



# Caractérisation de la matière organique pour prédire sa dégradation

*"BIOTECHNOLOGIES POUR LE TRAITEMENT DE L'EAU ET DES DECHETS"*

*6-10 juin 2011, IUT, Narbonne*

**Claire DUMAS**

[claire.dumas@supagro.inra.fr](mailto:claire.dumas@supagro.inra.fr)

# Problématique, objectifs

- Afin de proposer des éléments pour le traitement des produits résiduaire , il est indispensable de connaître leurs **caractéristiques**
- Nécessité de pouvoir caractériser les différentes matières organiques à traiter, au minimum pour les **comparer** entre elles, et si possible pour être en mesure de **prévoir leur comportement au sein des digesteurs** et leur valeur agronomique.
- La caractérisation des résidus méthanisables se résume souvent à déterminer leur potentiel méthane (Biochemical methane Potential) : test de 30 à 60 jours pour les solides, quelques jours pour les liquides

*Objectif : préciser l'intérêt et les limites, d'une part ,des approches biochimiques en tant que telles, d'autre part, des relations entre ces dernières et le « potentiel méthane »*

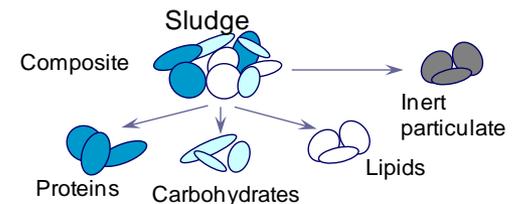
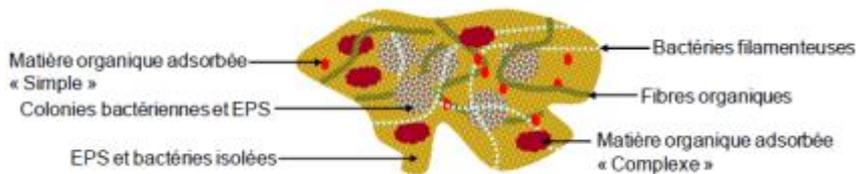
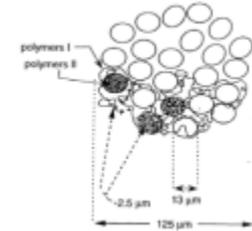
# Quelle matière organique?

- Effluents liquides
- Boues
- Résidus alimentaires
- Ordures ménagères
- Résidus lignocellulosiques

**Focus sur la  
caractérisation des  
boues et des résidus  
solides**

# Caractéristiques des boues

- Structure sous forme de **flocs**
- Matières minérales et organiques intimement liées
- Fraction minérale: particules et cations (silicates, les oxydes de fer ou le phosphate de calcium <sup>1</sup>)
- Fraction organique: gros polymères (cellulose, lignine), macromolécules, biomolécules (protéines, sucres), acides humiques et fraction lipidique <sup>2</sup>
- Microflocs (13  $\mu\text{m}$ ) : petites particules (bact. 2,5 $\mu\text{m}$ ) <sup>5</sup> reliées entre elles avec exopolymères . Ces microflocs sont reliés à d'autre bactéries isolées et forment des macroflocs poreux 125  $\mu\text{m}$ .
- Exopolymères : polysaccharides aminés ou phosphatés <sup>6</sup>



- une fraction facilement biodégradable <sup>7</sup>
- une fraction rapidement hydrolysable
- une fraction lentement biodégradable

<sup>1</sup> Salhi, 2003; <sup>2</sup> Trably, 2002; <sup>3</sup> Paul, 2005;

<sup>4</sup> Lehne, 2001; <sup>5</sup> Jorand, 1995; <sup>6</sup> Dignac, 1998, <sup>7</sup>Mottet PhD, 2010.

# Caractéristiques des ordures ménagères – en France

## Sortie de centre de tri

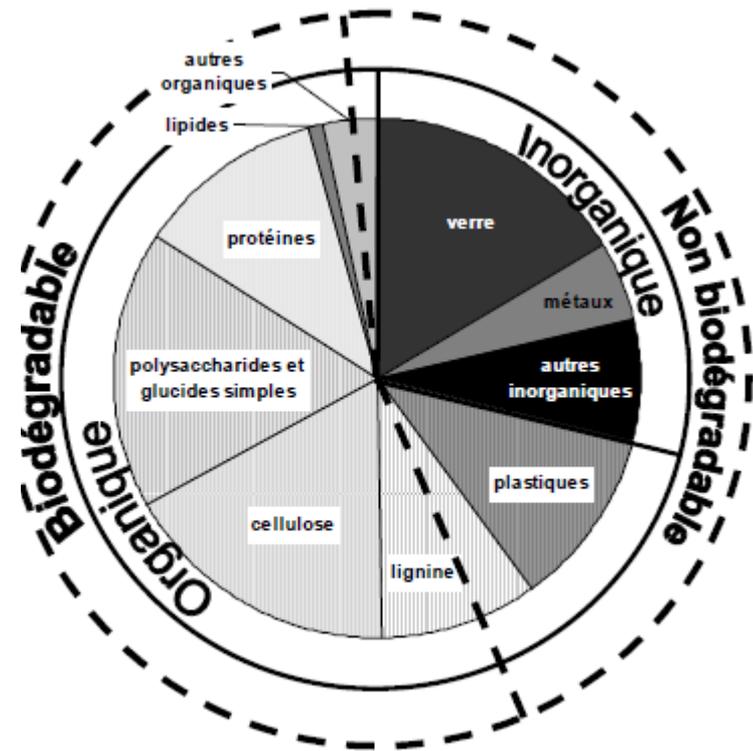
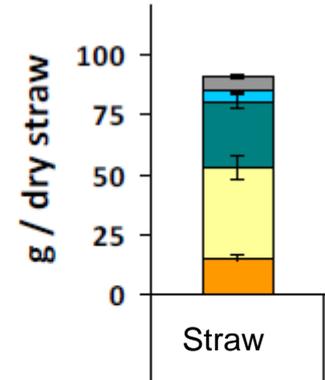
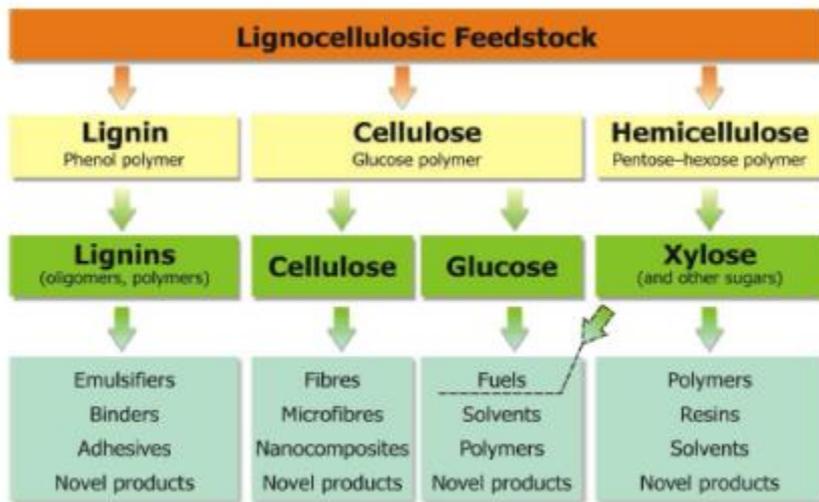
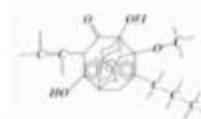
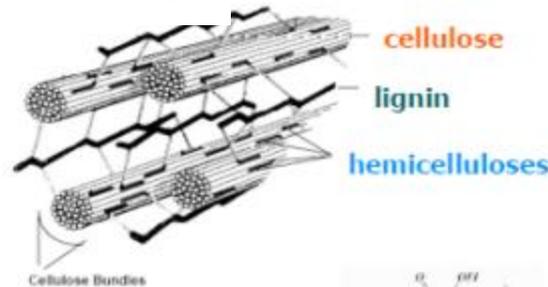


Figure 9. Répartition de la matière des ordures ménagères

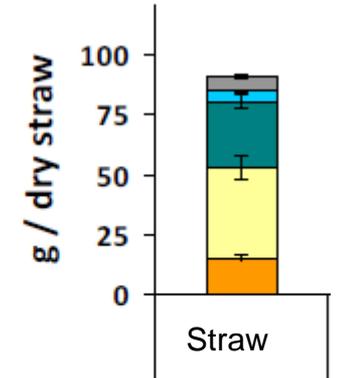
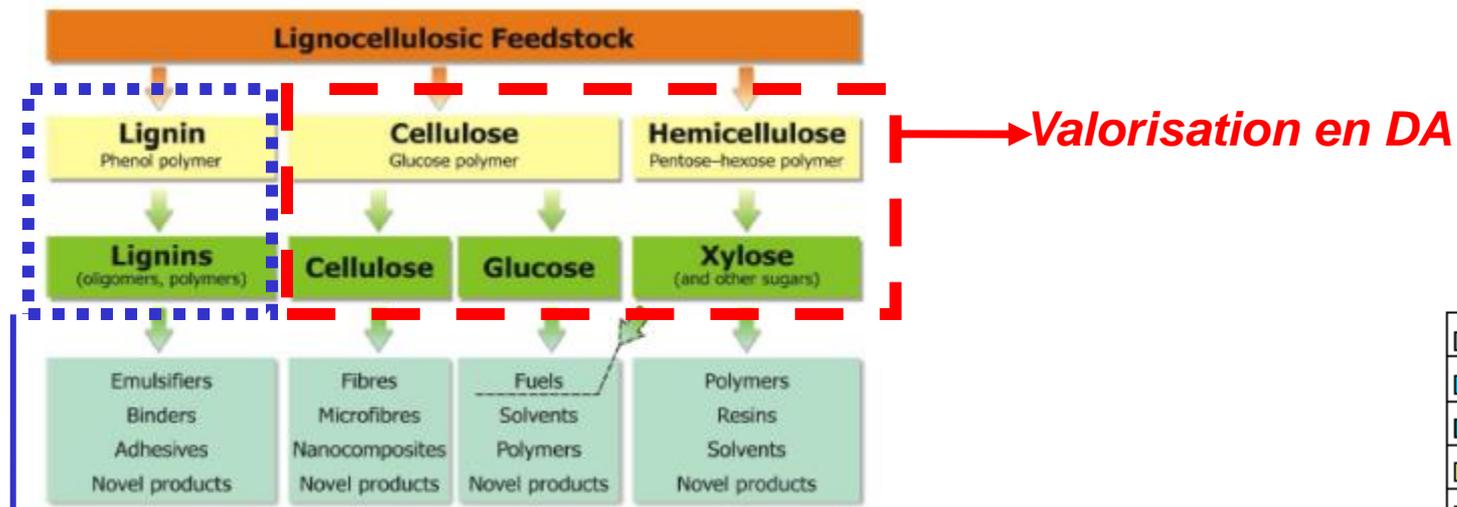
# Caractéristiques de la biomasse lignocellulosique



ash	6.2
proteins	4.4
hemicelluloses	27.2
cellulose	37.8
lignin	15.2

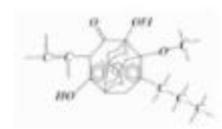
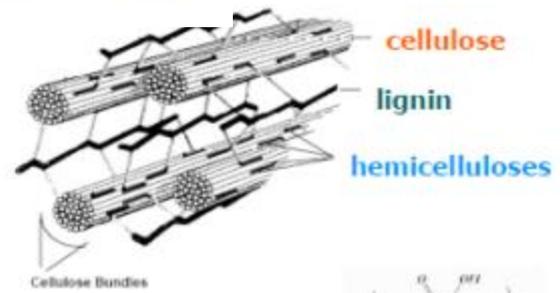


# Caractéristiques de la biomasse lignocellulosique



ash	6.2
proteins	4.4
hemicelluloses	27.2
cellulose	37.8
lignin	15.2

**Recalcitrants aux transformations biologiques**



**Structure complexe :**  
holocellulose inaccessible aux bactéries ou aux enzymes  
Réseau ligneux interconnecté

# Préparation/extraction de la MO des échantillons

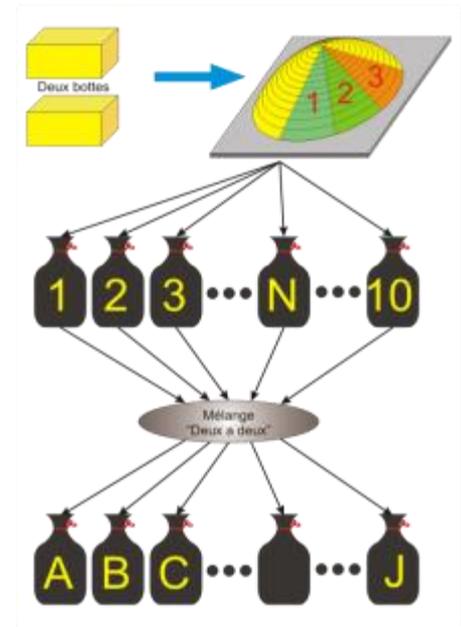
Quelques conseils, attentions à porter

- représentativité de l'échantillon
- prise d'essai : quantité minimale nécessaire

Protocole d'échantillonnage / norme pour les gros volumes <sup>1</sup>

**Compromis entre représentativité de l'échantillon  
et capacité d'analyse fine /pointue**

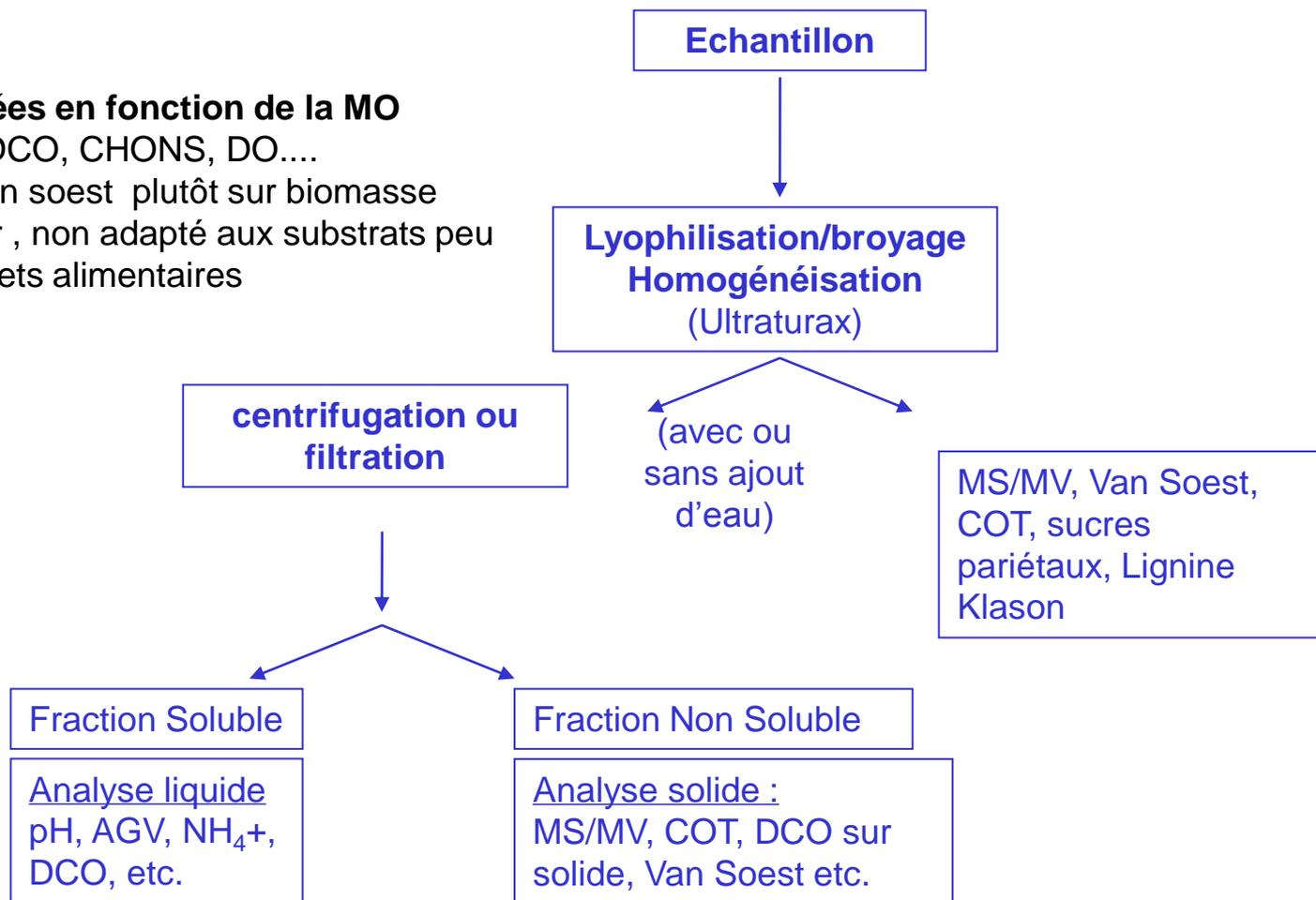
**Appareils analytiques nécessitent souvent peu de  
quantité**



# Préparation/extraction de la MO des échantillons

## Analyses appliquées en fonction de la MO

- Mesures universelles: MV, DCO, CHONS, DO....
- Mesures spécifiques: ex: Van soest plutôt sur biomasse lignocellulosique, OM, fumier, non adapté aux substrats peu ligneux, boues, algues, déchets alimentaires





# Caractérisation de matière organique: Mesures globales

# Analyses universelles/globales dans le domaine de la dépollution

Paramètres	Information	Méthode
MS/MV (MES/MVS)	Quantité de matière organique	methode gravimétrique : 105°C 24h ; 550°C 2h
DCO, DCOsol 	1gDCO = 350mL CH <sub>4</sub> (1atm, 0°C) Détermination de la matière organique oxydable Evaluation du risque de pollution dans l'environnement naturel.	Oxydation par le K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (en excès) en milieu acide (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) en présence d'un catalyseur (sulfate d'argent). Chauffage pdt 2h à 150°C -pour macro-méthode: dosage en retour de l'excès de K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> à l'aide d'une solution sel Mohr. -ou pour micro-méthode: Mesure de [Cr <sup>3+</sup> ] par spectrophotométrie 
Matière organique oxydable (MOO)	MOO: MO d'origine « naturelle » et oxydable par chimiquement	MO minéralisée en CO <sub>2</sub> et en H <sub>2</sub> O <i>différents oxydants</i> : eau oxygénée [Djakovitch, 1988], mélange sulfochromique (Norme ISO NF 14235, 1998 ; Norme AFNOR X31-419) et hypochlorite de sodium (eau de Javel) (Norme AFNOR XP U44-164, 2004)

<sup>1</sup> APHA, 1980. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 15th ed. American Public Health Association Inc., New York

<sup>2</sup> De araujo PhD (2006) : [http://docinsa.insa-lyon.fr/these/pont.php?id=de\\_araujo\\_morais](http://docinsa.insa-lyon.fr/these/pont.php?id=de_araujo_morais)

# Analyses universelles/globales dans le domaine de la dépollution

Paramètres	Information	Méthode
CT, COT	Détermination de la quantité de carbone de l'échantillon (organique et inorganique)	COT : combustion catalytique à haute température pour la fraction organique CI : méthode chimique de déplacement de l'équilibre acido-basique CO <sub>2</sub> produit est détecté par infrarouge.
NTK, NH <sub>4</sub>	Détermination de l'azote total Kjeldahl et ammoniacal (NH <sub>4</sub> ) de l'échantillon . Inhibitions éventuelles	N <sub>org</sub> minéralisé à chaud en milieu acide (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + catalyseur ) et transformé en sulfate d'ammonium. Alcalinisation par addition de soude. Ammonium distillé et recueilli dans une solution d'acide borique. Dosage par titration avec une solution d'acide de normalité connue (HCl 0.02N).



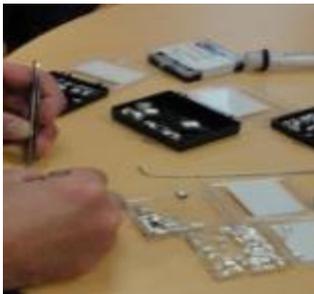
# Analyses universelles/globales dans le domaine de la dépollution

Paramètres	Information	Méthode
Anions/Cations	Potentielles inhibitions (ou compétitions) des bact. méthano. dues au substrat ( $\text{Na}^+$ , $\text{SO}_4^{2-}$ )	Séparation des ions par chromatographie ionique. membrane de suppression améliorée par un système d'électrolyse avec dégagement en sortie de $\text{H}_2$ et d' $\text{O}_2$ . Détection se fait par conductimétrie.
Acides gras volatils (AGV) $\text{C}_2\text{-C}_7$	Détermination de la composition et des concentrations en acides gras volatils (AGV) Information sur les voies métaboliques	Analyse par chromatographie gazeuse dans phase soluble



# Analyses universelles/globales dans le domaine de la dépollution

Paramètres	Information	Méthode
pH	Determination du pH du milieu/ conditions de pH favorables au développement ds méthanogènes	
CHONS (analyse élémentaire)	Quantité de chaque élément en % massique → formule de Buswell :qte de CH <sub>4</sub>	Le principe : combustion flash dynamique à 1700-1800°C (rapide) puis oxydation et réduction des gaz produits et analyse des gaz produits (N <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> ) par chromatographie gazeuse et détecté par TCD. Gaz vecteur Hélium sous atmosphère O <sub>2</sub> .





# Caractérisation de matière organique: Fractionnement

# Caractérisation biochimique : fraction glucidique

## Methode globale : Test à l'anthrone

### **Analyses dans les liquides**

- Anthrone + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (97-98%) (Dissoudre à froid 2mg/1mL)
- Mettre 1 mL d'échantillon+ 2 mL du réactif –
- T°C: **100°C**
- Durée:**10min**
- Mesurer de l'absorbance à **625nm**

### **Analyses dans les solides**

*prétraitements acides nécessaires*

- Extraction à **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** pendant 18h, sous agitation,
  - .T°C : ambiante
  - .Durée : **18h**
  - .test à l'anthrone du surnageant
- Extraction dans **HCL** (2.5N) +
  - T°C: **100°C**
  - durée: **3h** (*puis neutralisation avec du carbonate de sodium solide*)
  - test à l'anthrone du surnageant <sup>1</sup>

# Caractérisation biochimique : fraction glucidique

## Analyses des glucides structuraux dans la biomasse

### Analyses dans les liquides

Détermination des sucres, coproduits et produits de dégradation dans les fractions liquides des procédés

Filtration des échantillons à 0.2µm puis analyses en HPLC (Biorad Aminex HPX-87H)

### Analyses dans les solides

- 300mg ech. + 3mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72%)
- T°C: 30 °C
- Durée: 1h.

Dilution jusqu'à 4% par ajout d'H<sub>2</sub>O déminéralisée.

- T°C: 121°C
- Durée: 1h (autoclave ou chauffe)
- Refroidissement à T° amb puis filtration à 0.2 µm

Résidu solide → lignine Klason

Analyse liquide en HPLC (Shodex sugar SP0810 ou colonne Biorad Aminex HPX-87P)

### Éléments analysés

Xylitol,  
acide succinique,  
acide L-Lactique,  
Glycerol,  
acide acétique,  
éthanol,  
HMF, Furfural (Inhibiteurs)  
cellobiose,  
glucose,  
xylose, arabinose (Ar/Xyl)  
Mannose, galactose, (Man/Gal)

# Caractérisation biochimique : fraction protéique

## Analyses dans les boues :

≠ méthodes de dosage: <sup>1</sup>

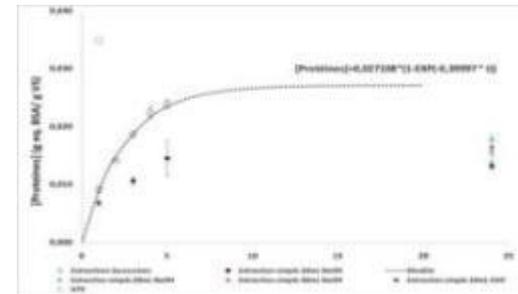
□ **Lowry** : *Lowry et al 1951; Frohland et al. 1995*

- .1 mL éch.+ 3mL solution alcaline de cuivre + 0.3 mL de réactif de Folin
- .obscurité pendant 2 h
- .Abs. à 750 nm.

□ **Acide bicinchoninique (BCA)**: *Smith et al. 1985*

- .20 mL éch.+ 1mL of réactif acide bicinchoninique
- .60°C pdt 30min.
- .Abs. à 562nm.

□ Kjeldahl : Approximation avec NTK (rapport 6.25) (!)



## Analyses dans les solides

-extractions successives nécessaires à NaOH (successives) + dosage Lowry ou BCA

<sup>1</sup> Ras M. et al. Water research 42 (2008) 1867 – 1878; Ras M. et al. Bioresource Technology 99 (2008) 7464–7471

# Caractérisation biochimique : fraction lipidique

caractère hydrophobe des solvants : sélectif aux lipides.

## Analyses dans les solides

ASE (Accelerated solvent extraction) <sup>1</sup> extraction à l'éther de pétrole:

Préparation et tare des cellules/vials

Extraction ASE

Evaporation sous vide puis sous azote.

Etuve à 105°C 2h des échantillons



Soxhlet: extraction par éther de pétrole (pt d'éb. 40-60°C) à chaud

Matières extractibles à l'heptane/hexane (MEH)

# Fractionnement VAN SOEST

Détournement d'une technique destinée à caractériser la valeur nutritionnelle des fourrages

Principe : extractions successives qui renseignent sur l'accessibilité de la matière organique

Applicable aux seuls produits solides (éventuellement boues lyophilisées)

Extractions nécessaires des lipides et de l'amidon

Méthodologie qui a évolué dans sa technologie : AUTOMATISATION (Fibertec, Fibertherm : Gerhardt , Foss)



# Fractionnement VAN SOEST

Possibilité d'effectuer une extraction à l'eau au préalable



Séchage à 105°C

Détergent neutre NDS  
100°C 1h



Séchage à 105°C

Détergent acide ADS  
100°C 1h

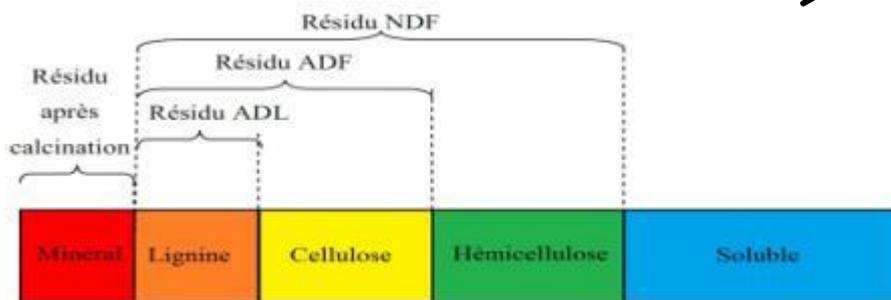


Séchage à 105°C

$H_2SO_4$   
20°C 3h



Séchage à 105°C



550°C





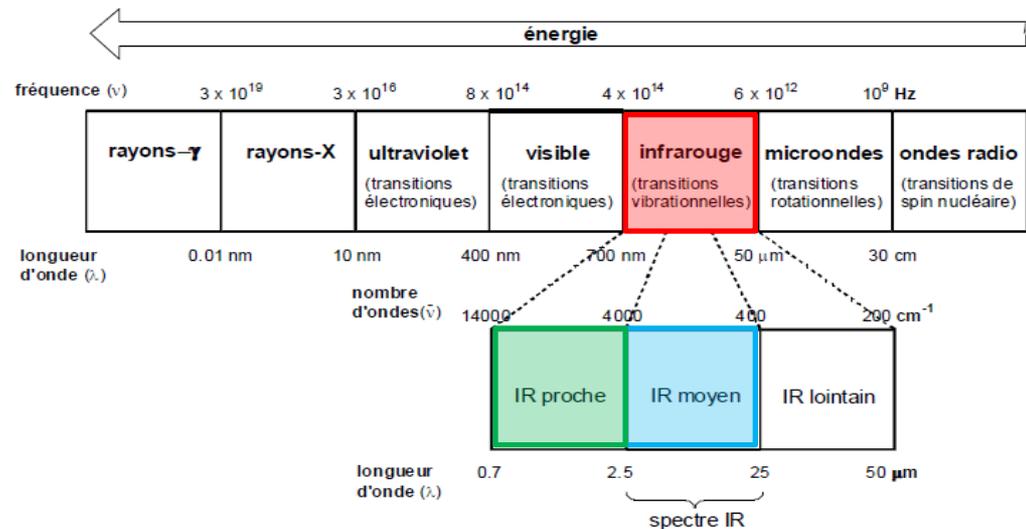
# Caractérisation de matière organique: Mesures spectrales

# Mesures spectrales

L'absorption de radiation électromagnétique par une molécule induit une transition vibrationnelle s'il s'agit de radiation infrarouge: **spectroscopie infrarouge**.

Mesures rapides qui renseignent sur la structure chimique des matières organiques (MO) complexes.

L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption



# Mesures spectrales

## Moyen Infra-Rouge IR à transformée de Fourier

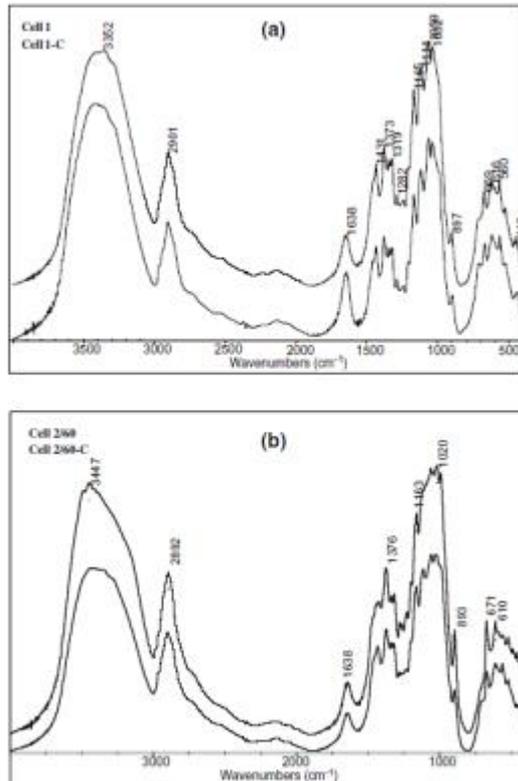


Figure 2. FTIR spectra of (a) Cell 1 (and Cell 1-C) and (b) Cell 2/60 (and Cell 2/60-C) prepared at 20 wt % of NaOH.

**Table 4.3** Characteristic infrared bands of oxygen-containing compounds

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Assignment
<i>Alcohol and phenols</i>	
3600	Alcohol O-H stretching
3550–3500	Phenol O-H stretching
1300–1000	C-O stretching
<i>Ethers</i>	
1100	C-O-C stretching
<i>Aldehydes and ketones</i>	
2900–2700	Aldehyde C-H stretching
1740–1720	Aliphatic aldehyde C=O stretching
1730–1700	Aliphatic ketone C=O stretching
1720–1680	Aromatic aldehyde C=O stretching
1700–1680	Aromatic ketone C=O stretching
<i>Esters</i>	
1750–1730	Aliphatic C=O stretching
1730–1705	Aromatic C=O stretching
1310–1250	Aromatic C-O stretching
1300–1100	Aliphatic C-O stretching
<i>Carboxylic acids</i>	
3300–2500	O-H stretching
1700	C=O stretching
1430	C-O-H in-plane bending
1240	C-O stretching
930	C-O-H out-of-plane bending
<i>Anhydrides</i>	
1840–1800	C=O stretching
1780–1740	C=O stretching
1300–1100	C-O stretching

# Mesures spectrales

## Moyen Infra-Rouge

### Biomasse lignocellulosique

Nbre d'ondes (cm-1)	Déformations/Information
3348	O–H élongation (rupture des liaisons H de la cellulose)
2900	C–H élongation (rupture du groupe methyl/methylene de la cellulose)
1745	Liaisons carbonyles (lignine)
1720	Groupes acides carboxyliques/ester
1595	élongation de cycle aromatique (lignine)
1260	Absorbance des esters (acide uronique)
1245	C–O adsorption (Clivage groupe acetyl)
1059	C–O élongation
1098/900	Ratio cellulose amorphe /cristalline (ratio d'intensité de deux bandes)
750/710	<b>Ratio de polymorphismes de cellulose cristalline (I<math>\alpha</math>/I<math>\beta</math>)</b>
900	Cellulose amorphe

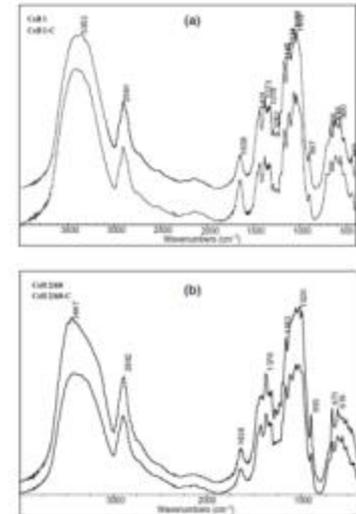


Figure 2. FTIR spectra of (a) Cell 1 (and Cell 1-C) and (b) Cell 200 (and Cell 200-C) prepared at 20 wt% of NaOH.

# Mesures spectrales

## Proche Infra-Rouge

Longueur d'ondes (nm)	Composé
1985 2060	Protéines –pics corrélés
2080	saccharose
2277	Amidon
2458	Glucide
2307	Lipides
1935	Lignine
2100	Hemicellulose
2208	Cellulose
2354	Cellulose
2388	Lignine/Hemicellulose

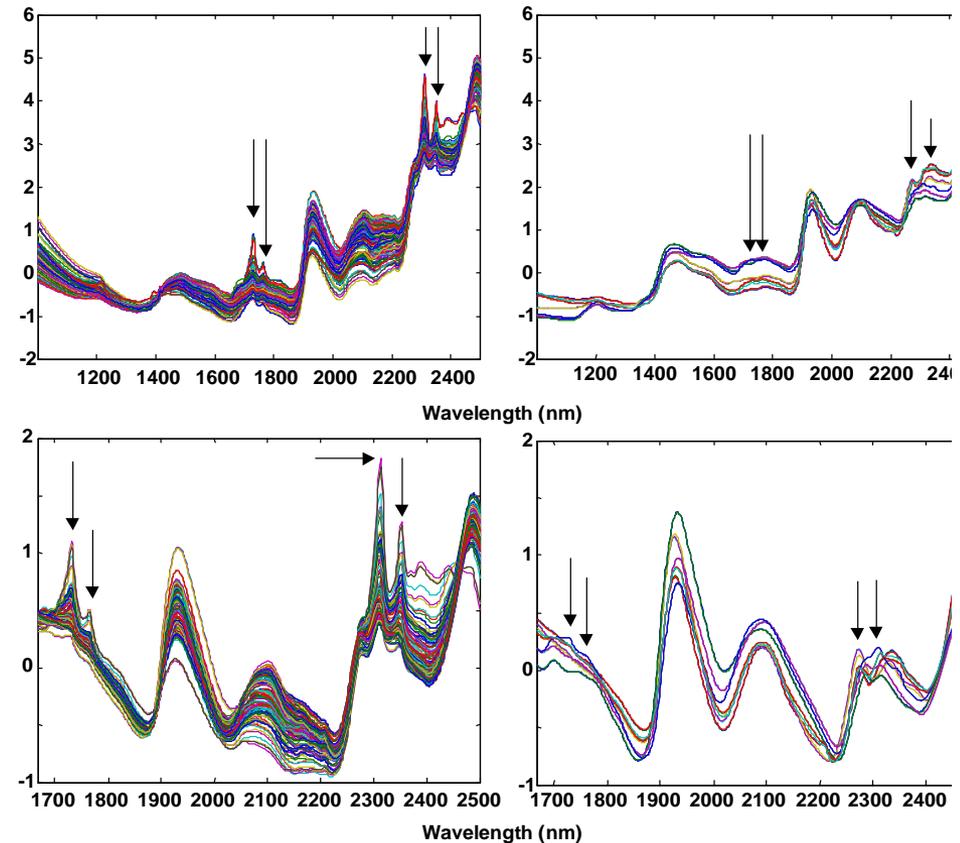
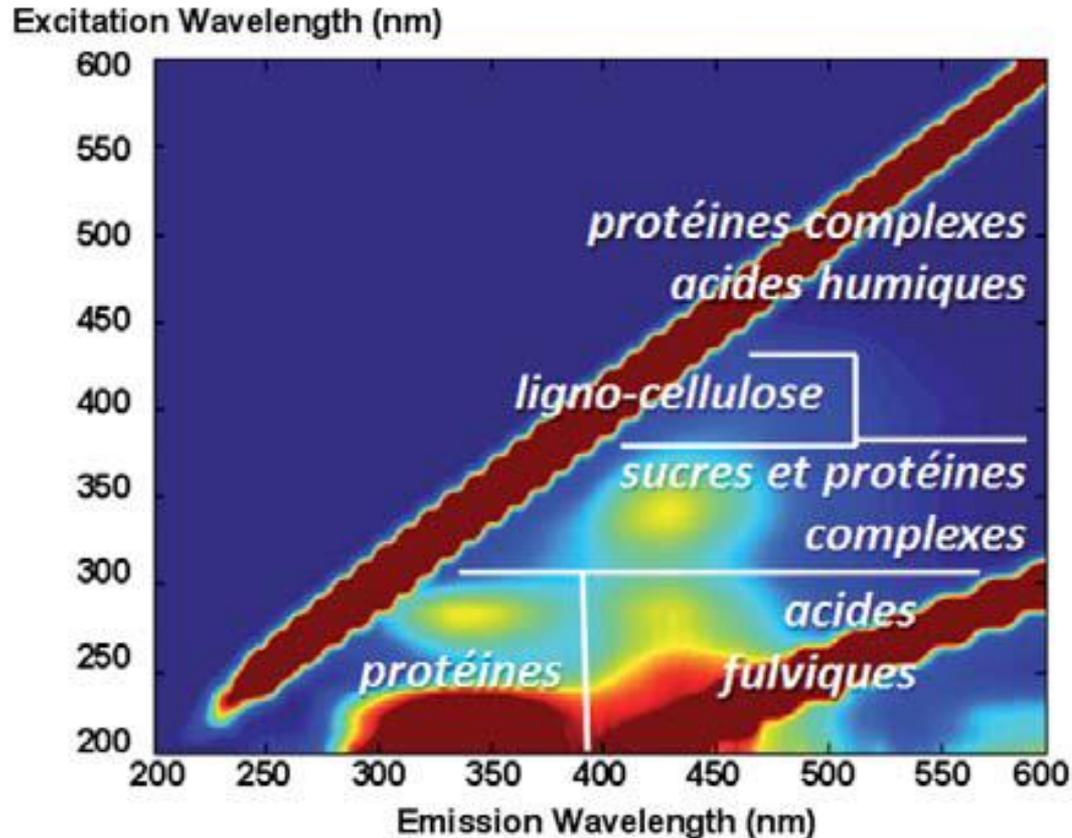


Figure 4. Spectra of the Municipal Solid Waste (left) and the « raw » wastes (right) after SNV pre-treatment (up) and SNV-Detrend on variables selection (1668 – 2500 nm) (down). Arrows show the most different peaks between MSW and raw wastes.

*Présentation Ondalys Vendredi*

# Mesures spectrales

## Fluo3D





# Caractérisation de la biodégradabilité

Etude de la digestion anaérobie de la  
M.O.

Test standard de  
« biochemical methane potential » (BMP)

# Biochemical methane potential (BMP)

## Principe :

Mesure de la quantité de biogaz produite au cours de la digestion anaérobie  
Durée: qqles jours (liquides) ; 30- 60 (solides)

Conditions mésophiles ou thermophiles (35°C ou 55°C)

Agitation



## Analyses

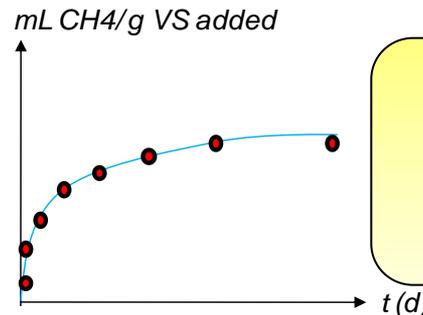
- des la matière organique entrante/sortante
  - de la composition du biogaz (O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S)
- Mesure
- du volume de biogaz produit

## Conditions favorables :

Solution tamponnée

Oligoéléments

Grande quantité de biomasse  
(S/X=0.5)



## Expression des résultats

Production de méthane cumulée ramenée à la quantité de matière (organique) introduite



Prédire – Modéliser  
la valeur du BMP  
les cinétiques de dégradation



# Prédire – Modéliser la valeur du BMP

## les cinétiques de dégradation

# Relation entre caractérisation et biodégradabilité

## Pour les liquides

Mesure de la DCO → théorie  $1\text{gDCO}=350\text{mL CH}_4$

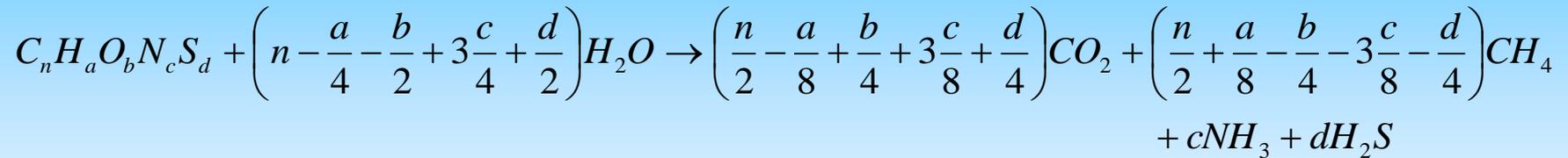
## Pour les solides/boues

corrélations souvent établies pour 1 type de MO, donc peu extrapolables

- Boues activées
- Résidus alimentaires
- Fraction fermentescible des ordures ménagères (FFOM)
- Résidus agricoles

# Prévoir et modéliser

## Formule de Buswell



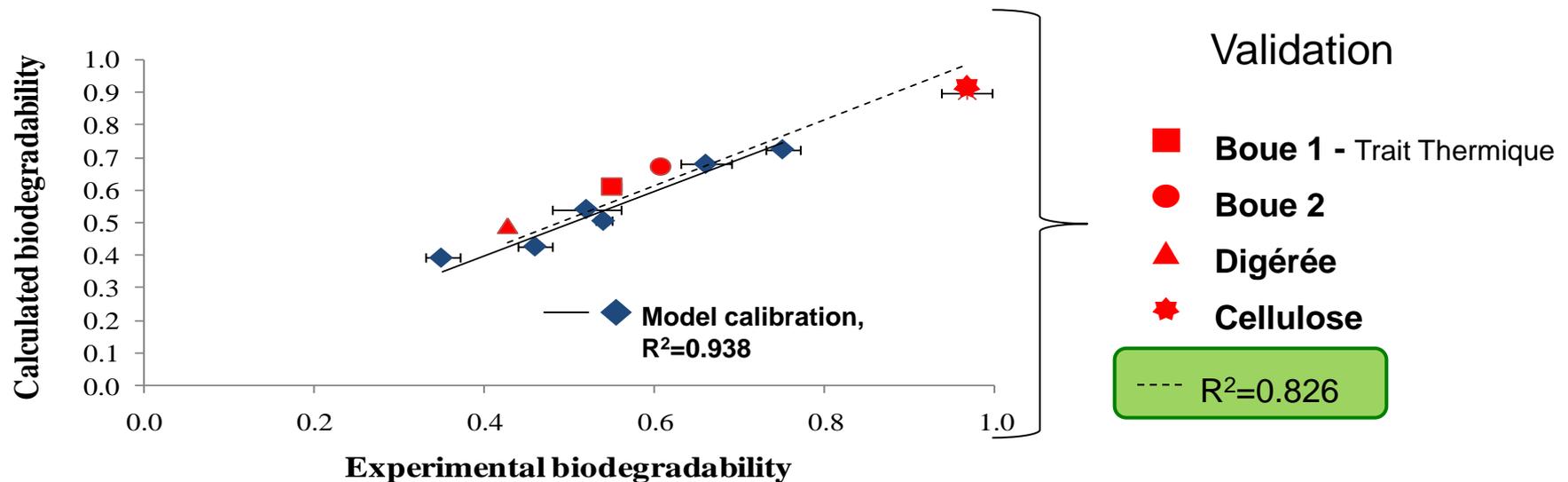
À partir de la composition élémentaire d'un échantillon, la formule de Buswell détermine la quantité de CH<sub>4</sub> qui devrait être produit

# Relation entre caractérisation et biodégradabilité

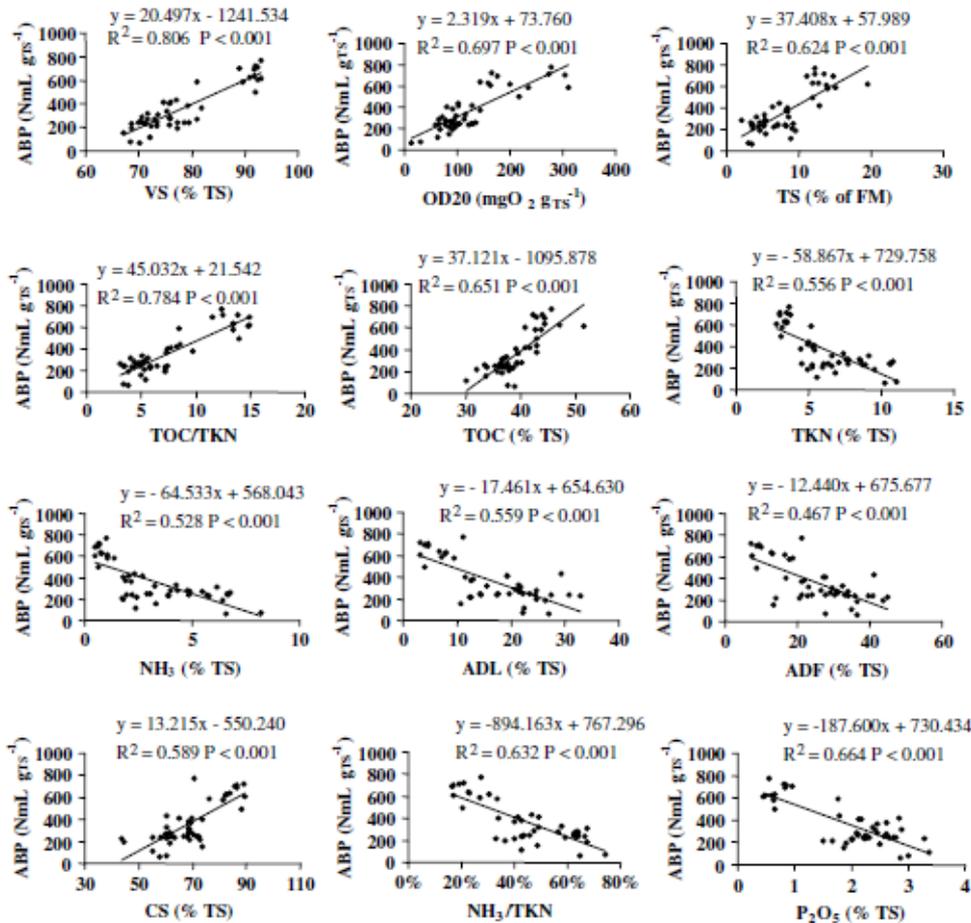
## Modèle boues activées

$$BD = 0,043 - 0,106Prot + 0,661Glu + 0,836Lpd + 0,074Ox + 0,349COsol$$

Prot = protéines    Glu = sucres    Lpd = lipides  
Ox = DCO/COT    COsol = COT soluble



# Relation entre caractérisation et biodégradabilité



- MV  
- MS

- DO20 (demande d'oxygène en test respirométrique de 20h)

- COT/NTK

- Soluble (extrait par détergent neutre VanSoest)

- NTK



- NH<sub>3</sub>

- ADF (résidus après extraction acide Van Soest)

- ADL (lignine Van Soest)

- NH<sub>3</sub>/NTK

- P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Fig. 1. Linear regressions between ABP and chemical and biochemical parameters, performed on the 46 samples studied.

# Relation entre caractérisation et biodégradabilité

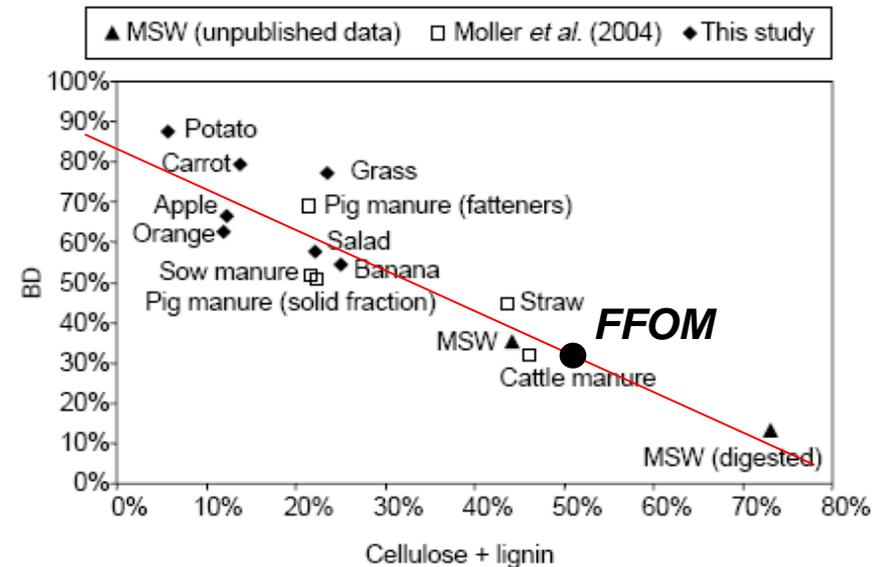
La quantité de « **Cellulose + lignine** » est corrélée de façon **négative** à la **biodégradabilité**

$$BD = 0.87 - 1.03(\text{CELL} + \text{LIGN})$$

$R^2 = 0.529$

## Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties

P. Buffiere, D. Loisel, N. Bemet and J-P. Delgenes



Water Science & Technology Vol 53 No 8 pp 233-241 © IWA Publishing 2006

Corrélation obtenue sur résidus alimentaires, FFOM\*, fumier, lisier

# Relation entre caractérisation et biodégradabilité

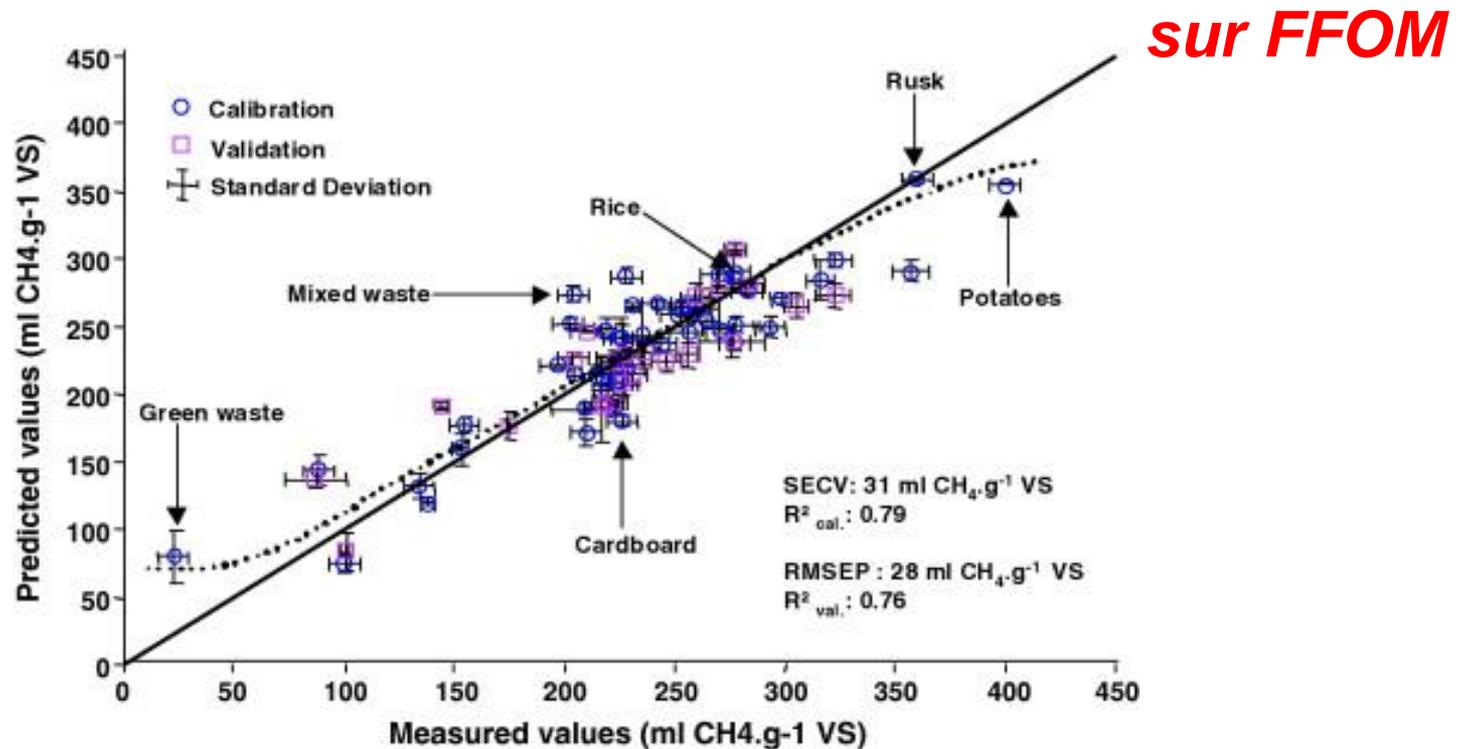
First step towards a fast analytical method for the determination of Biochemical Methane Potential of solid wastes by near infrared spectroscopy

M. Lesteur<sup>a,b,c</sup>, E. Latrille<sup>a</sup>, V. Bellon Maurel<sup>b</sup>, J.M. Roger<sup>b</sup>, C. Gonzalez<sup>c</sup>, G. Junqua<sup>c</sup>, J.P. Steyer<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>INRA UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne F-11100, France

<sup>b</sup>Cemagref-Montpellier SupAgro, UMR ITAP - Information and Technologies for AgroProcesses, BP 5095, 34033 Montpellier Cedex 1, France

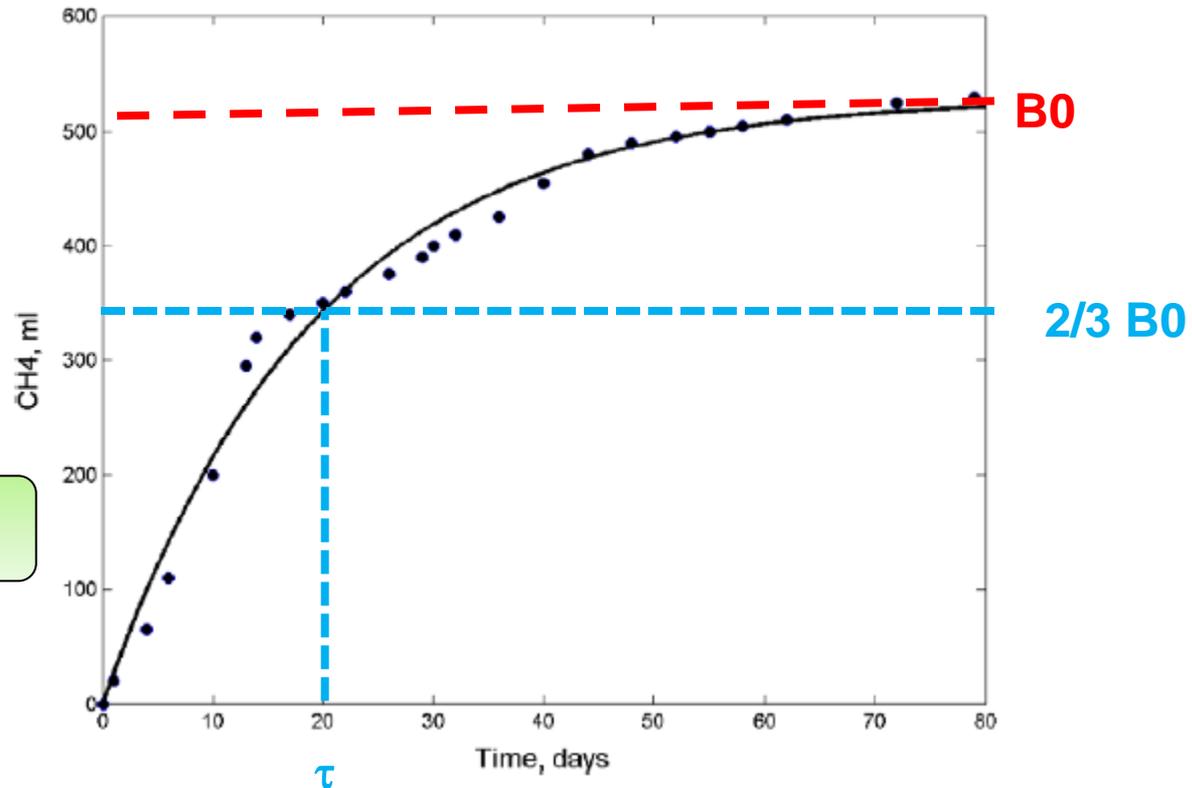
<sup>c</sup>Laboratoire Génie de l'Environnement Industriel, Ecole des Mines d'Alès, 6 avenue de Clavières, 30319 Alès Cedex, France





# Prédire – Modéliser la valeur du BMP les cinétiques de dégradation

# Cinétique du 1<sup>er</sup> ordre



$$BMP = B_0 * (1 - e^{-t/\tau})$$

Fig. 3. Time profile of the methane volume released during pig slurry (80% w/w) and pear waste (20% w/w) degradation under thermophilic conditions (55 °C). Symbols refer to the experimental data and lines to the model predictions with  $k = 0.052 \pm 0.003 \text{ d}^{-1}$  and  $\alpha S_0 = 530 \pm 11 \text{ ml}$ . Data were taken from Campos (2001).

# Cinétique du 1<sup>er</sup> ordre

Table 1  
Kinetic coefficients of the first-order rate of hydrolysis

Substrate	$k$ (day <sup>-1</sup> )	T (°C)	References
Carbohydrates	0.025–0.2	55	Christ et al. (2000)
Proteins	0.015–0.075	55	Christ et al. (2000)
Lipids	0.005–0.010	55	Christ et al. (2000)
Carbohydrates	0.5–2.0		Garcia-Heras (2003)
Lipids	0.1–0.7		Garcia-Heras (2003)
Proteins	0.25–0.8		Garcia-Heras (2003)
Lipids	0.76		Shimizu et al. (1993)
Lipids	0.63	25	Masse et al. (2002)
Cellulose	0.04–0.13		Guier and Zender (1983)
Cellulose	0.066	35	Liebetrau et al. (2004)
Kitchen waste	0.34	35	Liebetrau et al. (2004)
Biowaste	0.12	35	Liebetrau et al. (2004)
Cattle manure	0.13	55	Present study
Pig manure	0.1	28	Vavilin et al. (1997)
Proteins (gelatine)	0.65	55	Flotats et al. (2006)
Municipal solid waste	0.1	15	Bolzonella et al. (2005)
Office paper	0.036	35	Vavilin et al. (2004)
Cardboard	0.046	35	Vavilin et al. (2004)
Newsprint	0.057	35	Vavilin et al. (2004)
Food waste	0.55	37	Vavilin et al. (2004)
Forest soil	0.54	30	Lokshina and Vavilin (1999)
Forest soil	0.09–0.31	20	Lokshina and Vavilin (1999)
Slaughterhouse waste	0.35	35	Lokshina et al. (2003)
Household solid waste	0.1	37	Vavilin and Angelidaki (2005)
Primary sludge	0.4–1.2	35	O'Rourke (1968)
Primary sludge	0.99	35	Ristow et al. (2006)
Secondary sludge	0.17–0.60	35	Ghosh (1981)
Crops and crop residues	0.009–0.094	35	Lehtomaki et al. (2005)

Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview

V.A. Vavilin <sup>a</sup>, B. Fernandez <sup>b</sup>, J. Palatsi <sup>b</sup>, X. Flotats <sup>b,\*</sup>

Waste Management 28 (2008) 939–951

**! Vitesse initiale!  
Inoculum différents**

# Conclusion

## Préparation d'échantillon

- représentativité de l'échantillon

- prise d'essai : quantité minimale nécessaire

## Caractérisation chimique

- Analyse élémentaire et détermination de types de molécules

- Fractionnement : subdivision en compartiments de résistance croissante

- Techniques d'analyses rapide (Spectroscopie)

## Etude du comportement de la matière en digesteur

- Mesures directes du BMP

- Etudes cinétiques en réacteurs (pour dimensionnement)

## Conceptualisation, Modélisation, Prédiction

- Corrélations entre valeur du BMP et caractéristiques physico-chimiques

- Modèle du 1<sup>er</sup> ordre

- Modèle ADM1 : vers une meilleure compréhension des mécanismes et des synergies