filtrer l'échantillon acidifié à l'aide de l'éprouvette graduée pour connaître le volume filtré.

Pour l'eau usée en entrée et en sortie du décanteur primaire, 1L suffit lors de la filtration tandis que pour les boues, 50mL suffit car le filtre sature.

Faire le vide jusqu'à ce que tout l'échantillon soit passé.



Préparation de la cartouche :

Avec une pince, rouler le papier de soie et le filtre puis insérer le tout dans la cartouche de cellulose. Les cartouches n'ont pas besoin d'être nettoyées avant de les utiliser. A l'intérieur du Büchner, après avoir enlevé le filtre et le papier de soie, il restera un peu de suspension de filtre sous forme solide (de poudre), il faut verser tout ce qui reste dans un petit bécher et transvaser le contenu du bécher dans la cartouche de cellulose.

Découper des morceaux de papier filtre Wathman 40 imbibés d'hexane pour nettoyer le Büchner pour récupérer tous les lipides qui auraient pu s'accrocher sur les parois (en moyenne un seul filtre coupé en 5 morceaux suffit).

Insérer ces morceaux de papier à l'intérieur de la cartouche.

Mettre la cartouche dans le four à 105°C pendant 25 minutes puis la sortir et la laisser refroidir 10 minutes dans un dessiccateur.

Rincer un bout de laine de verre (juste assez pour recouvrir le filtre à l'intérieur de la cartouche) avec de l'hexane puis le laisser sécher sous la hotte. La laine de verre sert à retenir le filtre dans la cartouche.

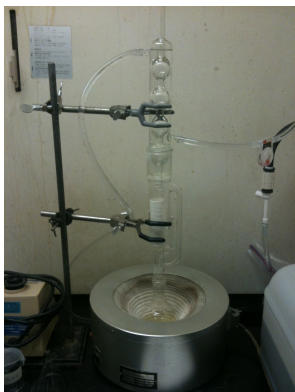
Intégrer cette laine de verre dans la cartouche, au-dessus du filtre, et tasser le tout.

Insérer la cartouche dans le corps du soxhlet.



Montage :

Une fois que la cartouche est insérée dans le corps du soxhlet, on peut l'emboîter avec le bas du réfrigérant et l'attacher avec une pince accrochée au statif. Ensuite après avoir préparé le ballon comme on va le voir dans la partie « préparation de l'extraction » on peut le joindre en bas du corps du soxhlet puis le rattacher à l'aide d'une pince au support. Desserrer ensuite les pinces du support pour faire glisser le montage jusqu'à ce que le ballon soit dans le chauffe-ballon. Connecter les tuyaux d'alimentation d'eau de refroidissement. L'entrée de l'eau de refroidissement se place en bas du réfrigérant alors que la sortie se trouve en haut.



Préparation de l'extraction :

Insérer dans le ballon des billes à ébullition (il faut insérer quelques grains soit l'équivalent d'une cuillère à thé), le plus important est de ne pas oublier de peser le ballon avec les billes).

Peser le ballon avec la balance de précision (Mo). Pour se faire tenir sur la balance, utiliser un support en caoutchouc ou un rouleau de ruban adhésif.

Ajouter 100 ml d'hexane dans le ballon.

Monter le ballon et le soxhlet.

Ouvrir le robinet d'eau de refroidissement.

Allumer le chauffe-ballon à 104 °C, c'est-à-dire placer le bouton du chauffe ballon sur le repère 5.

Laisser tourner pendant 5 h, on doit observer 20 cycles par heure.

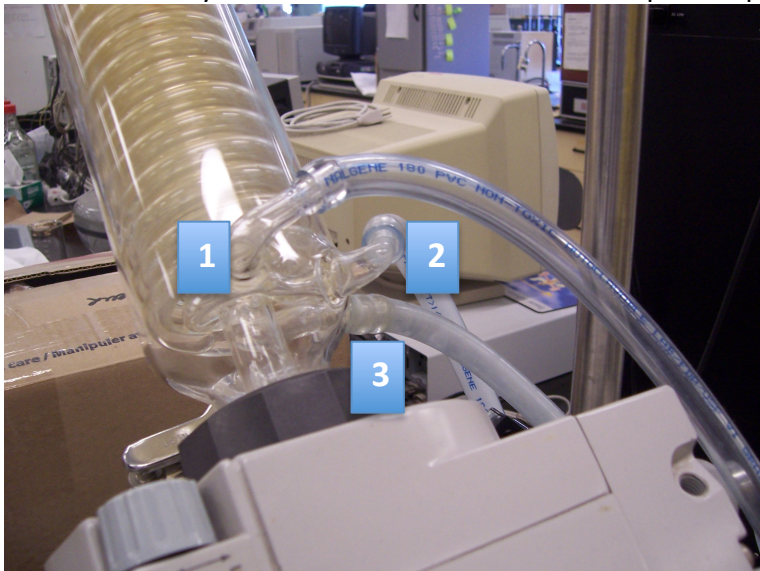
Malgré le réfrigérant, il est possible qu'une partie de l'hexane s'évapore durant l'extraction. Il peut alors arriver que le soxhlet ne se vidange plus si le niveau d'hexane devient trop bas. Dans ce cas, il suffit de rajouter de l'hexane par le haut du réfrigérant.

Penser à remplir la cuve d'eau de l'évaporateur rotatif et la mettre à chauffer à 98 °C. Il faut un certain temps pour que l'eau soit à la bonne température.

Après les 5 heures, récupérer le ballon. Pour cela, éteindre le chauffe-ballon tout en laissant l'eau de refroidissement allumée pour être sur que l'hexane ne s'évapore pas. Relever le refroidissement, puis le soxhlet et récupérer le ballon. Le recouvrir avec du papier d'aluminium et le laisser refroidir sous la hotte pendant 5 minutes.

Évaporation :

Brancher les tuyaux d'alimentation d'eau et d'air pour la pompe comme indiqué ci-dessous :

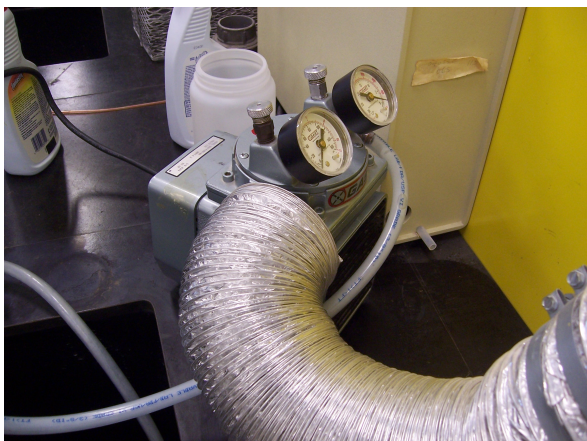


1 : Tuyau relié à la pompe

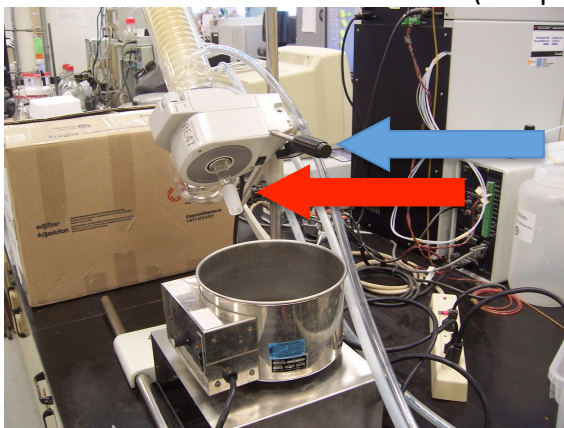
2 : Tuyau d'arrivée d'eau

3 : Tuyau de sortie d'eau

Vérifier que l'embout en haut du réfrigérant est bien fermé pour que le vide puisse se faire. Placer l'aspiration à la sortie de la pompe comme on peut le voir sur la photo :



Placer le ballon sur l'embout rotatif (indiqué par la flèche rouge).



Brancher la pompe à vide. Normalement, lorsque la pompe est branchée, le ballon tient tout seul sur l'embout rotatif.

Abaisser le ballon afin qu'il trempe dans le bain d'eau à l'aide de la poignée (indiquée par la flèche bleue).

Allumer l'eau de refroidissement.

Allumer le moteur. Il permet de faire tourner le ballon dans le bain chauffant.

Laisser tourner pendant 15 minutes environ (compter 15 min lorsque l'ébullition a commencé dans le ballon).

Ensuite éteindre l'évaporateur. Pour cela, éteindre le moteur et la pompe. Relever le ballon à l'aide de la poignée. Casser le vide en tournant l'embout situé en haut du réfrigérant.

Attention à tenir le ballon lorsque l'on casse le vide. Éteindre l'eau de refroidissement.

Récupérer le ballon puis le laisser refroidir dans le dessiccateur pour ne pas avoir d'humidité.

Pendant ce temps, récupérer le ballon indiqué par une flèche verte sur la figure ci-dessous.

Le ballon contient l'hexane évaporé. Jeter l'hexane dans le bidon «solvant non halogéné».

Avant de peser le ballon contenant les lipides, il faut attendre que le ballon soit à température ambiante.

Peser la masse finale (M_f) à l'aide de la balance de précision.



Rangement et nettoyage :

Tous les résidus d'hexane doivent être jetés dans le bidon intitulé «solvant non halogéné». La verrerie ayant contenu des lipides doit d'abord être rincée avec de l'acétone afin d'éliminer toute trace de lipides. Il faut ensuite les nettoyer à l'eau savonneuse et les rincer à l'eau distillée.

Pour les billes à ébullition, il faut les rincer à l'eau puis les jeter dans le lavabo blanc à côté de la chambre froide. Si elles sont collées dans le ballon, il est possible de les décoller avec un peu d'acétone.

Durée de chaque étape :

Etape	Préparation de l'échantillon	Extraction	Evaporation
Durée	2h30	5h	45 min

9. Calculs

Calcul de la masse de lipides (MI) :

$$MI (g) = M_f (g) - M_o (g)$$

Calcul de la concentration finale (Cf) :

$$C_f (mg/L) = MI (mg) / \text{Volume d'échantillon filtré (L)}$$

10. Remarques et problèmes possibles

La manipulation étant très longue, deux soxhlet ont été montés en série. Mais le soucis est que l'eau qui entre dans le second réfrigérant n'est pas aussi froide que celle qui entre dans le premier. Il y a donc plus de perte d'hexane c'est-à-dire que les vapeurs d'hexane s'échappent par le haut du réfrigérant. Il faut généralement alimenter par le dessus du réfrigérant avec de l'hexane.

Il serait préférable de faire un montage en parallèle.

Les cartouches utilisées doivent être dans un ziploc ouvert et sous la hotte. **ATTENTION !** Ne pas fermer le ziploc avec les cartouches à l'intérieur, car il faut laisser l'hexane s'évaporer. On peut ensuite les rincer à l'eau puis les jeter dans la poubelle.

L'hexane est jeté dans un bidon de récupération « solvant organique non halogéné » qui est sous la hotte de droite.

Le papier de soie peut être trouvé à Dollorama.

On pourrait penser que le coton fromage peut remplacer le papier de soie. **ATTENTION !** On ne peut pas utiliser le coton fromage car la filtration ne sera pas efficace, trop de particules peuvent passer à travers.

Ne pas mettre de glycérol pour joindre les embouts, car avec la chaleur, le glycérol tombe dans le ballon et fausse les résultats.

Ne pas utiliser une plaque chauffante, car on perd de la chaleur et on n'arrive pas à 20 cycles par heure.

11. Références

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

Le numéro du protocole est 5520D.