



**HAL**  
open science

# Composition organique de boues résiduaire de stations d'épuration lorraines : Caractérisation moléculaire et effets de la biodégradation

Emilie Jardé

► **To cite this version:**

Emilie Jardé. Composition organique de boues résiduaire de stations d'épuration lorraines : Caractérisation moléculaire et effets de la biodégradation. Géochimie. Université Henri Poincaré - Nancy I, 2002. Français. NNT : . tel-00007882

**HAL Id: tel-00007882**

**<https://theses.hal.science/tel-00007882>**

Submitted on 3 Jan 2005

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Faculté des sciences  
U.F.R S.T.M.P.  
Ecole Doctorale RP<sup>2</sup>E  
Ressources, Produits, Procédés et Environnement

UMR CNRS 7566

## Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I**  
en Sciences de l'Univers

par

**Emilie JARDÉ**

# **COMPOSITION ORGANIQUE DE BOUES RÉSIDUAIRES DE STATIONS D'ÉPURATION LORRAINES : CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE ET EFFETS DE LA BIODÉGRADATION**

Soutenue publiquement le 20 décembre 2002

### **Membres du jury**

M. M. Jauzein	Professeur, U.H.P, Nancy	Président
M. P. Landais	Directeur Scientifique ANDRA	Directeur de thèse
Mme L. Mansuy-Huault	Maître de Conférence, U.H.P, Nancy	Co-directeur de thèse
M. R.P. Eganhouse	Directeur de recherche USGC, Reston	Rapporteur
M. A. Amblès	Professeur à l'Université de Poitiers	Rapporteur
M. R. Flutsch	Ingénieur, Agence de l'Eau Rhin-Meuse	Examineur
M. J.L. Morel	Professeur de l'E.N.S.A.I.A, Nancy	Examineur



Les travaux présentés au cours de cette étude ont été réalisés au laboratoire de géochimie organique de l'Unité Mixte de Recherche 7566 G2R. Je tiens à remercier vivement Messieurs Patrick LANDAIS et Jacques LEROY de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Merci à Laurence MANSUY-HUAULT, qui en tant que (co)directrice de thèse m'a encadrée au cours de ces trois années. Je la remercie particulièrement pour ses conseils et critiques avisés, qui je le souhaite porteront leurs fruits, merci également pour son appui pendant ces dernières semaines.

Cette thèse a été développée dans le cadre d'un contrat avec l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse. Je remercie Messieurs FLUTSCH, BREUZIN et CLUZEL pour l'intérêt porté à ces travaux. Cette étude a également été soutenue par Chambre régionale de l'Agriculture de Lorraine aussi je remercie Messieurs LIMAUX et VAN DE KERCKHOVE de la Mission Régionale de Recyclage Agricole des Déchets ainsi que les responsables départementaux, Monsieur ALLAIN pour la Meurthe et Moselle, Monsieur PEUREUX pour la Meuse et Monsieur CAHARD pour la Moselle. Merci également à tous les exploitants des stations d'épuration visitées de m'avoir ouvert leurs portes

Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur Michel JAUZEIN pour avoir accepté de présider le Jury de ma thèse. Je remercie vivement Monsieur Robert EGANHOUSE de venir de Reston et de traverser l'océan pour juger mon travail, Merci également à Monsieur André AMBLES qui a lui aussi accepté d'être rapporteur de cette thèse. Enfin merci à Monsieur Jean-Louis MOREL d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de ce jury.

Les expériences de biodégradation ont été réalisées au LiMOS -FRE 2440 Laboratoire des Intéractions Micro-organismes, Minéraux, Matière Organique dans les Sols de Vandoeuvre. Merci à Corinne LEYVAL et Christian MUSTIN pour leur accueil et leur aide dans le déroulement de ces expérimentations.

Je remercie sincèrement tous les Gédeuzérien(ne)s pour leur accueil, leur convivialité et leur bonne humeur, qui m'ont permis de passer ces trois années dans une ambiance très agréable. Merci particulièrement à Patrick Lagrange pour ses services divers et variés et au Superman de l'Informatik Roland Mairet pour ses nombreux dépannages.

Un coup de cœur particulier aux membres du club des Rissons, j'ai nommé MissTock (freluchette, DD – faut gratter dédé??? - ou plus compliqué Donatienne Derome) et le Lion («allez va jouer au ballon<sup>1</sup>», ou Mister Risson, ou Salbêtkipik ou encore Damien – mais ça rimavekrien... – Guillaume). Ils ont su être là dans les moments de rires, de larmes et de yennamar pour écouter (canapé?), raconter de belles zistoires (zzzz...zzzz) et mettre du soleil dans la tête. Un spécial merci pour les changeages d'idées kand l'Hôm était dans sa bulle. Un plus pour les délires, les fourires, les magnums, les spoutniks dans nos têtes, les pikniks (douille c'est toi...), les zours kon a dévoré (ke ceux ki restent tremblent dans leur sak de kouchage juskau prochain massacre...y front moins les malins!) ainsi ke les réunions (mankées) du Club. Merci les Zouilles milmilliondfois et encore plus d'être kom vous êtes.....

Et puis en vrac et dans nimportikel ordre...Merci à.....Zorrotte (Aurore Marquette) qui depuis sa Verte Albion veille...Jo, Tania, Maria, GranJo Moura, les «Zuruguayens» pour leur bonne humeur communicative et leur sourire qui font tout oublier....Tidémon (Damien Gruson) pour nos longues discussions sur le pkoï du koment ....les familles Faure-Forêt (Samuel, Pierre et Marie) et Legros-Bourgault (Louis, Héléne et Régis) pour les ptites bouffes dans une ambiance toujours chaleureuse, clin d'œil à Louis et à ses réflexions philosophiques («c'est comme ça la vie!»), un spécial merci à Pierre pour ses corrections, aides en tout genre, paske sans lui le labo partirait en etc....Marcel pour ses conseils en sagesse et savoir vivre (sic)...l'AEDman (Franck Vilmin) d'avoir dompté la bête...à tes souhaits! Vincent (Huault) pour les prochaines fois.....merci à l'Englishman pour toute son aide...Ln (Héléne Tissoux), Linette (Aline Grosjean) et Fifine (Delphine Charpentier) paske la vie est magnifik!!...aux Girls; Alice (Chanvin) pour ses délires, Poulina (Pauline Michel) pour sa présence, son aide, ses plus musikaux, ses nombreuses zattentions, et Loreleï (Laure Sangely) d'avoir supporté mon caractère au kotidien bon courage ainsi qu'à Filou (Philippe Kister) pour la suite et tout le reste...au Caliméro mulhousien (Ludovic Haye)...merci à Régine (Ruck) et Thérèse (Lhomme) pour leurs ptis mots encourageants, Jow (Grimmer) pour son français bizarkornu, joublierai pas bien sûr le bisousss à Max...aux lutins ki ont tout pris en main....clin d'œil aux shôssettes ki sont chouettes et font sourire les pieds.....à tous ces ptis riens ki changent bokou la vie...un infini merci et plus enkor à tout le personnel du prot'.....

Enfin, mais pas des moindres, merci énormément à Pôpa-Môman pour leur soutien, leurs visites surprises et les chtios mails poétik de Mimi la ptite souris...

<sup>1</sup>Thomas Fersen – Les malheurs du lion.

*A l'Hôm et à ceux qui se sont transformés en étoile.....*

*Si un jour tu veux redescendre\* .....*

\*Damien Saez -Depuis que t'es montée là-haut.



# Sommaire

Introduction générale.....	3
----------------------------	---

## PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Traitements des eaux usées et des boues.....	9
I.1. TRAITEMENT DES EAUX USEES DANS UNE STATION D'EPURATION.....	9
I.1.1. Pré-traitements.....	9
I.1.2. Le traitement primaire.....	11
I.1.3. Les traitements secondaires.....	11
I.1.3.1 Les traitements physico-chimiques.....	12
I.1.3.2 Les traitements biologiques.....	12
I.1.3.2.1 Traitement biologique par boues activées.....	13
I.1.3.2.2 Traitement biologique par lit bactérien.....	13
I.1.4. Le traitement tertiaire.....	14
I.1.4.1 Réduction des matières en suspension et de la pollution organique biodégradable.....	14
I.1.4.2 Réduction de la pollution organique non biodégradable.....	14
I.1.4.3 Réduction de la pollution phosphorée : la déphosphatation.....	15
I.1.4.4 Élimination des germes pathogènes : la désinfection.....	15
I.2. TRAITEMENT DES EAUX USEES PAR LAGUNAGE.....	16
I.3. LA FILIERE DE TRAITEMENT DES BOUES.....	17
I.3.1. La stabilisation des boues.....	17
I.3.2. Réduction de la teneur en eau des boues.....	18
I.3.3. Les traitements d'hygiénisation.....	19
II. Devenir des boues ?.....	19
II.1. VOIES D'ELIMINATION COURAMMENT UTILISEES.....	20
II.1.1. L'incinération.....	20
II.1.2. La mise en décharge.....	20
II.1.3. L'épandage.....	20
II.2. VOIES "D'AVENIR" POUR REDUIRE LE VOLUME DES BOUES.....	21
II.2.1. La pyrolyse (ou thermolyse).....	21
II.2.2. La gazéification.....	22
II.2.3. L'oxydation par voie humide.....	22
II.3. CONCLUSION.....	22
III. Réglementations françaises et européennes.....	24
III.1. NORMES FRANÇAISES.....	24
III.2. NORMES EUROPEENNES.....	26
III.3. ORIGINE DES PRINCIPAUX COMPOSES ORGANIQUES SUIVIS DANS LES NORMES.....	29
III.3.1. HPAs (hydrocarbures polycycliques aromatiques).....	29
III.3.2. PCBs (hydrocarbures polycycliques aromatiques halogénés de type polychlorobiphényles).....	30
III.3.3. PCDDs/Fs (polychlorodibenzo-p-dioxines/ furanes).....	31
III.3.4. DEHP (di-2-ethylhexylphtalate).....	32
III.3.5. NPs/APEs (nonylphénol et alkyl phénoléthoxylates) et LASs (alkylbenzènes sulphonates linéaires).....	32
III.4. AUTRES COMPOSES ORGANIQUES DANS LES BOUES D'EPURATION.....	33
III.4.1. Les composés azotés.....	34
III.4.1.1 Les protéines et leurs dérivés.....	34
III.4.1.2 Les acides nucléiques.....	35
III.4.2. Les lipides : acides gras, stérols.....	36
III.4.2.1 Acides gras.....	36
III.4.2.2 Les stérols.....	37
III.4.3. Composés dérivés de la lignine.....	38
III.4.4. LABs.....	41
IV. Revue bibliographique des méthodes de caractérisation du contenu organique des boues d'épuration.....	42
IV.1. ANALYSE DES COMPOSES ORGANIQUES PRESENTS DANS LA FRACTION EXTRACTIBLE PAR LES SOLVANTS ORGANIQUES.....	43
IV.1.1. Méthodes d'extraction et pré-traitements.....	44
IV.1.1.1 Pré-traitements.....	44
IV.1.1.2 Extractions.....	45

IV.1.1.2.1	Extraction au SOXHLET .....	45
IV.1.1.2.2	Extraction au Soxhlet +saponification .....	45
IV.1.1.2.3	Extraction par agitation au ballon .....	46
IV.1.1.2.4	Extraction liquide-liquide .....	46
IV.1.2.	Méthodes de fractionnement .....	47
IV.1.3.	Analyses chromatographiques.....	48
IV.1.4.	Les différents composés analysés.....	49
IV.1.4.1	HPAs et PCBs .....	49
IV.1.4.2	PCDD/Fs .....	53
IV.1.4.3	LASs et LABs .....	53
IV.1.4.4	Autres composés organiques analysés.....	55
IV.2	ANALYSE DE LA FRACTION MACROMOLECULAIRE DES BOUES .....	60
IV.2.1.	Analyses globales.....	63
IV.2.2.	Analyses spectroscopiques et moléculaires.....	64
IV.2.2.1	Spectroscopie infrarouge.....	64
IV.2.2.2	Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN).....	66
IV.2.2.3	Pyrolyse flash couplée à une chromatographe en phase gazeuse et à un spectromètre de masse .....	67
IV.3.	ANALYSE DES EXOPOLYMERES DES BOUES .....	68
V.	Conclusion .....	69

## DEUXIEME PARTIE : DESCRIPTION DES ECHANTILLONS ET DES METHODES ANALYTIQUES

I.	Introduction.....	87
II.	Description des échantillons .....	87
III.	Description des méthodes utilisées .....	90
III.1.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS AVANT ANALYSE .....	90
III.1.1.	Préparation des échantillons.....	90
III.1.2.	Extraction et fractionnement .....	90
III.1.2.1	Méthode d'extraction .....	90
III.1.2.2	Fractionnement de FOS.....	93
III.2.	ANALYSES MOLECULAIRES .....	94
III.2.1.	Le couplage chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (GC-MS).....	95
III.2.2.	Le couplage pyrolyse flash - chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (Py-GC-MS) .....	97
III.2.3.	Détecteur à émission atomique (AED).....	101
III.3.	ANALYSE ELEMENTAIRE .....	105
IV.	Expérimentation: modification du contenu organique par biodégradation .....	105

## TROISIEME PARTIE : RESULTATS

### *Chapitre I : Caractérisation moléculaire de la fraction organique soluble*

I.	Introduction.....	115
II.	Caractérisation moléculaire de la fraction organique soluble (FOS) de boues de stations d'épuration .....	117
1.	Introduction.....	118
2.	Experimental .....	119
2.1.	Sampling and sample preparation .....	119
2.2.	Extraction-Fractionation.....	121
2.3.	Gas chromatography- mass spectrometry (GC-MS) .....	121
3.	Results and discussion.....	122
3.1.	Quantification of the lipidic fraction .....	122
3.2.	Characterisation of the polar compounds: fatty acids and steroids .....	125
	Fatty acids .....	129
	Steroids.....	132
3.3.	Characterisation of the aromatic compounds: LABs and quantification of PAHs and PCBs.....	134
	LABs (linear alkylbenzenes).....	134
	PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) .....	137
3.4.	Characterisation of the aliphatic compounds.....	139
	Group 1 .....	140

Group 2 .....	144
Group 3 .....	145
4. Conclusion .....	147
III. Conclusion .....	154

### ***Chapitre II : Caractérisation moléculaire de la fraction organique insoluble***

I. Introduction.....	159
II. Caractérisation des résidus solides par méthylation et hydrolyse assistée (THM) couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse.....	161
1. Introduction.....	162
2. Experimental .....	163
2.1. Sampling and sample preparation .....	163
2.2. Thermally hydrolysis methylation- GC-MS (THM-GC-MS) .....	165
2.3. Relative quantification .....	165
3. Results and discussion.....	166
3.1. Global analysis.....	166
3.2. Description of the pyrograms .....	168
3.3. Triangular diagram.....	180
4. Conclusion .....	182
III. Caractérisation par Py-GC-AED et Chimométrie.....	189
1. Introduction.....	190
2. Samples and Methods.....	191
2.1. Sampling and sample preparation .....	191
2.2. Analytical methods.....	193
3. Chemometric approach .....	194
3.1. Signal treatment: .....	195
3.2. Data analyses.....	197
4. Results and discussion:.....	198
5. Conclusion .....	205
IV. detection de micropolluants organochlorés par Py-GC-AED .....	209
V. Conclusion .....	211

### ***Chapitre III : Effets de la biodégradation sur le contenu organique des boues***

I. Introduction.....	215
II. Echantillons retenus pour les expérimentations .....	216
II.1. BOUE DOMESTIQUE U10 .....	218
II.2. BOUE DOMESTIQUE U1 .....	220
II.3. BOUE DE LAITERIE FP1 .....	223
II.4. BOUE DE PAPETERIE PM1 .....	225
III. Résultats.....	228
III.1. NOMENCLATURE UTILISEE.....	228
III.2. MINERALISATION DU CO <sub>2</sub> .....	229
III.3. CARACTERISATION DES ECHANTILLONS BIODEGRADES .....	231
III.3.1. Analyse globale.....	231
III.3.2. Fraction aliphatique.....	234
III.3.3. Fraction aromatique.....	241
III.3.3.1 HAPs .....	241
III.3.3.2 LABs .....	243
III.3.4. Fraction polaire .....	245
III.3.5. Fraction organique insoluble (FOI).....	249
IV. Conclusion et Perspectives.....	255

Conclusion générale .....	267
---------------------------	-----

# Table des illustrations

## Figures

### PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure I.1 Exemple de dégrillage .....	10
Figure I.2. Principe d'un bassin de décantation .....	11
Figure I.3. Schéma de fonctionnement d'une station d'épuration à boues activées .....	13
Figure I.4. Bassin à lit bactérien.....	14
Figure I.5. Epaissement des boues par flottation.....	18
Figure I.6. Déshydratation par filtre presse.....	19
Figure I.7. Nom, poids moléculaire et structure des 6 Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques (HAP) généralement ciblés.....	29
Figure I.8. Structure chimique de PCBs.....	30
Figure I.9. Structure chimique de PCDD/Fs.....	31
Figure I.10. Structure chimique du DEHP .....	32
Figure I.11. Bases azotées puriques (adenine et guanine) et pyrimidiques (cytosine et thymine) des acides nucléiques .....	35
Figure I.12. Formation du coprostanol et des stérols dérivés d'après .....	38
Figure I.13. Précurseur de la lignine .....	39
Figure I.14. a. Structures des ABS et LAS et b. Formation des LASs à partir des LABs.....	41
Figure I.15. Répartition des différentes fractions de la matière organique .....	43
Figure I.16. Schéma de l'appareillage d'extraction au Soxhlet.....	45
Figure I.17. Schéma de l'appareillage d'extraction au ballon.....	46
Figure I.18. Extraction des acides humiques et fulviques.....	62

### DEUXIEME PARTIE : DESCRIPTION DES ECHANTILLONS ET DES METHODES ANALYTIQUES

Figure II.1. Appareillage mis en œuvre pour l'extraction accélérée par solvants .....	91
Figure II.2. Constitution des extraits par chromatographie liquide.....	94
Figure II.3. Comparaison des chromatogrammes de composés polaires bruts et méthylés.....	97
Figure II.4. Comparaison des pyrogrammes des résidus solides bruts (par Py-GC-MS) et méthylés (par THM-GC-MS) .....	100

### TROISIEME PARTIE : RESULTATS

#### *Chapitre I : Caractérisation moléculaire de la fraction organique soluble*

Figure III.1.1. Extraction yields (mg/g sample) of domestic and industrial sludges.....	124
Figure III.1.2. Chromatograms of the polar fraction of food-processing and paper-mill sludges.....	127
Figure III.1.3. Chromatograms of the polar fraction of domestic sludges .....	128
Figure III.1.4. AGeven/AGodd ratio for the 48 analysed samples .....	131
Figure III.1.5. Chromatogram of the polar fraction of the manure sample (M1).....	133
Figure III.1.6. LABs in the aromatic fraction of an urban sewage sludge and a semi-urban one.....	136
Figure III.1.7. Chromatograms of the aliphatic fraction of group 1.....	142
Figure III.1.8. Distribution of the pentacyclic triterpanes (m/z=191) observed in all sludges (excepted M1 and M2).....	143
Figure III.1.9. Chromatograms of the aliphatic fraction of 2 paper-mill sludges characteristic of group 2.....	145
Figure III.1.10 Chromatograms of the aliphatic fraction of 2 sewage sludges characteristic of group 3.....	146
Figure III.1.11. Chromatograms of the aliphatic fraction of tar and motor oil .....	146

#### *Chapitre II : Caractérisation moléculaire de la fraction organique insoluble*

Figure III.2.1. TOC (%) in the samples of domestic and industrial sludges.....	167
Figure III.2.2. THM-GC-MS pyrograms of domestic sludges.....	170
Figure III.2.3. THM-GC-MS pyrograms of food processing and paper mill sludges.....	171

Figure III.2.4. $C_{18:1}/C_{18:0}$ and $FA_{\text{even}}/FA_{\text{odd}}$ in FOI of sewage sludges.....	177
Figure III.2.5. Distributions of fatty acids in insoluble residues and polar fractions of domestic, paper-mill and food-processing sludges.....	179
Figure III.2.6. Triangular representation of the chemical composition of insoluble residues of sewage sludge.	181
Figure III.2.7. The different steps of pyrograms processing prior to the chemometric approach. ....	195
Figure III.2.8. Simultaneous analysis of C, N, and S: (a) correlation circle showing the selected variables and (b) factorial plane representing the individuals. The groups are defined by a hierarchical classification.....	199
Figure III.2.9. Simultaneous representation of variables and groups of individuals in the F1-F2 factorial plane. ....	201
Figure III.2.10. Carbon-, Nitrogen- and Sulphur-specific pyrograms of four sludges representative of each group, and identification of the significant variables. ....	202
Figure III.2.11. Pyrogrammes de U10 et FP1 sur le canal du chlore .....	210

### **Chapitre III : Effets de la biodégradation sur le contenu organique des boues**

Figure III.3.1. Chromatogrammes des fractions aromatiques, aliphatiques, polaires et pyrogramme du résidu solide de l'échantillon U10. ....	219
Figure III.3.2. Chromatogrammes des fractions aromatiques, aliphatiques, polaires et pyrogramme du résidu solide de l'échantillon U1. ....	222
Figure III.3.3. Chromatogrammes des fractions aromatiques, aliphatiques, polaires et pyrogramme du résidu solide de l'échantillon FP1.....	224
Figure III.3.4. Chromatogrammes des fractions aromatiques, aliphatiques, polaires et pyrogramme du résidu solide de l'échantillon PM1. ....	227
Figure III.3.5. Evolution cumulée du $CO_2$ lors de la première phase de biodégradation. ....	229
Figure III.3.6. Evolution cumulée du $CO_2$ lors de la deuxième phase de biodégradation.....	230
Figure III.3.1. Evolution de la composition organique des quatre boues au cours de la biodégradation.....	233
Figure III.3.8. Chromatogrammes des n-alcanes ( $m/z = 85$ ) de la boue domestique U10 (de U10 brut à U10-BII-140).....	235
Figure III.3.9 Chromatogrammes des n-alcanes ( $m/z = 85$ ) de la boue de papeterie PM1 (de PM1 brut à PM1-BII-140).....	236
Figure III.3.10 Chromatogrammes des n-alcanes ( $m/z = 85$ ) de la boue U1 (de U1 brut à U1-BII-140).....	237
Figure III.3.11 Chromatogrammes des n-alcanes ( $m/z = 85$ ) de la boue de laiterie FP1 (de FP1 brut à FP1-BII-140).....	238
Figure III.3.12. Chromatogrammes de la fraction aromatique des boues U1, U10, FP1 et PM1 brutes et après 140 jours de biodégradation. ....	242
Figure III.3.13. Distributions des LABs dans les échantillons bruts et biodégradés de U1 et U10.....	244
Figure III.3.14. Chromatogrammes des fractions polaires des quatre échantillons bruts et après 140 jours d'expérimentation. ....	246
Figure III.3.15. Pyrogrammes des résidus solides de FP1 et PM1 bruts et après 140 jours d'incubation.....	250
Figure III.3.16. Pyrogrammes Py-GC-AED sur le canal Cl479 pour les échantillons bruts et biodégradés de FP1. ....	254

## **Tableaux**

### **PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

Tableau I.1. Vitesse de décantation de particules colloïdales en régime laminaire .....	12
Tableau I.2. Teneurs limites en éléments traces métalliques dans les boues .....	25
Tableau I.3. Teneurs limites en micropolluants organiques dans les boues.....	26
Tableau I.4. Teneurs limites en micropolluants organiques dans les boues épandues sur des terres agricoles ou maraîchères en Allemagne .....	27
Tableau I.5. Valeurs limites en éléments traces métalliques proposées par le groupe de travail sur les boues.....	28
Tableau I.6: Teneurs limites en composés organiques dans les boues d'après l' «European Union Draft on Sewage Sludge» .....	28
Tableau I.7. Persistance des surfactants dans les sols après épandage .....	33
Tableau I.8. Noms, symboliques et formules des principaux acides gras .....	37
Tableau I.9. Principaux composés dérivés de la lignine retrouvés en THM-GC-MS d'après .....	40
Tableau I.10. Comparaison de pré-traitements pour l'analyse des chlorobenzènes .....	44
Tableau I.11. Concentrations en HPAs (en mg/kg) dans les boues d'épuration. ....	49

Tableau I.12. Comparaison de méthodes d'extraction et de fractionnement pour les HPAs et les PCBs .....	50
Tableau I.13. Comparaison des méthodes d'extraction de détection des HPAs .....	50
Tableau I.14. Comparaison de différents solvants pour l'extraction des PCBs .....	51
Tableau I.15. Comparaison de deux types de fractionnement pour l'analyse des PCBs .....	51
Tableau I.16. Comparaison de différents types d'extraction pour l'analyse des PCBs .....	52
Tableau I.17. Autres méthodes utilisées couramment pour l'analyse des PCBs et HPAs .....	52
Tableau I.18. Méthodes de préparation et d'analyse pour la quantification des PCDD/Fs dans les boues .....	53
Tableau I.19. Méthode d'analyse pour les LASs .....	54
Tableau I.20. Demi-vie de différents LAS dans les boues d'épurations épandues au sol .....	54
Tableau I.21. Méthodes utilisées pour l'analyse des LABs .....	55
Tableau I.22. Méthodes utilisées pour l'analyse des chlorobenzènes .....	55
Tableau I.23. Méthodes d'extraction pour les composés organiques présents dans les fractions acides ou basiques et neutres .....	57
Tableau I.24. Comparaison des méthodes d'extraction pour les fractions lipidiques des boues .....	58
Tableau I.25. Composition élémentaire des substances humiques naturels et issus de boues .....	63
Tableau I.26. Principales bandes caractéristiques des acides humiques des boues d'épuration .....	65
Tableau I.27. Principales bandes caractéristiques des acides humiques .....	66

## DEUXIEME PARTIE : DESCRIPTION DES ECHANTILLONS ET DES METHODES ANALYTIQUES

Tableau II.1. Caractéristiques des boues étudiées .....	89
Tableau II.2. Comparaison de l'efficacité de différents solvants pour l'extraction des boues .....	92
Tableau II.3. Comparaison de trois méthodes d'extraction sur la boue de Maxéville (54) en utilisant un mélange DCM/M (65/35) .....	92
Tableau II.4. Caractéristiques expérimentales du détecteur à émission atomique .....	104

## TROISIEME PARTIE : RESULTATS

### *Chapitre I : Caractérisation moléculaire de la fraction organique soluble*

Table.III.1.1. Characteristics of the samples collected in wastewater-treatment plants of Lorraine .....	120
Table.III.1.2. Extraction yields (mg/g of the total sample) and compositional analysis of the .....	123
Table.III.1.3. Identification of peaks in the chromatograms of polar and aliphatic fractions of sewage sludges .....	126
Table.III.1.4. Results of fatty acids ratios in the polar fraction of sewage sludges .....	131
Table.III.1.5. Results of the Cop/ $\Sigma_{sterols}$ ratio in domestic sludges .....	133
Table.III.1.6. Results of the I/E ratios in domestic sludges .....	137
Table.III.1.7. Quantification of PAHs of 12 representative sewage sludges .....	137
Table.III.1.8. Results of the CPI and LMW/(C <sub>27</sub> +C <sub>29</sub> +C <sub>31</sub> ) .....	140
Table.III.1.9. Identification of the pentacyclic triterpanes in figure III.1.8 .....	144

### *Chapitre II : Caractérisation moléculaire de la fraction organique insoluble*

Table III.2.1. Characteristics of the samples collected in depuration plants of Lorraine .....	164
Table III.2.2. Results of the TOC .....	167
Table III.2.3. Identification of peaks in the pyrograms of insoluble residues of sewage sludge .....	169
Table III.2.4. Results of the ratio between lignin-derived compounds .....	174
Table III.2.5. Ratios between fatty acids .....	176
Table III.2.6. Description of the samples collected in different depuration plants .....	192
Table III.2.7. Analytical conditions for flash Py-GC-AED .....	194
Table III.2.8. Atomic ratios calculated from Py-GC/AED and elemental analyses of 3 samples: FP1, U10 and L1 representative respectively of group 3, group 1 and group 2 defined in figure III.2.9 .....	201

### *Chapitre III : Effets de la biodégradation sur le contenu organique des boues*

Tableau III.3.1. Formules chimiques et symboles des principaux pics identifiés dans les fractions extractibles et les résidus solides .....	218
Tableau III.3.2. Quantification des HAPs présents dans l'échantillon U10 .....	218
Tableau III.3.3. Résultats de l'analyse élémentaire et composition de l'extrait de l'échantillon U10 .....	219
Tableau III.3.4. Quantification des HAPs présents dans l'échantillon U1 .....	221
Tableau III.3.5. Résultats de l'analyse élémentaire et composition de l'extrait de l'échantillon U1 .....	221
Tableau III.3.6. Quantification des HAPs présents dans l'échantillon FP1 .....	223

Tableau III.3.7. Résultats de l'analyse élémentaire et composition de l'extrait de l'échantillon FP1.....	224
Tableau III.3.8. Quantification des HAPs présents dans l'échantillon PM1.....	226
Tableau III.3.9. Résultats de l'analyse élémentaire et composition de l'extrait de l'échantillon PM1.....	226
Tableau III.3.10. Evolution cumulée et moyennée (en ppm / mg éch) de la production de CO <sub>2</sub> lors de la première phase de biodégradation.....	229
Tableau III.3.11. Evolution cumulée et moyennée (en ppm / mg éch) de la production de CO <sub>2</sub> lors de la deuxième phase de biodégradation.....	230
Tableau III.3.12. Mesure du COT des échantillons bruts et biodégradés après 140j (phase II).....	231
Tableau III.3.13. Mesure du carbone total, du COT et du carbone inorganique des échantillons bruts.....	231
Tableau III.3.14. Evolution de la quantité de fraction organique soluble (FOS) et insoluble (FOI) au cours des expérimentations.....	232
Tableau III.3.15. Composition des fractions organiques solubles des échantillons bruts et après 140 jours de biodégradation.....	233
Tableau III.3.16. Résultats du C.P.I pour les boues PM1 et U10.....	234
Tableau III.3.17. Teneurs en HAPs dans les échantillons bruts.....	241
Tableau III.3.18. Résultats des rapports 5-6/3-4 et 4/3.....	243
Tableau III.3.19. Calcul du rapport I/E avec les isomères du n-C <sub>12</sub> pour les boues U1 et U10.....	244
Tableau III.3.20. Calcul des rapports d'acides gras et de stérols dans les fractions polaires des échantillons bruts et après 140 jours d'expérimentations.....	248
Tableau III.3.21. Evolution des rapports d'acides gras dans les résidus solides au cours de la biodégradation.....	251
Tableau III.3.22. Evolution des rapports entre les unités de la lignine au cours de la biodégradation.....	252



# *INTRODUCTION GÉNÉRALE*



L'eau consommée ou utilisée par l'homme à l'échelle domestique ou industrielle génère inévitablement des déchets. Ces eaux usées sont recueillies par les égouts et dirigées vers les stations d'épuration afin d'être purifiées avant leur réintroduction dans le milieu naturel. Leur traitement dans les stations permet de séparer une eau épurée d'un résidu secondaire, les boues, qui présentent les caractéristiques d'un amendement organique bien pourvu en matière organique, azote, phosphore ainsi qu'en oligo-éléments.

En France, le gisement actuel de boues urbaines est estimé à environ 1 000 000 tMS/an et devrait être supérieur à 1 300 000 tMS/an d'ici à 2005. Parallèlement à cette évolution croissante de la quantité de boues à traiter, les débouchés pour leur élimination sont de plus en plus restreints. En effet, compte tenu de la nouvelle réglementation des centres d'enfouissement techniques, seuls les déchets ultimes seront admis à compter du 1<sup>er</sup> juillet 2002. Le devenir des boues est donc un problème préoccupant. La voie de recyclage privilégiée est l'épandage agricole en raison des effets positifs des boues sur les propriétés physico-chimiques des sols (structure, stabilité) (Larson *et al.*, 1972; Sastre *et al.*, 1996; Navas *et al.*, 1998). Ce recyclage nécessite cependant des efforts constants de maîtrise des rejets raccordés. Ainsi, afin de s'assurer de l'innocuité des boues, elles sont au préalable soumises à des normes.

Actuellement en France, les teneurs limites admissibles dans les boues de stations d'épuration pour les métaux, les composés organiques et dans le cas de boues hygiénisées, les micro-organismes pathogènes, sont fixées par l'arrêté du 8 janvier 1998. Les seuls polluants organiques pris en compte sont les HPAs (hydrocarbures polycycliques aromatiques) et les PCBs (hydrocarbures polycycliques aromatiques halogénés de type polychlorobiphényles). De nombreuses études ont été réalisées sur le suivi des micropolluants organiques dans les boues (Berset & Holzer, 1995; Moreda *et al.*, 1998) mais également sur le transfert de ces composés vers le sol et les plantes (Wild & Jones, 1993; Smith *et al.*, 2001). Une autre préoccupation soulevée par le recyclage agricole est la détermination de la valeur agronomique de ce type d'amendement afin de justifier l'utilisation des boues d'un point de vue pédologique. Dans cette optique, ce sont essentiellement les substances humiques des boues qui sont étudiées et comparées à celles de différents sols (Boyd *et al.*, 1980; Iakimenko *et al.*, 1996). Cependant les protocoles d'extraction habituellement utilisés pour l'analyse des substances humiques des sols ne sont pas totalement adaptés à des matières organiques fraîches telles que les boues (Sanchez-Monedero *et al.*, 1999; Réveillé, 2001).

Le contenu organique des boues ne peut se réduire aux seuls micropolluants dosés dans les normes, lesquels représentent moins de 1% du contenu organique extractible. En

effet, la fraction extractible des boues est un mélange complexe d'origines variées dont la composition dépend de celle des eaux usées entrant dans le système de collecte. Les principaux paramètres qui influencent la composition des boues sont les types d'effluents traités (domestiques, industriels, agro-alimentaires) mais également les variations liées à des paramètres spatio-temporels. D'une part, en milieu rural ou urbain, certaines variations de la composition du contenu organique sont envisageables et peuvent être liées à des différences d'industrialisation, d'aires routières (lessivage des routes), ou de trafic routier. D'autre part, la composition des eaux usées peut également dépendre de la quantité d'eaux pluviales reçues et du degré de séparation existant entre les égouts pluviaux et ceux d'eaux sanitaires. Ainsi, certains composés organiques dilués dans les eaux pluviales pourraient s'accumuler dans les boues d'épuration. En raison de cette complexité, le contenu organique des boues dans son intégralité est peu caractérisé. Pourtant une meilleure connaissance de celui-ci est nécessaire, puisque de nombreux travaux ont souligné que la composition des boues conditionne leur réactivité (possibilité de complexation avec des composés organiques ou inorganiques, impact sur le sol après épandage). D'autre part ce sont souvent les boues urbaines au sens strict qui sont étudiées en raison de leur richesse en micropolluants organiques, et peu de données sont disponibles sur la variabilité potentielle de la composition chimique des boues d'épuration selon la taille de la station d'épuration ou le type d'effluents traités.

Afin d'approfondir les connaissances sur le contenu organique d'un large panel de boues résiduaire d'épuration d'origines variées (domestiques, industrielles et agro-alimentaires), ce travail a été initié en collaboration avec l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse et la Région Lorraine. Ce mémoire a été divisé en trois parties.

La première partie est une synthèse généraliste sur l'étude des boues de station d'épuration. Elle part du fonctionnement d'une station d'épuration vers une revue bibliographique des méthodes de caractérisation du contenu organique des boues, via une présentation des voies possibles de recyclages de ces déchets, ainsi que des réglementations françaises et européennes en vigueur qui définissent les teneurs limites en micropolluants autorisées dans les boues pour le recyclage agricole.

La deuxième partie présente les protocoles de préparation et d'analyse des échantillons utilisés dans le cadre de cette thèse. La méthodologie analytique appliquée est issue du savoir-faire pétrolier, en raison de l'historique du laboratoire dans lequel a été réalisée cette étude. Ce transfert de méthodologie à des problèmes environnementaux a été discuté par Pierrisnard (1996); Bourezgui (1998), Faure (1999), et nous a semblé adapté à la caractérisation du contenu organique des boues d'épuration. Les eaux usées entrant dans les systèmes de

collectes domestiques sont principalement des eaux sanitaires mais également des eaux de lavage des routes, des aires de stationnement, ainsi que toutes les eaux usées déversées intentionnellement ou accidentellement dans les égouts. Par conséquent, des composés d'origines très variées s'accumulent dans les boues et l'application de cette méthodologie apparaît comme le meilleur compromis pour extraire et caractériser le plus grand nombre de composés. Par ailleurs, elle pourra nous fournir des indices pour l'identification de leurs sources potentielles.

La troisième partie est subdivisée en trois chapitres et traite des résultats obtenus à l'issue de cette caractérisation. Les deux premiers chapitres s'intéressent à la caractérisation de la fraction organique soluble (chapitre I) et insoluble (chapitre II) dans les solvants organiques des échantillons. Le but de ces chapitres est de dresser l'inventaire des composés organiques présents afin de mettre en évidence une éventuelle variabilité de la composition moléculaire, et donc de la réactivité des boues, en fonction de la taille ou du type de station d'épuration. Les résultats ainsi que les interprétations de cette caractérisation sont présentés sous la forme de trois articles. Les principaux résultats sont résumés en français à la fin des chapitres. Une fois le contenu organique caractérisé, le deuxième aspect développé au cours de ce travail vise à simuler les processus de dégradation biologique de quatre échantillons de boues au moyen d'expérimentations en chambre d'incubation. Les échantillons biodégradés à l'issue de ces expérimentations sont analysés par les techniques décrites dans la deuxième partie.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Berset, J.D. & Holzer, R. (1995) Organic micropollutants in Swiss agriculture: distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in soil, liquid manure, sewage sludge and compost samples; a comparative study. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, **59**, 145-165.
- Bourezgui, Y. (1998) Contribution à la caractérisation de la composante organique d'un sédiment urbain (cas du bras mort de la Deûle), mémoire de thèse 196 p. Université du Val de Marne, Paris XII.
- Boyd, S.A., Sommers, L.E. & Nelson, D.W. (1980) Changes in humic acid fraction of soil resulting from sludge application. *Soil Science Society American*, **44**, 1179-1186.
- Faure, P. (1999) Application des techniques de géochimie organique pétrolière à l'étude de problèmes environnementaux: polluants organiques, inertage et stockage des déchets,

- mémoire de thèse, 293p, Institut National Polytechnique de Lorraine, académie Nancy-Metz.
- Iakimenko, O., Otabbong, E., Sadovnikova, L., Persson, J., Nilsson, I., Orlov, D. & Ammosova, Y. (1996) Dynamic transformation of sewage sludge and farmyard manure components. 1. Content of humic substances and mineralisation of organic carbon and nitrogen in incubated soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **58**, 121-126
- Larson, W.E., Clapp, C.E. & Dowdy, R.D. (1972) Interim report on the agricultural values of sewage sludges. USDA-Agricultural Research Service and Department of Soil Science, St Paul, Minnesota.
- Moreda, J.M., Arranz, A., Fdez de Betono, S., Cid, A. & Arranz, J.F. (1998) Chromatographic determination of aliphatic hydrocarbons and polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in a sewage sludge. *The Science of the Total Environment.*, **220**, 33-43.
- Navas, A., Bermudez, F. & Machin, J. (1998) Influence of sewage sludge application on physical and chemical properties of Gypsisols. *Geoderma*, **87**, 123-135.
- Pierrisnard, F. (1996) Impact de l'amendement des boues résiduaires de la ville de Marseille sur des sols à vocation agricole : le comportement du Cd, Cr, Ni, Pb, Zn, des hydrocarbures et des composés polaires, mémoire de thèse, 408p, Université d'Aix-Marseille.
- Réveillé, V. (2001) Caractérisation de mélanges sol/boues: complexe d'échange, matière organique et répartition des métaux, mémoire de thèse spécialité Sciences et Technique de l'Environnement, 277p, Université de Paris XII- Val de Marne, Paris
- Sanchez-Monedero, M.A., Roig, A., Cegarra, J. & Bernal, M.P. (1999) Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting. *Bioresource Technology*, **70**, 193-201.
- Sastre, I., Vicente, M.A. & Lobo, M.C. (1996) Influence of the application of sewage sludges on soil microbial activity. *Bioresource Technology*, **57**, 19-23.
- Smith, K.E.C., Green, M., Thomas, G.O. & Jones, K.C. (2001) Behavior of sewage sludge-derived PAHs on pasture. *Environmental Science and Technology*, **35**, 2141-2150.
- Wild, S.R. & Jones, K.C. (1993) Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **12**, 5-12.

# **PREMIÈRE PARTIE**

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**



## **DEFINITION D'UNE BOUE D'EPURATION**

Les boues sont définies par le Comité Européen de Normalisation (CEN) comme «*un mélange d'eau et de matières solides, séparé par des procédés naturels ou artificiels des divers types d'eau qui le contiennent*». Les boues sont issues du traitement des eaux usées domestiques ou industrielles. L'épuration de ces eaux usées s'effectue en différentes étapes (qui seront décrites par la suite) selon des techniques basées sur des lois de la physique, de la chimie et de la biologie. Il en résulte une eau épurée que l'on rejette dans le milieu naturel et un résidu principal : les boues. Ce résidu est constitué de matières minérales inertes, d'azote, de phosphore et de matières organiques.

En fonction du type d'effluents traité (eaux usées domestiques, agro-alimentaires ou industrielles), et des traitements effectués pour les eaux usées et les boues, la composition de ces dernières peut être différente. Le traitement des eaux usées permet d'éliminer d'une part, la partie la plus facilement dégradable de la matière organique (Hiroux *et al.*, 1983) et d'autre part, les différents composés dont les eaux sont chargées (débris alimentaires, graisses, fibres textiles et cellulosiques, savon, lessives et détergents) avant leur réintroduction dans le cycle de l'eau. Au sein des stations d'épuration, la filière «traitement des eaux usées» est à différencier de la filière «boues», avec des aller-retours possibles d'une filière à l'autre. Il est également possible d'épurer les eaux usées par le processus de lagunage, qui est une technique simple, mais qui donne des taux d'épuration importants pour un coût relativement limité.

## **I. TRAITEMENTS DES EAUX USEES ET DES BOUES**

### **I.1. Traitement des eaux usées dans une station d'épuration**

#### **I.1.1. Pré-traitements**

Avant l'arrivée dans la station d'épuration, les collecteurs des eaux usées charrient des matières très hétérogènes, et souvent grossières. Les eaux qui arrivent à la station d'épuration vont subir en premier lieu des traitements de dégrossissage nommés pré-traitements. Ceux-ci vont permettre d'extraire la plus grande quantité des éléments dont la taille (détritus grossiers), le pouvoir abrasif (sables, argiles) et la masse spécifique (graisses flottantes) risquent de perturber le fonctionnement des étapes ultérieures.

Ces pré-traitements constituent une première étape très importante pour assurer un traitement efficace des eaux usées. Trois types principaux peuvent être distingués :

- 1) Le dégrillage (figure I.1) permet d'éliminer les matières volumineuses (bouteilles, bois...) charriées par les eaux brutes et qui pourraient provoquer l'obturation de différentes unités de l'installation et nuire à l'efficacité des traitements ultérieurs. Le dégrillage est assuré par des grilles dont l'écartement des barreaux varie suivant la taille des objets à piéger.



*Figure I.1 Exemple de dégrillage*

- 2) Le tamisage assure un dégrillage poussé par filtration des eaux brutes sur toile, treillis ou tôle perforée, à mailles plus ou moins fines afin d'éliminer les matières solides (impuretés) présentes dans l'eau.
- 3) Le dessablage permet d'éliminer les graviers, sables ou particules minérales grâce à des pièges à sédiments, afin d'éviter le dépôt de ces particules dans les installations et de protéger les unités de traitement contre l'abrasion.
- 4) Le déshuilage consiste à récupérer grâce à des racleurs, les graisses domestiques ou industrielles qui se trouvent à la surface des eaux usées naturellement ou par flottation (injection de fines bulles d'air).

Après ces pré-traitements, les eaux usées vont suivre la filière «eau» dans le processus d'épuration.

### I.1.2. Le traitement primaire

Après les pré-traitements, il reste dans l'eau une charge polluante dissoute et des matières en suspension que ce traitement va permettre d'éliminer en partie. La nature (organique ou minérale), les dimensions (particules grossières non piégées lors des étapes de pré-traitements, finement dispersées ou à l'état colloïdal) et la densité de ces particules sont très variables. Le traitement primaire correspond à une étape gravitaire qui permet d'isoler par décantation les particules décantables.

Les eaux vont traverser les bassins décanteurs (figure I.2) à faible vitesse pour que les matières en suspension puissent sédimenter. Les décanteurs primaires sont équipés d'un pont tournant qui concentre les matières décantées vers le centre du bassin. Elles sont alors prélevées par des pompes qui les refoulent jusqu'aux installations de traitement des boues.

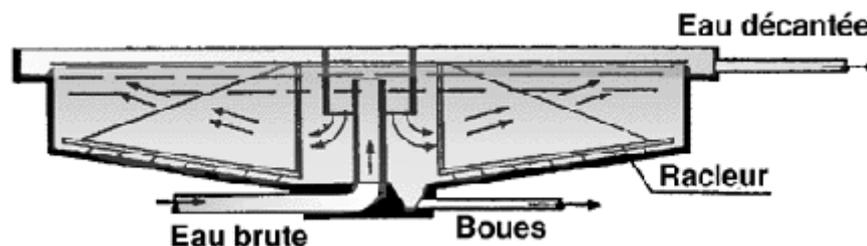


Figure I.2. Principe d'un bassin de décantation

### I.1.3. Les traitements secondaires

La décantation permet l'élimination des particules de grandes tailles (supérieures à 50 microns). Par contre, la séparation des matières finement dispersées et des colloïdes, qui sont à l'origine de la coloration des eaux, ne peut se faire directement par décantation.

Les espèces colloïdales que l'on rencontre dans une eau brute ou une eau résiduaire comprennent de l'argile, de la silice, du fer et autres métaux lourds et des solides organiques tels que des détritits d'organismes morts. Elles ont une taille inférieure à 1 micron. D'après la loi de Stokes, en régime laminaire leur vitesse de décantation est très faible.

<i>Diamètre du colloïde en <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>Temps de décantation pour 1 m d'eau à 20°C</i>
0,1	2 ans
0,01	20 ans
0,001	200 ans

Tableau I.1. Vitesse de décantation de particules colloïdales en régime laminaire déduite de la loi de Stokes

Les colloïdes sont donc des particules impossibles à décanter naturellement. Il est alors nécessaire de faire appel à des traitements secondaires. Ceux-ci permettent d'éliminer les particules non décantables et les matières dissoutes. Ils font généralement appel à des procédés physico-chimiques ou biologiques.

### ***I.1.3.1 Les traitements physico-chimiques***

Le traitement physico-chimique va permettre d'agglomérer les particules (coagulation – floculation) par adjonction d'agents floculants (chlorure de fer ou poly-alumino-chlorure PAC). Ces amas de particules ainsi formés seront séparés de l'eau par décantation dans des clarificateurs (élimination des particules formées décantables de taille généralement supérieure à 50  $\mu\text{m}$ ). Ce traitement peut être effectué préalablement aux traitements biologiques et s'intègre dans ce cas dans les étapes du traitement primaire.

### ***I.1.3.2 Les traitements biologiques***

Le traitement biologique se fait en mettant en contact l'eau à épurer et des micro-organismes. Ceux-ci vont se nourrir des matières organiques présentes dans les eaux usées et vont transformer les polluants :

- 1) par absorption des matières polluantes sur floc bactérien (agglomérat de micro-organismes),
- 2) par conversion en matière cellulaire,
- 3) par oxydation en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  qui produit l'énergie nécessaire au fonctionnement et à la production du matériau cellulaire.

Si la culture est en suspension dans un bassin aéré, il s'agit du procédé à boues activées. Dans le procédé de type lit bactérien par contre, la culture est fixée ou retenue sur un support solide. D'autres processus sont aussi utilisés (tel que les disques biologiques, ...),

mais dans le présent mémoire nous ne présenterons que les deux modes de traitements biologiques les plus fréquents.

### I.1.3.2.1 Traitement biologique par boues activées

Ce type de traitement implique l'aération du bassin des eaux usées afin d'assurer les conditions adéquates ( $O_2$ ) pour le développement des micro-organismes qui s'agglomèrent et forment le floc bactérien. Les matières organiques polluantes vont être captées par ces floes et former des boues activées qui sont brassées et assurent l'épuration des eaux usées dans le bassin. A l'aval de ce traitement, un clarificateur (ou décanteur secondaire) permet l'isolation des boues. Pour conserver un stock constant et suffisant de bactéries dans le bassin de boues activées, une partie des boues extraites du clarificateur est renvoyée en tête de bassin. L'autre partie est évacuée du circuit et dirigée vers les unités de traitement des boues.

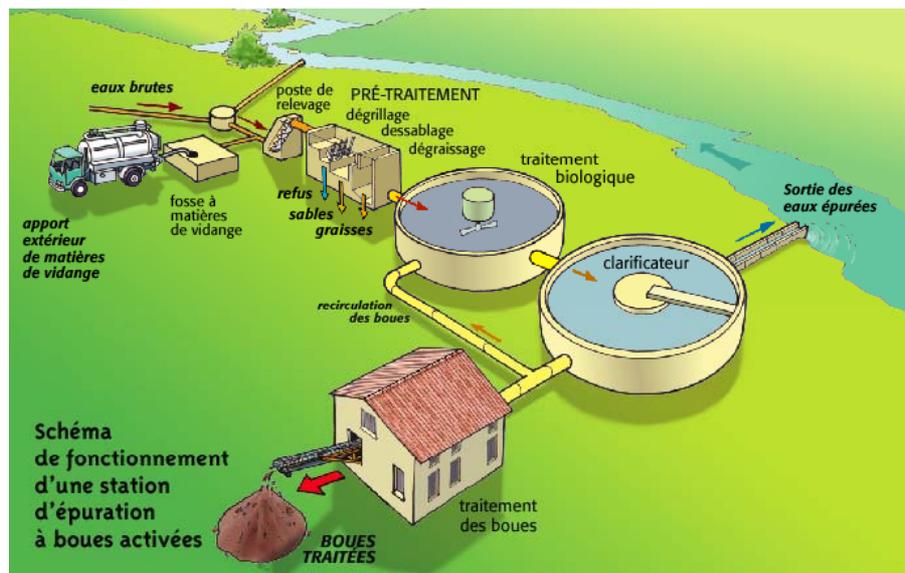


Figure I.3. Schéma de fonctionnement d'une station d'épuration à boues activées (d'après «les boues d'épuration municipales et leur utilisation en agriculture» élaboré par le Comité Technique Permanent sur l'épandage des boues d'épuration et édité par l'ADEME)

### I.1.3.2.2 Traitement biologique par lit bactérien

Le principe du traitement par lit bactérien consiste à faire ruisseler l'eau à traiter, préalablement décantée (traitement primaire), sur un support poreux contenant les micro-organismes épurateurs. L'eau à traiter est répartie uniformément à la surface du filtre

(dispersion en pluie par une grille de répartition- figure I.4), puis suit une phase d'aération pour apporter dans toute la biomasse du lit l'oxygène nécessaire au maintien des bonnes conditions pour la microflore, l'objectif final n'étant pas de développer une biomasse, mais de restituer une eau purifiée. Une étape de séparation liquide-biomasse est assurée par un dispositif de clarification. Comme pour les boues activées, une partie de ces boues sert à réensemencer les bassins biologiques tandis que le reste est transféré vers la filière boue.



Figure I.4. Bassin à lit bactérien.

#### **I.1.4. Le traitement tertiaire**

Le traitement tertiaire, qui n'est pas systématique, est une opération d'affinage de l'effluent avant réintroduction de l'eau épurée dans le milieu naturel.

##### ***I.1.4.1 Réduction des matières en suspension et de la pollution organique biodégradable***

Le traitement le plus utilisé afin de réduire les matières en suspension et la pollution organique biodégradable, est la filtration tertiaire qui, selon la nature du matériau utilisé, permet de réaliser une épuration essentiellement physique ou biologique.

##### ***I.1.4.2 Réduction de la pollution organique non biodégradable***

Pour fixer les matières carbonées dissoutes non biodégradables (par exemple les détergents), le moyen le plus utilisé est l'adsorption sur charbon actif.

### ***I.1.4.3 Réduction de la pollution phosphorée : la déphosphatation***

Le principal inconvénient de la forte teneur en phosphore dans les eaux est de favoriser l'eutrophisation des cours d'eau, des lacs et des milieux marins.

**Eutrophisation:** *enrichissement excessif d'un milieu aquatique (notamment si les eaux sont stagnantes ou à circulation réduite) en éléments nutritifs ou en matières organiques, provoquant un développement surabondant de biomasse végétale dont la décomposition ultérieure consomme, en partie ou en totalité, l'oxygène dissous dans l'eau et réduit la biodiversité du milieu aquatique.*

Ainsi, la réduction des apports phosphorés des eaux usées est en général considérée comme le facteur clé de la lutte contre l'eutrophisation des rivières et des lacs.

Le phosphore présent dans les eaux peut avoir trois origines :

- les apports diffus d'origine agricole (élevage, engrais...),
- les apports industriels (industrie agro-alimentaire, industrie de pâte à papier...),
- les apports domestiques.

Les techniques de déphosphatation qui sont généralement appliquées font appel à des réactions de précipitation (procédés physico-chimiques) ou à des micro-organismes épurateurs qui assurent une sur-élimination du phosphore (procédés biologiques).

- 1) La déphosphatation chimique se fait grâce à l'utilisation de réactifs (tels que les sels de fer et d'aluminium ou la chaux) qui donnent naissance à des précipités ou complexes insolubles séparés de l'eau par des techniques de séparation solide-liquide.
- 2) La déphosphatation biologique repose sur un transfert de phosphore de la phase liquide (eaux usées à épurer) vers la phase solide (boues) par stockage intracellulaire. Cette accumulation conduit à la formation de granules de polyphosphates (poly-P) et entraîne un enrichissement progressif de la boue en phosphore jusqu'à des teneurs très importantes. Il est alors aisé d'assurer l'élimination du phosphore de l'eau par simple soutirage des boues en excès après une étape de décantation.

### ***I.1.4.4 Élimination des germes pathogènes : la désinfection***

Par définition, les eaux usées urbaines, parce qu'elles représentent les déchets de la vie individuelle et collective des agglomérations, contiennent des micro-organismes pathogènes susceptibles d'être à l'origine de maladies (bactéries, virus, parasites...). La désinfection a

pour but de détruire les micro-organismes pathogènes. Les différents procédés de désinfection susceptibles d'être mis en œuvre utilisent :

- Le chlore (à l'état gazeux ou sous forme d'hypochlorite de sodium : eau de Javel). Ce moyen de désinfection et de stérilisation est le plus utilisé et le mieux maîtrisé,
- le bioxyde de chlore ( $\text{ClO}_2$ ) qui est un réactif très performant mais dont la mise en œuvre est délicate et nécessite une surveillance importante,
- l'ozone : il est très performant et très efficace pour l'élimination des virus mais il est encore actuellement peu utilisé en raison du coût élevé de sa mise en œuvre,
- les rayons ultraviolets.

Parmi les différentes techniques de traitements tertiaires, la déphosphatation est celle qui est principalement utilisée dans la majorité des stations d'épuration.

## **I.2. Traitement des eaux usées par lagunage**

Dans les villes ou villages qui ne sont pas reliés au réseau urbain et pour lesquels l'installation d'une station est trop onéreuse, l'épuration se fait par la méthode du lagunage.

Le lagunage est surtout développé pour les communes de moins de 2000 équivalent-habitants. Ce procédé d'épuration des eaux usées consiste en un lent écoulement de l'eau dans un ou plusieurs réservoirs peu profonds (la profondeur des lagunes varie de 0,5 à 1,5 m) où prolifèrent des bactéries et autres organismes vivants au détriment des matières organiques et des sels minéraux contenus dans les eaux. L'apport d'oxygène se fait par échange avec l'atmosphère ou par photosynthèse des algues de surface. Le temps de séjour dans les réservoirs est élevé (3 à 30 jours voire plus) ce qui entraîne une diminution du nombre d'agents pathogènes (bactéries, virus, parasites...).

Ce processus d'épuration biologique permet l'élimination des matières organiques biodégradables avec production de sels minéraux, entraînant un phénomène d'eutrophisation (souligné par la production d'algues). Celui-ci est profitable au lagunage, car la photosynthèse des algues qui se forment fournit l'oxygène nécessaire au développement des bactéries qui vont dégrader cette matière organique selon les processus de fermentation aérobie. Le lagunage permet également l'élimination de la pollution microbienne, ce qui est un avantage par rapport aux autres techniques d'épuration. Les boues vont se concentrer sur le fond des

lagunes (bassins de terre), intervenir dans la biologie du système et ne devront pas être évacuées avant 5 ou 10 ans.

### **I.3. La filière de traitement des boues**

La quasi-totalité des procédés d'épuration des eaux usées urbaines ou industrielles, qu'ils soient biologiques ou physico-chimiques, conduit à la concentration des polluants sous forme de résidu secondaire : les boues. Les boues se présentent sous forme liquide (95% d'eau en moyenne) avec une forte charge en matière organique hautement fermentescible ainsi que des matières minérales. Ces caractéristiques sont problématiques quelle que soit la destination des boues et imposent la mise en place d'une filière de traitement.

Les procédés de traitement des boues peuvent varier suivant leurs natures et la taille de la station d'épuration. Trois grands types de traitement sont à distinguer :

- des traitements de stabilisation, dont l'objectif est de réduire le pouvoir fermentescible des boues afin de limiter ou d'annuler les nuisances olfactives,
- des traitements de réduction de la teneur en eau des boues, visant (i) à diminuer le volume de boues à stocker ou à épandre et/ou (ii) à améliorer leurs caractéristiques physiques (tenue en tas notamment),
- des traitements d'hygiénisation qui visent à éliminer la charge en micro-organismes pathogènes.

#### **I.3.1. La stabilisation des boues**

Les traitements utilisés sont de types biologiques, chimiques ou thermiques. Ils s'appliquent aux boues fraîches issues des traitements primaires, aux boues issues des traitements secondaires, ou à l'ensemble des boues.

- La stabilisation biologique réduit la teneur des boues en matières fermentescibles. Elle se fait soit par voie aérobie (en présence d'oxygène) dans les bassins d'aération ou dans des bassins de stabilisation aérobie, soit par voie anaérobie (absence d'oxygène) dans des digesteurs avec production de biogaz riche en méthane.
- La deuxième technique de stabilisation utilisée est le compostage qui est un procédé particulier de stabilisation biologique aérobie. Il se réalise de préférence sur

des boues déjà déshydratées de façon à économiser l'approvisionnement en support de compostage.

- La troisième voie possible est la stabilisation chimique qui bloque simplement l'activité biologique et donc l'évolution de la boue, par adjonction d'une quantité importante de chaux, élevant le pH au-delà de 12. Le chaulage suppose généralement une déshydratation préalable des boues.

### **I.3.2. Réduction de la teneur en eau des boues**

Pour réduire les volumes de boues, différents procédés sont mis en œuvre, comprenant par ordre croissant d'efficacité et de coût, l'épaississement, la déshydratation et le séchage.

- L'épaississement (figure I.5) vise à augmenter la siccité des boues (teneur en matière sèche) sans pour autant modifier le caractère liquide de la boue. Cet épaississement peut se faire simplement par voie gravitaire dans un concentrateur ou par des moyens mécaniques (égouttage, flottation ou centrifugation).



*Figure I.5. Épaississement des boues par flottation*

- La déshydratation qui correspond à une augmentation forte de siccité, modifie l'état physique des boues, celles-ci passant de l'état liquide à l'état pâteux ou solide. Il existe deux procédés principaux, le procédé filtre bande et le procédé filtre presse (figure I.6).

Pour le procédé filtre bande, les boues sont déversées entre deux bandes continues verticales de toiles synthétiques se déroulant entre deux rouleaux presseurs puis acheminées vers une aire de stockage. Pour le deuxième procédé, les boues sont injectées dans des filtres presses. Ces derniers sont pressés puis des «gâteaux de boues» sont démoulés et vont rejoindre l'aire de stockage.



Figure I.6. Déshydratation par filtre presse

- Le séchage élimine l'eau en grande partie ou en totalité par évaporation, soit par voie naturelle (lits de séchage), soit par voie thermique. La technique des lits de séchage se réalise à l'air libre sur des boues liquides et combine évaporation naturelle et drainage de l'eau libre à travers une couche filtrante de sable et de graviers. Le séchage thermique permet une élimination de la quasi-totalité de l'eau (siccité d'environ 95%). Les boues sont pulvérulentes ou en granulés.

### **I.3.3. Les traitements d'hygiénisation**

L'arrêté du 8 janvier 1998 sur l'épandage des boues d'épuration définit l'hygiénisation comme un "*traitement qui réduit à un niveau non détectable les agents pathogènes présents dans les boues*". La plupart des boues épandues en France ne sont pas hygiénisées, la maîtrise du risque sanitaire reposant de façon satisfaisante sur l'application de règles de bonnes pratiques.

## **II. DEVENIR DES BOUES ?**

En France, le volume annuel des boues résiduaires urbaines produit est estimé à 850000 tonnes de matières sèches soit près de 1 000 000 tonnes de produit brut. Cette production devrait atteindre 1 300 000 à 1 500 000 tonnes de matières sèches d'ici 2005 – 2010. Une telle augmentation est à mettre en relation avec l'application de la directive européenne du 20 mai 1991 sur le traitement des eaux usées, qui impose aux villes de plus de 2000 habitants le raccordement à une station d'épuration. Ainsi, le recyclage des boues, qui a

longtemps été considéré comme un aspect secondaire du traitement des eaux usées, révèle maintenant toute son importance.

## **II.1. Voies d'élimination couramment utilisées**

Il existe trois voies principales d'élimination de ces déchets (OTV, 1997).

### **II.1.1. L'incinération**

Elle représente 15% à 20% du tonnage des boues, mais induit de forts coûts pour les exploitants des stations d'épuration. Les déchets sont brûlés dans une chambre à très haute température (de préférence à 1200°C) avec une fourniture suffisante en oxygène pour oxyder tous les matériaux organiques. Elle peut ainsi détruire 99,9 % des déchets organiques (y compris les composés organiques chlorés) si elle est convenablement utilisée.

### **II.1.2. La mise en décharge**

Elle représente 20 à 25% du tonnage, mais était supposée disparaître en juillet 2002 et n'être réservée qu'aux déchets ultimes. Or les boues ne correspondent pas à des déchets ultimes puisqu'elles sont valorisables (source nutritive, énergie...). La loi du 15 juillet 1975 modifiée, ainsi que les directives sur les déchets, s'opposent donc, à court terme, à leur dépôt en centre d'enfouissement. L'échéance prévue de juillet 2002 ne pouvant être respectée dans l'ensemble des départements, ni dans les autres pays de la CEE, une directive européenne du 26 avril 1999 a planifié la réduction progressive de la mise en décharge des déchets municipaux biodégradables, dont les boues d'épuration, jusqu'en 2015.

### **II.1.3. L'épandage**

Il se fait sur terres agricoles et représente 55 à 65% du tonnage des boues. Il s'agit de la voie privilégiée pour le recyclage des boues d'épuration depuis 1975 en raison de l'intérêt agronomique de celles-ci. Cette pratique courante ne concerne pas que les boues d'épuration, mais plusieurs centaines de millions de tonnes ou de mètres cubes de matières diverses. Ces matières entretiennent la fertilité des sols quand elles sont correctement appliquées, diminuant

alors les besoins d'engrais commerciaux. En agriculture, les boues sont utilisées comme un engrais, c'est-à-dire comme produit capable de fournir aux cultures des éléments nutritifs nécessaires à leur croissance et à leur développement. Compte tenu des multiples procédés épuratoires utilisés dans les différentes stations, les boues sont susceptibles de présenter une diversité de composition selon le type de traitement utilisé, le type d'effluent entrant ou encore la taille de la station.

## **II.2. Voies "d'avenir" pour réduire le volume des boues**

Ces procédés dits «d'avenir» sont généralement de types thermochimiques et regroupent notamment la pyrolyse, la gazéification, l'oxydation par voie humide et la combustion.

### **II.2.1. La pyrolyse (ou thermolyse)**

Ce procédé repose sur la décomposition de la matière organique grâce à la chaleur (~ 500 à 900°C) en absence d'oxygène (Rumphorst & Ringel, 1994). Contrairement à l'incinération et à la gazéification, il n'y a pas de réaction d'oxydation (combustion) de la matière, mais seulement une décomposition de celle-ci, ce qui permet de réduire notablement le volume de fumées engendrées et de produire moins d'éléments volatils nuisibles. Cette décomposition thermique génère deux sous-produits dans des proportions qui varient avec les conditions opératoires du procédé et la composition du déchet à traiter :

- un résidu carboné, appelé «char», qui contient la matière minérale du déchet traité ainsi qu'une partie du carbone, appelé carbone fixe. Dans ce résidu vont se concentrer les métaux lourds (sauf le mercure et le cadmium). Ce résidu sera ensuite déposé en décharge ou utilisé comme remblai (Caballero *et al.*, 1997).
- un gaz de thermolyse, constitué d'une fraction condensable (vapeur d'eau et goudron volatil) et d'une fraction non condensable composée principalement de CH<sub>4</sub>, CO, H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. Ce gaz est combustible et permet de valoriser l'énergie contenue dans les boues.

## **II.2.2. La gazéification**

La gazéification se différencie de la pyrolyse par le fait que le carbone est totalement converti en gaz, à des températures pouvant aller de 800 à 2000°C, sans production de phases liquides ou solides, et seulement la genèse de cendres comme sous-produits. La gazéification est un procédé endothermique et nécessite donc un apport de chaleur important. Celui-ci est en général apporté par combustion partielle du matériau initial avec de l'air ou de l'oxygène.

## **II.2.3. L'oxydation par voie humide**

Ce procédé est apparu dès les années 60 aux USA, et est développé en France par la société *Degrémont et Granit Technologies* ainsi que par *OTV*. Il s'agit, comme pour l'incinération, d'une oxydation de la matière organique, mais réalisée en milieu liquide, avec de l'air ou de l'oxygène pur. Un résidu minéral est obtenu (30 à 50 % de la matière sèche entrante) ainsi que du CO<sub>2</sub> et un effluent qui est traité ultérieurement en station d'épuration. Le résidu solide quant à lui est éliminé en décharge.

## **II.3. Conclusion**

Pour l'instant, la valorisation agricole reste la voie privilégiée de recyclage des boues. En effet, celles-ci agissent comme un catalyseur de la biologie du sol et non pas seulement comme un engrais au sens strict du terme. C'est surtout en raison de leur richesse en carbone organique, en azote et en phosphore, que les boues sont potentiellement intéressantes pour améliorer les propriétés des sols (Piccolo *et al.*, 1992; Navas *et al.*, 1998).

Cependant, l'azote présent dans les boues se trouve principalement sous forme organique et n'est disponible pour la plante qu'après minéralisation de la matière organique. Le phosphore est un constituant cellulaire et un transporteur d'énergie important. Dans les boues il se trouve essentiellement sous forme inorganique et constitue dans le sol un «pool» lentement utilisable par la végétation. Etant donné les teneurs élevées en azote et en phosphore dans les boues, leur épandage constitue alors un apport essentiel de nutriments dans les sols.

Les amendements en matière organique vont donc améliorer l'ensemble des propriétés d'un sol, ainsi que sa fertilité, en induisant une diminution des besoins en engrais commerciaux. Même si la matière organique ne représente généralement que 5% d'un sol, elle est un constituant fondamental et va y jouer différents rôles :

- rétention des particules du sol afin de former des agrégats et améliorer sa structure,
- libération des éléments nutritifs par biodégradation, favorisant le développement des végétaux,
- amélioration de la rétention d'eau.

La matière organique se trouve sous différentes formes dans le sol :

- la matière vivante animale et végétale constituée de bactéries, champignons, vers de terre,
- la matière organique fraîche composée de débris végétaux (résidus de récoltes, racines, etc..) et animaux (déjections, amendements apportés),
- les produits transitoires qui vont évoluer de la matière organique fraîche à l'humus sous l'action de la matière organique vivante,
- les composés organiques stabilisés désignés sous le terme général d'humus.

L'humus correspond au stade ultime de l'évolution de la matière organique du sol avant minéralisation. Seuls les composés ligno-celulosiques conduisent à de l'humus stable. Ce dernier pourra se combiner aux argiles pour donner des complexes argilo-humiques dont le rôle est essentiel dans la stabilité structurale du sol et la fixation des éléments minéraux.

Les apports de boues d'épuration vont permettre d'accroître les sources en matière organiques dans le sol et donc enrichir ce dernier en carbone organique. Les composés organiques présents dans les boues vont permettre d'améliorer certaines propriétés du sol telle que la porosité ou la structure (Sommers, 1977; Pagliai & Vittori Antisari, 1993). Pour des sols particuliers (en conditions semi-arides), l'apport de boues augmente de façon importante les teneurs en matière organique, en azote, en carbone organique des sols, et améliore le niveau de la porosité et le taux d'humidité du sol (Navas *et al.*, 1998).

Cependant, l'utilisation des boues en agriculture soulève de plus en plus de débats passionnés en raison de leur origine et de la présence d'éléments indésirables tels que les micropolluants organiques, les éléments traces métalliques ou les éléments biologiques pathogènes. Les composés organiques des boues domestiques utilisées en agriculture sont soumis à une grande variété de processus physiques, chimiques et biologiques après épandage

et ils peuvent être volatilisés, immobilisés par adsorption ou transportés à travers la colonne du sol vers les eaux souterraines. Les composés organiques adsorbés peuvent être chimiquement ou photo-chimiquement dégradés, micro-biologiquement décomposés ou désorbés. (Webber & Lesage, 1989). Ainsi, l'épandage des boues d'épuration doit se faire de manière réfléchie, et les boues susceptibles d'être épandues sont donc soumises à des normes. Celles-ci portent essentiellement sur les teneurs en éléments traces métalliques et sur un nombre limité de composés organiques (essentiellement les hydrocarbures polycycliques aromatiques – HPAs- et les hydrocarbures polycycliques aromatiques halogénés de type polychlorobiphényles- PCBs).

### **III. REGLEMENTATIONS FRANÇAISES ET EUROPEENNES**

Ce travail porte sur la caractérisation de la fraction organique des boues de stations d'épuration, et nous a conduit à nous intéresser particulièrement à la législation concernant le contenu organique. Toutefois, les valeurs limites en éléments traces métalliques sont également présentées dans ce chapitre.

#### **III.1. Normes françaises**

Le décret du 8 décembre 1997 et son arrêté du 8 janvier 1998 (Journal Officiel de la République- *cf. texte complet présenté dans les annexes*), pris en application de la loi sur l'eau du 3 janvier 1992, viennent clarifier la réglementation française en matière d'épandage des boues issues du traitement des eaux usées urbaines. Ce décret spécifie que les boues doivent avoir fait l'objet d'un traitement de manière à réduire leur pouvoir fermentescible et les risques sanitaires liés à leur utilisation. De plus, le décret précise la valeur agronomique des boues, les teneurs en éléments traces, ainsi que les teneurs limites en micropolluants organiques admissibles. Les teneurs limites en éléments traces métalliques ont été fortement diminuées (divisées par deux) par rapport à l'ancienne réglementation de 1992. Les éléments traces suivis sont le cadmium, le chrome, le cuivre, le mercure, le nickel, le plomb et le zinc. La méthodologie utilisée pour le dosage des ces micropolluants métalliques est par ailleurs précisée. Les extractions doivent être réalisées à l'eau régale, puis le séchage doit être effectué aux micro-ondes ou à l'étuve. Les éléments sont ensuite dosés par spectrométrie d'absorption atomique, spectrométrie d'émission, ou encore par spectrométrie d'émission couplée à la

spectrométrie de masse ou à la spectrométrie de fluorescence. Le tableau I.2 résume les valeurs limites en éléments traces au-delà desquelles une boue ne peut pas être épandue :

<i>Eléments traces</i>	<i>Valeur limite dans les boues (mg/kg MS)</i>	<i>Flux maximum cumulé, apporté par les boues en 10 ans (g/m<sup>2</sup>)</i>
Cadmium	20 (*)	0,03 (**)
Chrome	1000	1,5
Cuivre	1000	1,5
Mercuré	10	0,015
Nickel	200	0,3
Plomb	800	1,5
Zinc	3000	4,5
Chrome + cuivre + nickel + zinc	4000	6

(\*) 15 mg/kg MS (matière sèche) à compter du 1<sup>er</sup> janvier 2001 et 10 mg/kg MS à compter du 1<sup>er</sup> janvier 2004

(\*\*) 0,015 g/m<sup>2</sup> à compter du 1<sup>er</sup> janvier 2001.

*Tableau I.2. Teneurs limites en éléments traces métalliques dans les boues d'épuration*

La norme s'appliquant aux micropolluants organiques présents dans les boues cible sept PCBs (hydrocarbures polycycliques aromatiques halogénés de type polychlorobiphényles) qui sont:

- le 2,4,4'-trichlorobiphényle (isomère n°28),
- le 2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle (n°52),
- le 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphényle (n°101),
- le 2,2',3,4,5,5'-hexachlorobiphényle (n°138),
- le 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphényl (n°153),
- le 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphényl (n°180),
- le décachlorobiphényle (n°209).

La norme porte également sur trois HPAs (hydrocarbures polycycliques aromatiques) qui sont le fluoranthène, le benzo(b)fluoranthène et le benzo(a)pyrène. Ces composés sont présents dans la fraction des boues d'épuration extractible aux solvants organiques.

Les modes d'extraction préconisés par la norme, sont soit une extraction à l'acétone de 5 g de matière sèche pour les HPAs, soit une extraction au mélange acétone/éther de pétrole de 20 g de matière sèche pour les PCBs. L'extrait obtenu est ensuite séché au sulfate de sodium et purifié à l'oxyde d'aluminium ou par passage sur résine XAD (dans le cas des HPAs) ou sur colonne de célite ou gel de «bio-beads» (pour les PCBs). Enfin, les fractions

obtenues sont concentrées afin d'être ensuite analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée soit à un spectromètre de masse pour la détection des HPAs, soit à un détecteur à capture d'électrons pour la détection des PCBs.

Les concentrations limites autorisées de ces différents composés sont résumées dans le tableau I.3.

	<i>Valeurs limites dans les boues (mg/kg MS)</i>		<i>Flux maximum cumulé apporté par les boues sur 10 ans (g/m<sup>2</sup>)</i>	
	Cas Général	Épandage sur pâturage	Cas Général	Épandage sur pâturage
Total des 7 PCBs	0,8	0,8	1,2	1,2
Fluoranthène	5	4	7,5	6
Benzo(b)fluoranthène	2,5	2,5	4	4
Benzo(a)pyrène	2	1,5	3	2

Tableau I.3. Teneurs limites en micropolluants organiques dans les boues

La valeur agronomique des boues est également à prendre en considération. Elle est évaluée grâce aux paramètres suivants:

- mesure de la matière sèche (en %) et de la matière organique (en %),
- mesure du pH,
- mesure de l'azote total et de l'azote ammoniacal,
- mesure du rapport C/N,
- mesure du phosphore total (en P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), du potassium total (en K<sub>2</sub>O), du calcium total (en CaO), du magnésium total (en MgO),
- mesure des oligo-éléments (B, Co, Cu, Fe, Mo, Zn).

### III.2. Normes européennes

Peu de pays ont mis en place des normes concernant la fraction organique des boues d'épuration. Parmi eux, l'Allemagne et la Suisse font figures de précurseurs.

En Allemagne, une ordonnance relative à l'utilisation des boues en agriculture existe depuis 1982 pour les teneurs en métaux lourds. Depuis 1992, elle prend en compte les teneurs en micropolluants organiques tels que les composés organohalogénés (AOXs), les furannes, les dioxines et sept PCBs (isomères n°28, 52, 101, 138, 153, 180, 209). Les AOXs sont des composés organohalogénés présents dans les eaux usées, adsorbables sur charbon actif. La mesure des AOXs donne simplement une indication de quantité et non de toxicité. Les valeurs données dans le tableau I.4 datent de 1997 et concernent les teneurs limites en éléments traces

métalliques et en micropolluants organiques dans les boues d'épuration en Allemagne (Leschber, 1992).

<i>Composés</i>	<i>Concentration maximale dans les boues (mg/kg MS)</i>
Cadmium	1,4
Chrome	46
Cuivre	274
Mercure	1
Nickel	23
Plomb	63
Zinc	809
AOXs	140-280
HPAs	0,1-0,6
PCBs	0,01-0,04
DEHP	20-60
PCDDs et PCDFs (en ng TE/ kg MS)	15-45

Tableau I.4. Teneurs limites en micropolluants organiques dans les boues épandues sur des terres agricoles ou maraîchères en Allemagne (Jauzein *et al.*, 1995).

En Suisse, en 1992, une ordonnance concernant les matières dangereuses pour l'environnement (et particulièrement les boues d'épuration) fournit les exigences concernant les métaux lourds et les micropolluants organiques présents dans les boues. Ainsi, la teneur en AOXs ne doit pas dépasser 500 mg/kg MS (matière sèche) dans les boues d'épuration valorisées en agriculture. Pour le DEHP (di-2-éthylhexyl-phtalate), la concentration maximale est de 60 mg/kg MS, pour les polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDDs) et les polychlorodibenzofurannes la concentration maximale est de 45 mg/kg MS (Jauzein *et al.*, 1995).

Un groupe de travail européen a été mis en place pour améliorer la situation actuelle de gestion des boues résiduelles de stations d'épuration. Ce groupe a publié en avril 2000 un document qui devrait être utilisé comme base pour la mise en place d'une norme européenne sur les valeurs limites en éléments traces métalliques et composés organiques acceptables dans les boues pour la valorisation agricole ("Document de travail sur les boues d'épuration-3<sup>ème</sup> projet"- *cf. texte complet en annexe*). De nouvelles limites sont proposées pour les métaux lourds. Le tableau I.5 résume les valeurs proposées par ce texte et les valeurs en vigueur par la directive 86/278 (4/07/1986) de la CEE relative à la protection de l'environnement et notamment des sols lors de l'utilisation des boues d'épuration.

<i>Elément</i>	<i>Valeurs limites (mg/kg MS)</i>	
	Directive 86/278/CEE	Valeurs proposées
Cd	20-40	10
Cr	-	1000
Cu	1000-1750	1000
Hg	16-25	10
Ni	300-400	300
Pb	750-1200	750
Zn	2500-4000	2500

Tableau I.5. Valeurs limites en éléments traces métalliques proposées par le groupe de travail sur les boues.

Concernant les micropolluants organiques ce texte s'intéresse aux teneurs limites en AOXs (composés organiques halogénés), LASs (linéaires alkylbenzènes sulfonates), DEHP (di-2-éthylhexyl-phtalate), NPEs (nonyphénols et nonylphénoléthoxylates avec un ou deux groupements éthoxy), HPAs (somme des neuf hydrocarbures polycycliques aromatiques suivants: l'acénaphène, le phénanthrène, le fluorène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo(b+j+k)fluoranthène, le benzo(a)pyrène, le benzo(ghi)perylène, l'indéno(1,2,3-c.d)pyrène), PCBs (isomères 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) et Dioxine (polychlorodibenzo-p-dioxines et polychlorodibenzofurannes). Le tableau I.6 résume<sup>7</sup> les teneurs limites de ces composés dans les boues pour leur épandage sur sols agricoles.

<i>Composés organiques</i>	<i>Teneurs limites dans les boues (mg/kg MS)</i>
AOXs	500
LASs	2600
DEHP	100
NPEs	50
HPAs	6
PCBs	0,8
PCDDs/Fs	100

Tableau I.6. Teneurs limites en composés organiques dans les boues d'après l' «European Union Draft on Sewage Sludge».

La valeur agronomique des boues est toujours prise en compte, avec le suivi des paramètres suivants :

- matière sèche et matière organique (%),
- pH,
- éléments nutritifs primaires : azote (sous forme d'azote total et de NH<sub>4</sub>-N), phosphore (P), potassium (K),
- éléments nutritifs secondaires : calcium (Ca), magnésium (Mg), soufre (S),
- oligo-éléments : bore (B), cobalt (Co), fer (Fe), manganèse (Mn), molybdène (Mo).

### III.3. Origine des principaux composés organiques suivis dans les normes

#### III.3.1. HPAs (hydrocarbures polycycliques aromatiques)

Les HPAs sont composés de deux à cinq noyaux aromatiques associés d'une façon compacte. Les composés habituellement ciblés sont : le naphthalène, l'acénaphène, le fluorène, le fluoranthène, le pyrène et le benzo(a)pyrène (figure I.7).

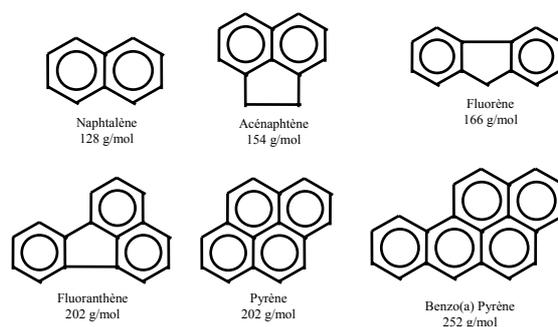


Figure I.7. Nom, poids moléculaire et structure des six Hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPAs) généralement ciblés.

Il y a trois sources possibles de HPAs dans les boues (Hoffman *et al.*, 1984; Jauzein *et al.*, 1995)

- les HPAs associés aux gaz d'échappement automobiles que l'on retrouve dans les eaux pluviales urbaines associés à ceux générés par l'usure des pneumatiques et ceux générés par l'asphalte, surtout à l'aval des zones de stationnement et axes de circulation,
- les HPAs générés par les unités thermiques industrielles, au niveau des fumées et qui, à cause des précipitations, se retrouvent de manière diffuse au niveau du sol et s'ajoutent aux précédents dans les eaux pluviales,
- et les HPAs associés à des déchets ou rejets de l'industrie que l'on retrouve anormalement dans les eaux usées (raccordements industriels).

Les HPAs peuvent se concentrer fortement dans les boues et sont faiblement dégradés par les processus biologiques du traitement des eaux. Les HPAs de bas poids moléculaire sont plus volatils et moins lipophiles que les HPAs de haut poids moléculaire. Ces propriétés physico-chimiques vont déterminer le comportement de ces composés dans les sols après

épandage des boues. Ainsi il apparaît que le transfert et la dégradation des HPAs de bas poids moléculaire soit plus rapide que ceux de haut poids moléculaire (Wild & Jones, 1995). Généralement plus le nombre de noyaux benzéniques est élevé plus le composé est résistant à la dégradation (Bossert & Bartha, 1986).

### III.3.2. PCBs (hydrocarbures polycycliques aromatiques halogénés de type polychlorobiphényles)

Ce sont des composés obtenus par chlorination des biphényles. Il y a à peu près 200 composés différenciés par leur niveau de chlorination. Les PCBs génèrent des PCDDs/Fs (polychlorodibenzo-p-dioxines / furannes) dans certaines conditions, quand ils sont brûlés par exemple. Il est également possible que les PCBs s'accumulent dans l'environnement. Dans les boues, les PCBs (figure I.8) proviennent majoritairement d'huiles transformées (Sulkowski & Rosinka, 1999). Ils ont également comme origine des produits de la vie quotidienne, comme le papier ou l'alimentation, mais aussi de vieux appareils électriques (Rahman *et al.*, 1998). Ce sont des composés très stables physiquement, chimiquement et biologiquement. Ils sont lipophiles et ont tendance à se concentrer dans les boues et donc dans le matériel organique des sols. Ils peuvent être potentiellement dangereux pour les organismes vivants en raison de la grande toxicité de certains congénères et de la possibilité d'accumulation dans les tissus adipeux (Sulkowski & Rosinka, 1999). Cependant, les PCBs peuvent être biodégradés sous des conditions aérobies et anaérobies (Rhee *et al.*, 1989, Gan & Berthouex, 1994). Le taux de dégradation diminue généralement quand le nombre de chlore substitué augmente (Rhee *et al.*, 1989; Gan & Berthouex, 1994). Les teneurs moyennes en PCBs dans les boues européennes varient entre 0 et 250 mg/kg MS.

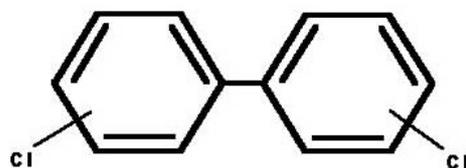


Figure I.8. Structure chimique des PCBs

### III.3.3. PCDDs/Fs (polychlorodibenzo-p-dioxines/ furannes)

Les dioxines et les furannes ne sont pas très différentes dans leurs structures (figure I.9). Ce sont des composés constitués de deux noyaux benzéniques chlorés liés par un cycle Dioxine (2 oxygènes) ou Furanne (1 oxygène). Comme pour les PCBs, il y a différents niveaux de chlorination, et il existe à peu près 200 congénères pour les PCDDs et les PCDFs. Les PCDDs/Fs sont générés durant la combustion de produits contenant de la matière organique et du chlore. Une des sources de dioxine et de furanne est l'incinération des déchets. Lorsqu'ils sont présents dans les boues, ces composés ont trois origines principales :

- comme sous-produits de l'industrie, ils peuvent apparaître dans les effluents industriels,
- ils sont présents dans l'environnement sous une forme diffuse et peuvent entrer dans le système de collecte des eaux après lessivage des routes,
- ils sont également présents dans les préparations commerciales d'insecticides.

Tout comme les PCBs, ils sont biologiquement, chimiquement et physiquement stables, et sont lipophiles. Ils ont tendance à se concentrer dans les boues et donc dans le matériel organique du sol. Les dioxines et les furannes, même en faibles concentrations, représentent des risques significatifs (Webber *et al.*, 1996). Dans les boues européennes, les valeurs moyennes mesurées en PCDD/Fs varient de 0,01 à 200 ng/ kg MS.

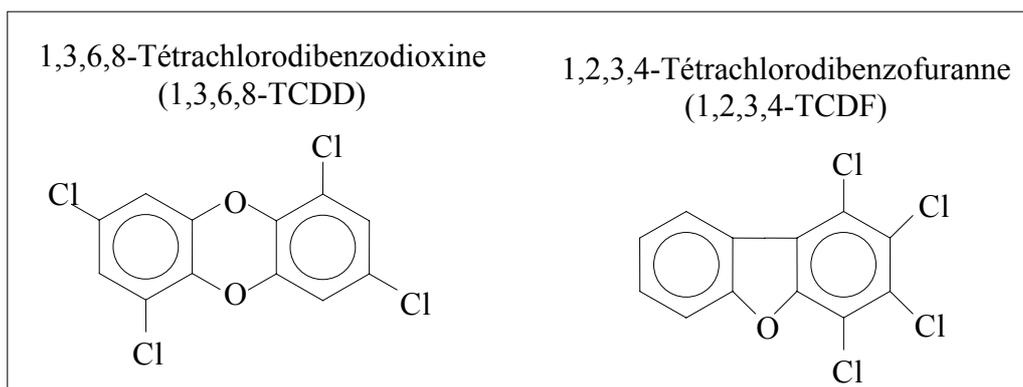


Figure I.9. Structure chimique de PCDD/Fs.

### III.3.4. DEHP (di-2-éthylhexylphtalate)

Le DEHP appartient à la famille des esters de phtalates, qui sont des esters de l'acide phtalique. Dans les boues d'épuration, de tels composés proviennent des effluents d'industrie du plastique, et de matériaux constitués de plastiques qui peuvent être transférés dans les eaux usées. Le DEHP semble s'accumuler dans le sol après application des boues, mais seulement si des grandes quantités de boues sont épandues. En raison de sa demi-vie très courte, à des doses normales, il est rapidement éliminé sous des conditions aérobies (Jauzein *et al.*, 1995; Dörfler *et al.*, 1996)

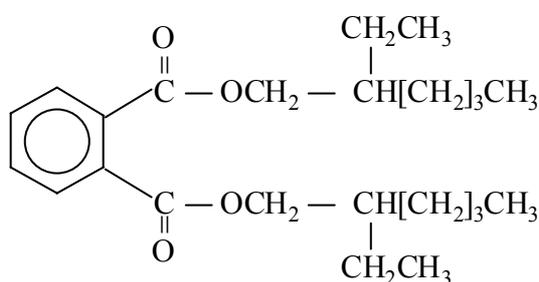


Figure I.10. Structure chimique du DEHP

### III.3.5. NPs/APEs (nonylphénol et alkyl phénoléthoxylates) et LASs (alkylbenzènes sulphonates linéaires)

Les APEs et les LASs sont utilisés dans la fabrication des détergents. Les nonylphénols se forment par transformation des nonylphénols ethoxylates durant la digestion des boues. La présence de ces composés dans les boues est due à l'utilisation domestique et industrielle de détergents. Globalement, les LASs sont rapidement biodégradés dans des conditions aérobies (Brunner *et al.*, 1988). Leur dégradation commence par celle de la chaîne alkyle, puis du groupement sulfonate et finalement du noyau benzénique (Perales *et al.*, 1999). Ainsi, elle produit des sulfites qui pourront être oxydés en sulfates dans l'environnement. Par contre les NPs et leurs précurseurs sont beaucoup moins biodégradables (Scott & Jones, 2000). Le tableau I.7 est une compilation des données sur la persistance des LASs et NP/NPEs dans les sols après épandage (Scott & Jones, 2000).

Type Echant.	Composés	Concentration dans le sol (mg/ kg) après application	Période de surveillance	Concentration finale dans le sol (mg/kg)	Demi-vie (jours)	Auteurs
Boue	LASs	22,4	6 mois 12mois	3,1 0,7		Prats et al. (1993)
		45	12 mois	5	9	Marcomini et al. (1989)
		16	6 mois 76 jours	0,19	68-117 13	Figge & Schöberl (1989)
		16	90 jours	0,3	26	Berna et al. (1989)
		2,6-66,4	5-6 mois	<1	7-22	Holt et al. (1995)
	LABs	0,3-9,5	55 jours	0-0,38	15	Holt & Bernstein (1992)
Surfactant	NPs	4,7		0,5		Litz et al. (1987)
	LASs		2 mois		5-25	
	LASs	27	106 jours	0,44	26	Knaebel et al. (1990)

Tableau I.7. Persistance des surfactants dans les sols après épandage (Scott & Jones, 2000).

### III.4. Autres composés organiques présents dans les boues d'épuration

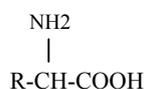
Les normes s'intéressent à un nombre réduit de composés organiques présents dans la fraction extractible des boues. Cependant, le contenu organique des boues ne peut pas se réduire à ces seuls polluants. Les boues sont en effet le produit final obtenu après extraction de l'eau épurée dans les stations d'épuration. Les eaux usées domestiques comprennent les eaux de ménage, qui proviennent des cuisines, des sanitaires, ainsi que toutes celles qui peuvent être accidentellement ou intentionnellement déversées dans les égouts. Sur le plan chimique, les eaux usées sont constituées de composés organiques et de composés inorganiques, ainsi que de gaz divers. Les composés organiques peuvent être formés d'hydrates de carbone, de protéines, de matières grasses, de surfactants, d'huiles, de pesticides, de phénols, etc. Quant aux composés inorganiques, ils peuvent comprendre des métaux lourds, de l'azote, du phosphore, des matières acido-basiques, du soufre, des chlorures, des matières toxiques, etc. Sur le plan biologique, les eaux usées contiennent divers micro-organismes tels que les bactéries, les champignons ainsi que des organismes pathogènes d'origine humaine. Dans les boues d'épuration on pourra retrouver une grande partie de ces composés soit sous forme libre (présents dans la fraction organique soluble), soit liés à la structure macromoléculaire des boues. Le but des paragraphes suivants est de décrire les principales familles de composés organiques, outre les micropolluants, susceptibles de s'accumuler dans les boues.

### III.4.1. Les composés azotés

#### III.4.1.1. Les protéines et leurs dérivés

Les protéines sont des constituants extrêmement importants des cellules vivantes, tant d'un point de vue quantitatif (elles représentent en général plus de la moitié du poids sec des cellules), que d'un point de vue qualitatif, avec par exemple le rôle biologique capital des enzymes, véritables catalyseurs biologiques indispensables au déroulement des réactions dans les cellules vivantes.

Les protéines sont formées par la condensation d'acides aminés. Ceux-ci sont constituées d'une dizaine à une cinquantaine d'atomes qui ont la particularité de porter à la fois un groupement acide (COOH) et un groupement amine (NH<sub>2</sub>). Il existe plusieurs types d'acides aminés, mais ceux rencontrés dans le monde vivant sont de type α-aminés, ce qui signifie que le groupement acide et le groupement amine sont portés par le même atome de carbone (Weil, 1994). La formule générale des acides aminés est (R= chaîne latérale de nature variable) :



Les 20 acides aminés standards sont constitués de chaînes latérales carbonées linéaires ou ramifiées (glycine, alanine, leucine, isoleucine), pouvant porter un groupe fonctionnel acide (acide aspartique, acide glutamique), alcool (sérine, thréonine), thiol (cystéine), thioether (méthionine), amide (asparagine, glutamine), amine (lysine), ou guanidine (arginine). La chaîne latérale peut également être cyclique : imidazole (histidine), phényl (phénylalanine), phénol (tyrosine), ou indole (tryptophane).

Lors de l'analyse par des techniques dégradatives comme la pyrolyse en présence de TMAH associée à la GC-MS (THM-GC-MS), les protéines vont produire comme fragments caractéristiques des alkyl-indoles, des alkyl-pyrroles, des alkyl-pyrridines et des nitriles aromatiques (Ishiwatari *et al.*, 1995). Les acides aminés vont donner des dérivés N,N-diméthyle-amino acides méthyle esters, excepté l'acide aspartique, qui subit une cyclisation secondaire au cours de la réaction avec le TMAH et se retrouve sous forme 1-méthyle-5-oxo-proline, méthyle ester (Zang *et al.*, 2000).

### III.4.1.2. Les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des macromolécules présentes dans toutes les cellules vivantes, soit libres, soit combinées à des protéines pour former des nucléoprotéines. Ces acides nucléiques ont une importance primordiale car ils sont soit le support de l'information génétique, soit les agents permettant l'expression de cette information. Ce sont des polymères constitués d'unités appelés nucléotides, eux-mêmes formés de trois constituants : base hétérocyclique azotée, pentose et acide phosphorique. Selon que le pentose est le désoxyribose ou le ribose, on distingue deux types d'acides nucléiques, les acides désoxyribonucléiques (ADN) trouvés principalement dans le noyau des cellules (animales ou végétales) au niveau des chromosomes, et les acides ribonucléiques (ARN) trouvés essentiellement dans le cytoplasme des cellules. Les bases azotées formant les nucléotides dérivent toutes de deux bases hétérocycliques : la purine et la pyrimidine. Les principales bases puriques sont l'adénine et la guanine et celles dérivant de la pyrimidine sont la cytosine et la thymine (figure I.11).

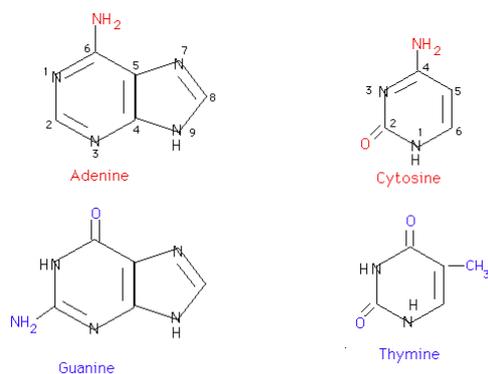


Figure I.11. Bases azotées puriques (adenine et guanine) et pyrimidiques (cytosine et thymine) des acides nucléiques

Ces bases sont présentes sous formes méthylées en raison de la réaction avec le TMAH en analyses THM-GC-MS, la cytosine et la guanine étant plus difficiles à détecter que l'adénine et la thymine (Voorhees *et al.*, 1997).

### III.4.2. Les lipides : acides gras, stérols

Les lipides sont une famille hétérogène de molécules organiques insolubles dans l'eau et les autres solvants polaires, mais solubles dans des solvants non polaires, tels le chloroforme ou l'éther. Les structures moléculaires des lipides sont très variées. Ils sont constitués de chaînes aliphatiques (chaîne formée de  $-CH_2$ ) d'au moins huit atomes de carbone. Seuls quelques acides gras à courte chaîne (comme l'acide butyrique en  $C_4$ ) font exception à cette règle. Les lipides regroupent des produits de condensation des acides gras (tels que les glycérides, les cérides) mais également d'autres molécules qui appartiennent à cette famille de par leurs propriétés physiques (hydrocarbures aliphatiques, aromatiques, stérols..). Ne seront développés dans ce paragraphe que les acides gras et les stérols.

#### III.4.2.1. Acides gras

Les acides gras sont les espèces chimiques dominantes des lipides des organismes vivants. Ce sont des acides carboxyliques possédant une chaîne hydrocarbonée de 10 à 40 atomes de carbone. Ils sont désignés par leur nombre d'atomes de carbone, suivi du signe «:» et de leur degré d'insaturation. Les principaux acides gras sont regroupés dans le tableau I.8. Le degré d'insaturation est suivi de la notation  $\omega x$  où  $x$  est la position de la double liaison par rapport au carbone aliphatique terminal. Les préfixes «a» et «i» indiquent que le substituant méthyle est en position *antéiso* (troisième carbone à partir du carbone aliphatique terminal) ou *iso* (deuxième carbone à partir du carbone aliphatique terminal) (Dignac, 1998).

La distribution des acides gras permet de relier ces composés à leur origine, même si souvent un acide gras donné peut avoir plusieurs origines. Par exemple, les distributions des acides gras des végétaux supérieurs ou des animaux sont dominées par ceux à nombre de carbone pair compris entre 12 et 24 atomes de carbone, avec une prédominance des chaînes  $C_{16}$  et  $C_{18}$  (Rao *et al.*, 1990). Les bactéries sont essentiellement constituées d'acides gras saturés ou mono-insaturés ainsi que d'acides gras au nombre de carbone impair (Tunlid & White, 1990). Les substitutions en position *iso*- ou *antéiso*- sont surtout présentes dans les distributions des acides gras d'origine bactérienne et notamment les bactéries Gram positives (Boon *et al.*, 1977; Eganhouse, 1982; Gillan & Hogg, 1984). Les résidus de cuisine riches en graisses animales et huiles végétales sont caractérisés par des distributions dominées par la présence de  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:1\omega 9}$  et  $C_{18:0}$  (Farrington & Quinn, 1973). Les fèces humaines sont quant

à elles dominées par la présence de C<sub>16:0</sub> et C<sub>18:1 $\omega$ 9</sub>. Tous ces acides gras sont susceptibles de se retrouver dans les boues d'épuration en raison de la nature variée des effluents traités.

<i>Symbole</i>	<i>Formule</i>	<i>Nom systématique</i>	<i>Nom usuel</i>
C <sub>12:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	Acide dodécanoïque	acide laurique
C <sub>13:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> COOH	Acide tridécanoïque	
C <sub>14:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH	Acide tétradécanoïque	acide myristique
C <sub>15:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> COOH	acide pentadécanoïque	
C <sub>16:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	acide hexadécanoïque	acide palmitique
C <sub>16:1<math>\omega</math>7</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	acide 9 hexadécénoïque	acide palmitoléique
C <sub>17:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> COOH	acide heptadécanoïque	acide margarique
C <sub>18:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH	acide octadécanoïque	acide stéarique
C <sub>18:1<math>\omega</math>9</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	acide 9 octadécénoïque	acide oléique
C <sub>19:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> COOH	acide nonadécanoïque	
C <sub>20:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> COOH	acide eicosanoïque	acide arachidique
C <sub>21:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>19</sub> COOH	acide heneicosanoïque	
C <sub>22:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>20</sub> COOH	acide docosanoïque	acide behénique
C <sub>23:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>21</sub> COOH	acide tricosanoïque	
C <sub>24:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>22</sub> COOH	acide tétracosanoïque	acide lignocérique
C <sub>25:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>23</sub> COOH	acide pentacosanoïque	

Tableau I.8. Noms, symboliques et formules des principaux acides gras

### III.4.2.2. Les stérols

Les stérols sont des composés dérivant d'un noyau polycyclique, appelé noyau du cyclopentanophénanthrène. Les stérols se retrouvent dans pratiquement toutes les cellules eucaryotes. Parmi eux, le cholestérol est le principal stérol des vertébrés ; l'ergostérol est un précurseur naturel de la vitamine D ; le stigmastérol et le sitostérol sont des constituants importants des végétaux (Weil, 1994).

Les profils des stérols des excréments de différents animaux permettent de mettre en évidence des différences de composition selon le régime alimentaire de ces animaux (carnivores, herbivores, omnivores) (Leeming *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1982). De plus, des bactéries anaérobies présentes dans l'appareil digestif des animaux supérieurs transforment les stérols en stanols avec des configurations isomériques caractéristiques de l'espèce animale (Martin *et al.*, 1973). Ainsi, un des stérols caractéristiques des fèces humaines est le coprostanol (5 $\beta$ -cholestan-3 $\beta$ -ol) qui se forme à partir du cholestérol par une hydrogénation bactérienne dans le petit intestin (Walker *et al.*, 1982) (figure I.12). Deux stéréo-isomères du coprostanol peuvent également se retrouver dans les fèces, ce sont le cholestanol (ou dihydrocholestérol ou 5 $\alpha$ -cholest-3 $\beta$ -ol) et l'épicoprostanol (5 $\beta$ -cholestan-3 $\alpha$ -ol). Du cholestérol est également présent, mais ce composé est ubiquiste (présents dans les bactéries,

les algues, le zooplancton) (Takada & Eganhouse, 1998) et ne peut par conséquent pas être utilisé comme marqueur des fèces humaines.

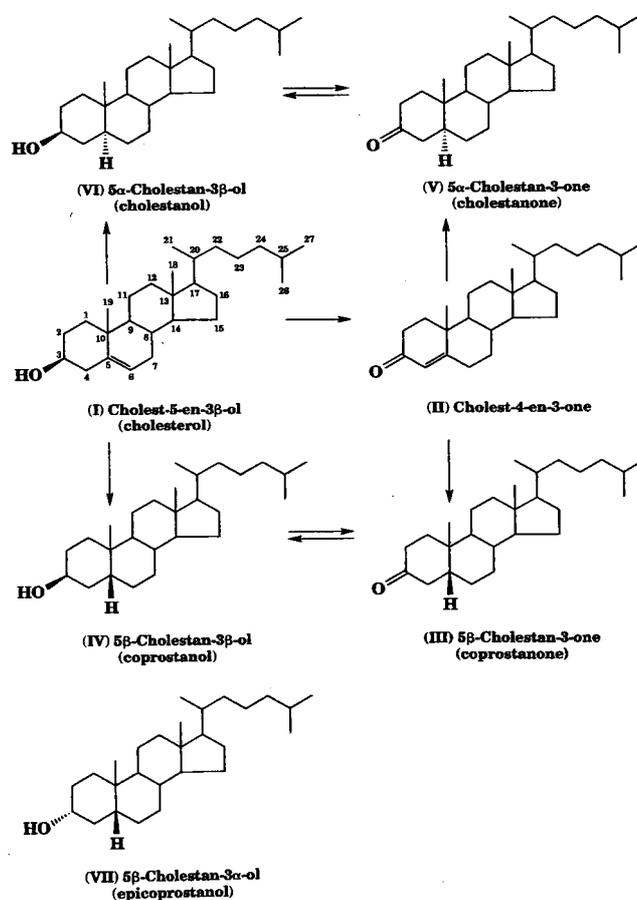


Figure I.12. Formation du coprostanol et des stérols dérivés d'après Takada & Eganhouse (1998)

### III.4.3. Composés dérivés de la lignine

La lignine est le principal constituant des végétaux vascularisés. Elle représente de l'ordre de 20 à 30 % du carbone de la biomasse végétale ; c'est, après la cellulose, le deuxième composé organique de la biosphère et une ressource naturelle renouvelable et abondante. Elle contribue au port vertical des végétaux malgré la gravité ou l'action du vent et à l'alimentation en eau et en sels minéraux des différents organes de la plante. Peu sensible à la dégradation biologique, la lignine crée une barrière morphologique à la pénétration et à la progression des agents pathogènes, et contribue à la protection naturelle des végétaux contre certaines attaques parasitaires. Les composés de la lignine résultent de la polymérisation oxydative de trois alcools phénoliques : l'alcool coniférylique, l'alcool sinapylique et l'alcool p-coumarylique. (figure I.13)

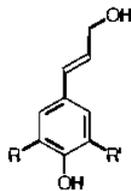


Figure I.13. Précurseur de la lignine : alcool *p*-coumarylique si  $R=R'=H$ , alcool coniférylique si  $R=H$  et  $R'=OCH_3$ , alcool sinapylique si  $R=R'=OCH_3$

La biosynthèse de ces alcools s'effectue en une série d'étapes initiées par les enzymes. Les copolymères obtenus contiennent donc des unités de base parahydroxyphényles, (*p*-coumaryles) guaiacyles (vanillyles) et syringyles. La proportion des unités monomères dépend de l'espèce végétale considérée, de l'âge de la plante et de la nature des tissus végétaux (saine ou altérée). En général, les unités guaiacyles (vanillyles) et syringyles sont prédominantes dans les lignines d'arbres feuillus (angiospermes) et en particulier dans les bois durs, les unités syringyle dominant dans les bois tendres et les unités guaiacyles (vanillyle) chez les résineux (gymnospermes). Les végétaux herbacés contiennent les trois types d'unités (Flaig *et al.*, 1975), et les deux principaux composés présents en THM-GC-MS pour déterminer la présence de végétaux herbacés sont l'acide *p*-coumarique (3-(4-méthoxyphényle)-2-propénoïque acide, méthyle ester) et l'acide ferrulique (3-(3,4-diméthoxyphényle)-2-propénoïque acide, méthyle ester) (Hedges & Mann, 1979; Morrison & Mulder, 1994).

L'utilisation de la THM-GC-MS pour analyser les résidus solides va induire des réactions de chimiolyse dans les unités ligneuses (Challinor, 1995). Les principaux produits formés sont les méthoxy, diméthoxy et triméthoxy benzènes liés à des unités aldéhydes, carboxyliques ou méthyle esters (Challinor, 1995; Clifford *et al.*, 1995). Tous ces produits dérivent de réactions de chimiolyse des unités méthoxyphénoliques de la lignine associées par des liaisons  $\beta$ -O-4 primaires (Mulder *et al.*, 1992; Hatcher *et al.*, 1995). Certains des produits obtenus (aldéhydes, cétones et dérivés des unités cinnamyles) peuvent être présents dans les échantillons bruts comme composants phénoliques «libres» et sont méthylés lors des réactions avec le TMAH. D'autres composés (tels que les dérivés vinyle, méthoxyvinyle, méthoxyallyle ou triméthoxypropyle) sont peu susceptibles d'exister sous la forme de phénols «libres» et donc dériveraient de la rupture des liaisons éthers  $\beta$ -O-4. Les phénols «libres» sont très susceptibles d'être éliminés lors de l'extraction. Clifford *et al.* (1995) ont montré que les pyrogrammes de bois préalablement extraits obtenus par THM-GC-MS sont identiques à ceux des échantillons bruts. Donc, la contribution des phénols libres est considérée comme

négligeable et les produits obtenus après dérivatisation avec le TMAH sont plutôt susceptibles de provenir de la thermochimioolyse des liaisons  $\beta$ -O-4 primaires (Clifford *et al.*, 1995). Ainsi les composés obtenus par THM-GC-MS peuvent être considérés comme des dérivés des composés ligneux présents dans l'échantillon initial. Les principaux composés dérivés de la lignine retrouvés en THM-GC-MS sont répertoriés dans le tableau I.9.

Structure	Nom
<b>Structure p-coumaryle</b>	4-méthoxybenzaldéhyde (=aubépine)
	4-méthoxy-acetophenone
	Acide 4-méthoxyabenzoïque, méthyle ester
	2-méthoxyprop-1-ène- <i>trans</i> -1-(4-méthoxyphényle)
	Acide 4-méthoxy- benzènepropanoïque, méthyle ester
	Acide 3-(4-méthoxyphényle)- <i>cis</i> -3-propenoïque, méthyle ester
	Acide 3-(4-méthoxyphényle)- <i>trans</i> -3-propenoïque, méthyle ester
<b>Structure guaiacyle</b>	2-propanone-1-(4-méthoxyphényl)
	2-méthoxyphénol
	1,2-diméthoxybenzène
	3,4-diméthoxytoluène
	3,4-diméthoxystyrène (3,4-diméthoxy éthenyl benzène)
	3,4-diméthoxybenzaldéhyde (=vanilline méthyle ether)
	benzoïque acide, 3,4-diméthoxy, méthyle ester
	<i>cis</i> -1-(3,4-diméthoxyphényle)-2-méthoxyéthylène
	2-méthoxyéthylène- <i>trans</i> -1-(3,4-diméthoxyphényle)
	Acide 3-(3,4-diméthoxyphényle)-3-propanoïque, méthyle ester
	3-méthoxyprop-1-ène- <i>trans</i> -1-(3,4-diméthoxyphényle)
	threo/erythro 1-(3,4diméthoxyphényle)-1,2,4-triméthoxypropane
	1,3-diméthoxyprop-1-ène- <i>cis</i> -1-(3,4-diméthoxyphényle)-
	3(3,4-diméthoxyphényle)- <i>cis</i> -3-propenoïque acide, méthyle ester
	3(3,4-diméthoxyphényle)- <i>trans</i> -3-propenoïque acide, méthyle ester
	1,3-diméthoxyprop-1-ène- <i>trans</i> -1-(3,4-diméthoxyphényle)
	3,4-diméthoxybenzèneméthanol méthyle éther
	1-(3,4-diméthoxyphényle)-1-propène
	1-(3,4-diméthoxyphényle)-2-propanone
	1-(3,4-diméthoxyphényle)-2-méthoxypropane
3,4-diméthoxybenzèneacetic acide, méthyle ester	
<b>Structure syringyle</b>	3,4-diméthoxyphénol
	1,2,3-triméthoxybenzène
	3,4,5-triméthoxytoluène
	3,4,5-triméthoxy-benzaldéhyde
	3,4,5-triméthoxybenzoïque acide, méthyle ester
	2-méthoxyéthylène- <i>cis</i> -1-(3,4,5-triméthoxyphényle)
	2-méthoxyéthylène- <i>trans</i> -1-(3,4,5-triméthoxyphényle)
	3-méthoxyprop-1-ène- <i>cis</i> -1-(3,4,5-triméthoxyphényle)
	méthoxyprop-1-ène- <i>cis</i> -1(3,4,5-triméthoxyphényle)
	Acide 3-(3,4,5-triméthoxyphényle)-propanoïque, méthyle ester
	3-méthoxyprop-1-ène- <i>trans</i> -1-(3,4,5-triméthoxyphényle)
	threo/erythro 1-(3,4,5-triméthoxyphényle)-1,2,3-triméthoxypropane
	1,3-diméthoxyprop-1-ene- <i>cis</i> -1(3,4,5-triméthoxyphényle)
	2-propanone-1-(3,4,5-triméthoxyphényle)-
	3,4,5-triméthoxybenzèneacideetic acide, méthyle ester

Tableau I.9. Principaux composés dérivés de la lignine retrouvés en THM-GC-MS d'après Clifford *et al* (1995).

### III.4.4. LABs

Les LABs sont utilisés pour la synthèse des LASs (Linear Alkylbenzenesulfonates), les surfactants anioniques les plus utilisés dans le monde (Takada & Eganhouse, 1998). Les LASs sont apparus dans les années 60 comme substituants aux surfactants moins biodégradables qu'étaient les alkylbenzènesulfonates (ABS) (Jensen, 1999) (figure I.14a). La réaction de formation des LASs peut être incomplète et ne pas consommer la quantité initiale de LABs. Ainsi, les détergents manufacturés peuvent contenir en plus des LASs, une certaine quantité de LABs. Cette quantité varie de 20 à 800  $\mu\text{g/g}$  (Eganhouse *et al.*, 1983; Takada & Ishiwatari, 1987). Les LABs ont pour formule chimique globale  $n\text{-C}_m$  où  $m$  est le nombre d'atomes de carbone de la chaîne alkyle et  $n$  la position du groupement phényle sur cette chaîne. Les isomères dont le noyau benzénique est positionné près de la fin de la chaîne alkyle sont référencés comme isomères externes ( $n = 2\text{-}, 3\text{-}$  et  $4\text{-}$ ) tandis que ceux dont le noyau benzénique est positionné au milieu de la chaîne alkyle sont appelés isomères internes ( $n = 5\text{-}, 6\text{-}, 7\text{-}$ ) (Ishiwatari *et al.*, 1983) (figure I.14b)

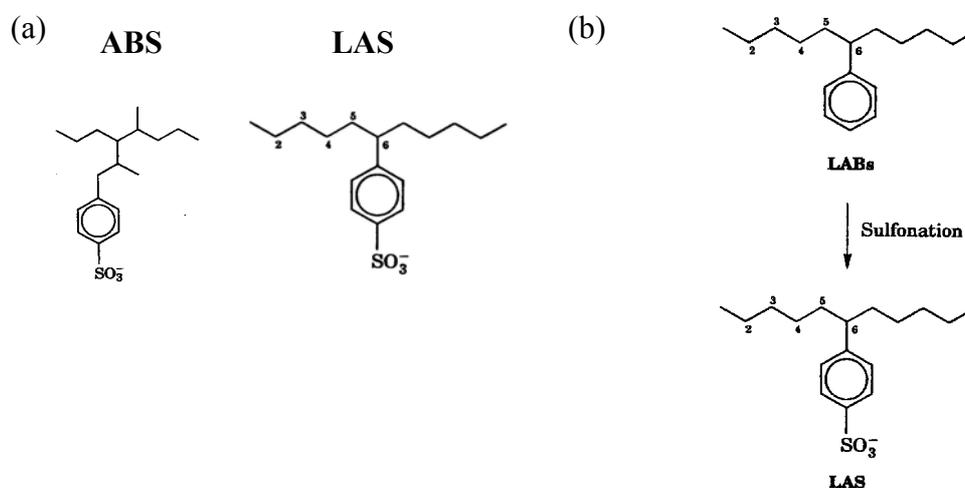


Figure I.14. (a). Structures des ABS et LAS et (b). Formation des LASs à partir des LABs

#### **IV. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DES METHODES DE CARACTERISATION DU CONTENU ORGANIQUE DES BOUES D'EPURATION**

Comme nous l'avons vu précédemment, le contenu organique des boues ne peut pas se réduire aux seuls micropolluants dosés dans les normes. Les composés organiques présents dans les boues correspondent à un mélange complexe d'éléments digérés résistants à la décomposition aérobie, de cellules microbiennes mortes et vivantes, et de composés synthétisés par les micro-organismes durant le processus de digestion. La matière organique des boues peut être divisée en deux grandes fractions ; (i) la matière organique extractible par les solvants organiques, et (ii) la matière organique macromoléculaire non extractible par les solvants organiques. La matière organique extractible contient les micropolluants qui sont habituellement dosés dans les normes et qui ne représentent qu'une petite fraction (quelques  $\mu\text{g} / \text{g}$  de matière sèche) du contenu organique des boues (figure.I.15), alors que la fraction macromoléculaire est celle qui est la plus importante en termes de poids (plusieurs  $\text{mg/g}$  de matière sèche). Cependant, de par sa complexité, l'analyse de cette fraction est rendue difficile.

La caractérisation du contenu organique des boues d'épuration répond généralement à trois préoccupations principales :

- la majorité des boues est éliminée par l'épandage agricole qui est soumis à des normes, entre autres sur les micropolluants organiques. Il est donc important de suivre et quantifier ces micropolluants afin de s'assurer de leur innocuité.
- D'autre part, la détermination de la valeur agronomique de ce type d'amendement organique est également à suivre afin de justifier l'utilisation des boues pour l'épandage d'un point de vue pédologique. Dans cette optique, ce sont essentiellement les substances humiques des boues qui sont étudiées et comparées à celles de différents sols.
- La nécessité d'obtenir une eau de très bonne qualité en sortie de station d'épuration nécessite de s'intéresser également à l'amélioration des techniques d'épuration et aux influences de la fraction organique sur les processus de traitement des eaux usées.

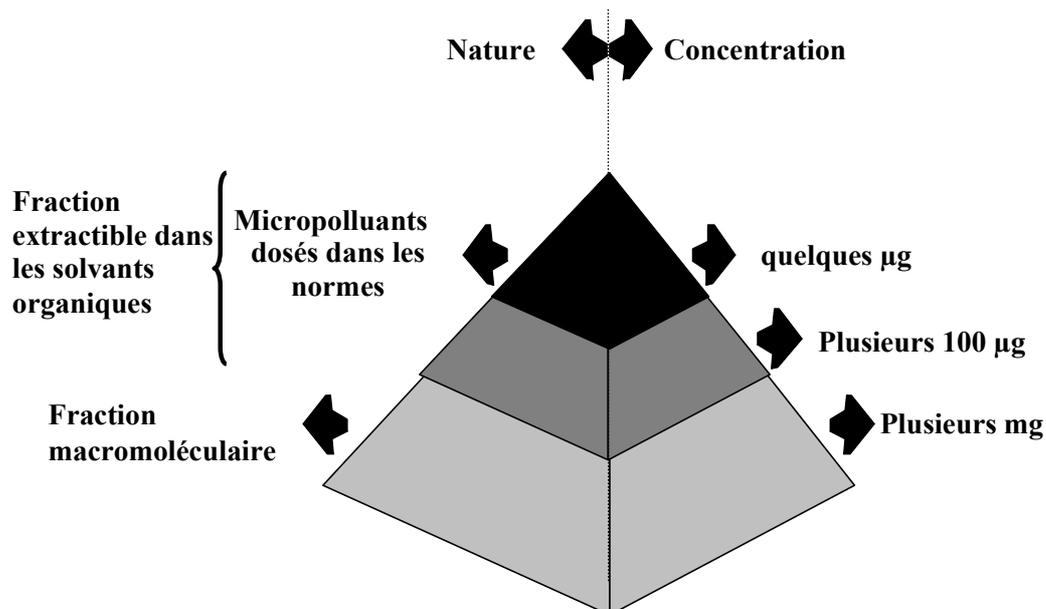


Figure I.15. Répartition des différentes fractions de la matière organique (adapté de Bersillon et al, 1999)

Les paragraphes suivants synthétisent les différentes méthodes d'extraction, de fractionnement et d'analyse existantes destinées à la caractérisation du contenu organique extractible (micropolluants ou composés particuliers), mais aussi à l'étude des substances humiques et des exopolymères dont la connaissance permet d'appréhender leur influence sur les processus de traitement des boues (Dignac, 1998).

#### **IV.1. Analyse des composés organiques présents dans la fraction extractible par les solvants organiques**

La fraction extractible par les solvants organiques est la fraction la plus souvent analysée car elle permet de faire l'inventaire des différents composés organiques présents, de les quantifier et d'évaluer leur toxicité. Il est alors possible d'identifier les composés organiques qui ont une incidence sur l'environnement et de déterminer leurs valeurs limites acceptables dans les boues. Les composés organiques les plus souvent ciblés sont les HPA et les PCBs. Nous évoquerons aussi quelques composés qui sont parfois étudiés tels que les LABs et les stéroïdes. Afin d'analyser cette fraction, il faut au préalable réaliser une extraction, c'est à dire séparer la fraction organique soluble de celle qui est insoluble dans les solvants organiques. Plusieurs méthodes sont proposées en fonction des composés ciblés.

## IV.1.1. Méthodes d'extraction et pré-traitements

### IV.1.1.1. Pré-traitements

Après échantillonnage, les boues doivent subir des pré-traitements car elles se présentent souvent sous forme pâteuse à liquide (siccité de 20 à 40%). Deux types principaux de pré-traitements existent :

- La centrifugation d'une à deux heures à 3000 tours/minute permet d'éliminer le surnageant (Wang & Jones, 1991; Rogers, 1996). Le culot est ensuite séché soit par voie chimique par ajout de sulfate de sodium anhydre ou par séchage à l'air, avant d'être extrait.

- La lyophilisation qui utilise le principe de la sublimation, permet de déshydrater les boues afin de les stabiliser et ainsi de faciliter leur conservation (Wang & Jones, 1991). Elle se fait en plusieurs étapes :

- 1) congélation des boues pour que l'eau qu'elles contiennent se transforme en glace,
- 2) sous l'effet du vide, la glace est sublimée en vapeur d'eau,
- 3) la vapeur d'eau est récupérée par condensation dans un piège à très basse température (généralement à -55°C),
- 4) récupération des boues lyophilisées qui sont prêtes pour l'extraction.

Le tableau I.10 présente un comparatif de quatre méthodes de séchage des boues avant extraction des chlorobenzènes (Wang & Jones, 1991):

	<i>Centrifugation et séchage par sulfate de sodium anhydre</i>	<i>Centrifugation et séchage à l'air</i>	<i>Centrifugation et lyophilisation</i>	<i>Lyophilisation</i>
Concentration en chlorobenzènes µg/kg	1650	926	1150	1650

Tableau I.10. Comparaison de pré-traitements pour l'analyse des chlorobenzènes

La centrifugation suivie d'un séchage chimique et la lyophilisation apparaissent comme les pré-traitements les plus efficaces pour le recouvrement des chlorobenzènes.

### IV.1.1.2. Extractions

#### IV.1.1.2.1. Extraction au Soxhlet

Une des méthodes d'extraction les plus utilisées est l'extraction au Soxhlet. Elle est particulièrement adaptée pour les échantillons qui présentent de faibles rendements d'extraction car elle permet d'extraire de grandes quantités d'échantillon. L'échantillon est introduit dans un filtre et le tout est placé dans le réservoir du Soxhlet (figure I.16). Le solvant est placé dans le ballon sous-jacent et chauffé jusqu'à sa température d'ébullition. Après évaporation, le solvant se condense sur le réfrigérant en verre et tombe dans le réservoir. Lorsque ce dernier est plein, le solvant se déverse dans le ballon, et un nouveau cycle recommence. Les durées d'extraction varient de 1 à 24h, la quantité d'échantillon de 1g à 50g, le type et la quantité de solvant varient de 150 à 300 ml en fonction des auteurs. Les solvants les plus utilisés sont le dichlorométhane, le chloroforme, le toluène, l'hexane, le mélange hexane/acétone ou le méthanol.

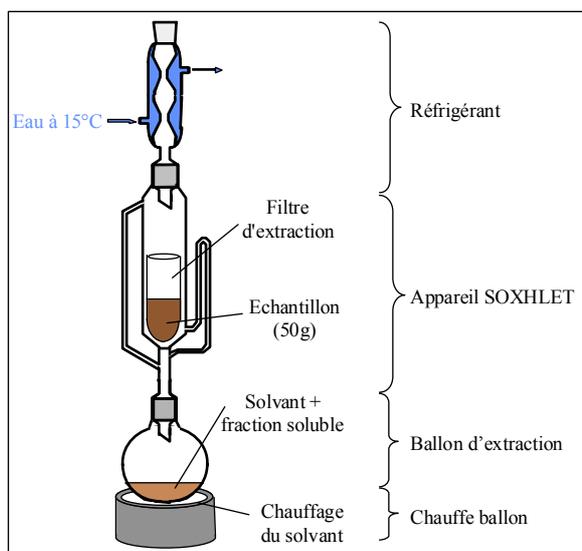


Figure I.16. Schéma de l'appareillage d'extraction au Soxhlet

#### IV.1.1.2.2. Extraction au Soxhlet + saponification

Dans un premier temps, la méthode d'extraction est la même que celle décrite précédemment, puis une fois l'extrait récupéré et après évaporation de la plus grande partie du solvant, l'extrait est mélangé avec de l'hydroxyde de potassium méthanolique qui est un agent de saponification. Le mélange est mis en reflux pendant quelques heures dans un bain-marie.

Après refroidissement, le mélange est placé dans une ampoule à décanter, et une extraction liquide-liquide est effectuée par ajout de solvant. Après décantation, l'extrait est récupéré et l'opération est renouvelée plusieurs fois. La saponification améliorerait d'après Mangas *et al.*, (1998) l'efficacité d'extraction pour l'analyse de certains composés organiques tels que les HPAs.

#### IV.1.1.2.3. Extraction par agitation au ballon

Pour les échantillons plus riches en matière organique, une extraction au ballon est généralement préférée. L'échantillon est extrait au solvant à chaud pendant 1 à 7 h sous agitation magnétique. Un réfrigérant vertical permet d'obtenir un reflux total et évite ainsi l'évaporation du solvant (figure I.17). Après ce laps de temps, l'extrait organique et le résidu solide sont séparés par filtration.

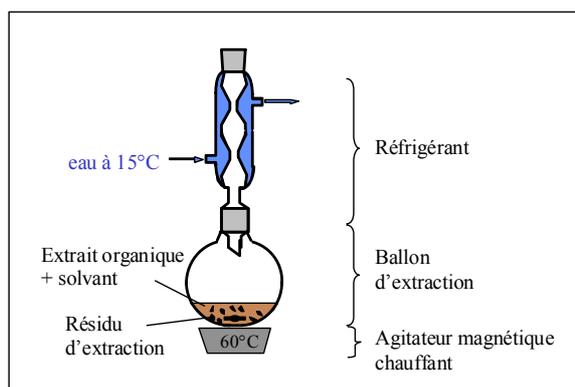


Figure I.17. Schéma de l'appareillage d'extraction au ballon.

#### IV.1.1.2.4. Extraction liquide-liquide

Ce type d'extraction se fait sur les échantillons liquides et ne nécessite pas de pré-traitement particulier. L'extraction liquide-liquide consiste en une extraction par agitation en ampoule à décanter avec du solvant renouvelé plusieurs fois. Les solvants utilisés sont divers et vont dépendre de la nature des produits recherchés, du pH de la solution et de la température, mais aussi des auteurs. Le dichlorométhane et l'hexane sont ceux qui sont les plus utilisés (Sauvegrain, 1981a; Sauvegrain, 1981b).

#### IV.1.2. Méthodes de fractionnement

Une fois l'extraction effectuée, les extraits organiques sont reconcentrés puis séchés. La séparation en différentes familles se fait le plus souvent par chromatographie liquide sur microcolonne remplie de substrat actif en utilisant des solvants de polarités croissantes pour éluier les composés en fonction de leur polarité. Les substrats utilisés vont également varier en fonction des composés ciblés, les plus souvent utilisés étant la silice ou l'alumine activées ou désactivées et le silicate de magnésium (appelé Florisil). Ces méthodes de fractionnement sont surtout utilisées pour analyser les micropolluants organiques tels que HPA et PCBs, qui seront élués avec des solvants différents.

La séparation peut également se faire par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP). Cette technique permet de séparer les composés peu volatils, mais solubles dans des solvants organiques, par élution à l'aide d'un liquide vecteur (mélange d'eau et de solvants organiques en général) au travers d'une colonne contenant une phase adsorbante stationnaire. L'intérêt de cette technique est que la colonne va être soumise à des hautes pressions, entraînant une meilleure séparation des constituants. Les composés analysés sont détectés en sortie de colonne par des détecteurs plus ou moins spécifiques et de sensibilités différentes (Synovec & Yeung, 1986):

- détecteurs électrochimiques (sensibilité 10 pg-1 ng) : les composés vont être ionisés pour être détectés. Les micropolluants organiques vont être séparés par dissociation acido-basique et détectés souvent avec des interférences,
- détecteur d'absorption UV-visibles (sensibilité 100 pg-1 ng) : tous les composés absorbant dans l'UV ou le visible sont détectés, donc une grande partie des composés organiques aromatiques va être détectée. Ce type de détecteur permet la détection d'un grand nombre de composés, ce qui réduit sa spécificité.
- détecteur de spectrométrie de fluorescence (sensibilité 1-10 pg) : la plupart des composés sont détectés avec une grande sensibilité et sélectivité par excitation à une longueur d'onde particulière et par mesure de l'émission spécifique du composé à une autre longueur d'onde.

### IV.1.3. Analyses chromatographiques

Après séchage par voie chimique (ajout de sulfate de sodium anhydre) ou sous flux de gaz inerte, les différentes fractions sont analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à différents détecteurs. La chromatographie en phase gazeuse (GC) permet de séparer des composés relativement volatils par élution à l'aide d'un gaz vecteur (le plus souvent l'hélium) au travers d'une colonne capillaire contenant une phase adsorbante stationnaire. Les colonnes capillaires de moins de 975  $\mu\text{m}$  de diamètre permettent une très bonne séparation des composés. L'association de cette méthode séparative avec un détecteur en fait une méthode analytique de tout premier plan pour identifier et quantifier les différents composés présents dans les échantillons. Les principaux détecteurs peuvent être séparés en trois grandes familles :

- Les détecteurs universels : ils sont sensibles à tous les composés élués, excepté le gaz vecteur, et sont donc bien adaptés à l'analyse d'échantillons dont la composition n'est à priori pas connue. Cependant, pour obtenir des informations qualitatives sur les composés élués, il est nécessaire de comparer les temps de rétention avec ceux du chromatogramme de produits connus (étalons). Il s'agit des détecteurs les plus répandus. Parmi eux, se trouvent le détecteur à ionisation de flamme (FID) et le détecteur à conductivité thermique (TCD). Leur avantage est qu'ils permettent d'obtenir à une quantification aisée après calibrage.
- Les détecteurs spécifiques : ils ne sont sensibles qu'à certaines catégories de composés. Les plus courants sont le détecteur à photométrie de flamme (FPD), sensible aux composés soufrés ou phosphorés, ou le détecteur à capture d'électrons (ECD). Ce dernier est un détecteur spécifique très sensible aux molécules contenant des groupements fonctionnels hautement électro-négatifs comme les halogènes, les peroxydes, quinones et groupes azotés. Leur spécificité leur confère généralement une grande sensibilité. Par définition, ce type de détecteur ne permet pas d'obtenir une caractérisation complète d'un échantillon inconnu.
- Les détecteurs de caractérisation : ils conduisent à des données structurales sur les composés élués. Ils sont à la fois universels et sélectifs, et par conséquent, parfaitement adaptés aux analyses complexes. L'utilisation d'un détecteur de masse (MSD) fait de la

chromatographie en phase gazeuse une méthode performante de caractérisation de la matière organique avec une sensibilité moyenne de  $10^{-5}$  g. La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires. Le chromatographe est couplé au spectromètre de masse par une ligne de transfert chauffée. Le gaz vecteur est éliminé alors que les molécules arrivant successivement dans la chambre d'ionisation sont bombardées par un faisceau d'électrons de 70eV. Les molécules séparées se fragmentent en ions moléculaires qui eux-mêmes vont continuer à se fragmenter ou se réarranger pour former des ions positifs plus petits ou des molécules neutres. Les ions fragmentés sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur (multiplicateur d'électron et amplificateur connectés à un système informatique d'acquisition). L'ensemble de ces ions fragmentés constitue le spectre de masse dont la lecture permettra l'identification de la structure moléculaire.

#### IV.1.4. Les différents composés analysés

##### IV.1.4.1. HPAs et PCBs

Les HPAs et les PCBs sont les composés qui sont les plus largement analysés par les différents auteurs. Le tableau I.11 résume les concentrations en HPAs trouvées dans les différentes études portant sur le sujet :

Composés (en mg / kg)	Berset & Holzer, 1995	Wild & Jones, 1992	Moreda et al., 1998	Perez et al. 2001	Berset & Holzer, 1999	
	Boues domestiques				Boues industrielles	
Acenaphtylène	0,06			0,06	0,01	0,02
Acenaphthène	0,09			0,32	0,21	0,15
Anthracène	0,19	0,33	1,15	0,17	0,02	0,14
Benzo(a)anthracène	0,44			0,14	0,10	0,45
Benzo(b)fluoranthène	0,40			0,03	0,14	0,96
Benzo(g,h,i)perylène		2,50	0,71		0,09	0,50
Benzo(a)pyrène	0,35			0,03	0,11	0,53
Chrysène	0,68			0,13	0,10	0,77
Fluoranthène	1,31	1,50	3,42	0,45	0,33	1,46
Fluorène		2,40	7,10	0,47	0,19	0,10
Naphtalène	0,07			0,2	0,20	0,13
Phénanthrène	0,86	3,00	7,20	1,35	0,49	1,33
Pyrène	1,04	2,00	2,83	0,53	0,23	1,18

Tableau I.11. Concentrations en HPAs (en mg/kg) dans les boues d'épuration.

Mangas *et al.* (1998) se sont attachés à la caractérisation des HPAs et des PCBs présents dans les boues, ils ont de ce fait comparé plusieurs méthodes d'extraction et de fractionnement. L'efficacité de ces méthodes préparatives a été testée en analysant une solution standard contenant une quantité connue de HPAs et de PCBs. Le tableau I.12 donne les taux de recouvrement obtenus en utilisant les différentes méthodes.

Extraction	Soxhlet 1 g d'éch./ 200 ml DCM/ 6 h				Soxhlet+saponification 1 g d'éch./ 100 ml de KOH méthan./ 6 h			
	Silice activée		Silice désactivée		Silice activée		Silice désactivée	
Fractionnement	Hex.	Hex/DCM (60/40)	Hex.	Hex/DCM (60/40)	Hex.	Hex/DCM (60/40)	Hex.	Hex/DCM (60/40)
Taux de recouvrement des PCBs (%)	88		99		49	12	63	
Taux de recouvrement des HPAs (%)		75		71		80		59

Tableau I.12. Comparaison des méthodes d'extraction et de fractionnement pour les HPAs et les PCBs (Mangas *et al.*, 1998)

Les PCBs sont analysés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électron (ECD), et les HPAs sont analysés et quantifiés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur UV. La saponification permet l'amélioration du taux de recouvrement de HPAs seulement dans le cas de l'utilisation d'un fractionnement sur silice activée, pour les PCBs l'utilisation de la saponification n'améliore pas les taux de recouvrement.

Codina *et al.* (1994) ont comparé les mêmes méthodes d'extraction que Mangas *et al.* (1998) pour la détermination des HPAs. Ils sont ensuite quantifiés par CLHP couplée à un détecteur UV programmable ou à un détecteur à fluorescence. L'efficacité des méthodes d'extraction et des méthodes d'analyse est testée en analysant un échantillon contenant des HPAs à des concentrations connues. Le tableau I.13 résume les résultats obtenus.

	Soxhlet et fractionnement sur microcolonne de silice		Soxhlet+saponification et fractionnement sur microcolonne de silice	
	Détecteur UV	Détecteur Fluo.	Détecteur UV	Détecteur Fluo.
Taux de recouvrement (%) moyen calculé sur 14 HPAs	62,9	56,28	78	84

Tableau I.13 : Comparaison des méthodes d'extraction et de détection des HPAs (Codina *et al.*, 1994)

Les résultats de Codina *et al.* (1994) et de Mangas *et al.* (1998) montrent des similitudes dans l'analyse de HPA. En effet, les taux de recouvrement pour les extractions au Soxhlet ou Soxhlet + saponification suivie d'une détection par CLHP couplée à un détecteur UV sont très proches. Les auteurs ont malgré tout retenu des méthodes différentes, car Mangas *et al.* (1998) ne s'intéressent pas seulement à l'analyse des HPA, mais aussi à celle des PCBs, donc la méthode choisie est un compromis permettant la détection des deux familles de composés.

Folch *et al.* (1996) se sont intéressés à la caractérisation des PCBs dans les boues. Le tableau I.14 montre que les taux de recouvrement des PCBs obtenus en utilisant différents solvants sont tout à fait comparables.

	<i>Extraction au Soxhlet avec 200 ml de solvant pendant 6h</i>		
	Hexane	Dichlorométhane	Hexane/Acétone
Taux de recouvrement 12 PCBs (%)	60,6	58,1	60,3

Tableau I.14. Comparaison de différents solvants pour l'extraction des PCBs (Folch *et al.*, 1996)

Deux méthodes de fractionnement pour récupérer les PCBs ont également été testées. Le tableau I.15 donne les taux de recouvrements des PCBs obtenus en fractionnant une solution standard de PCBs :

	<i>Fractionnement sur microcolonne avec 10 ml d'hexane</i>	
	Silice	Silicate de Magnésium
Taux de recouvrement 12 PCBs (%)	40,8	42,4

Tableau I.15. Comparaison de deux types de fractionnement pour l'analyse des PCBs (Folch *et al.*, 1996).

Les deux méthodes donnent sensiblement les mêmes résultats, mais l'utilisation du silicate de magnésium sera préférée car ce dernier permet une plus grande répétabilité. Les PCBs sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons.

Sulkowski & Rosinka (1999) ont testé l'efficacité de l'extraction à l'hexane et au dichlorométhane pour l'analyse des PCBs. Les résultats de ces tests sont résumés dans le tableau I.16.

<i>Poids éch.: 3 g</i>	<i>Dichlorométhane</i>	<i>Hexane</i>
	<i>Taux de recouvrement des PCBs (%)</i>	
Soxhlet 6h	66,4	66,75
Soxhlet 9h	67,5	67,55
Agitation 1h	67,0	68,9
Agitation 3h	72,5	73,9

Tableau I.16: Comparaison de différents types d'extraction pour l'analyse des PCBs (Sulkowski & Rosinka, 1999)

La concentration des PCBs augmente légèrement quand le temps d'extraction augmente, et l'extraction est légèrement améliorée par l'utilisation de l'hexane.

Le tableau.I.17 résume les méthodes d'extraction utilisées par différents auteurs pour l'analyse des HPA et des PCBs présents dans les boues de stations d'épuration.

	<i>Composés analysés</i>	<i>Extraction</i>				<i>Fractionn.</i>	<i>Analyse</i>
		Type	Poids Ech (g)	Solvant	Temps		
Lazzari, 1999	HPAs PCBs	Sonication	1g	Hex/DCM (4/1)	3x2h	Silice et alumine	GC-MS GC-ECD
Riley, 2001	PCBs	Liquide-liquide	2g	DCM		Florisil	GC-MS
Alcock et al., 1996				Hexane	16h		GC-ECD
Rahman et al., 1998	Hc aliphatiques et HPAs	Soxhlet	3g	Hex/acétone (2/3)	20h	Silice	
Moreda et al., 1998			1g	DCM/M (2/1)	48h		
Berset & Holzer, 1995	PCBs HPAs	Liquide-liquide	1 à 2.5 g	Hexane		2h	Silice et alumine
Jaouen-Madoulet et al., 2000		Soxtec system		Hexane/acetone	GC-ECD GC-FID ou MS		
Perez et al., 2001	HPAs	Ultra-sons	2g	DCM/M (2/1)	20 min	Alumine	GC-MS
Blanchard et al., 2001	HPAs PCBs		1g	Hex/DCM (85/15)	30 min		HPLC GC-MS

Tableau I.17. Autres méthodes utilisées couramment pour l'analyse des PCBs et HPAs

L'ensemble des études faites sur les HPAs et les PCBs montrent que la méthode la plus couramment utilisée pour l'étude de ces composés est l'extraction au Soxhlet. Le choix du solvant va dépendre des composés ciblés : pour l'analyse des HPAs, le solvant le plus adapté est soit le dichlorométhane soit le mélange dichlorométhane/hexane (40/60) ; pour l'analyse des PCBs, le solvant le plus efficace est l'hexane. Un des inconvénients de l'extraction au Soxhlet est la durée d'extraction : 6 à 48 h selon les auteurs (les durées plus longues améliorant le rendement d'extraction).

#### IV.1.4.2. PCDD/Fs

Webber *et al.* (1996) se sont intéressés entre autres à la quantification des dibenzo(p)dioxines polychlorées (PCDDs) et des dibenzofurannes polychlorées (PCDFs). Ces composés sont extraits au Soxhlet avec du toluène suivi d'une phase de digestion avec de l'acide sulfurique. Les composés sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

Stevens *et al.* (2001) se sont attachés à compiler les données concernant une étude comparative de l'analyse de 17 PCDD/Fs dans les boues d'épuration par cinq laboratoires anglais. Différentes méthodes d'extractions et de fractionnement ont été utilisées suivant les laboratoires. Molina *et al.* (2000) se sont intéressés à l'étude de l'évolution des PCDD/Fs dans les boues épandues sur les sols. La méthode d'extraction est différente de celles proposées par Stevens *et al.* (2001). Le tableau suivant résume les différentes méthodes d'extraction utilisées pour ces composés :

	<i>Méthode de séchage pour les boues liquides avant extraction</i>	<i>Méthode d'extraction</i>	<i>Méthode de fractionnement</i>	<i>Analyse des PCDD/Fs</i>
Molina et al. 2000	Lyophilisation des boues	Soxhlet pendant 24h avec du toluène	Colonne Florisil	GC-MS
Stevens et al. 2001	Séchage à l'air à température ambiante	Soxhlet pendant 8h avec du Toluène	Colonne Florisil et colonne d'Alumine	
	Séchage à l'air à 30°C	ASE avec toluène	Reflux avec silice Puis colonne d'alumine	
	Centrifugation 12000 t/min et élimination du surnageant	Soxhlet pendant 16h avec 300 ml de toluène	Colonne de silice, Puis colonne d'alumine et colonne de carbone.	

Tableau I.18. Méthodes de préparation et d'analyse pour la quantification des PCDD/Fs dans les boues (Stevens *et al.*, 2001) et (Molina *et al.*, 2000).

Les résultats de l'étude de Molina *et al.* (2000) montrent que l'apport de boues dans les sols augmente la concentration de PCDD/Fs et que ces composés sont persistants pour des périodes d'au moins un an.

#### IV.1.4.3. LASs et LABs

La structure des LASs et LABs a été décrite dans les paragraphes précédents (*cf* III.4.4 LABs). La toxicité des LASs est faible (concentration létale 50% pour les poissons entre 1 et 10 mg/l- Jauzein *et al.*, 1995). Ces composés sont largement utilisés au niveau industriel dans

les préparations commerciales de lessives. Rapaport et Eckhoff (1990) ont compilé des données sur les LASs dans 36 stations d'épuration, 35 sédiments de rivière et 5 boues épandues sur des sols aux Etats-Unis, au Canada et en Europe de l'ouest. La Farré *et al.* (2001) ont étudié la toxicité due aux surfactants dans les boues en Espagne. Les méthodes d'extraction et d'analyse utilisées pour l'étude des LASs sont résumées dans le tableau suivant:

	<i>la Farré et al.,2001</i>	<i>Osburn, 1986</i>	<i>Matthijs et De Henau, 1987</i>
Type d'échantillon	Boues		
Extraction	Sonication	Soxhlet	
Solvant et durée d'extraction	Méthanol/DCM (7/3) 3x20 min	Ethyl Ether 16h	Méthanol 2h
Méthode d'analyse	chromatographie liquide/ MS	Désulfonation-GC/MS	HPC/UV
Taux de recouvrement	?	90%	90%

Tableau I.19. Méthode d'analyse pour les LASs (Rapaport et Eckhoff, 1990; la Farré et al., 2001)

McEvoy et Giger (1986) ont mis en évidence des concentrations de 0,3 à 1,2% en poids de matière sèche de LASs dans les boues. Différents auteurs ont étudié la biodégradation des LASs dans les sols et les résultats sont compilés dans le tableau I.20 (Ward & Larson, 1989).

<b>Composés</b>	<b>Demi-vie (jours)</b>	<b>Références</b>
<sup>10</sup> C-LAS	21	Ward & Larson, 1989
<sup>11</sup> C-LAS	25	
<sup>12</sup> C-LAS	23	
<sup>13</sup> C-LAS	18	
	17	
<sup>14</sup> C-LAS	10	Inoue et al., 1978
	11-18	Kawashima & Takeno, 1982
	8-27	De Henau et al., 1986
	5-25	Litz et al., 1987
<sup>12</sup> C-LAS	5	Giger et al., 1987

Tableau I.20. Demi-vie de différents LAS dans les boues d'épurations épandues au sol.

D'après Schöberl (1989), les LAS ont une demi-vie de 1 à 30 jours en fonction de la concentration initiale dans le sol, ainsi que des caractéristiques du sol.

Les LABs sont plus résistants à la dégradation microbienne dans les environnements aquatiques que les LASs (Ishiwatari *et al.*, 1983). Pour cette raison, les LABs sont souvent utilisés comme des marqueurs moléculaires de l'activité humaine (Bothner *et al.*, 1994). Dans les boues de stations d'épuration, la concentration moyenne des LABs varie de 17 à 430 µg/g (M.S) (Eganhouse *et al.*, 1988). Le tableau I.21 résume les méthodes d'extraction les plus couramment utilisées pour l'analyse des LABs dans les boues d'épuration

		<i>Klotz, 1998</i>	<i>Holt &amp; Bernstein, 1992</i>	<i>Takada &amp; Ishiwatari, 1987</i>	<i>Takada &amp; Ishiwatari, 1985</i>
Extraction	Type	Soxhlet			
	Poids éch (g)	2g de boues	5g de boues	5g	0,1 à 2g de boues
	Solvant	Méthanol		Benzène*/méthanol (6/4)	
	Temps	4h		18h	18h
Fractionnement		Microcolonne de silice activée	Colonne échangeuse d'ions	Colonne Florisil	Microcolonne de silice activée
Analyse		GC-MS			

\* le benzène n'est plus utilisé comme solvant actuellement

Tableau I.21 . Méthodes utilisées pour l'analyse des LABs

La dégradation des LABs est fonction de la position du noyau benzénique sur la chaîne alkyle. Ainsi, la biodégradation entraîne une dégradation préférentielle des isomères externes par rapport aux isomères internes (Eganhouse *et al.*, 1983). Le calcul du rapport I/E (isomère interne sur isomère externe) donne alors une idée de l'état de dégradation des LABs.

#### IV.1.4.4. *Autres composés organiques analysés*

D'autres micropolluants organiques ont également été analysés, comme les chlorobenzènes dont l'extraction se fait au Soxhlet dans des conditions variables en fonction des auteurs. Ces conditions sont résumées dans le tableau I.22. Les chlorobenzènes sont très utilisés dans l'industrie et dans certains produits domestiques (Rogers *et al.*, 1989; Rogers, 1996). Les données concernant la concentration en chlorobenzènes dans les boues sont assez variables, Rogers *et al.* (1989) ont noté des variations de 0,05 mg/kg M.S. à 5,5 mg/kg M.S. pour la concentration totale en chlorobenzènes.

		<i>Crathorne et al. (1989)</i>	<i>Rogers et al. (1989)</i>	<i>Wang et Jones (1991)</i>
Pré-traitement		Centrifugation et élimination du surnageant Séchage du culot par voie chimique (sulfate de sodium anhydre)		
Extraction	Type	Soxhlet		
	Solvant	Hexane		Hexane/acétone (67/33)
	Temps	4h	15h	6h
Analyse		GC-ECD		

Tableau I.22. Méthodes utilisées pour l'analyse des chlorobenzènes

En plus des LASs, Scott et Jones (2000) s'intéressent également à une autre classe de surfactants, celle des alkylphénols ethoxylates (APE), qui sont largement utilisés dans les détergents, les peintures, les pesticides. La production mondiale annuelle des APE est de 500 000 tonnes. Des restrictions quant à l'utilisation de ce type de surfactants sont apparues en 1984, quand il a été découvert que les produits formés par la biodégradation des APE (les nonylphénols) étaient plus 10 fois plus toxiques que les APE eux-mêmes (Renner, 1997).

Lin *et al.* (1999) ont testé l'efficacité de l'extraction par fluide supercritique pour la détermination du 4-nonyphénol (4-NP) dans les boues. Ce composé se forme par biodégradation anaérobie des nonylphénols polyéthoxylates au cours du traitement des eaux usées. Il est résistant à la biodégradation (Jauzein *et al.*, 1995) et s'accumule dans les sédiments, dans lesquels il peut persister pendant au moins 400 jours (Heinis *et al.*, 1999). De plus l'action tensio-active de ce type de composés peut augmenter la solubilité d'autres micropolluants organiques et donc leur biodisponibilité vis à vis des organismes vivants du sol (Jauzein *et al.*, 1995). Les extraits obtenus ont ensuite été analysés par GC-MS, et la concentration en 4-NP a été suivie afin de déterminer la méthode avec les meilleurs taux de recouvrement. Finalement, il apparaît que l'extraction donnant des résultats optimaux est l'extraction par fluide supercritique avec une pression de 97 bar, une température de 40 °C, un flux de 3.0 t/min, une période statique de 2 min et une période d'extraction dynamique de 5 min. Avec de tels paramètres le taux de recouvrement pour le 4-NP est de 77% (Lin *et al.*, 1999).

Berset et Holzer (2001) se sont attachés à la détermination des phtalates dans la fraction extraite des boues de station d'épuration. Leur étude porte sur 16 phtalates (ou acides diesters phtaliques) et la méthode d'analyse utilisée comprend une extraction liquide-liquide sur 2g de boue séchée avec 7 ml d'éthyle acétate. Après centrifugation, le surnageant est analysé par GC-MS. Une quantification a été effectuée en ajoutant des standards internes pour les composés ciblés. Les résultats montrent que le DEHP est le phtalate majoritaire dans les échantillons, représentant plus de 90% en poids des phtalates dans les boues. La concentration moyenne en DEHP dans les boues varie de 0,04 à 160 mg / kg MS (Berset & Holzer, 2001).

Webber et Lesage (1989) ont choisi d'étudier les composés organiques présents dans les fractions acides et basiques-neutres des boues. Dans le groupe des composés basiques/neutres (concentration de 152 à 364 mg/kg M.S. en moyenne) sont ciblés trois HPAs (acénaphène, benzo(a)pyrène et fluoranthène), les benzènes chlorés (1,2-dichlorobenzène,

hexachlorobenzène), les esters de phtalates (DEHP et butyl benzylphtalate), les éthers halogénés (4-chlorophényle phényle ether et bis-2-chloroéthyle ether), ainsi que d'autres composés comme le 2,6-dinitrotoluène, hexachloroéthane et le nitrobenzène. Parmi les composés de la fraction acide (concentration de 2 à 26 mg/kg M.S. en moyenne) le 2,4-dichlorophénol, 2,4-diméthylphénol, pentachlorophénol et le phénol ont été étudiés. Six méthodes d'extraction liquide-liquide ont été comparées, elles sont résumées dans le tableau suivant :

<i>Méthode A</i>	<i>Méthode B</i>	<i>Méthode C</i>	<i>Méthode D</i>	<i>Méthode E</i>	<i>Méthode F</i>
Dilution	Protocole EPA	Fractionnement	Comparaison des agitateurs pour l'extraction		
Boues diluées à 11 avec de l'eau distillée	Boues divisées en deux	Centrifugation : La partie liquide est extraite selon la méthode B	Boues liquides séchées à l'air	Boues liquides séchées à l'air	Boues liquides séchées à l'air
pH>11 3 extractions avec 60 ml de DCM	ph> 11 3 extractions avec 40 ml de DCM agitation manuelle	Extraction au Soxhlet avec 150 ml de hexane/acétone (1/1)	3 extractions avec 40 ml de DCM en utilisant un agitation mécanique	3 extractions avec 40 ml de DCM avec agitations par ultrasons	3 extractions avec 40 ml de DCM avec homogénéiseur Polytron
pH<2 3 extractions avec 60 ml de DCM	ph<2 3 <sup>e</sup> extractions avec 40 ml de DCM agitation manuelle	Evaporation jusqu'à 10 ml, ajout d'eau puis extraction selon la méthode B			

Tableau I.23. Méthodes d'extraction pour les composés organiques présents dans les fractions acides ou basiques et neutres (Webber & Lesage, 1989).

Les méthodes présentant le meilleur compromis entre performance (facilité et temps d'extraction) et rentabilité (taux de recouvrement des composés ciblés) sont les méthodes E et F (Webber & Lesage, 1989).

Lega *et al.* (1997) se sont intéressés à la quantification des polluants organiques prioritaires par GC-MS, c'est-à-dire, les HPAs, les PCBs, les chlorobenzènes, les chlorophénols et les pesticides chlorés dans les boues. Habituellement ces composés sont caractérisés par familles, et les auteurs ont essayé de développer une procédure pour l'analyse globale de l'ensemble de ces composés. Pour ce faire, l'extraction se fait par ultra sons par le mélange DCM/diéthyle ether (1/2). Les échantillons sont centrifugés pendant 15 min à 2500 tours/min après extraction, le surnageant est éliminé et la phase restante est à nouveau extraite par le même mélange. Tous les extraits sont recombinaés puis séchés avant d'être fractionnés par chromatographie à perméation de gel pour récupérer les fractions correspondant aux composés ciblés. Les fractions obtenues sont ensuite analysées par GC-MS. Les résultats

montrent que cette méthode fournit une bonne alternative pour la détermination d'un grand nombre de polluants organiques prioritaires. Les taux moyens de recouvrement obtenus pour ces composés sont de 95% pour les pesticides organo-chlorés, 90% pour les PCBs, 77% pour les HPAs, 59% pour les chloro-aromatiques et 57% pour les composés phénoliques.

Boocock *et al.* (1992) se sont attachés à la caractérisation de la fraction lipidique d'une boue d'épuration. Le but de cette étude est de liquéfier les boues d'épuration afin de les transformer en apports chimiques pour les sols. Deux méthodes d'extraction ont été comparées.

	<i>Sohxlet</i>		<i>Extraction au ballon</i>	
Poids ech.	50 g		100 g	
Solvants	Chloroforme	Toluène	Chloroforme	Toluène
	300 ml		600 ml	
Durée	4 h		2 h	
Taux de recouvrement des lipides	11,8-12 %		17-18 %	

Tableau I.24. Comparaison des méthodes d'extraction pour les fractions lipidiques des boues (Boocock *et al.*, 1992).

Les deux solvants donnent des résultats similaires concernant le taux de recouvrement des lipides. Cependant le toluène sera préférentiellement utilisé pour des raisons de sécurité et de coût. Les extraits obtenus vont ensuite être séparés en deux fractions d'acides gras par l'éther de pétrole et le toluène. La fraction obtenue par l'éther de pétrole contient la majorité des acides gras, et le toluène est utilisé pour récupérer les acides résiduels dans la phase aqueuse. Les distributions des acides gras s'étendent du C<sub>12</sub> au C<sub>18</sub> avec les acides palmitique, stéarique et oléique en constituants majoritaires.

Eganhouse *et al.* (1988) se sont intéressés à la quantification des stérols fécaux dans les boues d'épuration. Pour analyser les stérols, les échantillons sont tout d'abord centrifugés, le surnageant est éliminé, puis 100 ml de dichlorométhane sont ajoutés à l'échantillon et la solution est agitée pendant 1h. L'ensemble est ensuite centrifugé jusqu'à l'obtention de deux phases. La phase dissoute dans le dichlorométhane est prélevée et l'opération est répétée deux fois. Les stérols sont séparés de l'extrait par chromatographie d'adsorption et élués par l'éthyle acétate. La fraction est ensuite analysée par GC-MS. Chan *et al.* (1998) ont également étudié la distribution des stérols fécaux tels que le coprostanol, le cholestanol et le cholestérol dans des sédiments près d'une zone de dépôt de boues d'épuration. Cette étude a pour objectif de

déterminer des traceurs des boues dans les sédiments aux alentours du site de dépôt. Les échantillons lyophilisés ont été extraits au Soxhlet avec un mélange DCM/méthanol (2/1) pendant 36 h. Après évaporation, l'extrait est remis en reflux pendant 3 heures avec de l'hydroxyde de potassium méthanolique puis extrait à nouveau avec 30 ml de n-hexane (l'opération est répétée deux fois). Puis l'extrait est séparé sur microcolonne d'alumine et de silice et l'éluat récupéré par le méthanol est analysé par GC-MS et GC-FID. Le même type d'approche a été utilisé pour tracer les boues dans les environnements marins grâce à des biomarqueurs lipidiques tels que les stérols (Writer *et al.*, 1995; Seguel *et al.*, 2001) et les acides gras (Seguel *et al.*, 2001). La méthode utilisée par Writer *et al.*, (1995) ainsi que Seguel *et al.* (2001) consiste en une extraction-saponification à l'hydroxyde de potassium dans du méthanol. Puis les extraits ont été fractionnés afin d'analyser les stérols et les acides gras par GC-MS.

Ibanez *et al.* (2000) ont travaillé sur la quantification des stérols et des 5 $\alpha$ - et 5 $\beta$ -stanols (stérols fécaux) dans les boues, le fumier et les sols amendés avec ces apports organiques. Pour quantifier ces composés, il est tout d'abord nécessaire d'extraire la fraction lipidique. Pour ce faire, 5g de boue ou de fumier (et 10 g de mélange sol+boue) ont été extraits au Soxhlet avec 200 ml de mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (3/2) pendant 12h. La fraction lipidique subit ensuite une saponification avec 20 ml de KOH-méthanol pendant 5h à 70°C. Une chromatographie par perméation de gel permet ensuite le fractionnement de l'extrait pour obtenir deux fractions, l'une riche en stérols et 5 $\alpha$ -stanols et l'autre riche en 5 $\beta$ -stanols. Les fractions obtenues sont ensuite dérivatisées avant d'être analysées par GC-FID. Les résultats montrent que la dose de boue épandue sur un sol influence la concentration en 5 $\beta$ -stanols dans le sol, ce qui n'est pas observé avec les 5 $\alpha$ -stanols ou les stérols.

Ibanez *et al.* (1997) ont étudié la composition en hydroxy acides gras dans les boues. Ces composés ont été détectés dans différents échantillons tels que des boues d'épuration, des sédiments et du fumier (Kaneshiro *et al.*, 1995). L'origine des  $\alpha$  et  $\beta$  hydroxy acides gras serait l'oxydation des  $\alpha$  et  $\beta$  acides gras correspondant (Eglinton *et al.*, 1968). Afin de les analyser, les échantillons ont au préalable été extraits au Soxhlet pendant 12 h avec 200 ml de mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (3/2). La fraction lipidique obtenue a été saponifiée pendant 5 h au KOH-méthanol afin de récupérer la phase acide contenant les composés ciblés. L'analyse se fait par GC-FID et GC-MS avec injection d'un standard interne pour les

quantifications (acide heptadécanoïque). Dans une boue, la quantité moyenne d'hydroxy acides gras retrouvée est de 15 mg pour 100 g de boues.

Chaler *et al.* (2001) se sont intéressés à la composition en stérols, acides bileux, et stérones dans les eaux usées et les boues d'épuration afin de déterminer des traceurs de ce type de pollution organique. Les échantillons de boues (1g) ont été lyophilisés puis extraits aux ultrasons au mélange DCM-méthanol (2-1) pendant 10 min. Les extraits ont ensuite été analysés par GC-MS. Les composés majoritaires retrouvés sont les acides lithocholiques, le cholestérol, le coprostanol, le cholestenone et le coprostanone. Le coprostanone et les épimères de l'acide lithocholique ( $3\alpha$ -hydroxy- $5\beta$ -cholanique acide et  $3\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -cholanique acide) se retrouvent également dans les eaux en sortie de la station d'épuration. Ces composés pourront alors être utilisés comme traceurs de contamination par des effluents de stations d'épuration dans les eaux de rivières.

#### **IV.2. Analyse de la fraction macromoléculaire des boues**

Parallèlement aux études sur les micropolluants organiques présents dans la fraction organique soluble, certains auteurs se sont attachés à la caractérisation des substances humiques présentes dans les boues d'épuration afin d'évaluer l'impact de leur épandage sur les sols. Une meilleure compréhension de la structure et de la composition chimique de la fraction macromoléculaire est essentielle afin d'avoir une meilleure connaissance de la réactivité potentielle de la boue, et de mieux appréhender les interactions possibles de la matière organique de la boue avec les composés organiques ou inorganiques du sol (Senesi *et al.*, 1996, Miikki *et al.*, 1999).

Les substances humiques sont des molécules complexes, stabilisées en raison du blocage de leurs sites réactionnels par les cations polyvalents et les supports minéraux du milieu. De par la quantité et la variété des sites qu'elles offrent, ces molécules vont jouer un rôle important dans l'agrégation des sols mais également dans le développement de complexes adsorbants et donc dans la complexation des métaux lourds mais aussi dans la rétention de micropolluants organiques (Senesi *et al.*, 1995). Ces substances existent dans tous les environnements terrestres et aquatiques (Aiken *et al.*, 1985). La formation des substances humiques va résulter d'un ensemble de processus biologiques et abiotiques, liés aux conditions physico-chimiques et biologiques du milieu. Ce processus consiste en une

polymérisation de molécules organiques issues de la dégradation de matière organique plus complexe ou produites par des organismes vivants. Selon Senesi *et al.* (1996), les boues d'épuration sont riches en substances organiques présentant les mêmes caractéristiques que les substances humiques, par conséquent, leur application au sol risque de modifier le contenu, la composition et les propriétés de la matière organique autochtone.

Pour extraire les substances humiques de nombreuses techniques peuvent être utilisées telles que l'extraction par des résines échangeuses d'ions (McCarthy *et al.*, 1979; Lesourd-moulin, 1985) ou l'attaque acide suivie d'une extraction alcaline (Piccolo *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1993; Hernandez *et al.*, 1993). Cette dernière technique, adoptée par la Société Internationale des Substances Humiques, est celle qui est la plus couramment utilisée (Swift, 1996). L'extraction est réalisée en principe sur 5 g de boue préalablement séchée à l'étuve à 45°C, après élimination des lipides. L'échantillon est ensuite traité à l'acide chlorhydrique (HCl) 0,1 N pendant 30 min sous agitation. Après centrifugation (2000 rpm, 20 min), le surnageant récupéré est filtré. Le traitement à l'acide chlorhydrique est répété trois fois et permet de récupérer les acides fulviques. Une extraction à la soude (NaOH) 0,1 N (4 heures d'agitation) est ensuite réalisée sur le culot. L'échantillon est centrifugé (3500 rpm, 30 min). Cette opération est renouvelée trois fois. Le culot final correspond à l'humine, associée à la matière minérale. Le surnageant représente les matières humiques totales, constituées des acides humiques et fulviques. Elles comportent encore des argiles, précipitées par addition de chlorure de potassium (KCl) récupérées par centrifugation (5000 rpm, 30 min) et ajoutées à l'humine. L'ensemble des matières humiques est acidifié par de l'acide chlorhydrique (jusqu'à pH 2) afin de précipiter les acides humiques. Après centrifugation (5000 rpm, 30 min), le culot est dissout à nouveau dans la soude 0,1 N, puis précipité par acidification ; ces deux opérations sont répétées plusieurs fois de suite de façon à éliminer les acides fulviques. L'ensemble de ces opérations est résumé dans la figure suivante (Réveillé, 2001):

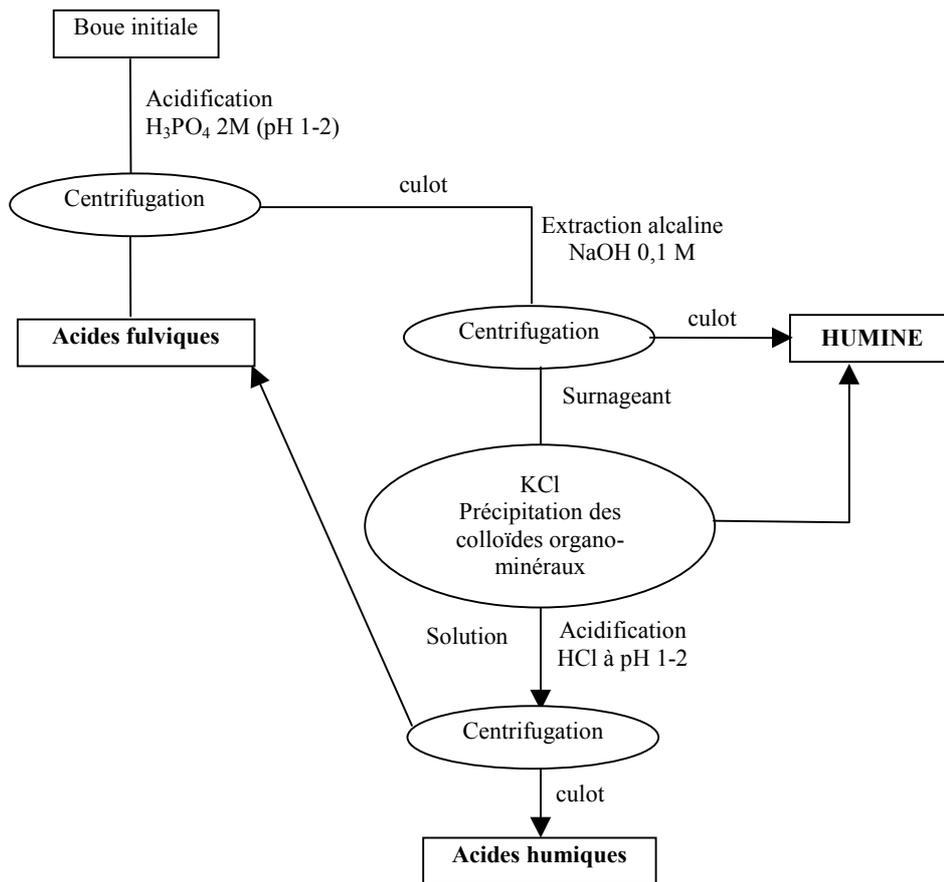


Figure I.18. Extraction des acides humiques et fulviques

Après cette étape d'extraction, il est nécessaire de purifier les substances humiques pour éliminer les réactifs d'extraction. La méthode la plus utilisée consiste à dialyser les acides humiques contre l'eau distillée puis à leur faire subir une décationisation sur résines échangeuses d'ions (Aiken *et al.*, 1985; Réveillé, 2001). La décationisation consiste à déplacer les cations complexés par les composés humiques.

Cette méthode d'extraction montre cependant quelques limites pour l'extraction des substances humiques dans les boues. En effet la solution alcaline utilisée pour l'extraction peut dissoudre les composants protoplasmiques et structuraux des résidus végétaux et de la biomasse bactérienne et peut coextraire des substances non-humiques, résidus de lignine, quinones, polyphénols, lipides, polysaccharides, peptides (Sanchez-Monedero *et al.*, 1999). Ces substances non humifiées sont co-extraites et co-précipitées et selon leur solubilité, elles vont être associées aux différentes fractions humiques. De plus, Réveillé (2001) a mis en évidence une co-extraction des lipides avec les acides humiques, il est donc difficile d'estimer la part réelle des substances humiques totales dans la matière organique des boues.

Après extraction, les acides humiques et fulviques sont reconcentrés et séchés avant d'être analysés par des techniques globales ou par des techniques plus spécifiques comme la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie RMN, ou encore des méthodes de pyrolyse couplées aux méthodes de chromatographie.

#### IV.2.1. Analyses globales

Ces techniques globales regroupent la mesure de paramètres chimiques, comme le pH, la capacité d'échange cationique, ainsi que des analyses élémentaires. Celles-ci permettent de fournir la composition en éléments C, H, N, O, et S et de calculer les rapports atomiques H/C, O/C, N/C et S/C pour la caractérisation de l'origine et du degré d'évolution des substances humiques (Steelink, 1985):

- Le rapport C/H est un indice d'aromaticité.
- Le rapport O/C reflète l'abondance des groupements fonctionnels oxygénés.
- Les rapports C/N et S/C traduisent le degré d'incorporation des composés azotés et soufrés dans les substances humiques des échantillons les plus actifs du point de vue biologique.

Hernandez *et al.* (1993) ont comparé les compositions élémentaires des substances humiques de boues d'épuration issues de traitement biologique à celles des substances humiques naturelles, les résultats sont résumés dans le tableau I.25.

		C(%)	H(%)	N(%)	O(%)	C/H	C/N	O/H
Acides humiques naturels	Stevenson, 199)	53,8-58,7	3,2-6,2	0,8-4,3	32,8-38,3			
	Hernandez et al., 1993	60,02	3,51	1,43	35,04	16,90	41,97	9,98
Acides humiques des boues	Ayuso et al., 1996	56,27	8,73	6,50	28,50			
	Veeken et al., 2000					7,03	26,88	
	Hernandez et al., 1993	60,38	7,5	8,05	24	8,035	7,47	3,19
	Riffaldi et al., 1983	60,45	8,29	8,09	25,32	7	7	
Acides fulviques des boues		44,54	6,51	6,31	38,26	7	7	

Tableau I.25. Composition élémentaire des substances humiques naturelles et issues de boues (Riffaldi et al., 1983; Hernandez et al., 1993; Stevenson, 1994; Veeken et al., 2000)

Ces résultats montrent que les acides humiques issus des boues d'épuration sont plus riches en azote que les acides humiques naturels. De plus, les rapports C/H des substances humiques des boues sont inférieurs à ceux des substances humiques naturelles, montrant ainsi que les boues ont une structure beaucoup plus aliphatique (Hernandez *et al.*, 1988). Par

contre, les acides fulviques des boues sont plus riches en oxygène que les acides humiques des boues, mais sont moins riches en carbone, hydrogène et azote (Riffaldi *et al.*, 1983). Cette étude conclue que les acides humiques et fulviques des boues sont riches en azote et présentent une structure moléculaire plus complexe que les composés humiques extraits de la matière organique des sols (Riffaldi *et al.*, 1983). Unsal et Sozudogru Ok (2001) se sont intéressés à l'analyse élémentaire et fonctionnelle des acides humiques provenant de différentes origines dont les boues d'épuration. L'analyse fonctionnelle montre que les boues sont riches en groupements carboxyliques et phénoliques et que le compostage entraîne une diminution des groupements phénoliques et une augmentation des groupements carboxyliques amenant à des structures plus stables par rapport à celles des acides humiques non compostés.

#### **IV.2.2. Analyses spectroscopiques et moléculaires**

Parallèlement aux analyses élémentaires, des techniques plus complexes peuvent être utilisées pour la caractérisation des substances humiques des boues d'épuration, telles que des méthodes spectroscopiques ou moléculaires.

##### ***IV.2.2.1. Spectroscopie infrarouge***

Cette technique permet de traiter les fractions organiques complexes comme les substances humiques, afin d'étudier la structure (aliphatique ou aromatique) ou le degré de fonctionnalisation des substances humiques. L'infrarouge moyen concerne les rayonnements de longueurs d'onde variant de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ . Un spectre IR se compose de bandes d'absorption correspondant aux différents modes de vibration de la molécule. L'obtention d'un spectre IR nécessite l'analyse de toutes les longueurs d'ondes émises par la source, après absorption par l'échantillon. Chaque bande d'absorption peut être attribuée à un groupement caractéristique, et le calcul des aires de bandes majeures permet de déterminer des rapports d'abondance utilisés pour caractériser la fonctionnalisation des échantillons.

Les principales bandes observées dans les boues d'épuration sont résumées dans le tableau I.26.

<i>Abondance des bandes (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Groupements</i>
3450-3425	-OH
3275	-NH (amide I et II)
2975-2825	CH-aliphatique
2362-2338	groupement Si-H
1750-1710	-C=O des amides I
1560-1530	amides II
1510	noyaux aromatiques
1470-1460	-CH, CH <sub>2</sub> et CH <sub>3</sub> aliphatiques
1400-1390	-CH aliphatique et COO <sup>-</sup> , -OH élongation, -C-O
1265-1237	-C-O et -OH déformation des COOH
1080-1030	-C-O des carbohydrates
537-472	-C-O-C de déformation des aromatiques Si-O, groupement Me-OH

Tableau I.26. Principales bandes caractéristiques des acides humiques des boues d'épuration (Garcia *et al.*, 1992; Filip *et al.*, 2000)

Hernandez *et al.* (1993) ont utilisé la spectroscopie infrarouge pour comparer les acides humiques issus des boues d'épuration et les acides humiques naturels. Les résultats IR montrent que les acides humiques des boues sont plus riches en azote et ont une nature plus aliphatique que les acides humiques naturels. Piccolo *et al.* (1992) ont démontré la même chose en étudiant les effets de l'application de boues sur des sols. Garcia *et al.* (1991) ont caractérisé les substances humiques des boues avant et après compostage, et les résultats montrent que:

- les substances humiques gardent leur caractère aliphatique après compostage,
- les polysaccharides (Garcia *et al.*, 1991; Veeken *et al.*, 2000), les composés azotés (Garcia *et al.*, 1992; Esteves Da Silva *et al.*, 1998) et les lipides (Miikki *et al.*, 1999; Veeken *et al.*, 2000) sont minéralisés conduisant ainsi à une structure plus stable.

L'aliphaticité des substances humiques mise en évidence par Garcia *et al.* (1991) est contradictoire avec ce qui a été trouvé par Filip *et al.* (2000) en ce qui concerne les acides humiques. En effet, en étudiant les acides humiques extraits de boues d'épuration par plusieurs techniques spectroscopiques, dont la spectroscopie infra-rouge, ils ont mis en évidence une diminution des unités aliphatiques par rapport aux unités aromatiques au cours de la dégradation microbienne.

#### IV.2.2.2. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique non destructive, puissante pour la détermination de la structure des molécules. En effet, en utilisant les propriétés magnétiques des noyaux, elle permet de voyager au cœur de la matière et d'établir une cartographie au niveau des atomes. Elle va permettre de compter le nombre de protons, de noyaux de carbone, de phosphore, d'azote, d'hydrogène et des autres noyaux présents éventuellement dans la molécule à étudier. Leurs fréquences de résonance dans des champs magnétiques intenses donnent d'excellents renseignements sur la densité électronique au niveau de ces noyaux.

La technique de  $^{13}\text{C}$ -RMN est très utilisée pour la caractérisation des substances humiques (Stevenson, 1994). Deux types de techniques peuvent être potentiellement utilisées ; la spectroscopie  $^{13}\text{C}$ -RMN à l'état liquide ou à l'état solide. Cependant en raison de l'insolubilité de certains composés (tels que l'humine ou les acides humiques), il est préférable d'utiliser la RMN à l'état solide. Le résultats d'une telle technique se présentent sous forme de spectre, comme la spectroscopie infrarouge, et chaque bande correspond à une classe chimique (tableau I.27).

<i>Abondance des bandes (ppm)</i>	<i>Groupements</i>
0-50	C aliphatique
20	Groupement méthyle
30	Aliphatiques linéaires
40	Aliphatiques ramifiés
50-110	C-O aliphatique
56	Groupement méthoxy
71	Dérivés des carbohydrates
110-160	C aromatique
115	C aromatique non substitué
128	C aromatique substitué
150-160	C aromatique phénolique
160-220	C carboxyle/carbonyle (COO)
171	Groupement carboxylique
195	Cétones/ quinones

Tableau I 27. Principales bandes caractéristiques des acides humiques (Stevenson, 1994; Wilson & Hatcher, 1988; Gonzalez-Vila et al., 2001).

Le calcul des rapports d'aire de bandes majeures est utilisé pour la caractérisation fonctionnelle des acides humiques et fulviques.

Cette technique a été utilisée par Veeken *et al.* (2000) pour la caractérisation structurale des acides humiques lors du compostage des boues. Les spectres NMR des acides humiques de l'échantillon de départ sont caractérisés par la présence de C aliphatique et carbohydate dûe aux acides gras, aux sucres ou à l'hémicellulose. Le compostage entraîne une augmentation de l'aromaticité des acides humiques sur les spectres NMR, une augmentation des groupements aromatiques et carboxyliques, ceci montre que la contribution en composés ligneux et dérivés de la lignine augmente au cours du compostage (Veeken *et al.*, 2000).

#### ***IV.2.2.3. Pyrolyse flash couplée à une chromatographe en phase gazeuse et à un spectromètre de masse***

Cette technique permet d'analyser les composés organiques qui ne peuvent pas être directement analysés par GC/MS, tels que les substances humiques ou les fractions organiques insolubles. Il est en effet important de bien les caractériser pour appréhender la structure macromoléculaire de ces substances humiques. De plus, au sein de cette structure, peuvent être incorporés des composés organiques qui pourront être libérés dans le sol lors de l'épandage.

La pyrolyse flash permet de briser les macromolécules en fragments chromatographiables plus petits. Le chromatographe permet de séparer ces fragments qui pourront ensuite être identifiés par le détecteur (*cf deuxième partie- méthodes analytiques*). La nature des fragments permet de connaître plus en détail la structure des substances humiques. Miikki *et al.* (1999) se sont intéressés à la caractérisation des acides humiques de boues brutes et compostées par Py-GC-MS et par THM-GC-MS en utilisant différentes températures de pyrolyse (de 350° à 600°), et ils ont mis en évidence qu'à 600°C, les acides humiques analysés par Py-GC-MS produisent majoritairement des composés aromatiques tels que les alkylbenzènes et les alkylphénols. Par contre, par THM-GC-MS à la même température, la nature des produits de dégradation générés n'est plus la même et les composés majoritairement produits sont des acides gras. En fait, il apparaît qu'en Py-GC-MS traditionnelle certains composés aromatiques proviennent d'acides gras insaturés par des réactions secondaires comme cela a été démontré par Saiz-Jimenez (1995). Garcia *et al.* (1992) ont montré que les acides humiques dans les boues étaient riches en lipides. Gonzalez-Vila *et al.* (1999) se sont intéressés à l'évolution des substances humiques des boues au cours

du compostage. Les résultats montrent que par THM-GC-MS, les acides humiques des boues génèrent surtout des acides alcanoniques, des alcanes, des stérols et des composés aromatiques tels que les alkylbenzènes.

### IV.3. Analyse des exopolymères des boues

Urbain *et al* (1993) définissent les boues activées comme constituées de floccs formés de micro-organismes (bactéries) mais aussi de particules inorganiques (silicates, phosphate de calcium oxydes de fer) ainsi que de cations multivalents et d'exopolymères qui en assurent la cohésion. Les exopolymères sont constitués d'éléments de nature différente (Dignac, 1998) tels que :

- des métabolites excrétés par les cellules bactériennes au cours de leur croissance (protéines, polysaccharides et lipides),
- des composés intracellulaires libérés lors de la lyse des cellules (Urbain *et al.*, 1993),
- et des composés apportés par les eaux résiduaires : cellulose, acides humiques (Urbain *et al.*, 1993).

La matrice des exopolymères est très hétérogène. Les exopolymères jouent un rôle important au niveau de la biofloculation des boues (Pavoni *et al.*, 1972; Chao & Keinath, 1979), au niveau de la structure des boues (Forster, 1985; Urbain *et al.*, 1993; Frolund *et al.*, 1996), ainsi qu'au niveau de la déshydratation des boues activées (Pere *et al.*, 1993).

La majorité des études sur les exopolymères concerne ceux produits par les bactéries en culture pure. Par contre, les études concernant ceux des boues activées sont plus rares, car d'une part il s'agit de milieux complexes contenant un grand nombre de bactéries aux métabolismes différents (Dignac, 1998), et d'autre part il n'y a pas de protocole d'extraction bien défini et donc les comparaisons entre les études sont assez difficiles. L'extraction doit permettre de disperser les floccs en détruisant les liens entre les micro-organismes et la matrice de polymères par des méthodes chimiques ou physiques. Les attaques chimiques se font par des bases tel que l'hydroxyde de sodium ou d'ammonium (Sato & Ose, 1980; Sheintuch *et al.*, 1986), des acides tel que l'acide trichloroacétique ou sulfurique (Sandford & Conrad, 1966), des agents tels que l'EDTA qui assure l'élimination des cations multivalents formant les ponts entre les sites négativement chargés des exopolymères et assurant la cohésion des floccs (Brown & Lester, 1980), ou encore par résine échangeuse de cations (résine Dowex), dont le rôle est analogue à celui d'un agent chélatant (Frolund *et al.*, 1996; Bura *et al.*, 1998).

Les extractions physiques se font soit par chauffage à des températures variant de 80 à 100°C (Clarke & Forster, 1982), soit par destruction mécanique des floccs par les ultrasons (Urbain *et al.*, 1993), ou par centrifugation à haute vitesse ou combinaison des deux (Brown & Lester, 1980).

Ces méthodes d'extraction couramment utilisées ont été comparées par Dignac (1998), et les méthodes les plus appropriées semblent être les extractions par la résine Dowex ou aux ultrasons. Ce sont des méthodes faciles à mettre en œuvre, efficaces pour détruire les floccs et peu destructrices pour les cellules (Jorand *et al.*, 1995; Dignac, 1998).

Les études sur les exopolymères montrent que ceux-ci sont principalement constitués de polysaccharides neutres et acides, de lipopolysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques et d'acides humiques (Goodwin & Forster, 1985, Urbain *et al.*, 1993; Frolund *et al.*, 1996). Les composés majoritaires sont les protéines (Dignac, 1998). Une meilleure connaissance de la composition chimique des exopolymères permet d'appréhender la structure des floccs et de comprendre les mécanismes d'interaction entre les exopolymères et les autres constituants des floccs. En effet, la composition chimique des exopolymères donne une idée sur les groupements fonctionnels présents et donc permet de faire des hypothèses sur la nature des liaisons entre les exopolymères et les cations multivalents permettant la formation des floccs (Dignac, 1998; Liao *et al.*, 2002).

## V. CONCLUSION

Cette synthèse bibliographique montre qu'un grand nombre d'études présente des développements analytiques visant à améliorer la quantification des micropolluants organiques tels que les HPA ou PCBs, ou encore à définir leur toxicité. La plupart de ces travaux se concentrent sur l'étude des boues résiduelles de stations d'épuration domestiques d'agglomérations fortement urbanisées, caractérisées par de fortes teneurs en HPA, souvent attribuées à l'importance des infrastructures routières et/ou à la forte industrialisation. Peu de données sont en revanche disponibles sur la variabilité de la composition organique des boues selon la taille de la station d'épuration, son environnement urbain ou rural ou encore le type d'effluents traités (domestiques, industriels). D'autres familles de composés sont présentes dans les boues et certaines sont utilisées comme marqueurs moléculaires des boues. Elles permettent d'identifier l'accumulation des boues mais aussi des eaux usées dans les eaux

superficielles. Cependant, peu d'études s'attachent à la caractérisation exhaustive de la composition moléculaire de la fraction lipidique.

La fraction organique insoluble (FOI), qui constitue une proportion importante de la matière organique des boues, est peu caractérisée d'un point de vue moléculaire. Généralement, les auteurs s'intéressent à la valeur agronomique des boues et surtout à leur influence sur les propriétés des sols. A cette fin, les substances humiques sont extraites selon le protocole préconisé par l'IHSS et habituellement utilisé pour les sols. Toutefois, les substances humiques des boues d'épuration sont différentes de celles des sols. Ainsi, du matériel non-humique est souvent co-extrait avec les substances humiques, ce qui rend difficile les interprétations quant à leur structure réelle. Enfin, en raison de la complexité du protocole d'extraction utilisé, les auteurs traitent généralement un petit nombre d'échantillons. De ce fait, il y a un manque de données sur la variabilité de la composition macromoléculaire des boues selon leur origine. Les techniques habituellement utilisées pour l'analyse des substances humiques, telles que l'analyse élémentaire ou les techniques spectroscopiques, vont fournir des données sur la fonctionnalité de ces substances dans les boues afin de les comparer avec celles des sols. Peu d'études ont été réalisées sur la composition moléculaire du contenu macromoléculaire des boues, alors qu'elles pourraient constituer un complément important aux données spectroscopiques, et permettraient ainsi de mieux approcher la composition des boues. Une meilleure caractérisation de la composition organique des boues est en effet fondamentale afin d'appréhender leur réactivité dans un sol, et vis-à-vis des micropolluants organiques ou inorganiques.

L'étude présentée dans ce mémoire a été orientée de façon à répondre à deux interrogations. La première est d'évaluer la variabilité du contenu organique des boues selon leur origine. La deuxième est de s'intéresser à l'évolution de ce contenu organique au cours d'expériences de biodégradation simulant un contexte d'épandage. L'originalité de ce travail réside d'une part dans le nombre d'échantillons de boues analysés (48 au total), regroupant les divers types de stations d'épuration présents à l'échelle de la région Lorraine, et d'autre part dans la démarche analytique adoptée visant à réaliser une caractérisation exhaustive des composés organiques des boues.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aiken, G.R., Mc Knight, D.M., Wershaw, R.L. & Mc Carthy, P. (1985) *Humic Substances in Soil, Sediment and Water, Geochemistry, Isolation and Characterisation*, New York.
- Alcock, R.E., Bacon, J., Bardget, R.D., Beck, A.J., Haygarth, P.M., Lee, R.G.M., Parker, C.A. & Jones, K.C. (1996) Persistence and fate of polychlorinated biphenyls (PCBs) in sewage sludge-amended agricultural soils. *Environmental Pollution*, **93** (1), 83-92.
- Ayuso, M., Hernandez, T. & Garcia, C. (1996) Effect of humic fractions from urban wastes and other more evolved organic materials on seed germination. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **72**, 461-468.
- Berna, J.L., Ferrer, J., Moreno, A., Prats, D. & Ruiz, F. (1989) The fate of LAS in the environment. *Tenside Surfactants Detergents*, **26**, 101-107.
- Berset, J.D. & Holzer, R. (1995) Organic micropollutants in Swiss agriculture: distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in soil, liquid manure, sewage sludge and compost samples; a comparative study. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, **59**, 145-165.
- Berset, J.D. & Holzer, R. (1999) Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sewage sludges using supercritical fluid extraction and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, **852**, 545-558.
- Berset, J.-D. & Holzer, R.E. (2001) Determination of phthalates in crude extracts of sewage sludges by high-resolution capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, **84**(2), 383-391.
- Blanchard, M., Teil, M.-J., Ollivon, D., Garban, B., Chesterikoff, C. & Chevreuil, M. (2001) Origin and distribution of polyaromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in urban effluents to wastewater treatment plants of the Paris area (France). *Water Research*, **35** (15), 3679-3687.
- Boocock, D.G.B., Konar, S.K., Leung, A. & Ly, L.D. (1992) Fuels and chemicals from sewage sludge. 1. The Solvent extraction and composition of a lipid from a raw sewage sludge. *Fuel*, **71**, 1283-1297.
- Boon, J., De Leeuw, J.W., Van der Hoek, G.J. & Nosjan, J.H. (1977) Significance and taxonomic value of iso and anteiso monoenoic fatty acids and branched  $\beta$ -hydroxy acids in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of Bacterial Marine*, **129**, 1183-1191.

- Bossert, I.P. & Bartha, R. (1986) Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *Bulletin of Environmental and Contaminant Toxicology*, **37**, 490-495.
- Bothner, M.H., Takada, H., Knight, I.T., Hill, R.T., Butman, B., Farrington, J.W., Colwell, R.R. & Grassle, J.F. (1994) Sewage contamination in sediments beneath a deep-ocean dump site off New-York. *Marine Environmental Research*, **38**, 43-59.
- Brown, M.J. & Lester, J.N. (1980) Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Applied Environmental Microbiology*, **40**(2), 179-185.
- Brunner, P.H., Capri, S., Marcomini, A. & Giger, W. (1988) Occurrence and behaviour of linear alkylbenzenesulfonates, nonylphenol, nonylphenol monophenol and nonylphenol diethoxylates in sewage and sewage-sludge treatment. *Water Research*, **22**, 1465-1472.
- Bura, R., Cheung, M., Liao, B.Q., Finlayson, J., Lee, B.C., Droppo, I.G., Leppard, G.G. & Liss, S.N. (1998) Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. *Water Science and Technology*, **37**(4-5), 325-334.
- Caballero, J.A., Front, R., Marcilla, A. & Conesa, J.A. (1997) Characterization of sewage sludges by primary and secondary pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **40-41**, 433-450.
- Chaler, R., Simoneit, B.R.T. & Grimalt, J.O. (2001) Bile acids and sterols in urban sewage treatment plants. *Journal of chromatography*, **927**, 155-160.
- Challinor, J.M. (1995) Characterisation of wood by pyrolysis derivatisation-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **35**, 93-107.
- Chan, K.-H., Lam, M.H.W., Poon, K.-F., Yeung, H.-Y. & Chiu, T.K.T. (1998) Application of sedimentary fecal stanols and sterols in tracing sewage pollution in coastal waters. *Water Research*, **32**(1), 225-235.
- Chao, A.C. & Keinath, T.M. (1979) Influence of process loading intensity on sludge clarification and thickening characteristics. *Water Research*, **13** (12), 1213-1220.
- Clarke, A.R. & Forster, C.F. (1982) Biopolymer yields from activated sludge and their relation to the operation of treatment plant. *Biotechnology Letters*, **4** (10), 655-660.
- Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D.E., Bortiatynsky, J.M. & Hatcher, P.G. (1995) A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. *Organic Geochemistry*, **23**(2), 169-175.

- Codina, G., Vaquero, M.T., Comellas, L. & Broto-Puig, F. (1994) Comparison of various extraction and clean-up methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soils. *Journal of Chromatography A.*, **673**, 21-29.
- Crathorne, B., Donaldson, K., James, H.A. & Rogers, H.R. (1989) The determination of organic contaminants in UK Sewage sludges. In: *Organic Contaminants in Waste Water, Sludge and Sediment: Occurrence, Fate and Disposal* (Ed. by D. Quaghebeur, Y. Temmerman & G. Angeetti), pp. 46-65. Elsevier Applied Science, London.
- De Henau, H., Matthijs, E. & Hopping, W.D. (1986) Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in sewage sludges, soils and sediments: analytical determination and environmental safety considerations. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **26**, 279-293.
- Dignac, M.-F. (1998) Caractérisation chimique de la matière organique au cours du traitement des eaux usées par boues activées. mémoire de thèse en Océanologie, Météorologie, Environnement, 303p, Université de Paris VI, Paris VI.
- Dörfler, U., Haala, R., Matthies, M. & Scheunert, I. (1996) Mineralization kinetics of chemicals in soils in relation to environmental conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **34**, 216-222.
- Eganhouse, R.P. (1982) Organic matter in municipal wastes and storm runoff: characterization and budget to the coastal waters of southern California. Ph-D thesis in Geochemistry, 230p. University of California, Los Angeles.
- Eganhouse, R.P., Blumfield, D.L. & Kaplan, I.R. (1983a) Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment. *Environment Science and Technology*, **17**, 523-550.
- Eganhouse, R.P., Ruth, E.C. & Kaplan, I.R. (1983b) Determination of long-chain alkylbenzenes in environmental samples by argentation thin-layer chromatography/ high-resolution gas chromatography and gas chromatography / mass spectrometry. *Analytica Chemica*, **55**, 2120-2126.
- Eganhouse, R.P., Olaguer, D.P., Gould, B.R. & Phinney, C.S. (1988) Use of molecular markers for the detection of municipal sewage sludge at sea. *Marine Environmental Research*, **25**, 1-22.
- Eglinton, G., Hunneman, D.H. & Douraghi-Zadeh, K. (1968) Gas chromatographic-mass spectrometric studies of long chain hydroxy acids- II. The hydroxy acids and fatty acids of a 5000-year-old lacustrine sediment. *Tetrahedron*, **24** (18), 5929-5941.

- Esteves Da Silva, J.C.G., Machado, A.A.S.C. & Silva, M.A.B.A. (1998) Acid-base properties of fulvic acids extracted from an untreated sewage sludge and from composted sludge. *Water Research*, **32**(2), 441-449.
- Farrington, J.W. & Quinn, J.G. (1973) Petroleum hydrocarbons and fatty acids in wastewater effluents. *Journal Water Pollution Control Federation*, **45**, 704-712.
- Figge, K. & Schöberl, P. (1989) LAS and application of sewage sludge in agriculture. *Tenside Surfactant Detergent*, **26**, 122-128.
- Filip, Z., Pecher, W. & Berthelin, J. (2000) Microbial utilization and transformation of humic acid-like substances extracted from a mixture of municipal refuse and sewage sludge disposed of in a landfill. *Environmental Pollution*, **109**, 83-89.
- Folch, I., Vaquero, M.T., Comellas, L. & Broto-Puig, F. (1996) Extraction and clean-up methods for improvement of the chromatographic determination of polychlorinated biphenyls in sewage sludge-amended soils: elimination of lipids and sulphur. *Journal of Chromatography A*, **719**, 121-130.
- Forster, C.F. (1985) Factors involved in the settlement of activated sludge: I. nutrients and surface polymers. *Water Research*, **19**(10), 1259-1264.
- Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K. & Nielsen, P.H. (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, **30** (8), 1749-1758.
- Gan, D.R. & Berthouex, P.M. (1994) Disappearance and crop uptake of PCBs from sludge-amended farmland. *Water Environment Research*, **66**(1), 54-69.
- Garcia, C., Hernandez, T., Costa, F. & Polo, A. (1991) Humic Substances in composted sewage sludges. *Waste Management and Research*, **9**, 189-194.
- Garcia, C., Hernandez, T. & Costa, F. (1992) Characterization of Humic Acids from Uncomposted and Composted Sewage Sludge by Degradative And Non-Degradative Techniques. *Bioresource Technology*, **41**, 53-57.
- Garcia, D., Cegara, J., Bernal, M.P. & Navarro, A. (1993) Comparative evaluation of methods employing alkali and sodium pyrophosphate to extract humic substances from peat. *Soil Science Plant Analysis*, **24** (13/14), 1481-1494.
- Giger, W., Brunner, P.H., Ahel, M., McEvoy, J., Marcomini, A. & Schaffner, C. (1987) Organic detergent components and their degradation products in waste water and sludge. *Gas Wasser Abwasser*, **66**.
- Gillan, F.T. & Hogg, R.W. (1984) A method for the estimation of bacterial biomass and

- community structure in mangrove-associated sediments. *Journal of Microbiological Methods*, **2**, 275-293.
- Göbbels, F.J. & Püttmann, W. (1997) Structural investigation of isolated aquatic fulvic and humic acids in seepage water of waste deposits by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Water Research*, **31** (7), 1609-1618.
- Gonzalez-Vila, F.J., Almendros, G. & Madrid, F. (1999) Molecular alterations of organic fractions from urban waste in the course of composting and their further transformation in amended soil. *The Science of the Total Environment*, **236**, 215-229.
- Gonzalez-Vila, F.J., Lankes, U. & Lüdemann, H.-D. (2001) Comparison of the information gained by pyrolytic techniques and NMR spectroscopy on the structural features of aquatic humic substances. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **58-59**, 349-359.
- Goodwin, J.A. & Forster, C.F. (1985) A further examination into the composition of activated sludge floc matrix. *Applied Microbiological Biotechnology*, **43**, 755-761.
- Hatcher, P.G., Nanny, M.A., Minard, R.D., Dibble, S.D. & Carson, D.M. (1995) Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with TMAH. *Organic Geochemistry*, **23**(10), 881-888.
- Heinis, L.J., Knuth, M.L., Liber, K., Sheedy, B.R., Tunell, R.L. & Ankley, G.T. (1999) Persistence and distribution of 4-nonylphenol following repeated application to littoral enclosures. *Environmental Toxicological Chemistry*, **18**(3), 363-375.
- Hernandez, T., Moreno, J.I. & Costa, F. (1988) Characterization of Sewage Sludge Humic Substances. *Biological Wastes*, **26**, 167-174.
- Hernandez, T., Moreno, J.I. & Costa, F. (1993) Infrared spectroscopic characterization of sewage sludge humic acids. Evidence of sludge organic matter-metal interactions. *Agrochimica*, **37**(1-2), 12-17.
- Hiroux, G., Lefevre, G. & Gaffet, M.A. (1983) Composition organique et décomposition dans le sol de boues mixtes de station d'épuration urbaine. *Sciences du Sol*, **1**, 17-26.
- Hoffman, E.J., Mills, G.L., Latimer, J.S. & Quinn, J.G. (1984) Urban Runoff as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons to coastal waters. *Environment Science and Technology*, **18**, 580-587.
- Holt, M.S. & Bernstein, S.L. (1992) Linear Alkylbenzenes in sewage sludges and sludge amended soils. *Water Research*, **26**(5), 613-624.
- Holt, M.S., Waters, J., Comber, M.H.I., Armitage, R., Morris, G. & Newbery, C. (1995)

- AIS/CESIO environmental surfactant monitoring programme. SDIA sewage treatment pilot study on linear alkylbenzene sulphonate. *Water Research*, **29**, 2063-2070.
- Iakimenko, O., Otabbong, E., Sadovnikova, L., Persson, J., Nilsson, I., Orlov, D. & Ammosova, Y. (1996) Dynamic transformation of sewage sludge and farmyard manure components. 1. Content of humic substances and mineralisation of organic carbon and nitrogen in incubated soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **58**, 121-126.
- Ibanez, E., Borros, S., Comellas, L. & Gassiot, M. (1997) Determination of  $\beta$ -hydroxy fatty acids in sewage sludge by using selected ion monitoring. *Journal of Chromatography A*, **775**, 287-293.
- Ibanez, E., Borros, S. & Comellas, L.I. (2000) Quantification of sterols, 5a- and 5b-stanols in sewage sludge, manure and soils amended with these both potential fertilizers. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **366**, 102-105.
- Inoue, K., Kaneko, K. & Yoshida, M. (1978) Adsorption of dodecylbenzene sulfonates by soil colloids and influence of soil colloids on their biodegradation. *Soil Science Plant Nutrition*, **24**, 91-102.
- Ishiwatari, R., Takada, H., Yun, S.J. & Matsumoto, E. (1983) Alkylbenzene pollution of Tokyo Bay sediments. *Nature*, **301**, 599-600.
- Ishiwatari, R., Yamamoto, S. & Handa, N. (1995) Characterization of sinking particles in the ocean by pyrolysis-gas chromatography/ mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **32**, 75-89.
- Jaouen-Madoulet, A., Abarnou, A., Le Guellec, A.-M., Loizeau, V. & Leboulenger, F. (2000) Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, **886**, 153-173.
- Jauzein, M., Feix, I. & Wiart, J. (1995) Les micro-polluants organiques dans les boues résiduelles des stations d'épurations urbaines, pp. 222. Rapport de L'ademe- IRH environnement.
- Jensen, J. (1999) Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in the terrestrial environment. *The Science of the Total Environment*, **226**, 93-111.
- Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J.C., Bottero, J.Y., Villemin, G., Urbain, V. & Manem, J. (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Research*, **29**(7), 1639-1647.
- Kaneshiro, T., Nakamura, L.K. & Bagby, M.O. (1995) Oleic acid transformations by selected

- strains of *Sphingobacterium thalpophilum* and *Bacillus cereus* from composted manure. *Current Microbiology*, **31**(1), 62-67.
- Kawashima, K. & Takeno, T. (1982) Fate of linear alkylbenzene sulfonates (14C-LAS-Ca, 14C-LAS-Na) in soils and plant. *Yukagaku*, **31**, 944-948.
- Klotz, H. (1998) Trace Analysis of Surfactants in Sewage Sludges and soils. *Tenside Surfactant Detergent*, **35**(6), 459-463.
- Knaebel, D.B., Federle, T.W. & Vestal, J.R. (1990) Mineralisation of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) and linear alcohol ethoxylate (LAE) in 11 contrasting soils. *Environmental Toxicological Chemistry*, **9**, 981-988.
- la Farré, M., Garcia, M.-J., Castillo, M., Riu, J. & Barcelo, D. (2001) Identification of surfactant degradation products as toxic organic compounds present in sewage sludge. *Journal of Environmental Monitoring*, **3**, 232-237.
- Leeming, R., Latham, V., Rayner, M. & Nichols, P. (1997) Detecting and Distinguishing Sources of Sewage Pollution in Australian Inland and Coastal Waters and Sediments. In: *Molecular Markers in Environmental Geochemistry* (Ed. by R. P. Eganhouse), pp. 306-319.
- Lega, R., Ladwig, G., Meresz, O., Clement, R.E., Crawford, G., Salemi, R. & Jones, Y. (1997) Quantitative determination of organic priority pollutants in sewage sludge by GC-MS. *Chemosphere*, **34**(8), 1705-1712.
- Leschber, R. (1992) Organohalogen compounds in sewage sludges and their determination as cumulative parameters. In: *Effects of Organic Contaminants in Sewage Sludge on Soil Fertility, Plants and Animals*. (Ed. by S. D. Hall JE., L'Hermitte PL, editors), pp. 45-53.
- Leeming, R., Ball, A., Asholt, N. & Nicholes, P.D. (1996) Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Research*, **30**(12), 2893-2900.
- Lesourd-moulin, V. (1985) Les acides humiques et leurs interactions avec les éléments métalliques Cu(II), Eu(III), Th(IV), U(VI): apport d'une méthode de chromatographie par exclusion stérique et recherche de modèles de complexation, mémoire de thèse, 214p., Université de Lyon, Lyon.
- Liao, B.Q., Allen, D.G., Leppard, G.G., Droppo, L.G. & Liss, S.N. (2002) Interparticle interactions affecting the stability of sludge flocs. *Journal of Colloid and Interface Science*, **249**, 372-380.
- Lin, J.G., Arunkumar, R. & Liu, C.H. (1999) Efficiency of supercritical fluid extraction for

- determining 4-nonylphenol in municipal sewage sludge. *Journal of Chromatography A.*, **840**, 71-79.
- Litz, N., Doering, H.W., Thiele, M. & Blume, H.-P. (1987) The behavior of linear alkylbenzene sulfonate in different soils: a comparison between field and laboratory studies. *Ecotoxicological Environmental Safety*, **14**, 103-116.
- Mangas, E., Vaquero, M.T., Comellas, L. & Broto-Puig, F. (1998) Analysis and Fate of Aliphatic hydrocarbons, linear alkylbenzenes, polychlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soils. *Chemosphere*, **36**(1), 61-72.
- Marcomini, A., Capel, P.D., Lichtensteiger, T.H., Brunner, P.H. & Giger, W. (1989) Behaviour of aromatic surfactants and PCBs in sludge-treated soil and landfills. *Journal of Environmental Quality*, **29**, 523-528.
- Martin, W.J., Ravi Subbiah, M.T., Kottke, B.A., Birk, C.C. & Naylor, M.C. (1973) Nature of fecal sterols and intestinal bacterial flora. *Lipids*, **8**(208-215).
- Matthijs, E. & De Henau, H. (1987) Determination of LAS. *Tenside Surfactants Detection*, **24**, 193-199.
- McCarthy, P., Pterson, M.J., Malcolm, R.I. & Thurman, E.M. (1979) Separation of humic substances by pH gradient desorption from hydrophobic resin. *Analytical Chemistry*, **51**, 2041-2043.
- McEvoy, J. & Giger, W. (1986) Determination of linear alkylbenzenesulfonates in sewage sludge by high-resolution gas chromatography / masse spectrometry. *Environment Science and Technology*, **20**, 376-383.
- Miikki, V., Hänninen, K., Knuutinen, J. & Hyötyläinen, J. (1999) Pyrolysis of humic acids from digested and composted sewage sludge. *Chemosphere*, **38**(2), 247-253.
- Molina, L., Diaz-Ferrero, J., Coll, M., Marti, R., Broto-Puig, F., Comellas, L. & Rodriguez-Larena, M.C. (2000) Study of evolution of PCDD/F in sewage sludge-amended soils for land restoration purposes. *Chemosphere*, **40**, 1173-1178.
- Moreda, J.M., Arranz, A., Fdez de Betono, S., Cid, A. & Arranz, J.F. (1998) Chromatographic determination of aliphatic hydrocarbons and polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in a sewage sludge. *The Science of the Total Environment.*, **220**, 33-43.
- Mulder, M.M., Van der Hage, E.R.E. & Boon, J.J. (1992) Analytical in source pyrolysis methylation electron impact mass spectrometry of phenolic acids in biological matrices. *Phytochemistry Analytical*, **3**, 165-172.
- Navas, A., Bermudez, F. & Machin, J. (1998) Influence of sewage sludge application on

- physical and chemical properties of Gypsisols. *Geoderma*, **87**, 123-135.
- Osburn, Q.W. (1986) Analytical methodology for linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in waters and wastes. *Journal of American Soil Chemistry Society*, **63**, 257-263.
- Pagliai, M. & Vittori Antisari, L. (1993) Influence of waste organic matter on soil micro- and macrostructure. *Bioresource Technology*, **43**, 205-213.
- Pavoni, J.L., Tenney, M.W. & Echelberger, W.F. (1972) Bacterial extracellular polymers and biological flocculation. *Journal of Water Pollution Control Federal*, **44**(3), 414-431.
- Perales, J.A., Manzano, M.A., Sales, D. & Quiroga, J.M. (1999) Linear alkylbenzene sulphonates: biodegradability and isomeric composition. *Bulletin of Environmental and Contaminant Toxicology*, **63**, 94-100.
- Pere, J., Alen, R., Viikari, L. & Eriksson, L. (1993) Characterization and dewatering of activated sludge from the pulp and paper industry. *Water Science and Technology*, **28**(1), 193-201.
- Perez, S., Guillamon, M. & Barcelo, D. (2001) Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from wastewater treatment plants. *Journal of Chromatography A*, **938**, 57-65.
- Piccolo, A., Zaccheo, P. & Genevini, P.G. (1992) Chemical characterization of humic substances extracted from organic-waste-amended soils. *Bioresource Technology*, **40**, 275-282.
- Prats, D., Ruiz, F., Vasquez, B., Zarzo, D., Berna, J.L. & Moreno, A. (1993) LAS homolog distribution shift during wastewater treatment and composting: ecological implications. *Environmental Toxicological Chemistry*, **12**, 1599-1608.
- Rao, K.S., Dominic, R., Singh, K., Kaluwin, C., Rivett, D.E. & Jones, G.P. (1990) Lipid fatty acid, amino acid and mineral compositions of five edible plant leaves. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **38**, 2137-2139.
- Rahman, M.S., Parreno, M., Bosi, R., Paya-Perez, A.B. & Larsen, B. (1998) Chlorobiphenyls in sewage sludge: a comparison of extraction methods. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **360**, 556-563.
- Rapaport, R.A. & Eckhoff, W.S. (1990) Monitoring linear Alkyl benzene sulfonate in the environment: 1973-1986. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**, 1245-1257.
- Renner, R. (1997) European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environment Science and Technology*, **31**, 316-320.
- Réveillé, V. (2001) Caractérisation de mélanges sol/boues: complexe d'échange, matière

- organique et répartition des métaux., mémoire de thèse en Science et Techniques de l'Environnement, 277 p. Université de Paris XII- Val de Marne.
- Rhee, G.-Y., Bush, B., Brown, M.P., Kane, M. & Shane, L. (1989) Anaerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in Hudson river sediments and dredged sediments in clay encapsulation. *Water Research*, **23**, 957.
- Riffaldi, R., Levi-Minzi, R. & Saviozzi, A. (1983) Humic fractions of organic wastes. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **10**, 353-359.
- Riley, C.E. (2001) Method development and implementation for co-planar polychlorinated biphenyls (PCBs). *Waste Management*, **21**, 465-470.
- Rogers, H.R. (1996) Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. *The Science of the Total Environment*, **185**, 3-26.
- Rogers, H.R., Campbell, J.A., Crathorne, B. & Dobbs, A.J. (1989) The occurrence of chlorobenzenes and permethrins in twelve U.K. sewage sludges. *Water Research*, **23**(7), 913-921.
- Rumphorst, M.P. & Ringel, H.D. (1994) Pyrolysis of sewage sludge and use of pyrolysis coke. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **28**, 137-155.
- Saiz-Jimenez, C. (1995) The origin of alkylbenzenes and thiophenes in pyrolysates of geochemical samples. *Organic Geochemistry*, **23**(1), 81-85.
- Sanchez-Monedero, M.A., Roig, A., Cegarra, J. & Bernal, M.P. (1999) Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting. *Bioresource Technology*, **70**, 193-201.
- Sandford, P.A. & Conrad, H.E. (1966) The structure of *Aerobacter aerogenes* A3(S1) polysaccharide I. A re-examination using improved for methylation analysis. *Biochemistry*, **5**, 1508-1517.
- Sato, T. & Ose, Y. (1980) Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxide solution. *Water Research*, **14**, 333-338.
- Sauvegrain, P. (1981a) Les Micropolluants organiques dans les eaux superficielles continentales. Rapport n°1: Les pesticides organochlorés, pp. 41-46.
- Sauvegrain, P. (1981b) Les Micropolluants organiques dans les eaux superficielles continentales. Rapport n°2: Les pesticides organochlorés et autres, pp. 65-67.
- Schöberl, P. (1989) Basic principles of LAS biodegradation. *Tenside Surfactant Detergents*, **26**, 86-94.
- Scott, M.J. & Jones, M.N. (2000) The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1508**, 235-251.

- Seguel, C.G., Mudge, S.M., Salgado, C. & Toledo, M. (2001) Tracing sewage in the marine environment: altered signatures in concepcion bay, Chile. *Water Research*, **17**, 4166-4174.
- Senesi, N., D'Orazio, V. & Miano, T.M. (1995) Adsorption mechanisms of s-triazine and bipyridylum herbicides on humic acids from hop field soils. *Geoderma*, **66**.
- Senesi, N., Miano, T.M. & Brunetti, G. (1996) Humic-like substances in organic amendments and effect on native soil humic substances. In: *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems* (Ed. by A. Piccolo), pp. 14.
- Sheintuch, M., Lev, O., Einav, P. & Rubin, E. (1986) Role of exocellular polymer in the design of activated sludge. *Biotechnology and Bioengenergy*, **28**, 1564-1576.
- Sommers, L.E. (1977) Chemical composition of sewage sludges and anlysis of their potential use as fertilizers. *Journal of Environmental Quality*, **6**, 225-232.
- Steelink, C. (1985) Implications of Elemental Characteristics of Humic Substances. In: *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water- Geochemistry, Isolation and Characterization* (Ed. by D. M. M. George R. Aiken, Robert L. Wershaw and Patrick Maccarthy), pp. 457-476. Wiley-Intersciences, New York.
- Stevens, J.L., Green, N.J.L., Bowater, R.J. & Jones, K.C. (2001) Interlaboratory comparison exercise for the analysis of PCDD/Fs in samples of digested sewage sludge. *Chemosphere*, **45**, 1139-1150.
- Stevenson, F.J. (1994) *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. John Wiley and Sons, New York.
- Sulkowski, W. & Rosinka, A. (1999) Comparison of the efficiency in extraction methods for polychlorinated biphenyls from environmental wastes. *Journal of Chromatography A.*, **845**, 349-355.
- Swift, R.S. (1996) Organic matter characterization. In: *Methods of soil analysis* (Ed. by D. L. SEA), pp. 1018-1020. Soil science society of america, Madison.
- Swischer, R.D., Kaelbe, E.F. & Liu, S.K. (1961) Capillary gas chromatography of phenyldodecane alkylation and isomerisation mixtures. *Journal of Organic Chemistry*, **346**, 281-290.
- Synovec, R.E. & Yeung, E.S. (1986) Fluorescence detected circular dichroism as a detection principle in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.*, **368**, 85-93.
- Takada, H. & Ishiwatari, R. (1985) Quantitation of long-chain alkylbenzenes in

- environmental samples by silica gel column chromatography and high-resolution gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **346**, 281-290.
- Takada, H. & Ishiwatari, R. (1987) Linear alkylbenzenes in urban riverine environments in Tokyo: distribution, sources and behavior. *Environment Science and Technology*, **21**, 875-883.
- Takada, H. & Eganhouse, R.P. (1998) Molecular markers of anthropogenic waste. In: *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation* (Edited by R. A. Meyers), pp. 2883-2940. John Wiley & Sons.
- Tunlid, A. & White, D.C. (1990) Use of lipid biomarkers in environmental samples. In: *Analytical Microbiology Methods* (Edited by P. Press), pp. 259-274. Fox Alvin.
- Unsal, T. & Sozudogru Ok, S. (2001) Description of characteristics of humic substances from different waste materials. *Bioresource Technology*, **78**, 239-242.
- Urbain, V., Block, J.C. & Manem, J. (1993) Biofloculation in activated sludge : an analytical approach. *Water Research*, **27**, 829-838.
- Veeken, A., Nierop, K., de Wilde, V. & Hamelers, B. (2000) Characterization of NaOH-extracted humic acids during composting of a biowaste. *Bioresource Technology*, **72**, 33-41.
- Voorhees, K.J., Basile, F., Beverly, M.B., Abbas-Hawks, C., Hendricker, A., Cody, R.B. & Hadfield, T.L. (1997) The use of biomarker compounds for the identification of bacteria by pyrolysis-mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **40-41**, 111-134.
- Walker, R.W., Wun, C.K. & Litsky, W. (1982) Coprostanol as an indicator of fecal pollution. *Critical Reviews in Environmental Control*, **10**(91-112).
- Wang, M.J. & Jones, K.C. (1991) Analysis of chlorobenzenes in sewage sludge by capillary gas chromatography. *Chemosphere*, **23**(5), 677-691.
- Ward, T.E. & Larson, R.J. (1989) Biodegradation kinetics of linear alkylbenzene sulfonate in sludge-amended agricultural soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **17**, 119-130.
- Webber, M.D. & Lesage, S. (1989) Organic contaminants in Canadian municipal sludges. *Waste Management and Research*, **7**, 63-82.
- Webber, M.D., Rogers, H.R., Watts, C.D., Boxall, A.B.A., Davis, R.D. & Scoffin, R. (1996) Monitoring and prioritisation of organic contaminants in sewage sludges using specific chemical analysis and predictive, non-analytical methods. *The Science of the Total Environment*, **185**, 27-44.

- Weil, J.H. (1994) *Biochimie générale*, Paris.
- Wild, S.R. & Jones, K.C. (1992) Organic chemicals entering agricultural soils in sewage sludges: screening for their potential to transfer to crop plants and livestock. *The Science of the Total Environment*, **119**, 85-119.
- Wild, S.R. & Jones, K.C. (1995) Polynuclear aromatic hydrocarbons in the united kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution*, **88**, 91-108.
- Wilson, M.A. & Hatcher, P.G. (1988) Detection of tannins in modern and fossil barks and in plant residues by high-resolution solid state <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. *Organic Geochemistry*, **12**, 539-546.
- Writer, J.H., Leenheer, J.A., Barber, L.B., Amy, G.L. & Chapra, S.C. (1995) Sewage contamination in the upper Mississippi river as measured by the fecal sterol, coprostanol. *Water Research*, **29**(6), 1427-1436.
- Zang, X., Van Heemst, J.D.H., Dria, K.J. & Hatcher, P.G. (2000) Encapsulation of protein in humic acid from histosol as an explanation for the occurrence of organic nitrogen in soil and sediment. *Organic Geochemistry*, **31**, 679-695.



**DEUXIÈME PARTIE**  
**DESCRIPTION DES ECHANTILLONS ET**  
**DES METHODES ANALYTIQUES**



## **I. INTRODUCTION**

L'objectif de ce chapitre est de décrire les échantillons étudiés et de présenter tous les protocoles et techniques utilisés au cours de cette thèse. Compte tenu de la complexité de la matière organique des boues, il est nécessaire d'effectuer des traitements préalables aux analyses pour séparer la matière organique en une fraction extractible dans les solvants organiques (FOS) et en une fraction insoluble (FOI). La FOS est ensuite séparée par chromatographie liquide en trois sous-fractions. Puis, des analyses chromatographiques sont effectuées afin d'étudier la matière organique des boues à l'échelle moléculaire.

## **VI. DESCRIPTION DES ECHANTILLONS**

Les échantillons étudiés sont des boues de stations d'épuration lorraines. La campagne d'échantillonnage a été initiée avec la collaboration des missions de valorisation agricole des Chambres Départementales d'Agriculture de Meuse, de Meurthe et Moselle et de Moselle, de la Chambre Régionale d'Agriculture de Lorraine, et de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse. Celles-ci nous ont fourni une liste de stations d'épuration nous permettant d'évaluer l'influence de différents paramètres (capacité des stations, localisation des stations, traitements d'eaux domestiques, agro-alimentaires ou industrielles, mode de traitement des boues...). Une cinquantaine de points d'échantillonnage a été retenue afin d'avoir un ensemble de boue représentatif de la région Lorraine. Les principales caractéristiques des boues sont décrites dans le tableau II.1.

	<i>Symbole</i> <sup>1</sup>	<i>Eqhab</i> <sup>2</sup>	<i>Type de station</i>	<i>Traitement</i> <sup>3</sup>	<i>Type de boue</i>	<i>Epandage</i>
Aingeray (54)	SU1	4200	Petite urbaine	BA/ AP	liquides	Oui
Audun le Tiche (57)	U1	24500	urbaine	BA/ AP/ DA/ DPC	filtre presse	Non
Baccarat (54)	SU2	3800	Petite urbaine	BA	épaississeur: pâteuses	Non
Baleycourt (55)	FP1	150000	Laiterie (80%) et industrie (20%)	BA	pâteuses (filtre presse)	Oui
Bouxières (54)	SU3	5800	Petite urbaine	BA/ AP/ DPC	pâteuses	Retraitées à Forbach
Carling (57)	SU4				liquides	Oui
Château-Salins (57)	SU5	3375	Petite urbaine	BA/ AP/ DPC	épaissies	Oui
Clairefontaine (88)	PM1	4500 m <sup>3</sup> /j	Papeterie		pâte à papier	Non
Clairefontaine compost (88)	PM2	4500 m <sup>3</sup> /j	Compost papeterie		compost	Oui
Colligny (57)	L1	477	lagunage			Oui
Commercy (55)	U2	11200	urbaine	BA/ DA/ DPC	filtre bande	Oui
Créhange (57)	U3	16166	urbaine	BA/ AP	déshydratées (bande)	Oui
Dieue/Meuse (55)	FP2		Fromagerie	Lit bactérien	pâteuses	Oui
Dombasle (54)	SU6	7400	Petite urbaine	BA/ AP	pâteuses	Oui
Florange (57)	U4	65000	urbaine		digérées déshydratées	Non
Forbach (57)	U5	44333	urbaine	BA/ AP/ DA/ DPC	déshydratées	Oui
Kerbach (57)	U6	22000	urbaine	BA/ AP	filtre presse	Oui
Liverdun (54)	U7	21000	urbaine	BA/ AP	pâteuses	Oui
Longwy (54)	U8	49635	urbaine	BA/ DPC	pâteuse chaulées	Oui
Louvigny (57)	R1	1150	rurale	BA/ AP	déshydratées chaulées	Oui
Lunéville (54)	U9	33300	urbaine	LBI	déshydratées	Non (HPA>)
Maxéville 1 séché (54)	U10a	480000	urbaine	BA	séchées	Oui
Maxéville 2 digérée	U10b				digérées	
Maxéville 3	U10c				liquides (bassin primaire)	
Maxéville 4	U10d				pâteuses	
Maxéville 5 (54)	U10e				liquides (recirculation)	
Merlebach (57)	SU7				déshydratées (bande)	Non
Metz biologique (57) <sup>d</sup>	U11a	340000	urbaine	BA/ DA/ DPC	bassin bio (liquides)	Non
Metz primaire (57) <sup>d</sup>	U11b				épaississeur: pâteuses	Non

Mirecourt INRA 1 (88)	M1		Fumier			
Mirecourt INRA 2 (88)	M2		Compost		compost de fumier	
Morhange (57)	SU8	8300	Petite urbaine	BA/ AP	liquides	Oui
Piennes (54)	R2	2000	rurale	BA/ AP	pâteuses	Oui
Pierrepont (54)	R3	1600	rurale	BA/ AP	pâteuses	Oui
Rambervillers papeterie (88)	PM3	5500m <sup>3</sup> /j	papeterie		pâte à papier	Oui
Raon (88)	U12	16187	Petite urbaine	BA/AP/ DA/ DPC	pâteuses chaulées	Oui
Raon papeterie (88)	PM4	2880 m <sup>3</sup> /j	Papeterie		pâte à papier	Oui
Remilly (57)	SU9	3500	Petite urbaine	BA/ AP	liquides	Oui
Schorbach (57)	R4	550	rurale	BA	liquides	Oui
Senoble (57)	FP3		fromagerie	BA	grille d'épaississement	Oui
St Avold (57)	SU10	3500	Petite urbaine	BA/ AP/ DA/ DPC	déshydratées	Oui
St Mihiel (55)	SU11	9000	Petite urbaine		grille d'épaississement	Oui
Thionville (57)	U13	83000	Urbain	BA	pâteuses (filtre)	Oui
Toul (54)	U14	25375	urbaine	BA/ DA/ DPC	déshydratées chaulées	Oui
Tronville (55)	U15	15000	Urbaine		liquides	Oui
UPK Kimène Docelles (88)	PM5	3200 m <sup>3</sup> /j	Papeterie		pâte à papier chaulée	Oui
Verdun (55)	U16	52500	Urbaine			Oui
Woutsviller (57)	SU12	4200	Petite urbaine	BA/ AP	liquides	Oui

Tableau II.1. Caractéristiques des boues étudiées

<sup>1</sup>U pour boues urbaines, SU pour semi-urbaines, R pour rurales, PM pour boues de papeterie, FP pour boues agro-alimentaires (laiterie ou fromagerie), M pour fumier et L pour lagunage. Les différences entre les boues urbaines, semi-urbaines et rurales sont basées sur la capacité des stations : une boue est dite rurale quand la capacité est inférieure à 2000 eqhab, petite urbaine quand la capacité est entre 2000 et 10000 eqhab et urbaine quand la capacité est supérieure à 10000 eqhab.

<sup>2</sup>Eqhab= équivalent habitant, qui correspond aux quantités journalières de pollutions prises en compte pour un habitant. Ces quantités sont de l'ordre de :

- 90g de MES (Matière Sèche en Suspension)
- 60g de DBO5 (quantité d'oxygène nécessaire aux micro-organismes contenus dans l'eau pour oxyder une partie des matières carbonées pendant 5 jours. Elle représente la quantité de pollution biodégradable).
- 15 g d'azote
- 4g de phosphore
- 150 à 200 litres d'eaux usées.

<sup>3</sup>BA: boue activée ; AP: aération prolongée ; DA: dénitrification par anoxie, DPC: déphosphatation physico-chimique, LBI: lit bactérien immergé.

<sup>4</sup>U11a and U11b correspondent respectivement à la boue primaire et secondaire de cette station urbaine.

## VII. DESCRIPTION DES MÉTHODES UTILISÉES

### VII.1. Traitement des échantillons avant analyse

#### VII.1.1. Préparation des échantillons

Les échantillons de boues collectés dans les stations d'épurations se présentent sous forme liquide ou pâteuse dans la majorité des cas avec une siccité assez faible (ne dépassant pas 30%). La première étape consiste donc à sécher les échantillons afin d'éliminer l'eau absorbée et adsorbée. Pour ce faire, après prélèvement, les échantillons ont été congelés pendant 5 jours. Ils ont ensuite été lyophilisés pendant 10 jours, puis broyés et tamisés afin d'obtenir une poudre homogène de granulométrie inférieure à 500  $\mu\text{m}$ .

#### VII.1.2. Extraction et fractionnement

##### I.1.1.2. *Méthode d'extraction*

La méthode d'extraction la plus utilisée dans la littérature pour la caractérisation des micropolluants organiques est l'extraction au Soxhlet. Cependant les principaux inconvénients du Soxhlet sont une grande consommation de solvant organique, ainsi que des durées d'extraction extrêmement longues. Trois systèmes d'extraction de la fraction organique sont disponibles dans notre laboratoire : l'extraction au Soxhlet et par agitation au ballon (*ces deux méthodes ont été décrites dans la première partie- synthèse bibliographique*) ainsi que la technique d'extraction accélérée aux solvants (ASE200 par Dionex™). Ce système d'extraction accélère les processus traditionnels en utilisant des solvants à des températures élevées. Une haute pression est alors nécessaire pour maintenir le solvant à l'état liquide. L'automatisation de cet appareil permet un gain de temps important (en moyenne, une extraction dure 15 à 20 minutes) et une parfaite reproductibilité (Li *et al.*, 2002). L'appareillage comporte une cellule d'extraction en acier reliée à un système de chauffage et de pompe (figure II.1) contrôlé électroniquement afin de maintenir les conditions de température et de pression sélectionnées.

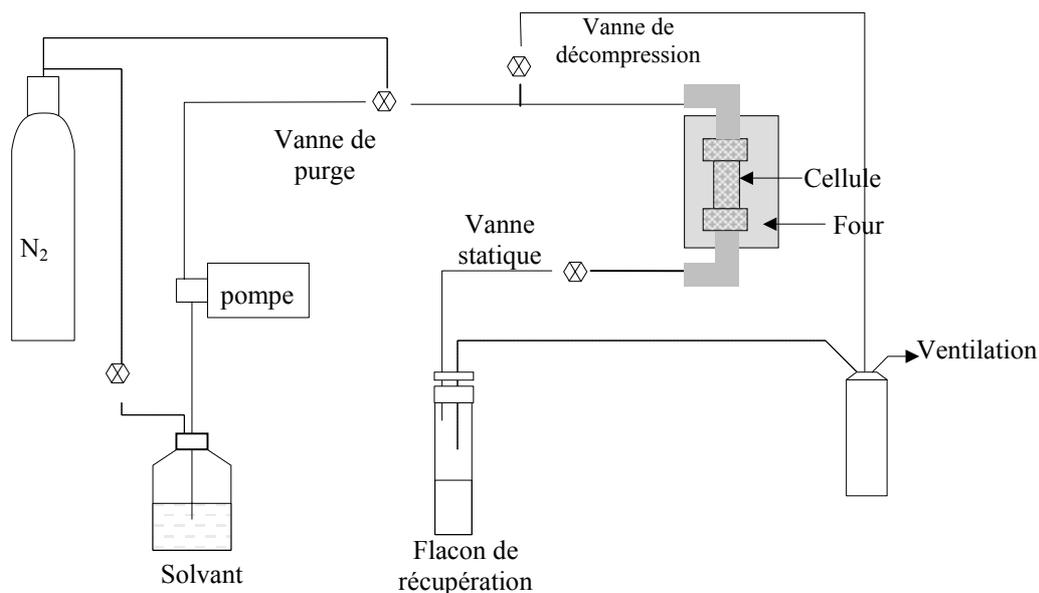


Figure II.1. Appareillage mis en œuvre pour l'extraction accélérée par solvants

Les étapes de l'extraction sont les suivantes :

- dépôt de l'échantillon dans la cellule : 2 à 5 g d'échantillons sont introduits dans une cellule préalablement remplie au 1/3 par des billes de silice afin d'augmenter la dispersion de l'échantillon et ainsi obtenir un rendement d'extraction optimum,
- chargement automatique de la cellule dans le système,
- remplissage de la cellule avec le solvant et pressurisation (100 bars),
- chauffage de la cellule à 80°C,
- extraction en mode statique (pas de flux de solvant à travers la cellule),
- transfert de l'extrait vers le flacon de récupération et lavage de la cellule et des tubulures à l'aide d'un petit volume de solvant frais,
- purge du système à l'aide d'un flux de gaz pressurisé,
- retour de la cellule dans le carrousel.

Afin de déterminer le solvant le plus efficace pour l'extraction des boues d'épuration, des tests ont été effectués sur l'échantillon de la boue de Maxéville - U10a (54). Notre objectif est d'analyser la fraction lipidique dans sa totalité, il est alors nécessaire de tester différents solvants afin de choisir celui qui permettra d'obtenir le meilleur taux d'extraction. Nous avons

comparé les résultats obtenus avec les solvants utilisés dans le cadre de la norme française et d'autres solvants organiques ou mélanges de solvants habituellement utilisés au sein du laboratoire. Chaque extraction est répétée trois fois afin de calculer des rendements d'extraction moyens. Les résultats sont résumés dans le tableau II.2. Au vu des résultats, le solvant choisi est le mélange dichlorométhane/méthanol (65/35) qui permet d'obtenir un taux d'extraction deux fois plus élevé qu'avec l'acétone, le chloroforme et l'éther de pétrole.

<i>Solvant utilisé</i>	<i>Rendement d'extraction moyen (% poids de l'échantillon initial)</i>
Acétone <sup>1</sup>	2,2 +/- 0,26
Acétone/Ether de pétrole (50/50) <sup>1</sup>	2,7 +/- 0,13
Chloroforme <sup>2</sup>	1,2 +/- 0,08
Chloroforme/Méthanol (50/50) <sup>3</sup>	3,5 +/- 0,17
Méthanol	3,4 +/- 0,09
Dichlorométhane/Méthanol(65/35)	5,2 +/- 0,15

Tableau II.2. Comparaison de l'efficacité de différents solvants pour l'extraction des boues.

<sup>1</sup> Solvants préconisés par l'arrêté du 8 janvier 1998 pour l'extraction des HPAs et des PCBs.

<sup>2</sup> Solvant très couramment utilisé en géochimie organique pétrolière.

<sup>3</sup> Le méthanol est utilisé pour les échantillons contenant de l'eau car celle-ci est soluble dans le méthanol.

Les trois méthodes d'extraction à notre disposition au laboratoire ont également été testées et comparées sur la boue de Maxéville (U10a) avec le mélange dichlorométhane-méthanol (65/35). Chaque extraction est répétée trois fois afin de calculer les rendements d'extraction moyens, qui sont résumés dans le tableau II.3.

<i>Méthode utilisée</i>	<i>Moyenne des rendements d'extraction (%)</i>
Extraction accélérée ASE200	5,2 +/- 0,15
Soxhlet (24h)	4,7 +/- 0,25
Extraction par agitation au ballon (45 min)	4,4 +/- 0,20

Tableau II. 3. Comparaison de trois méthodes d'extraction sur la boue de Maxéville (54) en utilisant un mélange DCM/M (65/35)

L'extraction accélérée par ASE200 donne les meilleurs résultats en terme de rendements d'extraction. (Abrha & Raghavan, 2000) ont comparé l'extraction au Soxhlet avec l'ASE pour l'analyse des PCBs, les résultats montrent que les deux méthodes permettent d'obtenir des taux de recouvrement équivalents pour les PCBs. Néanmoins, l'ASE est souvent préférée car l'automatisation de cet appareil permet un gain de temps très important et une consommation de solvant plus faible; en moyenne une extraction par ASE prend 15 à 20 minutes, contre 45 minutes avec l'extraction par agitation au ballon et 24h avec le Soxhlet.

C'est donc l'extraction accélérée qui a été retenue pour notre étude et grâce à son automatisation, chaque échantillon est extrait jusqu'à ce que le solvant soit incolore (en moyenne 4 extractions par échantillon). Ainsi, cette méthode permet de séparer la fraction organique soluble dans les solvants organiques (FOS) de la fraction organique insoluble (FOI).

### ***I.1.1.3 Fractionnement de FOS***

Après la phase d'extraction, les FOS sont reconcentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif Büchi Rotavapor R110 à une température de 45 °C, puis séchées à température ambiante sous un faible flux d'argon pour éviter l'oxydation des composés avant d'être pesées. Les FOS sont ensuite fractionnées en différentes familles. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, dans la littérature, cette séparation se fait le plus souvent par chromatographie liquide sur microcolonne. La méthode de fractionnement de FOS développée dans notre laboratoire est issue des méthodes de géochimie pétrolière correspondant à un fractionnement en composés aliphatiques, aromatiques et polaires sur microcolonnes de silice et d'alumine. Cette méthode a été appliquée aux échantillons de boues d'épuration. La fraction aliphatique comporte essentiellement les alcanes ; les hydrocarbures aromatiques sont majoritairement constitués des LABs, des HPAs, et les composés polaires regroupent les acides gras, les stéroïdes, des composés oxygénés comme les phénols, des composés azotés comme les indoles ou les pyrimidines.

La séparation consiste à fractionner l'extrait sur une microcolonne contenant de l'alumine activée (1,4 g) 1 heure à 150°C (figure II.2). La FOS est diluée dans du dichlorométhane (0,3 ml) et injectée dans la microcolonne. L'éluat, constitué par les hydrocarbures (aliphatiques et aromatiques) est récupéré dans un flacon préalablement pesé avec 4 ml de dichlorométhane. Les composés plus polaires, piégés en tête de colonne, sont élués avec 7 ml de mélange méthanol/dichlorométhane (50/50).

Le mélange d'hydrocarbures est repris avec 0,3ml de *n*-pentane, puis passé sur une microcolonne de silice activée (1 g) 1 heure à 150°C. La fraction aliphatique est alors récupérée dans un flacon avec 3,5 ml de *n*-pentane, puis les composés aromatiques sont récupérés avec 2,5 ml de mélange *n*-pentane/dichlorométhane (65/35). Les composés peu polaires sont récupérés avec 10 ml de mélange méthanol/dichlorométhane (50/50) dans le flacon contenant déjà les composés les plus polaires.

Les solvants contenus dans chaque flacon sont évaporés à température ambiante sous un faible flux d'argon, puis les flacons sont pesés. Toutes les pesées ont été effectuées à l'aide d'une balance Mettler AT 201 avec une précision d'affichage de 0,01 mg.

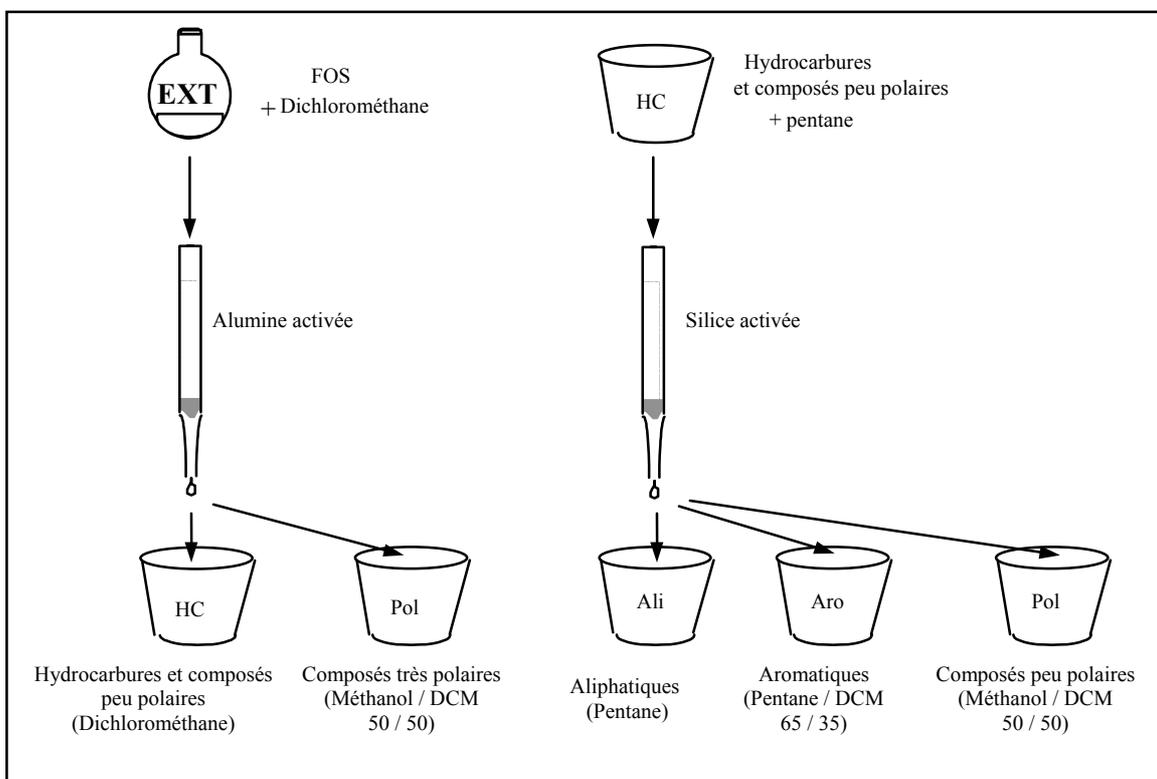


Figure II.2. Constitution des extraits par chromatographie liquide

## VII.2. Analyses moléculaires

Les fractions préparées précédemment restent des mélanges complexes qui nécessitent l'utilisation de techniques de chromatographie en phase gazeuse pour séparer à l'échelle moléculaire les différents composés constituant la matière organique. Plusieurs modes d'injection sont utilisés suivant la fraction organique à analyser. Les FOS et les différentes fractions séparées sont injectées directement, tandis que la caractérisation moléculaire des produits lourds (FOI) nécessite préalablement de casser leur structure par pyrolyse.

## VII.2.1. Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC/MS)

### L'appareillage

Les analyses chromatographiques sont effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard HP 5890 série II couplé à un spectromètre de masse Hewlett-Packard HP 5971A. L'injecteur utilisé est un injecteur Split-Splitless maintenu à une température de 300°C. La séparation chromatographique est réalisée avec une colonne capillaire en silice fondue DB-5 J&W Scientific (longueur : 60 m ; diamètre: 0,25 mm ; épaisseur de film : 0,1 µm) à phase non polaire (5% phényl-méthylpolysiloxane) selon le programme de température suivant: 40°C-130°C à 15°C/min, 130°C-300°C à 3°C/min, palier de 15 min à 300°C, le débit d'hélium étant constant à 1 ml/min.

Le chromatographe est couplé au spectromètre de masse par une ligne de transfert chauffée à 300°C. Le gaz vecteur est éliminé par pompage (le vide dans le spectromètre de masse est inférieur à  $10^{-5}$  Torr) alors que les molécules arrivant successivement dans la chambre d'ionisation sont bombardées par un faisceau d'électrons à 70 eV. Les molécules séparées se fragmentent en ions moléculaires qui eux-mêmes vont continuer à se fragmenter ou se réarranger pour former des ions positifs plus petits ou des molécules neutres.

Les ions sont ensuite accélérés par une forte différence de potentiel, concentrés en un faisceau grâce à une série de lentilles utilisant des champs électromagnétiques et envoyés à travers le spectromètre de masse. Il s'agit d'un quadropôle constitué de deux pôles positifs et deux pôles négatifs. Les ions, sélectionnés selon le rapport masse/charge, vont ensuite frapper un détecteur (multiplicateur d'électron et amplificateur connectés à un système informatique d'acquisition).

Deux modes d'analyses sont possibles :

- l'analyse en mode «Fullscan» permet d'enregistrer les ions dont le rapport masse/ charge est compris entre  $m/z = 50$  et 550. Ce mode de détection permet d'analyser et d'enregistrer l'ensemble des ions produits par l'ionisation des composés. Cette méthode est utilisée pour identifier les composés présents dans les fractions à analyser. Chaque pic chromatographique donne lieu à un spectre de masse caractéristique de la structure du composé. Il est constitué de

l'ion moléculaire, de l'ion caractéristique et des fragments générés lors de la collision avec les électrons. L'ion caractéristique est spécifique à chaque composé ou famille de composés et peut être identique à l'ion moléculaire. Ces spectres de masse et les temps de rétention des composés permettent d'identifier les molécules présentes sur les chromatogrammes. L'appel successif sur l'écran de l'ordinateur de l'ion caractéristique d'un composé ou d'une suite d'ions de composés appartenant à une même famille permet de travailler uniquement sur la distribution souhaitée et, dans certains cas, de supprimer les éventuelles interférences liées à la présence d'autres composés (coélution).

- L'analyse en mode «SIM» (Single Ion Monitoring) permet de détecter certains ions possédant des rapports masse/charge ( $m/z$ ) prédéterminés et sélectionnés. Ce mode de détection permet d'augmenter la sensibilité du détecteur et ainsi d'analyser avec plus de précision les distributions de certaines familles de composés.

#### Modes d'injection:

Deux modes d'injection différents ont été utilisés en fonction de la nature chimique des composés à analyser : injection directe (a) ou injection après dérivation par méthylation liquide (b).

- (a) Les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques sont dissous dans de l'hexane à une concentration de 4 mg/ml et 0,5  $\mu$ l de solution est injecté dans le chromatographe.
- (b) Les composés polaires renferment des molécules qu'il est difficile d'analyser directement, car les molécules trop polaires sont mal séparées avec les colonnes chromatographiques utilisées en routine dans le laboratoire. De plus, les molécules les plus polaires restent piégées en tête de colonne et ne sont, de ce fait, pas détectées. Des techniques de dérivation permettent de diminuer la polarité des molécules et ainsi d'améliorer la résolution chromatographique (Metcalfe, 1974). La méthylation avec le TMAH 0,2 M dans du méthanol permet de remplacer l'hydrogène actif des fonctions acides par un groupement méthyle, ce qui diminue fortement la polarité des molécules.

Pour effectuer cette réaction, les fractions polaires sont diluées à une concentration de 4mg/ml avec du TMAH 0,2M dans du méthanol (Supelco). Ensuite, 0,5µl de la solution est introduit dans l'injecteur du chromatographe. La figure II.3 présente les chromatogrammes de U10a avec et sans méthylation et montre d'une part que la résolution chromatographique est clairement améliorée après dérivatisation, et d'autre part que la détection des acides alcanoïques et des stéroïdes est améliorée après méthylation.

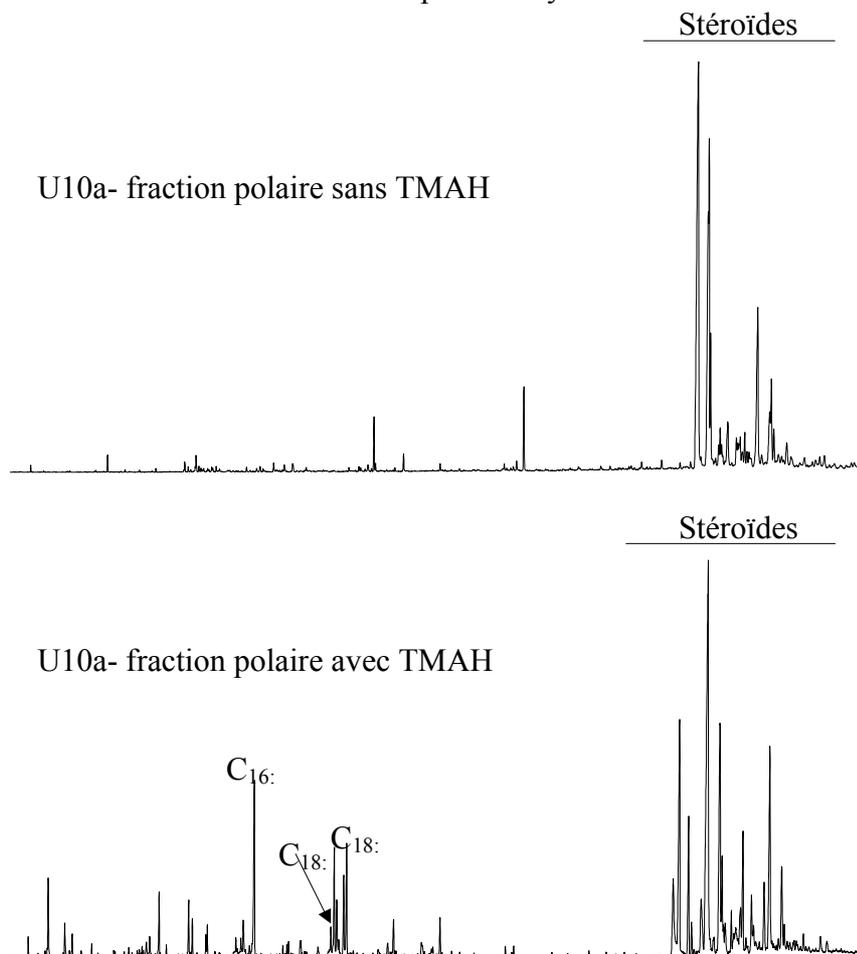


Figure II.3. Comparaison des chromatogrammes de composés polaires bruts et méthylés.

### VII.2.2. Le couplage pyrolyse flash-chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (Py-GC/MS)

La pyrolyse est la dégradation thermique d'un matériel dans une atmosphère inerte, à l'opposé de la combustion qui est une réaction chimique où le matériel réagit avec l'oxygène de l'air (Saiz-Jimenez, 1994b). La pyrolyse analytique est une méthode de dégradation thermique à petite échelle des matières organiques en absence d'oxygène. Cette technique couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse est un puissant

outil pour la caractérisation des macromolécules organiques, et notamment pour celles qui ne peuvent pas être directement analysées en chromatographie gazeuse. En plus des coupures de liaison, la pyrolyse peut entraîner des déshydratations, des réarrangements ou des formations de liaisons. Les composés produits, de faible poids moléculaire, sont séparés par chromatographie gazeuse et identifiés par spectrométrie de masse. Chaque fragment peut être attribué à une classe de polymères organiques, un même fragment pouvant avoir plusieurs origines. L'origine des fragments est déterminée à partir de la bibliographie ou par comparaison avec la pyrolyse de composés standards.

Cette technique a été utilisée pour la caractérisation de matières organiques récentes telles que les substances humiques des sols (Saiz-Jimenez & de Leeuw, 1986; Schulten & Schnitzer, 1992; Van Bergen *et al.*, 1997) ou les boues de stations d'épuration (Barrio *et al.*, 1996; Miikki *et al.*, 1999; Tienpont *et al.*, 2001; Réveillé *et al.*, 2002). La pyrolyse analytique va toutefois permettre la libération de composés qui ne sont pas assez volatiles pour passer à travers la colonne chromatographique. Ainsi les composés les moins polaires tels que les alcanes et les alkylbenzènes sont détectés et analysés, mais les composés plus polaires ne le sont pas et vont se condenser directement dans le four de pyrolyse ou vont rester bloqués en tête de colonne. Les résultats sont alors biaisés, puisque seule une partie des composés présents dans les échantillons peut être analysée (Hatcher & Clifford, 1994). Cet artefact d'analyse est d'autant plus important que les échantillons à analyser sont riches en composés polaires et en particulier en composés oxygénés.

Afin de passer outre cette difficulté, une méthode de dérivation spécifique à la pyrolyse flash (Hatcher & Clifford, 1994; Saiz-Jimenez, 1994b; Martin *et al.*, 1995; Challinor, 1996) a été mise en œuvre en utilisant du TMAH (tétraméthylammonium hydroxylé). Ce réactif permet de protéger les fonctions carboxyles et hydroxyles en créant des liaisons méthyle-ester (Hatcher & Clifford, 1994). Ainsi les acides carboxyliques sont dérivés en esters méthyliques et les groupements hydroxyles en éthers méthyliques. Cette technique va apporter plus d'informations sur la structure de l'échantillon que la pyrolyse analytique classique (Hatcher & Clifford, 1994; Martin *et al.*, 1995).

En fait, la pyrolyse en présence de TMAH consiste non pas en une pyrolyse simple, mais en une hydrolyse à haute température. Cette technique a donc été renommée sous le terme général «THM» (Thermally assisted Hydrolysis and Methylation) pour tenir compte du rôle du mécanisme d'hydrolyse (Challinor, 2001). Elle a été appliquée à la caractérisation chimique d'un grand nombre de matériaux synthétiques et naturels (Challinor, 2001) incluant entre autres des acides humiques de sédiments récents (Hatcher & Clifford, 1994; Saiz-

Jimenez, 1994a; Mansuy *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001), des macromolécules organiques (del Rio *et al.*, 1998; van den Berg & Boon, 2001; Zang *et al.*, 2001), des cires naturelles (Asperger *et al.*, 2001) et des boues d'épuration (Miikki *et al.*, 1999; Réveillé *et al.*, 2002).

Cependant son emploi se heurte à quelques difficultés. Le premier problème réside dans l'interprétation des résultats obtenus par pyrolyse avec ou sans TMAH. En effet, la pyrolyse peut causer des modifications drastiques des groupements originels de l'échantillon menant à des conclusions erronées concernant la structure de l'échantillon. Certains composés peuvent par exemple, subir des transformations au sein du pyrolyseur, tels que les acides aromatiques provenant de la lignine qui peuvent se décarboxyler (Saiz-Jimenez, 1994a; Saiz-Jimenez, 1994b). La THM permet de limiter ce problème (Saiz-Jimenez, 1995), cependant il reste souhaitable d'interpréter les pyrogrammes avec attention et de comparer les fragments obtenus avec ceux générés par des composés purs ou avec les données de la littérature. De plus un autre problème induit par la pyrolyse est que la quantité des produits de pyrolyse libérée est biaisée par une augmentation de la fraction aliphatique car ces composés sont plus facilement volatiles et moins liés aux structures polymérisées par rapport à la fraction aromatique dont la libération nécessite davantage d'énergie (Martin *et al.*, 1995). Malgré ces limitations, la pyrolyse et en particulier la THM est une technique adaptée à l'analyse des FOI qui permet de fournir une empreinte moléculaire de la structure macromoléculaire des échantillons analysés.

### Pyrolyseur:

Le pyrolyseur, un *CDS Pyroprobe 2000*, est constitué d'une interface et d'une canne chauffante. Cette canne possède un filament de tungstène dont la température peut atteindre 700°C très rapidement. Le contrôle de la température s'effectue par le biais d'un boîtier électronique qui régule l'intensité du courant qui traverse le filament préalablement calibré par *CDS analytical*. Une fois l'échantillon placé au cœur du filament, la canne est introduite dans l'interface chauffée à 200°C en continu. Le programme de température de la pyrolyse est : 25°C pendant 1 seconde, montée en température jusqu'à 620°C à 200°C/ms, palier de 15 secondes à 620°C. Les effluents générés par la pyrolyse sont ensuite transférés par le gaz vecteur (hélium) dans l'injecteur du chromatographe via l'interface.

Le mode de pyrolyse utilisé est une pyrolyse après dérivatisation in situ par méthylation (THM). Les résidus solides sont mélangés avec du TMAH dans la proportion de 1/10 en masse comme préconisé par Saiz-Jimenez (1994b). Ce mélange est placé dans un tube

en quartz introduit au cœur du filament de la canne du pyrolyseur et placé dans l'interface chauffée à 200°C. La pyrolyse est déclenchée en même temps que le programme de température du four du chromatographe. La figure II.4 présente les résultats d'analyse d'un résidu solide de boue pyrolysé avec et sans TMAH. Cet exemple illustre l'intérêt de cette méthode de dérivation, puisque l'on observe une meilleure résolution du pyrogramme.

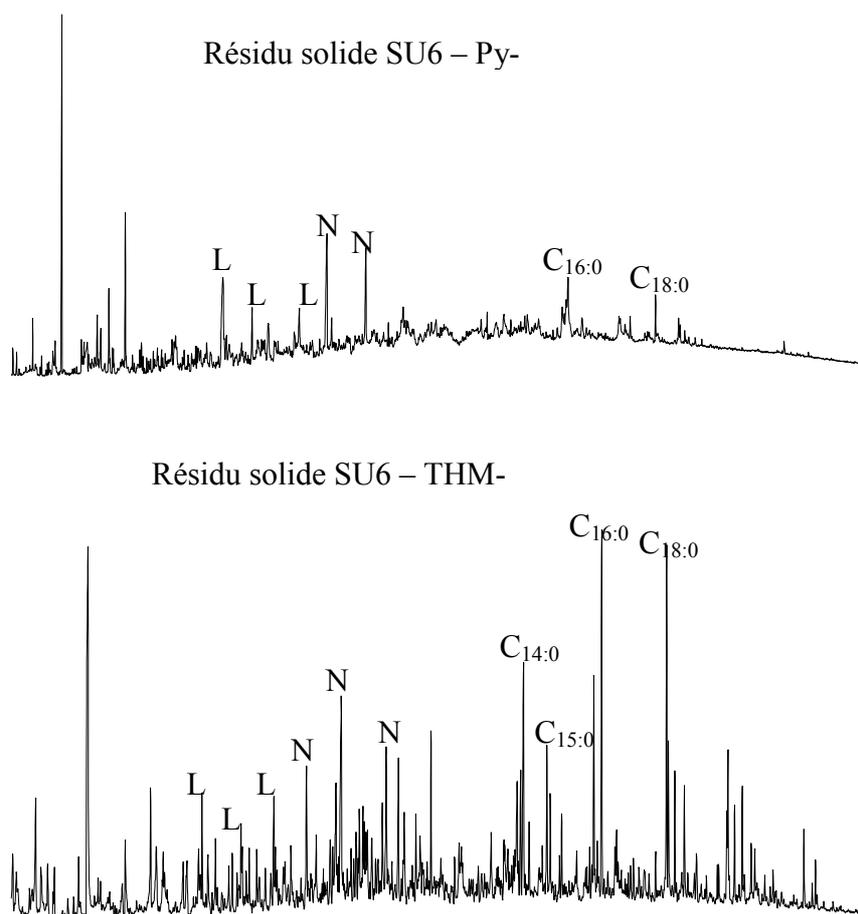


Figure II. 4. Comparaison des pyrogrammes des résidus solides bruts (par Py-GC/MS) et méthylés (par THM-GC/MS) (N: composés azotés; L: composés dérivés de la lignine)

### Couplage GC/MS:

L'analyse des fragments de pyrolyse est réalisée par un chromatographe HP 5890 série II couplé à un spectromètre de masse HP 5972. L'injecteur est un injecteur Split-Splitless maintenu à une température de 300°C. La colonne capillaire utilisée présente les mêmes caractéristiques que celles de la colonne utilisée pour le couplage GC/MS précédemment décrit.

En revanche, le programme du four est différent :

- palier à 0°C pendant 1 minute pendant la pyrolyse de l'échantillon (cryogénie),
- augmentation rapide jusqu'à 40°C (70°C/min) suivie d'un palier à 40°C pendant 6 minutes,
- augmentation de la température jusqu'à 300°C à raison de 6°C/min,
- et palier à 300°C pendant 15 minutes.

Pour améliorer la chromatographie des différents composés et surtout ceux de bas poids moléculaire, il est nécessaire de refroidir l'enceinte du chromatographe à 0°C en utilisant du CO<sub>2</sub> liquide pour que tous les composés commencent leur transfert au même moment. Le fonctionnement et le mode de détection du spectromètre de masse sont identiques à ceux décrits pour la GC/MS.

### VII.2.3. Détecteur à émission atomique (AED)

La spectroscopie d'émission atomique est une méthode d'analyse élémentaire faisant intervenir des processus de relaxation radiatifs d'atomes ou d'ions excités par l'effet d'un plasma de haute température. Deux phénomènes physiques sont concernés par l'émission atomique:

- a) la quantification des niveaux d'énergie atomique : un atome donné ne peut exister que dans des états d'énergie définis et déterminés par sa configuration électronique. Selon la condition de fréquence de Bohr, une variation d'énergie  $\Delta E$  dans l'atome donne lieu à l'absorption ou à l'émission d'un photon dont la fréquence  $\nu$  est telle que :

$$\Delta E = h\nu$$

Il existe trois principaux types de transitions spectroscopiques: l'absorption, l'émission spontanée, et l'émission stimulée. En spectroscopie d'émission atomique, ce sont les deux processus émissifs qui interviennent. Par ailleurs, il existe des transitions permises et d'autres interdites. Celles-ci sont précisées par l'intermédiaire des règles de sélection, déduites de calculs de mécanique quantique. C'est pour cette raison que l'on peut observer un spectre d'émission (présence de raies d'émission réversibles et irréversibles). Ainsi , chaque atome possède un spectre de raies caractéristique (largeur

de pic à mi-hauteur de  $10^{-3}$  à  $10^{-2}$  nm). Comme un photon est émis par atome et par transition, le spectre d'émission obtenu fournit:

- une information qualitative : longueur d'onde de la transition
- une information quantitative : nombre de photons à une longueur d'onde donnée, autrement dit, intensité de la raie d'émission

b) influence de la température : le processus d'excitation des atomes en spectroscopie d'émission, fait intervenir des collisions inélastiques avec des particules de haute énergie cinétique. L'échantillon à analyser est introduit dans la source de chaleur, de telle manière que toutes les structures organisées soient détruites et réduites à l'état d'atomes ou d'ions (éventuellement de molécules diatomiques ou d'ions moléculaires très stables). L'apport de chaleur sert également à faire passer les atomes à des niveaux excités. Les atomes excités redescendent à leur état fondamental en émettant des radiations caractéristiques. L'analyse du spectre d'émission permet de doser les différents atomes contenus dans l'échantillon.

### **Le couplage Pyrolyse flash-chromatographie en phase gazeuse-détecteur à émission atomique (Py-GC/AED)**

#### Pyrolyseur

Les analyses ont été effectuées avec un pyrolyseur SGE PYROJECTOR II. Les échantillons solides sous forme de poudre sont introduits à l'aide d'un pelletiseur. La température et la pression dans le four sont réglées à partir d'un module de contrôle. Celui-ci permet d'imposer une température constante comprise entre la température ambiante et 900°C. Le régulateur de pression est utilisé pour imposer une perte de charge entre le four de pyrolyse et l'injecteur. Ce pyrolyseur présente deux inconvénients majeurs : le remplacement régulier du liner qui collecte les poudres à analyser dans le four, une faible reproductibilité de la pyrolyse. Par ailleurs, le pyrolyseur SGE n'est pas programmable en température, mais il est possible de réaliser manuellement des rampes de température en modifiant rapidement la température de consigne sur le contrôleur. Grâce à l'inertie thermique du four de pyrolyse, la rampe de température imposée s'avère d'une répétabilité estimée à 5%, ce qui est tout à fait acceptable. Cette méthode manuelle ne permet pas de maîtriser le gradient de température mais est suffisante pour réaliser une thermodésorption des échantillons.

Pour des raisons pratiques, ce pyrolyseur a été utilisé au début du programme d'étude notamment lors de la mise au point du système de Py-GC/AED et de son application à la caractérisation des boues.

En fonction de l'information recherchée, trois paliers de température ont été retenus:

- séchage à 150°C: on élimine ainsi l'eau libre et les composés volatils éventuellement adsorbés sur l'échantillon.
- thermodésorption entre 200°C et 300°C: la température de 300°C est considérée comme une limite haute entre la thermodésorption des produits lourds, et le début de craquage des macromolécules. Ceci étant, certaines fonctions labiles (fonctions amines, carboxyliques) sont probablement détruites à cette température. Une température de 200°C libère une partie des composés thermodésorbables tout en étant moins sévère vis-à-vis des fonctions labiles. Le choix de la température dépend donc du problème à traiter.
- pyrolyse à 620°C: Cette température est très répandue en géochimie organique. Elle est liée initialement à l'utilisation de la pyrolyse au point de Curie qui impose une température de 610°C (Larter et Douglas, 1982).

### Couplage GC/AED

L'analyse des fragments de pyrolyse est réalisée par un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard HP 6890 équipé d'un injecteur split-splitless. Il est couplé à un détecteur à émission atomique Hewlett-Packard HP G2350A, seconde génération du détecteur Hewlett-Packard HP 5921A décrit par Quimby & Sullivan (1990). La séparation chromatographique est réalisée par une colonne capillaire en silice fondue DB-5 J&W Scientific (longueur 60 m, diamètre intérieur 0,25 mm, épaisseur de film 0,1 µm) à phase non polaire selon le programme de température suivant : 40°C-130°C à 15°C/min, 130°C –300°C à 3° C/min, puis palier à 300°C pendant 20 min, le débit d'hélium est constant à 1 ml/min.

L'effluent de la colonne (gaz vecteur: hélium et composés constitutifs de l'échantillon) est ensuite introduit via une ligne de transfert chauffée à 300°C dans un plasma induit par micro-ondes. Les composés sont entièrement décomposés en atomes excités par le plasma à haute énergie. En retournant à leur état fondamental, les atomes émettent un ensemble de radiations lumineuses (photons) à des fréquences caractéristiques de chaque élément. Les différentes raies d'émission sont séparées par un système optique qui comprend un réseau de

diffraction couplé à un détecteur à barrette de diode mobile. Il est ensuite possible de tracer le chromatogramme pour l'élément ciblé.

Plusieurs éléments peuvent être détectés simultanément en fonction de leurs longueurs d'onde caractéristiques et en fonction des gaz réactants nécessaires à leur détection. Ainsi, par exemple, on peut simultanément détecter le carbone (à 193 nm), le soufre (à 181nm) et l'azote (à 174 nm) avec le mélange H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. Par contre, la détection de l'oxygène (à 171 nm) se fait seule, car celle-ci utilise le mélange N<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub>. Les gaz réactants sont ajoutés à l'hélium (0,1 à 0,5 %) afin d'empêcher le carbone de se déposer sur les parois du tube à décharge (là où l'échantillon entre en contact avec le plasma). Le dépôt de carbone augmente en effet le bruit de fond et dégrade la qualité du chromatogramme. Les caractéristiques expérimentales du détecteur sont résumées dans le tableau II.4 (Vilmin, 2000).

<i>AED</i>	<i>Température de la cavité</i>	<i>310°C</i>
	Pression dans la cavité	1,5 Psi
	Pression des gaz réactants	- C496, H486, Cl479, Br478: O <sub>2</sub> = 25 Psi - C193, S181, N174 : O <sub>2</sub> = 35 Psi ; H <sub>2</sub> = 9 Psi - O171 : H <sub>2</sub> = 12 Psi ; N <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub> = 25 Psi

Tableau II.4. Caractéristiques expérimentales du détecteur à émission atomique

La mise au point de cette technique pour l'étude de sédiments récents tels que les sédiments de rivières ou les boues d'épuration a fait l'objet d'une publication publiée dans la revue *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* (cf annexe). Dans un second temps, l'acquisition d'un pyrolyseur CDS Pyroprobe 1000 a permis d'améliorer la reproductibilité des analyses et d'utiliser des conditions opératoires en tout point similaires à celles imposées en Py-GC/MS (cf. § III.2.2.) incluant une option cryogénique.

### Application

Cette technique a été appliquée à l'étude des FOI des boues de stations d'épuration en parallèle à l'analyse par Py-GC/MS. En effet la Py-GC/MS permet une analyse moléculaire des FOI, mais un certain nombre de composés restent non identifiés. Une étude complémentaire en Py-GC/AED peut s'avérer utile pour apporter des informations nouvelles : composition atomique globale, caractérisation de la distribution des composés polaires,

détection éventuelle de micropolluants et étude de leur devenir au cours des expériences de biodégradation.

### **VII.3. Analyse élémentaire**

Les résidus solides ont été caractérisés par analyse élémentaire pour doser le carbone (C), l'hydrogène (H), l'azote (N), et le soufre (S). Ces éléments sont dosés en faisant brûler l'échantillon dans un four avec un catalyseur (oxyde de chrome) et un apport d'oxygène. Divers gaz, dont le CO<sub>2</sub>, l'H<sub>2</sub>O, le SO<sub>2</sub> et des oxydes d'azote sont ainsi générés. Les gaz passent dans un tube de réduction pour transformer les oxydes d'azote en N<sub>2</sub>. Le mélange gazeux est alors séparé dans une colonne chromatographique. La détection des gaz CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, SO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub> se fait à l'aide d'un catharomètre. L'intégration des pics obtenus permet de déterminer les teneurs en C, H, N, et S de l'échantillon.

Les analyses élémentaires effectuées dans le cadre de ce travail ont été réalisées au LiMOS (FRE 2440-Laboratoire des Interactions Micro-organismes – Minéraux - Matière Organique dans les Sols) à Vandoeuvre-lès-Nancy.

## **VIII. EXPÉRIMENTATION : MODIFICATION DU CONTENU ORGANIQUE PAR BIODÉGRADATION**

Les expériences de biodégradation ont été réalisées au LiMOS (FRE 2440-Laboratoire des Interactions Micro-organismes – Minéraux - Matière Organique dans les Sols) de Vandoeuvre-lès-Nancy sous la direction de Mme C. Leyval.

Les expérimentations ont été effectuées en utilisant des flacons en verre de 300 ml avec un bouchon muni d'un septum en Téflon afin d'éviter les pollutions par les matières plastiques. Ces flacons ont préalablement été stérilisés à 120°C durant une demi-journée. Ils ont ensuite été remplis avec 10 g de matière. Trois répliques de chaque échantillon ont été réalisées afin de s'assurer de la signification des mesures. Les échantillons utilisés au cours de ces expérimentations n'ayant pas subi de lyophilisation, leurs siccités sont différentes. Dans le but d'uniformiser les conditions analytiques initiales, il a été décidé de placer les échantillons à leur capacité au champ déterminée par remontée capillaire. La quantité d'eau distillée nécessaire à cette fin a donc été ajoutée.

Les flacons contenant ces échantillons ont ensuite été placés en chambre d'incubation chauffée à 24°C. La production de CO<sub>2</sub> a été mesurée périodiquement grâce à un analyseur de gaz (BINOS 1004 Gas analyser). Cet appareil permet de déterminer la concentration d'un gaz par injection d'un volume connu (ici 5 ml) grâce à la mesure photométrique de l'absorption d'une radiation infrarouge spécifique (longueur d'onde de cette radiation : 2325,6 cm<sup>-1</sup> pour analyser le CO<sub>2</sub>) par ce gaz.

Deux phases d'expérimentations ont été initiées, l'une en conditions normales pendant 50 jours et l'autre en conditions accélérées grâce à une solution nutritive pendant 150 jours. Au cours de la première phase, des prélèvements ont été effectués après 18 et 49 jours d'incubation afin d'analyser leur contenu organique par les méthodes moléculaires définies dans la partie II. La deuxième phase a été réalisée en ajoutant en excès une solution nutritive constituée de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (775 mg/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (350 mg/l), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (200 mg/l) et MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (100 mg/l) afin d'accélérer les processus de dégradation bactérienne. Les échantillons ont ensuite été placés, comme lors de la première phase, en chambre d'incubation à 24°C pendant 150 jours sur une table agitée. Après 30, 62, 104 et 140 jours d'expérimentation, des prélèvements ont été réalisés pour analyser l'évolution du contenu organique. L'ensemble des échantillons prélevés au cours des deux phases ont été analysés par les méthodes classiques décrites précédemment afin d'analyser les modifications éventuelles du contenu organique.

Quatre échantillons ont été utilisés pour ces expériences : les échantillons des stations urbaines U10 (54) et U1 (57), l'échantillon de laiterie FP1 (55) et l'échantillon de la papeterie PM1 (88). Ces échantillons ont été choisis, car ils correspondent à des types de boues différents représentatifs de l'ensemble des échantillons analysés.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrha, Y. & Raghavan, D. (2000) Polychlorinated biphenyl (PCB) recovery from spiked organic matrix using accelerated solvent extraction (ASE) and Soxhlet extraction. *Journal of Hazardous materials*, **80**, 147-157.
- Asperger, A., Engewald, W. & Fabian, G. (2001) Thermally assisted hydrolysis and methylation- a simple and rapid online derivatization method for the gas chromatographic analysis of natural waxes. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **61**, 91-109.

- Barrio, M.E., Lliberia, J.L., Comellas, L. & Broto-Puig, F. (1996) Pyrolysis-gas chromatography applied to the study of organic matter evolution in sewage sludge-amended soils using nitrogen-phosphorus, flame ionization and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A.*, **719**, 131-139.
- Challinor, J.M. (1996) A rapid simple pyrolysis derivatisation gas chromatography- mass spectrometry method for profiling of fatty acids in trace quantities of lipids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **37**, 185-197.
- Challinor, J.M. (2001) Review: the development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **61**, 3-34.
- del Rio, J.C., McKinney, D.E., Knicker, H., Nanny, M.A., Minard, R.D. & Hatcher, P.G. (1998) Structural characterization of bio- and geo-macromolecules by off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Chromatography A.*, **823**, 433-448.
- Flaig, W., Beyteflager, H. & Rietz, M. (1975) Chemical composition and physical properties of humic substances. In: *Soil Components, Organic Components* (Edited by J. E. Gieseking), pp. 1-211. Springer-Verlag.
- Hatcher, P.G. & Clifford, D.J. (1994) Flash pyrolysis and in situ methylation of humic acids from soils. *Organic Geochemistry*, **21**(10-11), 1081-1092.
- Hedges, J.I. & Mann, D.C. (1979) The characterisation of plant tissues by their lignin oxidation products. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **43**, 1803-1807.
- Ishiwatari, R., Takada, H., Yun, S.J. & Matsumoto, E. (1983) Alkylbenzene pollution of Tokyo Bay sediments. *Nature*, **301**, 599-600.
- Li, Y., Michels, R., Mansuy, L., Fleck, S. & Faure, P. (2002) Comparison of pressurized liquid extraction with classical solvent extraction and microwave-assisted extraction-application to the investigation of the artificial maturation of Mahakan coal. *Fuel*, **81**, 747-755.
- Mansuy, L., Bourezgui, Y., Garnier-Zarli, E., Jardé, E. & Réveillé, V. (2001) Characterisation of humic substances in highly polluted river sediments by pyrolysis methylation-gas chromatography-mass spectrometry. *Organic Geochemistry*, **32**, 223-231.
- Martin, F., Almendros, G., Gonzalez-Vila, F.J. & Verdejo, T. (2001) Experimental reappraisal of flash pyrolysis and low-temperature thermally assisted hydrolysis and methylation using tetramethylammonium hydroxide for the molecular characterization of humic acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **61**, 133-145.

- Martin, F., del Rio, J.C., Gonzalez-Vila, F.J. & Verdejo, T. (1995) Pyrolysis derivatization of humic substances. 2. pyrolysis of soil humic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **31**, 75-83.
- Metcalfe, L.D. (1974) Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base-catalyzed transesterification. In: *American Oil Chemists Society*, Mexico.
- Miikki, V., Hänninen, K., Knuutinen, J. & Hyötyläinen, J. (1999) Pyrolysis of humic acids from digested and composted sewage sludge. *Chemosphere*, **38**(2), 247-253.
- Quimby, B.D. & Sullivan, J.J. (1990) Evaluation of microwave cavity discharge tube and gas flow system for combined gas chromatography-atomic emission detection. *Analytical Chemistry*, **62**, 1027-1034.
- Réveillé, V., Mansuy, L., Jardé, E. & Garnier-Sillam, E. (2002) Characterisation of sewage sludge-derived organic matter: lipids and humic acids. *Organic Geochemistry-submitted*
- Saiz-Jimenez, C. (1994a) Analytical Pyrolysis of Humic Substances: Pitfalls, Limitations, and Possible Solutions. *Environmental Science and Technology*, **28**(11), 1773-1780.
- Saiz-Jimenez, C. (1994b) Application of Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry to soil Chemistry. In: *15<sup>th</sup> World Congress of Soil Science* pp. 65-84, Acapulco Mexico.
- Saiz-Jimenez, C. (1995) The origin of alkylbenzenes and thiophenes in pyrolysates of geochemical samples. *Organic Geochemistry*, **23**(1), 81-85.
- Saiz-Jimenez, C. & de Leeuw, J.W. (1986) Chemical characterisation of soil organic matter fractions by analytical pyrolysis- gas chromatography- mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.*, **9**, 99-119.
- Schulten, H.R. & Schnitzer, M. (1992) Structural studies on soil humic acids by curie-point pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Soil Science*, **153**(3), 205-224.
- Takada, H. & Ishiwatari, R. (1987) Linear alkylbenzenes in urban riverine environments in Tokyo: distribution, sources and behavior. *Environment Science and Technology*, **21**, 875-883.
- Tienpont, B., David, F., Vanwalleghem, F. & Sandra, P. (2001) Pyrolysis-capillary gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polyvinyl chloride traces in solid environmental samples. *Journal of Chromatography A*, **911**, 235-247.
- Van Bergen, P.F., Bull, I.D., Poulton, P.R. & Evershed, R.P. (1997) Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted Classical experiments I. Total lipids extracts,

- solvent insoluble residues and humic acids from Broadbalk Wolderness. *Organic Geochemistry*, **26**(1/2), 117-135.
- van den Berg, J.D.J. & Boon, J.J. (2001) Unwanted alkylation during direct methylation of fatty (di)acids using tetramethylammonium hydroxide reagent in a Curie-point pyrolysis unit. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **61**, 45-63.
- Vilmin, F. (2000) Le couplage chromatographie en phase gazeuse - détecteur à émission atomique: applications à l'analyse de la matière organique sédimentaire., 138p, mémoire pour l'obtention du diplôme d'ingénieur du Conservatoire national des arts et métiers- Paris, Nancy (France).
- Zang, X., Brown, J.C., van Heemst, J.D.H., Palumbo, A. & Hatcher, P.G. (2001) Characterization of amino acids and proteinaceous materials using online tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis and gas chromatography-mass spectrometry technique. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **61**, 181-193.



# **TROISIÈME PARTIE**

## **RÉSULTATS**



## **CHAPITRE I**

*Caractérisation moléculaire de la  
fraction organique soluble de boues  
résiduaire de stations d'épuration*



## I. INTRODUCTION

L'utilisation des boues en agriculture a largement été discuté dans la littérature (Larson *et al.*, 1972; Milne & Graveland, 1972; Bortlitz & Malz, 1982; Linster, 1991). Malgré de nouvelles avancées dans le domaine du recyclage des boues (gazéification, oxydation par voie humide, pyrolyse), l'épandage agricole reste la voie privilégiée en France. Les apports de boues vont en effet permettre d'enrichir le sol en azote, en carbone organique, mais également d'améliorer certaines propriétés des sols telles que la porosité ou la structure (Sommers, 1977).

Cependant, la présence d'éléments indésirables dans les boues nécessite de soumettre les épandages à des normes portant essentiellement sur les teneurs en éléments traces métalliques et sur un nombre limité de micropolluants organiques. Il est donc important de suivre et quantifier ces micropolluants afin de s'assurer de leur innocuité. De nombreux auteurs se sont intéressés au statut des micropolluants organiques présents dans les boues tels que les hydrocarbures polycyclique aromatiques (HPAs), les polychlorobiphényles (PCBs), les halogénés (AOX), et sur les risques éco-toxicologiques induits par l'épandage des boues (*cf. synthèse bibliographique de la première partie*).

Néanmoins, la fraction organique soluble (FOS) d'une boue d'épuration ne se résume pas aux quelques micropolluants organiques dosés dans les normes. Les composés organiques retrouvés dans les boues proviennent de la dégradation par les micro-organismes de composés variés entrant dans le réseau de collecte des eaux usées, ainsi que de composés synthétisés durant le processus d'épuration. Aussi, comme nous l'avons vu dans la première partie, différents composés tels que les hydrocarbures, les acides gras, les stérols vont se retrouver dans la fraction extractible des boues. Peu d'auteurs s'intéressent à la caractérisation des ces familles de composés dans la FOS des boues (Eganhouse & Kaplan, 1982). Cependant, cette caractérisation est importante puisque les composés lipidiques même s'ils améliorent dans une certaine mesure la structure du sol, sont hydrophobes et vont altérer les propriétés de rétention en eau des sols (Jambu *et al.*, 1978). D'autre part, peu de données sont compilées sur les éventuelles variations de composition du contenu organique en fonction de l'origine géographique de la boue, de la taille du réseau de collecte, du type d'effluents traités.

L'objectif de ce travail est de caractériser la FOS d'une cinquantaine de boues d'épuration provenant de stations domestiques (de différentes tailles) et industrielles afin

d'étudier la variabilité potentielle de composition entre ces boues. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article qui a été soumis à la revue *Water Research*.

## IX. CARACTERISATION MOLECULAIRE DE LA FOS DE BOUES DE STATIONS D'EPURATION

### Molecular characterisation of the lipidic fraction from different sewage sludges

Emilie JARDE, Laurence MANSUY and Pierre FAURE

UMR7566, G2R UHP, BP 239-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

---

#### ABSTRACT

This study enables us to define an average organic composition typical of each group of sewage sludges.

The lipidic organic fraction of 48 sewage sludges originating from food-processing, paper-mill and domestic (urban, small urban, and rural) wastewater-treatment plants of the Lorraine region (Northeast of France) was characterised by gas chromatography coupled with mass spectrometer.

LABs are only present in domestic sludges, sterols in food-processing and domestic sludges. Paper-mill sludges are characterised by specific distribution of *n*-alkanes. Moreover, all domestic sludges whatever the size of the wastewater catchment, are characterised by the same distribution of polar compounds. Differences can be evidenced in the distribution of the aliphatic compounds of some domestic sewage sludges and are attributed to the important contribution of petroleum products in their sewer system.

Moreover, this study highlights the correlation between abundance of PAHs in the aromatic fraction of some sewage sludges and a distribution of *n*-alkanes characteristic of heavy petroleum products into the corresponding aliphatic fraction. This might be a clue for the determination of punctual sources of PAHs.

**Key words:** *Sewage sludges, molecular markers, PAH, aliphatic fraction, fatty acids, steroids, LABs.*

## 1. Introduction

Sewage sludge is what is left behind after water is cleaned in wastewater-treatment plants, generally after primary and secondary treatment processes. The major way of recycling these wastes is by land disposal, because sewage sludges provide agricultural soils with organic matter and nutrients (nitrogenous and phosphorated contributions) (Bortlitz & Malz, 1982). They also have positive effects on the physical and chemical properties of soils. (Piccolo *et al.*, 1992). On the other hand, inorganic, organic, pathogenic and microbiological micropollutants frequently appear in sewage sludges (Moreda *et al.*, 1998). As a consequence, their extensive use as fertiliser can lead to the accumulation of micropollutants in soils, plants or animal pastures. These toxic compounds can also enter the food chain or be transported towards rivers or groundwater (Duarte-Davidson & Jones, 1996; O'Connor, 1996).

In order to avoid these problems, land disposal of sewage sludges in France must comply with concentration limits for metals (e.g. Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb...), for their agronomic value, and for a limited number of organic compounds (7 polychlorinated biphenyls-PCBs- and 3 PAHs). Moreover, a new draft directive of the European Community Council has been recently propounded, regulating nonylphenol ethoxylates, AOXs (Absorbable Organic "Halogens"), linear alkylbenzene sulfonates (LASs), di-(2-ethylhexyl)-phthalate, (polychlorinated dibenzodioxins/furans) PCDDs/Fs, polychlorinated biphenyls (PCBs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sewage sludges used in agriculture (European Union Draft on sewage sludge, 27/04/2000).

The principal studies on the extractable organic fraction focus on the quantification of organic micropollutants in order to assess the potential risks to recycle sewage sludges in agriculture (Berset & Holzer, 1995; Ollivon *et al.*, 1999). Some others deal with the characterisation of families of compounds such as hydrocarbons or fatty acids (Farrington & Quinn, 1973; Eganhouse & Kaplan, 1982; Boocock *et al.*, 1992; Mangas *et al.*, 1998). But, to our knowledge, few studies have been performed on the detailed characterisation of the whole lipidic fraction of sewage sludge although there is a strong need to better understand its structure and its chemical composition. Indeed, besides its potential toxicity, the lipidic fraction of sewage sludge might also influence water retention capacity of soils because of its hydrophobic properties, the mobility of heavy metals and mineralization processes.

The main inputs of organic matter in sewage sludge are domestic and industrial wastes, runoff waters and bacterial biomass and their metabolites. Domestic inputs are mainly constituted of detergents, kitchen wastewater and faecal organic matter. Industrial inputs is

made of a wide range of wastes from petroleum to food-processing by-products and strongly depend on the economic activity of the wastewater catchment. Runoff waters flush ground surfaces including roads and parking lots, gardens and soils and collect various organic compounds coming from atmospheric deposits, petroleum spillage, erosion of road asphalts and soils. Again, these contributions might vary according to the size and the economic activity of the wastewater catchment. Finally, the lipidic fraction of sewage sludges is a composite organic fraction including petroleum as well as natural hydrocarbons, surfactants, fatty acids, sterols and micropollutants.

However, few data are available on the variability of the composition of this lipidic fraction according to the origin of sewage sludges. Indeed, differences in the chemical composition of the lipidic fraction might be expected according to the type of treated wastewater (domestic versus industrial) or to the size and the economic activity of wastewater catchments (rural versus urban areas).

The aim of this study is to provide a detailed characterisation of the lipidic fraction of a large number of sewage sludges (48), originating not only from various rural and urban domestic wastewater-treatment plants, but also from papermill and food-processing effluents treatment plants.

## **2. Experimental**

### **2.1. Sampling and sample preparation**

Samples of sewage sludge were obtained from domestic (4 rural, 12 small urban and 21 urban samples), paper-mill (5) and food-processing (2 dairy and 1 cheese-dairy) wastewater-treatments plants of Lorraine (Northeast of France.) In addition to these, one sample originating from a purifying lagoon system and two samples of cow-manure (raw and composted samples) were collected. The characteristics of the samples are given in Table III.1.1.

<i>Wastewater treatment plant</i>	<i>Capacity (inhab.)</i>	<i>Type of influent</i>	<i>Process</i>	<i>Recycling by land disposal</i>
FP1		Food-processing (diary) + 20% chemical industry	Activated sludge	Yes
FP2		Food-processing (cheese diary)	Trickling filter	Yes
FP3		Food-processing (diary)	Activated sludge	Yes
PM1		Paper-mill	?	No
PM2		Paper-mill (compost)	?	Yes
PM3		Paper-mill	?	Yes
PM4		Paper-mill	?	Yes
PM5		Paper-mill	?	Yes
U1	24500	Urban	Activated sludge	No
U2	11200	Urban	Activated sludge	Yes
U3	16166	Urban	Activated sludge	Yes
U4	65000	Urban	?	No
U5	44333	Urban	Activated sludge	Yes
U6	22000	Urban	Activated sludge	Yes
U7	21000	Urban	Activated sludge	Yes
U8	49635	Urban	Activated sludge	Yes
U9	33000	Urban	Bacterial bed	No
U10a	480000	Urban	Activated sludge	Yes
U10b	480000	Urban		
U10c	480000	Urban		
U10d	480000	Urban		
U10e	480000	Urban		
U11a*	340000	Urban	Activated sludge	No
U11b*	340000	Urban		No
U12	20385	Urban	Activated sludge	Yes
U13	83000	Urban	Activated sludge	Yes
U14	25375	Urban	Activated sludge	Yes
U15	15000	Urban	?	Yes
U16	52500	Urban	?	Yes
SU1	4200	Small urban	Activated sludge	Yes
SU2	3800	Small urban	Activated sludge	no
SU3	5800	Small urban	Activated sludge	No
SU4		Small urban	?	Yes
SU5	3375	Small urban	Activated sludge	Yes
SU6	7400	Small urban	Activated sludge	Yes
SU7		Small urban	?	No
SU8	8300	Small urban	Activated sludge	Yes
SU9	7400	Small urban	Activated sludge	Yes
SU10	3500	Small urban	Activated sludge	Yes
SU11	9000	Small urban	Activated sludge	Yes
SU12	4200	Small urban	Activated sludge	Yes
R1	1150	Rural	Activated sludge	Yes
R2	2000	Rural	Activated sludge	Yes
R3	1600	Rural	Activated sludge	Yes
R4	550	Rural	Activated sludge	Yes
M1		Cow Manure		
M2		Composted manure		
L1	477	Lagunal	?	Yes

Table.III.1.1. Characteristics of the samples collected in wastewater-treatment plants of Lorraine

Note : U for urban sludge, SU for small urban sludge, R for rural sludge, PM for paper-mill sludge, FP for food-processing sludge, L for purifying lagoon system and M for manure.

The difference between urban, small urban and rural sludges is based on the capacity of the stations (defined as the number of inhabitants that can be connected on the sewer line): rural when the capacity is below 2,000 inhabitants (inhab.), small urban when the capacity is between 2,000 and 10,000 inhab., and urban when the capacity is above 10,000 inhab.

\* U11a and U11b correspond respectively to the primary and secondary sludges of an urban wastewater-treatment plant.

After collection, the samples were frozen during five days, then freeze-dried during ten days, and finally crushed and sieved (<500 µm).

## 2.2. Extraction-Fractionation

The protocol used is modified from Li *et al.* (2002). Two to five grams of each freeze-dried sample were extracted four times, with an accelerated solvent extractor (ASE; ASE200 Dionex®) using a dichloromethane-methanol (65/35) mixture. The conditions of extraction by ASE were : 11-ml cells, 80 °C, 100 bar, 5-min heat-up time, two cycles of 5-min static time, 150 % flush, 300 seconds purge with nitrogen. The extracts obtained were concentrated using a rotary evaporator, transferred to a 7-ml pre-weighed glass vial, and then evaporated to dryness under N<sub>2</sub>.

The organic extract was fractionated by liquid chromatography on alumina and silica previously washed with 200 ml of each solvent (*n*-pentane, dichloromethane, and methanol) and activated at 150 °C for 1 h. The extract obtained was diluted with dichloromethane (0.3 ml) and then quantitatively transferred to the top of the micro-column of activated alumina (1.4 g). Elution of hydrocarbon fraction (aliphatic + aromatic compounds) was carried out using dichloromethane (4 ml). Low molecular weight polar compounds were then recovered with dichloromethane/methanol (1:1, v/v, 5 ml). The vial containing the hydrocarbon fraction was evaporated to dryness under N<sub>2</sub>, and was then diluted with *n*-pentane (0.3 ml) and quantitatively transferred to the top of the micro-column of activated silica (1 g). Elution of aliphatic fraction was carried out using *n*-pentane (3.5 ml). Aromatic compounds were eluted with *n*-pentane/dichloromethane (65:35, v/v, 2.5 ml). High molecular weight polar compounds were recovered with dichloromethane/methanol (1:1, v/v, 10 ml) in the same vial used for the recovery of the low molecular weight polar compounds (previously evaporated to dryness under N<sub>2</sub>).

## 2.3. Gas chromatography- mass spectrometry (GC-MS)

The GC-MS analyses of the aliphatic, aromatic and polar fractions were performed in an HP5890 series II GC coupled to an HP5972A mass spectrometer, using an on-column injector, a 60 m DB-5 J&W, 0.25 mm id; 0.1 µm film fused silica column. The temperature program was 40 -130°C at 15°C/min, then 130 -300°C at 3°C/min, followed by an isothermal stage at 300°C during 15 min (constant helium flow of 1ml/min).

Before the analysis of the polar fraction, derivatisation using tetramethylammonium hydroxide (TMAH) 0.2M in methanol was carried out in order to improve the chromatographic resolution (Metcalf, 1974). An aliquot of each polar fraction was dissolved with the derivative solution at a 4 mg/ml concentration. One microliter of this solution was then injected directly into the GC-MS.

Moreover, quantifications of PAHs and PCBs on 12 representative samples have been carried out by the IRH (registered analysis laboratory at Vandoeuvre-lès-Nancy, France) using HPLC with fluorimetric detector. The targeted PAHs were acenaphthene, phenanthrene, fluorene, fluoranthene, pyrene, benzo(b+j+k)fluoranthene, benzo(a)pyrene and benzo(ghi)perylene, indeno(1.2.3-c,d) pyrene, six isomers of PCBs were measured too (28, 52, 101, 118, 153 and 180).

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. Quantification of the lipidic fraction**

The extraction yields (table III.1.2 and figure III.1.1) of the different samples of sewage sludge show some variations without obvious correlation either with the origin (domestic or industrial) of wastewater, or with the treatment processes, or with the size of the wastewater catchment (urban, small urban or rural plants). Some variations can perhaps due to analytical mistakes during the extraction or the fractionation of the samples.

Samples		Extract	Total hydrocarbon	ALI <sup>1</sup>	ARO <sup>2</sup>	POL <sup>3</sup>
		mg/g sample				
Food-processing sludges	FP1	60	6.1	2.5	3.6	53.9
	FP2	49	36.8	17.4	19.4	12.1
	FP3	102.8	30.3	29.5	0.8	72.4
Paper-mill sludges	PM1	36.7	18.2	14.4	3.8	18.5
	PM2	74.5	27.9	10.5	17.4	46.6
	PM3	34.8	10.6	2.8	7.8	24.2
	PM4	23.4	2.7	0.9	1.8	20.7
	PM5	29.9	10.6	9.7	0.9	19.3
Purifying Lagoon system	L1	361.9	41.2	17.6	23.6	320.7
Rural sludges	R1	52.5	11.4	6.4	5	41.1
	R2	62	11	1	10	51
	R3	104.1	54	40.6	13.4	50.1
	R4	142.3	29.2	14.4	14.8	113.2
Semi-urban sludges	SU1	150.6	23.1	11.3	11.8	127.6
	SU2	70.1	10.2	9.1	1.1	59.8
	SU3	74	46.6	13.2	33.4	27.4
	SU4	185.4	31.7	12.9	18.8	153.7
	SU5	147.8	50.7	34	16.7	97.14
	SU6	108.6	62.7	22.7	40	45.84
	SU7	539.1	170.7	144.5	26.2	368.41
	SU8	71.8	23.3	12.8	10.5	48.56
	SU9	32.1	6.5	3.4	3.1	25.59
	SU10	72.6	6.8	2.8	4	65.77
	SU11	162.1	43.1	23.3	19.8	119.06
	SU12	49.4	10.9	4.7	6.2	38.59
Urban sludges	U1	62.2	29.6	20.7	8.9	32.60
	U2	196.2	38.6	17.7	20.9	157.57
	U3	87	15.6	10.9	4.7	71.33
	U4	118.9	18.6	11.3	7.3	100.24
	U5	89.6	44.6	39.1	5.5	45
	U6	111.1	82.6	76.5	6.1	28.5
	U7	79.1	25.7	13	12.7	52.5
	U8	21.6	10.5	4.7	5.8	11.1
	U9	76.8	28.6	17.3	11.2	48.2
	U10a	47.1	16	9.6	6.4	31.1
	U10b	49.8	17	10.2	6.8	32.8
	U10c	100.1	22	19.3	2.7	78.2
	U10d	52.4	14.7	10.6	4.1	37.7
	U10e	72.4	15.5	10.8	4.7	56.9
	U11a	168	26	18.2	7.8	142.1
	U11b	Loss	n.d	n.d	n.d	n.d
	U12	21.8	3.8	2.6	1.2	18
	U13	177.1	66.9	46.8	20.1	110.2
U14	70.9	11.9	6.7	5.2	59	
U15	85.5	26.1	18.9	7.2	59.4	
U16	99.9	24.3	9.9	14.4	75.6	
Manure samples	M1	68.1	9.5	4.6	4.9	58.6
	M2	35	9.4	4.3	5.1	25.6

<sup>1</sup>ALI for aliphatic fraction, <sup>2</sup>ARO for aromatic fraction, <sup>3</sup>POL for polar fraction

Table.III.1. 2. Extraction yields (mg/g of the total sample) and compositional analysis of the extracts (mg/g of total samplet) of sewage sludges.

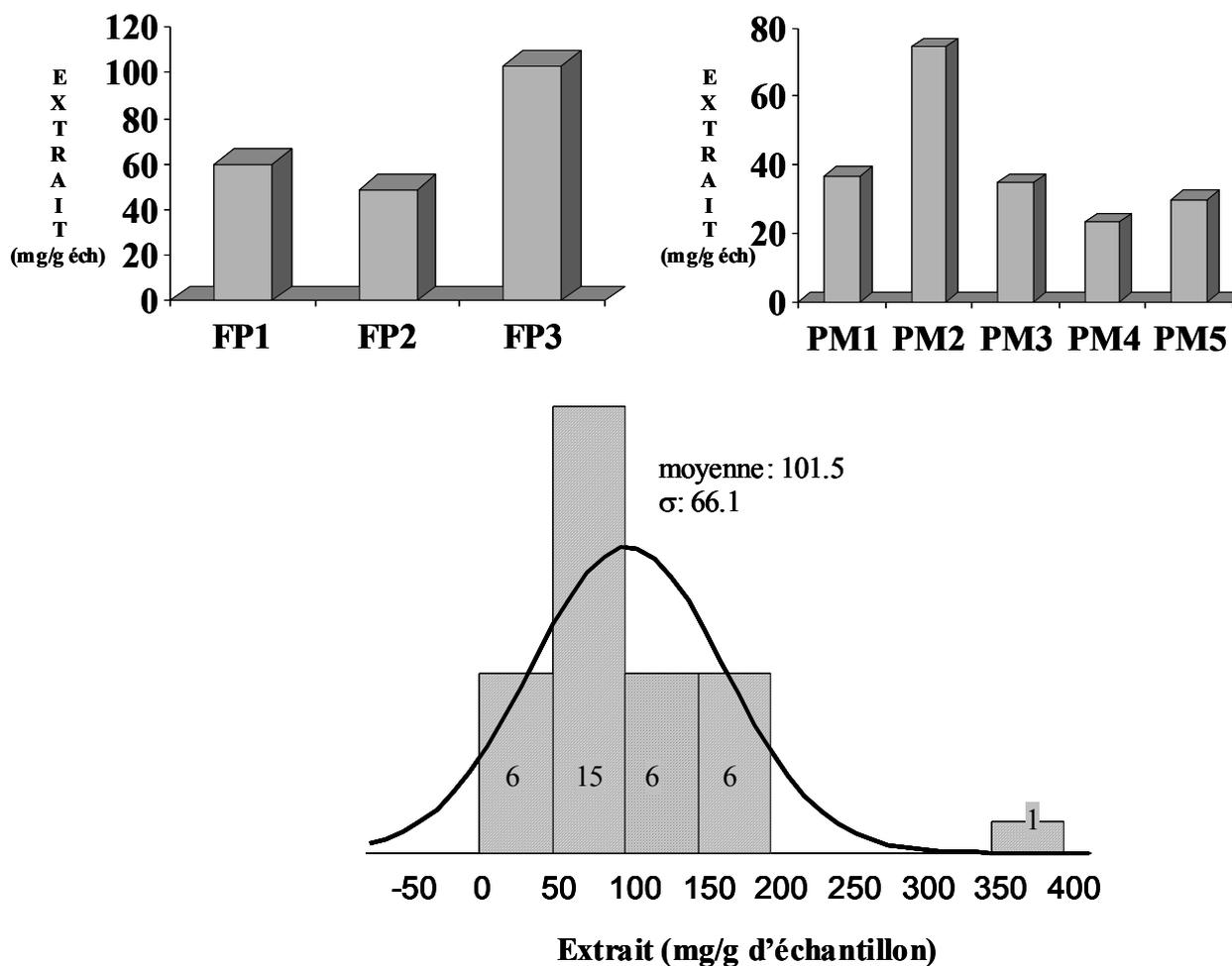


Figure III.1. 1. Extraction yields (mg/g of sample) in domestic and industrial sludges.

The extraction yields of food-processing sludges range from 48.9 to 102.8 mg/g (for FP2 and FP3 respectively). FP3, the cheese-dairy sludge is characterised by the highest extractable organic content. The extraction yields of paper-mill sludges range from 23.4 to 74.5 mg/g (PM4 and PM2 respectively). The extraction yield of the composted sample (PM2) is twice as high as that of the raw sample (PM1). Excepted PM2, the amount in extractable organic carbon are quite constant from one paper-mill sludge to another. The extraction yields of domestic sludges range from 21.6 to 539.1 (U8 and SU7 respectively).

For forty-two samples out of forty-eight, the proportion of polar compounds represents the majority of the extract (50.16 to 90.6% of the extract) and is higher than the proportion of total hydrocarbon compounds (sum of aliphatic and aromatic compounds), which is consistent with the study of Eganhouse (1982). Five samples (FP2, R3, SU3, SU6 and U6) are characterised by high amounts of hydrocarbon (75.2, 51.9, 62.9, 57.8 and 74.4 %

respectively) with some variations in the proportion of aliphatic and aromatic compounds. R3 and U6 are characterised by high amounts of aliphatic compounds (39% and 68.9% respectively), and SU3 by a high amount of aromatic compounds (45.1%). SU6 is characterised by equal amounts of aromatic and polar compounds (36.9% and 42.2% respectively) and FP2 by equal amounts of aliphatic and aromatic compounds (35.6% and 39.6% respectively).

### 3.2. Characterisation of the polar compounds: fatty acids and steroids

All the compounds were identified by their mass spectra and the identification of each peak is given in table III.1.3.

<i>Chemical Formula</i>	<i>Formula</i>	<i>Symbols</i>
Dodecanoic acid, methyl ester	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>12:0</sub>
Tridecanoic acid, methyl ester	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>13:0</sub>
Tetradecanoic acid, methyl ester	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>14:0</sub>
Pentadecanoic acid, methyl ester	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>15:0</sub>
Tetradecanoic acid, 13-methyl, methyl ester	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	iC <sub>15:0</sub>
Tetradecanoic acid, 12-methyl, methyl ester	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	aC <sub>15:0</sub>
Hexadecanoic acid, methyl ester	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16:0</sub>
9-hexadecanoic acid, methyl ester	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16:1</sub>
Heptadecanoic acid, methyl ester	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>17:0</sub>
Octadecanoic acid, methyl ester	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18:0</sub>
9-octadecanoic acid, methyl ester	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18:1</sub>
Eicosanoic acid, methyl ester	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20:0</sub>
Docosanoic acid, methyl ester	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>22:0</sub>
Pentadecane	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	C <sub>15</sub>
Heptadecane	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	C <sub>17</sub>
Nonadecane	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	C <sub>19</sub>
Heneicosane	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	C <sub>21</sub>
Tricosane	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	C <sub>23</sub>
Pentacosane	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	C <sub>25</sub>
Heptacosane	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	C <sub>27</sub>
Nonacosane	C <sub>29</sub> H <sub>62</sub>	C <sub>29</sub>
Hentriacontane	C <sub>31</sub> H <sub>66</sub>	C <sub>31</sub>
Tritriacontane	C <sub>33</sub> H <sub>70</sub>	C <sub>33</sub>
Pentatriacontane	C <sub>35</sub> H <sub>74</sub>	C <sub>35</sub>
Heptatriacontane	C <sub>37</sub> H <sub>78</sub>	C <sub>37</sub>
Nonatriacontane	C <sub>39</sub> H <sub>82</sub>	C <sub>39</sub>
Benzene,1-butylhexyl	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub>	5-C <sub>10</sub>
Benzene,1-pentylhexyl	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub>	6-C <sub>11</sub>
Benzene,1-butylheptyl	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub>	5-C <sub>11</sub>
Benzene,1-propyloctyl	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub>	4-C <sub>11</sub>
Benzene,1-ethylnonyl	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub>	3-C <sub>11</sub>
Benzene,1-pentylheptyl	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub>	6-C <sub>12</sub>
Benzene,1-butylloctyl	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub>	5-C <sub>12</sub>
Benzene,1-propylnonyl	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub>	4-C <sub>12</sub>

Benzene,1-ethyldecyl	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub>	3-C <sub>12</sub>
Benzene,1-pentylloctyl	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub>	6-C <sub>13</sub>
Benzene,1-butylnonyl	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub>	5-C <sub>13</sub>
Benzene,1-propyldecyl	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub>	4-C <sub>13</sub>
Benzene,1-methyldodecyl	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub>	3-C <sub>13</sub>
Benzo(a)anthracene	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	Ban
Phenanthrene	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	Phn
Phenanthrene, 1-methyl-7-(1-methylethyl)	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub>	mPh
Fluoranthene	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	Fth
Pyrene	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	Pyr
Benzo(a)pyrène	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	BPyr
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	IPyr
Benzo(k)fluoranthene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	BFth
Triphenylene	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	3T
Perylene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	Per
Cholest-5-en-3-ol (cholestérol)	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	2
5β-cholestan-3β-ol (coprostanol)	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O	4
5α-cholestan-3β-ol (cholestanol)	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O	6
5β-cholestan-3α-ol (épicoprostanol)	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub>	7
Cholest-5-ene,3-methoxy	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	1
24-ethyl-5β-cholestan-3β-ol	C <sub>29</sub> H <sub>52</sub> O	3
5β-campestanol	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O	9
5α-Ergostan-3α-ol	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O	8
5α-stigmast-5-en-3β-ol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	5

Table.III.1. 3. Identification of peaks in the chromatograms of polar and aliphatic fractions of sewage sludges.

Figures III.1.2, III.1.3 show representative chromatograms of polar fractions of domestic, food-processing and paper-mill sewage sludges. The chromatograms of the different samples show the presence of two major families of compounds: fatty acids (identified as methyl esterified fatty acids because of the derivative method used for GC-MS analyses) and steroids.

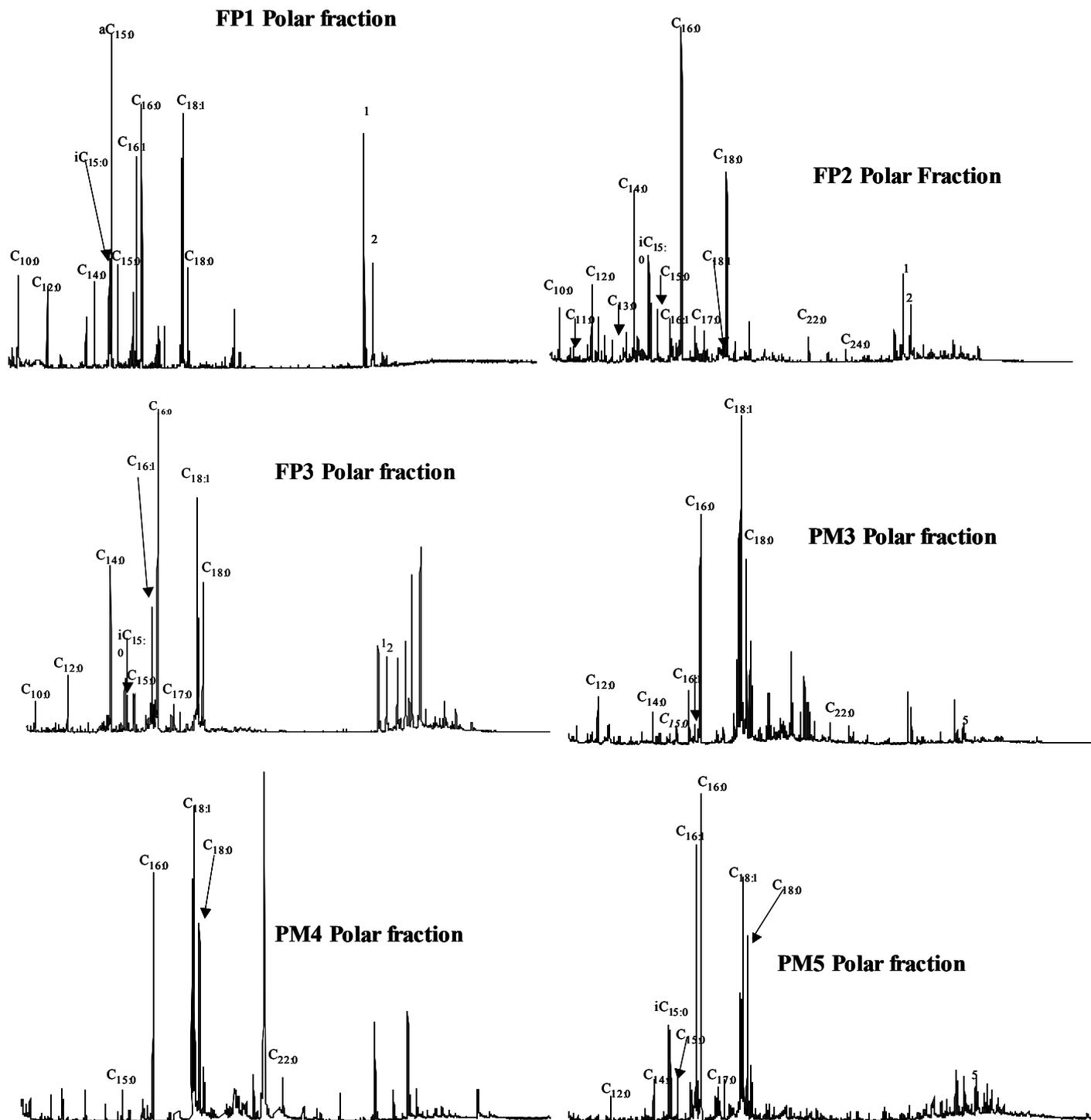


Figure III.1. 2. Chromatograms of the polar fraction of food-processing and paper-mill sludges

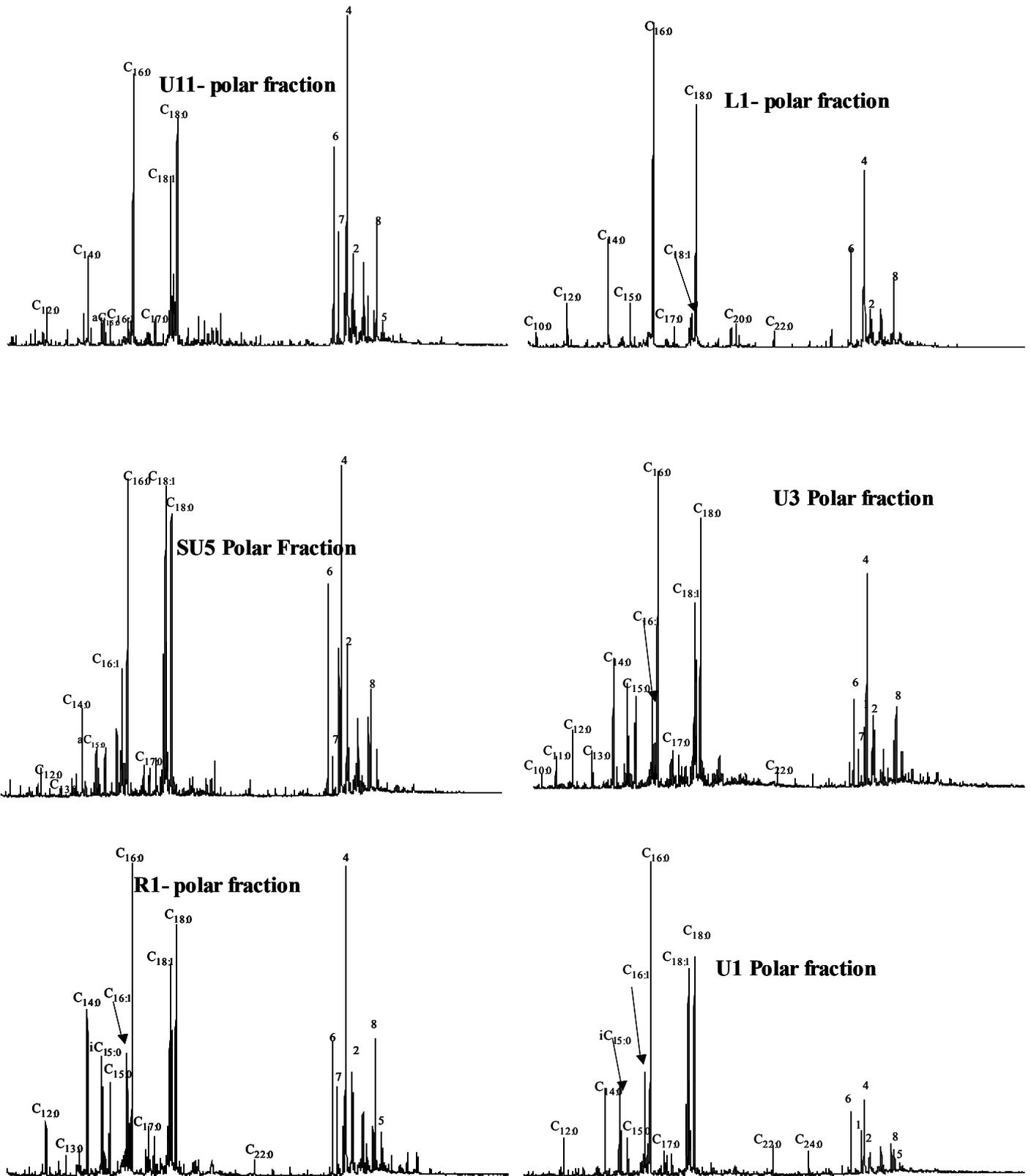


Figure III.1. 3. Chromatograms of the polar fraction of domestic sludges

## Fatty acids

Fatty acids constitute the predominant family of compounds in the polar fraction of all sludges. Their distributions whatever the origin of sludges are dominated by even fatty acids, in the range of  $C_{10}$ - $C_{18}$ . This observation has been evidenced by the calculation of the even-odd ratio (table III.1.4 and figure III.1.4) between  $C_{16:0}$  and  $C_{18:0}$  versus  $C_{15:0}$  and  $C_{17:0}$ . This ratio ranges from 0.7 (for PM1) and 70.1 (for L1). Excepting PM1, all the sludges have ratios higher than 2.67. The presence of an even-odd predominance (in the range of  $C_{12:0}$  to  $C_{32:0}$ ) with a dominance of chains containing 16 and 18 carbons (Rao *et al.*, 1990) is typical of a higher plants or animal contribution to the fatty acids composition. The main sources for lipids in raw domestic sludges are kitchen wastes and human excreta. Kitchen wastes derive from vegetable oils and animal fats and show typical distributions of fatty acids dominated by  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$ ,  $C_{18:1\omega9}$  and  $C_{18:2\omega6}$  (Gunstone, 1967; Farrington & Quinn, 1973). The distribution of human faecal fatty acids are dominated by  $C_{18:1\omega9}$ ,  $C_{18:0}$  and  $C_{16:0}$  (William *et al.*, 1960).

Figure III.1.2. shows the chromatograms of polar fractions of food-processing sludges. The distributions of fatty acids are dominated by  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:1}$ ,  $C_{16:1}$  and  $C_{18:0}$  for FP1 and FP3, and by  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$ ,  $C_{18:1}$  and  $C_{16:1}$  for the polar fraction of the cheese-diary sludge FP2. Some odd fatty acids can also be evidenced and especially the branched *iso*- and *anteiso*-  $iC_{15:0}$  and  $aC_{15:0}$  (which are the dominant compounds in FP1), which are known to be bacterial markers (Perry *et al.*, 1979) as mono-unsaturated acids, especially the hexadecenoic one ( $C_{16:1\omega7}$ ) (Volkman, 1986; Tunlid & White, 1990) but also by  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:1\omega9}$  and  $C_{18:0}$  (Eganhouse, 1982). The ratio between bacterial fatty acids ( $iC_{15:0}$ ,  $aC_{15:0}$ ,  $C_{16:1}$ ,  $C_{18:1}$ ) over the sum of the total fatty acids ( $FA_{bact}/\Sigma_{FA}$ ) has been calculated (see table III.1.4). It varies from 1.2 (FP2) to 2.4 (FP1), evidencing a higher bacterial contribution in FP1 than in FP2 and FP3.

Figure III.1.2 represents the chromatograms of the polar fractions of paper-mill sludges. The distributions are dominated by  $C_{18:1}$ ,  $C_{18:0}$ ,  $C_{16:0}$  and  $C_{16:1}$  (higher abundance for PM5 than for PM4 and PM3). Branched *iso*- and *anteiso*-  $iC_{15:0}$  and  $aC_{15:0}$  are present essentially in the PM5 distribution, which thus evidences a higher bacterial contribution ( $FA_{bact}/\Sigma_{FA}$  is of 1.9) than in the other paper-mill sludges. One might expect this trend to result from a longer period of residence of sludge PM5 in the storage area, or by a longer biological treatment.

Figure III.1.3. shows the chromatograms of polar fractions of domestic sludges. The distributions of fatty acids of rural, small urban and urban sludges are quite homogenous and are dominated by  $C_{18:0}$ ,  $C_{18:1}$ ,  $C_{16:0}$  and  $C_{16:1}$ , and by the presence of the branched *iso*- and *anteiso*- fatty acids ( $iC_{15:0}$  and  $aC_{15:0}$ ), which is in agreement with previous studies on the characterisation of fatty acids in wastewater (Walter, 1961; Viswanathan & Kukar, 1962). The distribution of fatty acids of the sample originating from a purifying lagoon system is quite different by the absence of  $C_{16:1}$ , the low abundance of  $C_{18:1}$ , a low  $FA_{bact}/\Sigma_{FA}$  ratio (1.1) that can be explained by a low bacterial contribution in this sample, and by the highest even-odd ratio (70.1).

<i>Samples</i>	<i>Even/Odd</i>	<i>FA<sub>bact</sub>/Σ<sub>FA</sub></i>
FP1	3.1	2.4
FP2	9.7	1.2
FP3	13.5	1.6
PM1	0.7	1.1
PM2	2.9	1.5
PM3	2.5	1.6
PM4	4.2	1.5
PM5	6	1.9
L1	70.1	1.1
R1	6.6	1.5
R2	4.4	1.5
R3	11	1.7
R4	8.8	1.5
SU1	17.1	1.5
SU2	9.5	1.4
SU3	6.9	1.8
SU4	4.7	1.6
SU5	10	1.6
SU6	4.8	1.9
SU7	10.2	1.9
SU8	13.6	1
SU9	3.6	1.7
SU10	23.5	1.5
SU11	14	1.7
SU12	5.7	1.3
U1	20.1	1.3
U3	8.1	1.3
U4	48.5	1.1
U5	9.1	1.3
U6	38.5	1.1
U7	8.4	1.4
U8	14.1	1.3
U9	9.9	1.3
U10a	8	1.5
U10b	8.1	1.3
U10c	8.3	1.5
U10d	6.6	1.6
U10e	8.7	1.4
U11a	28.2	1.3
U11b	40.6	1.1
U12	26.5	1.3

U13	12.5	1.7
U14	11.5	1.7
U15	2.7	1.4
U16	32	1.2
M1	9.8	1.4
M2	3.2	1.6

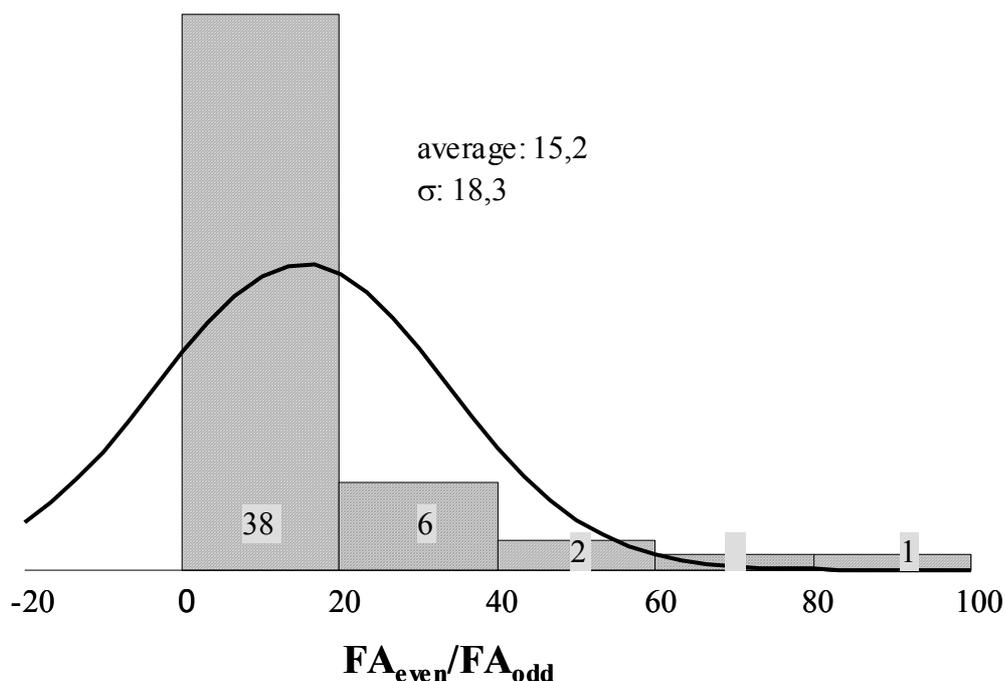


Table.III.1. 4. Results of fatty acids ratios in the polar fraction of sewage sludges

Figure III.1. 4.  $AG_{\text{even}}/AG_{\text{odd}}$  ratio for the 48 samples

Sources of fatty acids are numerous, including bacteria, microalgae, higher plants, and animals. It is possible to relate these compounds to their origin. Such distributions in the samples of sewage sludges can be explained by a variety sources, including faeces, kitchen wastes (vegetable and animal fats and oils), or higher plants (in the case of domestic sludge especially). Moreover, the presence of  $aC_{15:0}$  and  $iC_{15:0}$  in these samples and the calculation of  $FA_{\text{bact}}/\Sigma_{FA}$  ratio (which ranges from 1 to 2.6) evidence a bacterial contribution in the sludges. All sludges whatever their origin are characterised by quite the same distribution of fatty acids. This typical fatty acids distribution could be used to identify the contribution and the accumulation of sewage sludges in recent sediments. Nevertheless, some studies have demonstrated that lipid components degrade easily and some others can be also former during

decomposition (Marty *et al.*, 1996; Stefanova & Disnar, 2000), so some attention might be done in interpreting the presence of these compounds in recent sediments.

### Steroids

The analysis of the polar fractions of the five paper-mill sludges revealed the low abundance of steroids and only the presence of stigmastanol.

Food-processing sludges are characterised by cholestanol and cholesterol and 3-methoxy-cholest-5-ene.

The distribution of sterols in domestic sludges is dominated by the presence of 5 $\beta$ -cholestan-3 $\beta$ -ol (coprostanol) and its 3 $\alpha$ -epimer epicoprostanol, 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol (cholestanol), cholesterol, cholest-5-ene,3-methoxy, stigmastanol and ergostanol. The distribution of sterols is very homogenous in all domestic sludges, with coprostanol as a dominant peak as previously evidenced (Takada & Eganhouse, 1998). However, it has been demonstrated that the production of coprostanol can occur during treatment processes (Gaskell & Eglinton, 1975; McCalley *et al.*, 1981). Thus, the concentration of coprostanol in sludges will depend on its concentration in the incoming wastes as well on the rate of in situ generation and decomposition before and during waste processing. This could explain the differences observed in the calculation of the relative abundance of coprostanol versus the sum of sterols ( $Cop/\Sigma_{sterols}$ ). This ratio varies in domestic sludges between 0.1 and 0.3 (see results in table III.1.5). Moreover, the abundance of cholestanol in the domestic sludges might be explained by the reduction of cholesterol which produces both cholestanol and coprostanol as described above (Gaskell & Eglinton, 1975; Taylor *et al.*, 1981).

	<i>Cop/<math>\Sigma_{sterols}</math> ratio</i>
R1	0.2
R2	0.2
R3	0.3
R4	0.3
SU1	0.1
SU2	0.2
SU3	0.2
SU4	0.2
SU5	0.2
SU6	0.2
SU7	0.2
SU8	0.3
SU9	0.2
SU10	0.2
SU11	0.2

SU12	0.2
U1	0.2
U2	0.3
U3	0.2
U5	0.2
U6	0.3
U7	0.2
U8	0.2
U9	0.3
U10a	0.3
U10b	0.2
U10c	0.2
U10d	0.2
U10e	0.2
U11a	0.2
U11b	0.3
U12	0.3
U13	0.3
U14	0.2
U15	0.2
U16	0.2

Table.III.1. 5. Results of the  $Cop/\Sigma_{sterols}$  ratio in domestic sludges.

(n.d.: ratio not determined because there is no peak of epicoprostanol for these samples)

Figure III.1.5. represents the chromatogram of the polar fraction of the manure sample. The distribution of the sterols in this sample is very different from that in domestic sludges. It is dominated by 24-ethylcoprostanol (24-ethyl-5 $\beta$ -cholestan-3 $\beta$ -ol), 5 $\beta$ -campestanol and cholestanol. The 5 $\beta$ -stanols originate from bio-hydrogenation of corresponding sterols (Martin *et al.*, 1973).  $\beta$ -Sitosterol and campesterol are characteristic of higher plants and usually present in herbivore faeces (Leeming *et al.*, 1996).

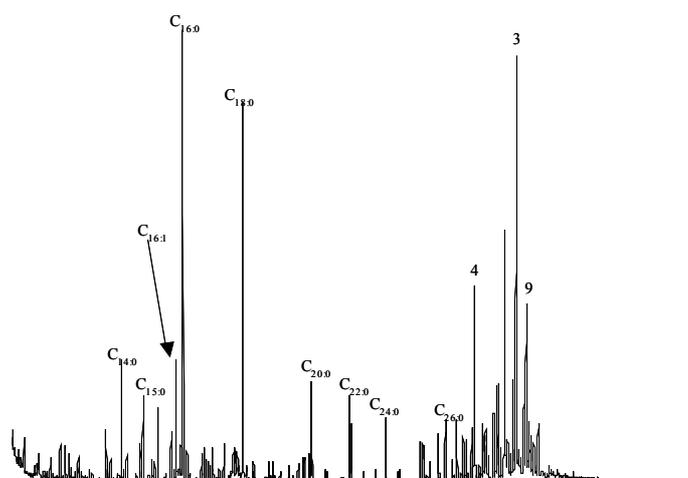


Figure III.1. 5. Chromatogram of the polar fraction of the manure sample (M1).

Sterols are present in practically all eucaryote cells. More than one hundred sterols are known: cholesterol is present in animals, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol in plants, and ergosterol, which is a precursor of D-vitamin, in yeast (Volkman, 1986). The principal human faecal sterol is coprostanol ( $5\beta$ -cholestan- $3\beta$ -ol), which is produced in the digestive tract by the anaerobic microbial hydrogenation of cholesterol (cholest-5-en- $3\beta$ -ol) (Walker *et al.*, 1982). In adult human faeces, coprostanol comprises 24-89 % of total steroids (Férézou *et al.*, 1978). Under aerobic conditions, cholesterol is hydrogenated into  $5\alpha$ -cholestan- $3\beta$ -ol (cholestanol), which is thermodynamically favoured during hydrogenation (Sherblom *et al.*, 1997), whereas coprostanol and its  $3\alpha$ -epimer, epicoprostanol, are produced only through the mediation of anaerobic bacteria (Leeming *et al.*, 1996). The other faecal sterols than coprostanol are found in non-human living organisms as well, and thus cannot be used as markers of human faeces. Although coprostanol can be produced by animals as well (Walker *et al.*, 1982; Leeming *et al.*, 1996), its concentration in animal faeces is generally much lower than in human faeces (Leeming *et al.*, 1996).

The distributions of sterols enable us to distinguish sludges according to their origin (domestic, food-processing and paper-mill sludges). Moreover, the analysis of the polar fraction of manure shows that the sterols profile of herbivores is very different from that of humans, as previously demonstrated (Leeming *et al.*, 1996). Many studies have highlighted the use of coprostanol as a sewage sludge marker in recent/modern sediments with the intention of measuring sewage pollution (Gaskell & Eglinton, 1975; Muller *et al.*, 1979; Eganhouse *et al.*, 1988; Phillips *et al.*, 1997; Eganhouse & Sherblom, 2001; Mansuy *et al.*, 2001; Seguel *et al.*, 2001). Thus, such distributions which are typical of domestic or food-processing sludges might be used as molecular sterol profile of sewage sludges once they are applied to land.

### **3.3. Characterisation of the aromatic compounds: LABs and quantification of PAHs and PCBs**

#### **LABs (linear alkylbenzenes)**

LABs are only present in the thirty-eight domestic sludges and no LABs are detected in the food-processing and paper-mill sludges. The molecular formula of a LAB is expressed here as  $n\text{-C}_m$  where  $m$  indicates the number of alkyl carbon atoms and  $n$  is the position on the alkyl chain where the phenyl group is attached. Isomers whose benzene ring is attached near

the end of the alkyl chain are commonly referred as external isomers ( $n = 2$  to  $4$ ). On the other hand, isomers whose benzene ring is attached near the middle of the alkyl chain are referred to as internal isomers ( $n = 5$  to  $7$ ).

Figure III.1.6 shows that the distributions of LABs in the domestic sludges are all dominated by  $C_{12}$ ,  $C_{13}$  and  $C_{11}$  homologues,  $C_{10}$  homologues being minor constituents and  $C_{14}$  homologues only present in very low amounts. No great variation is observed in the distribution of the homologues from one domestic sludge to another. This is in agreement with the study of Holt & Bernstein (1992). LABs are found as unsulfonated residues in detergents along with LASs (Eganhouse *et al.*, 1983), and are significant constituents of municipal wastes (Eganhouse & Kaplan, 1982; Takada & Ishiwatari, 1987). Moreover, LABs are more resistant to microbial attack in the environment than LASs (Ishiwatari *et al.*, 1983) and it is well established that LABs have been recognised as molecular markers of domestic waste inputs (Eganhouse *et al.*, 1983; Ishiwatari *et al.*, 1983; Takada & Ishiwatari, 1987). The ratio of internal to external isomers (I/E ratio : a ratio of the sum of 6- $C_{12}$  and 5- $C_{12}$  relative to 4- $C_{12}$ , 3- $C_{12}$  and 2- $C_{12}$ ) has been proposed as an index of the degree of LAB degradation (table III.1.6). Previous studies on laboratory and field experiments have shown that the external isomers are degraded more rapidly than the internal ones (Eganhouse *et al.*, 1983; Takada & Ishiwatari, 1987). We can evidence within U10 wastewater treatment plant, an increase of I/E ratio between U10c (1.81) corresponding to the influent collected after the pre-treatment, and U10a (2;78) which is the final dried sludge destined to land disposal.

When considering the whole of domestic sludges, this ratio varies from 1.4 (U11a) to 9.4 (SU2). These variations could be explained by the different treatment processes (the I/E ratio in activated sludges is higher than in digested sludges), but no correlation has been evidenced. These variations could be explained also by the different state of degradation of the sludges analysed (Takada & Ishiwatari, 1987). Indeed, the sampling concerns some sludges coming from disposal area (such as U9 or SU3), but no correlation can be made between the highest I/E ratios and the sludges originating from disposal area. So, this ratio seems to be well adapted in order to follow the evolution of a specific sludge in the wastewater treatment processes, but it is more difficult to extract the essential information by considering the whole of domestic sludges.

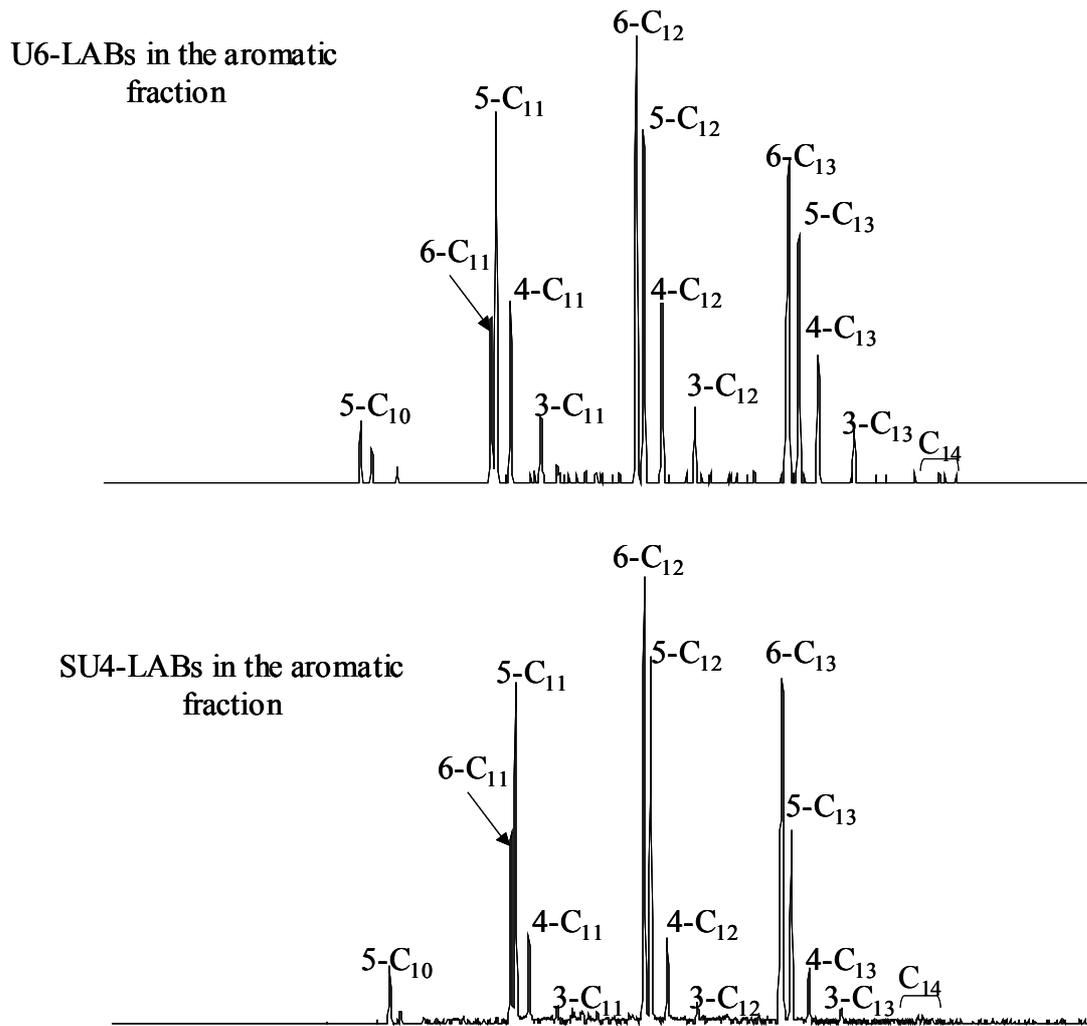


Figure III.1. 6.LABs in the aromatic fraction of an urban sewage sludge and a semi-urban one.

Samples	I/E ratio <sup>1</sup>
L1	1.7
R2	5
R3	3.7
R4	3.4
SU1	3.6
SU2	9.4
SU3	4.7
SU4	7.5
SU5	6.5
SU6	4.8
SU7	2.5
SU9	9
SU10	7.2
SU11	5.1
SU12	5.3
U1	3.6
U2	4.9

U3	7.5
U6	3.1
U8	4.7
U9	2
U10a	2.8
U10b	3.3
U10c	1.8
U10e	3.9
U11a	1.4
U11b	1.5
U13	2.5
U14	5.1
U16	4.6
U15	5.6

$${}^1I/E = (6-C_{12}+5-C_{12})/(4-C_{12}+3-C_{12}+2-C_{12})$$

Table.III.1. 6. Results of the I/E ratios in domestic sludges.

### PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) and PCBs (polychlorinated biphenyls)

Anthracene, naphthalene and alkylnaphthalenes, phenanthrene, fluorene, chrysene, fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, pyrene, perylene, benzo(a)pyrene and indeno(1.2.3-cd)pyrene are identified in the chromatograms of the aromatic fraction

The results of the quantification on 16 PAHs and 6 PCBs are given in table III.I.7.

Targeted compounds (mg/kg dry)	FP1	FP3	PM1	PM5	L1	R2	SU11	U1	U10a	U15	M1	M2	
PCBs	PCB28	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	
	PCB52	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	
	PCB101	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	
	PCB118	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	
	PCB153	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	
	PCB180	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	
PAHs	Acenaphthene*	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	
	Acenaphthylene	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	
	Anthracene	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	0.33	<0.15	0.31	<0.15	<0.15	<0.15	
	Benzo(a)pyrene*	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.36	3.2	0.14	2.53	0.6	0.55	<0.05	<0.05
	Benzo(b)fluoranthene	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.48	3.83	0.18	3.2	0.66	0.67	<0.05	<0.05
	Benzo(a)anthracene	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	2.47	0.12	2.12	0.62	0.39	<0.05	<0.05
	Benzo(ghi)perylene*	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	0.58	3.11	<0.25	2.47	0.55	0.44	<0.25	<0.25
	Benzo(k)fluoranthene*	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.24	2	0.09	1.57	0.34	0.32	<0.05	<0.05
	Chrysene	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	0.41	2.49	0.14	1.93	0.65	0.35	<0.15	<0.15
	Dibenzo(a,h)anthracene	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	0.79	<0.25	0.63	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
	Fluorene*	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15
	Fluoranthene*	<0.05	0.22	<0.05	0.07	1.46	3.75	0.21	3.74	1	0.51	0.11	0.11
	Indeno(1.2.3-cd)pyrene*	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	0.44	3.46	<0.25	2.7	0.56	0.5	<0.25	<0.25
	Naphtalene	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
Phenanthrene*	<0.15	<0.15	<0.15	0.15	0.64	1.45	<0.15	1.27	0.68	<0.15	<0.15	<0.15	
Pyrene*	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	3.46	<0.15	3.13	1.17	0.54	<0.15	<0.15	
<b>ΣPAHs<sup>1</sup> (mg/kg dry)</b>	<b>0</b>	<b>0.22</b>	<b>0</b>	<b>0.22</b>	<b>3.72</b>	<b>20.43</b>	<b>0.44</b>	<b>17.41</b>	<b>4.9</b>	<b>2.87</b>	<b>0.11</b>	<b>0.11</b>	

<sup>1</sup> sum of the polycyclic aromatic hydrocarbons which are designed by the mark \*, according to the European directive on sewage sludge, 3<sup>rd</sup> draft (27.04.2000)

Table.III.1. 7. Quantification of PAHs of 12 representative sewage sludges.

Whatever the type of sludges (domestic or industrial), the PCBs content is always below the detection limits.

Among the 12 samples analysed, R2 and U1 show total PAH contents 3 times higher than the recommended average value which is of 6 mg/kg (value recommended by the European union for the land disposal of sludge). These samples show particularly high amounts of benzo(a)pyrene, benzo(k)fluoranthene, fluoranthene, indeno(1.2.3-cd)pyrene and pyrene. Samples coming from industrial treatment show values below the detection limit regarding PAHs.

The contamination of sewage sludges by PAHs is well documented in several countries since these compounds are quantified by a routine procedure. The values for each PAH compound generally fall between 1 and 10 mg/kg (Berset & Holzer, 1995). Most authors determine these compounds in order to understand their environmental behaviour and fate, primarily because of their demonstrated carcinogenicity (Marcé & Borrull, 2000). However, PAHs are ubiquitous compounds originating from natural combustion (due for example to forest fires) or possibly microbiological synthesis (Berset & Holzer, 1999), or again from anthropogenic origins, such as industrial activities (Bieri *et al.*, 1986), heating from fossil fuels, or motor vehicle exhausts (Codina *et al.*, 1994) They enter the sewers because of the collecting of runoff waters and the precipitation of combustion products (Rogers, 1996; Miège *et al.*, 1999).

The main sources of PAHs in wastewater are (Codina *et al.*, 1994):

- exhaust gas and the runoff of raining water on roads,
- the fumes of industrial thermal units that reach the soil through raining water,
- the industrial effluents or petroleum wastes, which are, abnormally, present in domestic wastewater, or petroleum spillage.

PAHs are removed from the water phase by adsorption onto suspended solids during the biological wastewater-treatment process, and hence are accumulated in the sludge.

The high amounts of PAHs observed in sludge R2 cannot be justified by the first two sources referred to in the list above, which take into account diffuse inputs of PAHs. Indeed, R2 comes from a rural wastewater-treatment plant, where the vehicle traffic is very low and industrial setting up non existent. In the same way, a diffuse origin of PAHs in sludge U1 cannot be adduced, since the wastewater catchment is certainly urban and industrial but not as big as the catchment of U10 (480 000 inhabitants), which is characterised by a low amount of PAHs. The last source, which takes into account some unusual petroleum or industrial wastes or spillage, seems to be the most likely to explain such quantities of PAHs.

### 3.4. Characterisation of the aliphatic compounds

The analysis of the aliphatic fractions allows to distinguish sludges according to the distributions of *n*-alkanes, which are the dominant compounds present in these fractions. Three groups have been evidenced in our samples. In order to distinguish the different contributions in the samples analysed, the carbon preference index (CPI) was determined. It is generally used by petroleum geochemists in order to determine the proportion, by weight, of odd to even molecules (Bray & Evans, 1961), and was calculated as follows :

$$\text{CPI} = 0.5 \times ([\Sigma(\text{C}_{25}\text{-C}_{33}) / \Sigma(\text{C}_{24}\text{-C}_{32})] + [\Sigma(\text{C}_{25}\text{-C}_{33}) / \Sigma(\text{C}_{24}\text{-C}_{34})])$$

Moreover, the ratio between low molecular weight *n*-alkanes (from C<sub>15</sub> to C<sub>22</sub>) versus the *n*-alkanes of natural origin (C<sub>27</sub>+C<sub>29</sub>+C<sub>31</sub>) has also been calculated in order to estimate the proportion of low molecular weight *n*-alkanes in the samples which are characteristic of petroleum products. These ratios are given in table III.1.8 and detailed for each group.

<i>Samples</i>	<i>CPI</i>	<i>LMW/(C<sub>27</sub>+C<sub>29</sub>+C<sub>31</sub>)</i>	<i>Group</i>
M1	30.9	n.d	1a
M2	65.5	n.d	1a
R4	1.7	0.2	1a
SU3	2.4	0.3	1a
R1	2.3	0.3	1a
SU1	2.4	0.3	1a
U16	2.7	0.3	1a
U2	1.8	0.4	1a
SU4	1.9	0.4	1a
U12	1.8	0.4	1a
U7	2.2	0.4	1a
U8	2.6	0.5	1a
SU8	1.9	0.5	1a
U11a	2.2	0.5	1a
SU7	1.5	0.6	1a
SU12	1.9	0.6	1a
SU10	2	0.6	1a
U10a	1.9	0.7	1a
SU11	1.5	0.8	1a
U10b	1.9	1	1a
U13	1.6	1.3	1b
U3	2.2	1.4	1b
L1	2	1.4	1b
U10e	1.6	1.4	1b
U10c	1.9	1.5	1b
U10d	1.9	1.7	1b
U9	1.4	1.9	1b
U4	2	2	1b
U11b	1.5	2.3	1b
U14	1.6	2.8	1b
PM3	1	n.d	2
PM1	0.7	n.d	2
PM4	1	n.d	2
PM2	0.9	n.d	2
R2	n.d	n.d	3

R3	n.d	n.d	3
SU2	n.d	n.d	3
SU5	n.d	n.d	3
SU6	n.d	n.d	3
SU9	n.d	n.d	3
U1	n.d	n.d	3
U5	n.d	n.d	3
U15	n.d	n.d	3
U6	n.d	n.d	?
FP1	n.d	n.d	?
PM5	n.d	n.d	?
FP2	n.d	n.d	?
FP3	n.d	n.d	?

Table.III.1. 8. Results of the CPI and LMW/(C<sub>27</sub>+C<sub>29</sub>+C<sub>31</sub>)

(n.d : not determined ratios because of the absence of some targeted compounds)

## Group 1

### n-alkanes

The great majority of the samples of sewage sludges are characterised by distributions always dominated by the presence of odd carbon-numbered chains in the range of C<sub>25</sub> to C<sub>32</sub> (C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> and C<sub>31</sub> are especially predominant) with a more or less important contribution of low molecular weight *n*-alkanes. Figure III.1.7 represents the chromatograms of the *n*-alkanes of this group from M1 to U11b. M1 shows a distribution which is typical of higher plants contribution without low molecular weight *n*-alkanes, while the other samples and especially U11b show a marked bimodal distribution.

The predominance of odd over even carbon-numbered long chains is typical of cuticular waxes of terrestrial higher plants (Eglinton & Hamilton, 1967) which preferentially generate odd carbon compounds of high molecular weight (> C<sub>22</sub>). Thus, the high CPI (>>1) observed in the samples of group 1 suggest an important contribution of terrestrial plants.

In the manure sample and its compost (M1 and M2 respectively), the presence of a natural contribution is explained by the origin of these samples (which are mainly composed of wastes of higher plants). For the other samples such a natural contribution can be explained the transport of terrestrial plants debris by runoff water.

The presence of the low molecular weight *n*-alkanes (in the range of C<sub>15</sub>-C<sub>25</sub>) without even-odd predominance is characteristic of a contribution of fossil organic matter. In order to estimate the proportion of the fossil organic matter contribution versus the natural contribution, the LMW/(C<sub>27</sub>+C<sub>29</sub>+C<sub>31</sub>) was calculated for this group. The results (table III.1.8) enable us to sub-divide group 1 into 1a (value < 1) and 1b (value >1). The 20 samples

belonging to 1a are characterised by low ratios (between 0 for M1 and 1 for U10b), while the ratios of group 1b are high (between 1.3 for U13 to 2.8 for U14), indicating a dilution of the natural contribution by the presence of low molecular weight *n*-alkanes typical of fossil organic matter.

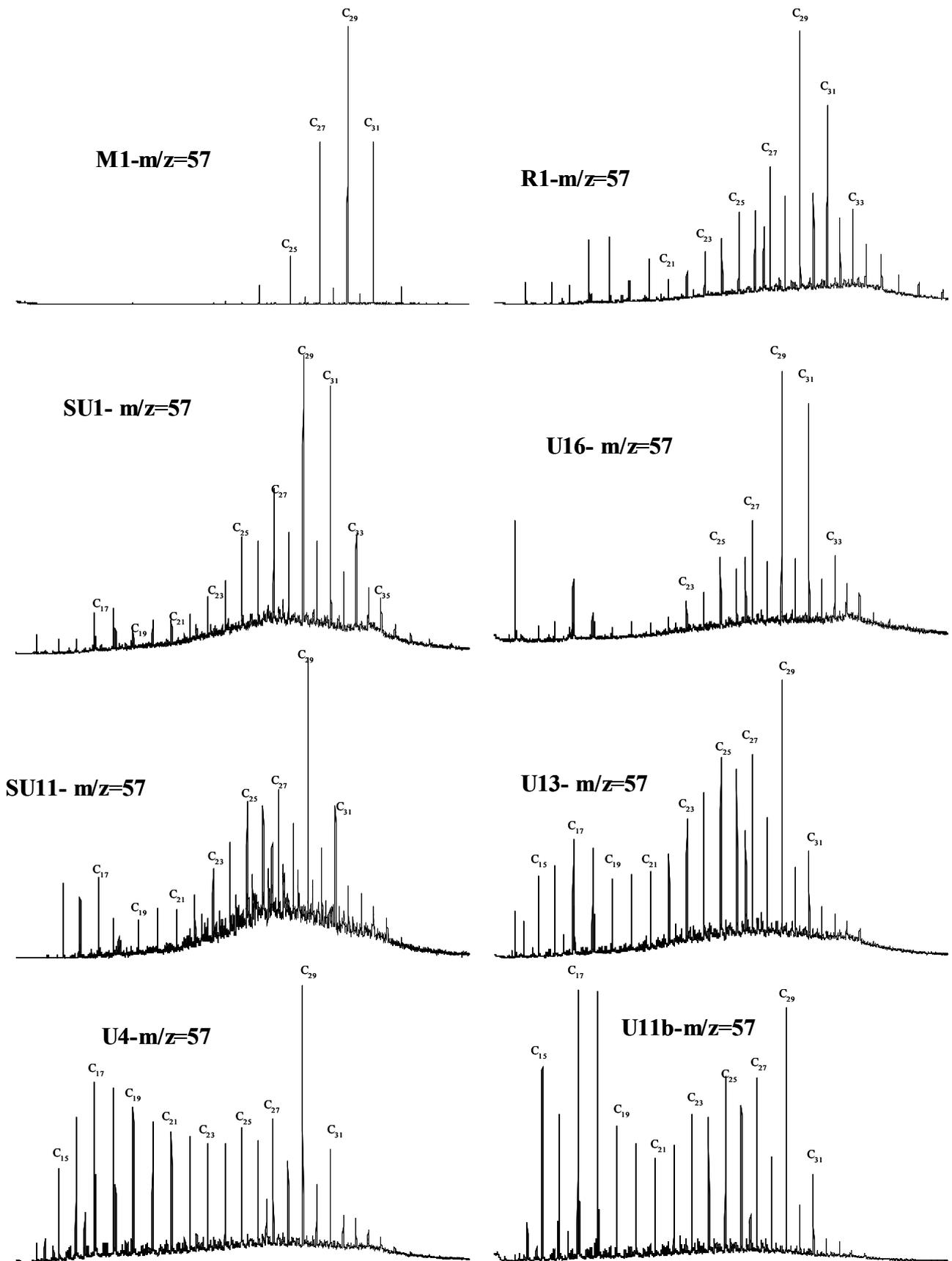


Figure III.1. 7. Chromatograms of the aliphatic fraction of Group 1.

### Pentacyclic triterpanes

The distribution of the pentacyclic triterpanes ( $m/z=191$ ) has been studied in the sludges of group 1. These compounds are present in all sludges, except in M1 and M2 and characterised by the predominance of  $17\alpha(H)$ ,  $21\beta(H)$ -30-norhopane and  $17\alpha(H)$ , $21\beta(H)$ -hopane associated with the  $C_{31}$ - $C_{35}$  homohopanes with higher amounts of S diastereomers than R (figure III.1.8, peak identification in Table III.1.9). These distributions are typical of a fossil organic matter origin (petroleum) (Ourisson *et al.*, 1979; Tissot & Welte, 1984; Philp, 1985). The variation in the isomerization at the C-22 position (proportion of 22R and 22S) in the  $C_{31}$  to  $C_{35}$   $17\alpha(H)$ -hopanes is generally used in organic geochemistry to determine the degree of maturity of oils (Philp, 1985; Peters & Moldowan, 1993). The  $22S/(22S+22R)$ - $C_{32}$  ratio has been calculated for all sludge and range between 0.5 (for U13) and 0.7 (for SU10). According to Philp (1985) and Peters & Moldowan (1993), these values are characteristic of mature fossil organic matter. The important fact is that the distribution of the hopanes is similar for all the samples whatever the size of the treatment plant, which suggests a common source of petroleum product. This observation tallies with the study of Eganhouse & Kaplan, (1982), who found the same distribution of hopanes in wastewater. This suggests a regular input of a mixture of petroleum products which enters the sewer systems and can be considered as a hydrocarbon background in sewage sludges. As detailed by Farrington & Quinn, (1973), several sources can explain such amounts of hydrocarbon in sewage sludges, such as oil washed from roads, hydrocarbons washed from atmosphere by rain or road asphalt particles.

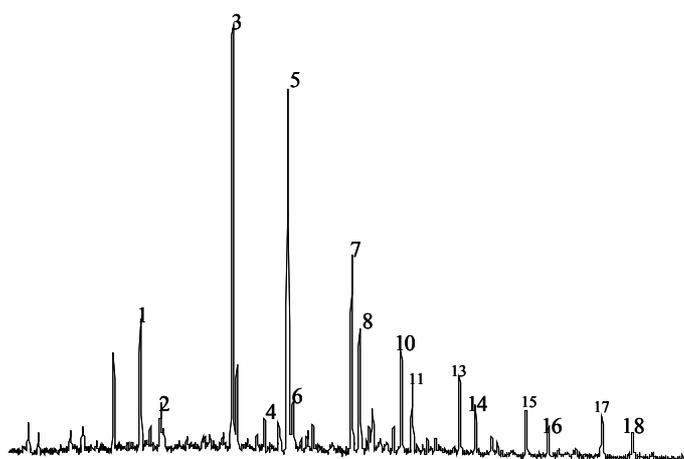


Figure III.1. 8. Distribution of the pentacyclic triterpanes ( $m/z=191$ ) observed in all sludges (excepted M1 and M2).

N°	Compounds	
1	18 $\alpha$ (H)-trisorhopane (Ts)	C <sub>27</sub>
2	17 $\alpha$ (H)-trisorhopane (Tm)	C <sub>27</sub>
3	17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30-norhopane	C <sub>29</sub>
4	17 $\beta$ (H),21 $\alpha$ (H)-normorétane	C <sub>29</sub>
5	17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-hopane	C <sub>30</sub>
6	17 $\beta$ (H),21 $\alpha$ (H)-morétane	C <sub>30</sub>
7	22S-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30-homohopane	C <sub>31</sub>
8	22R-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30-homohopane	C <sub>31</sub>
10	22S-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30 bishomohopane	C <sub>32</sub>
11	22R-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30 bishomohopane	C <sub>32</sub>
13	22S-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30 trishomohopane	C <sub>33</sub>
14	22R-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30 trishomohopane	C <sub>33</sub>
15	22S-17 $\alpha$ (H), 21 $\beta$ (H)-30 tétrakishomohopane	C <sub>34</sub>
16	22R-17 $\alpha$ (H), 21 $\beta$ (H)-30 tétrakishomohopane	C <sub>34</sub>
17	22S-17 $\alpha$ (H), 21 $\beta$ (H)-30 pentakishomohopane	C <sub>35</sub>
18	22R-17 $\alpha$ (H), 21 $\beta$ (H)-30 pentakishomohopane	C <sub>35</sub>

Table.III.1. 9. Identification of the pentacyclic triterpanes in figure III.7.

## Group 2

The distribution of the aliphatic compounds (figure III.1.9) of group 2 show the presence of high molecular weight *n*-alkanes, without any marked odd or even carbon number predominance, leading to a CPI close to 1 (between 0.7 for PM1 to 1 for PM4). Such a distribution is likely to originate from petroleum products of paraffinic nature. Such a distribution is characteristic of paper-mill sludges and might be explained by the use of paraffin in paper-paste factories.

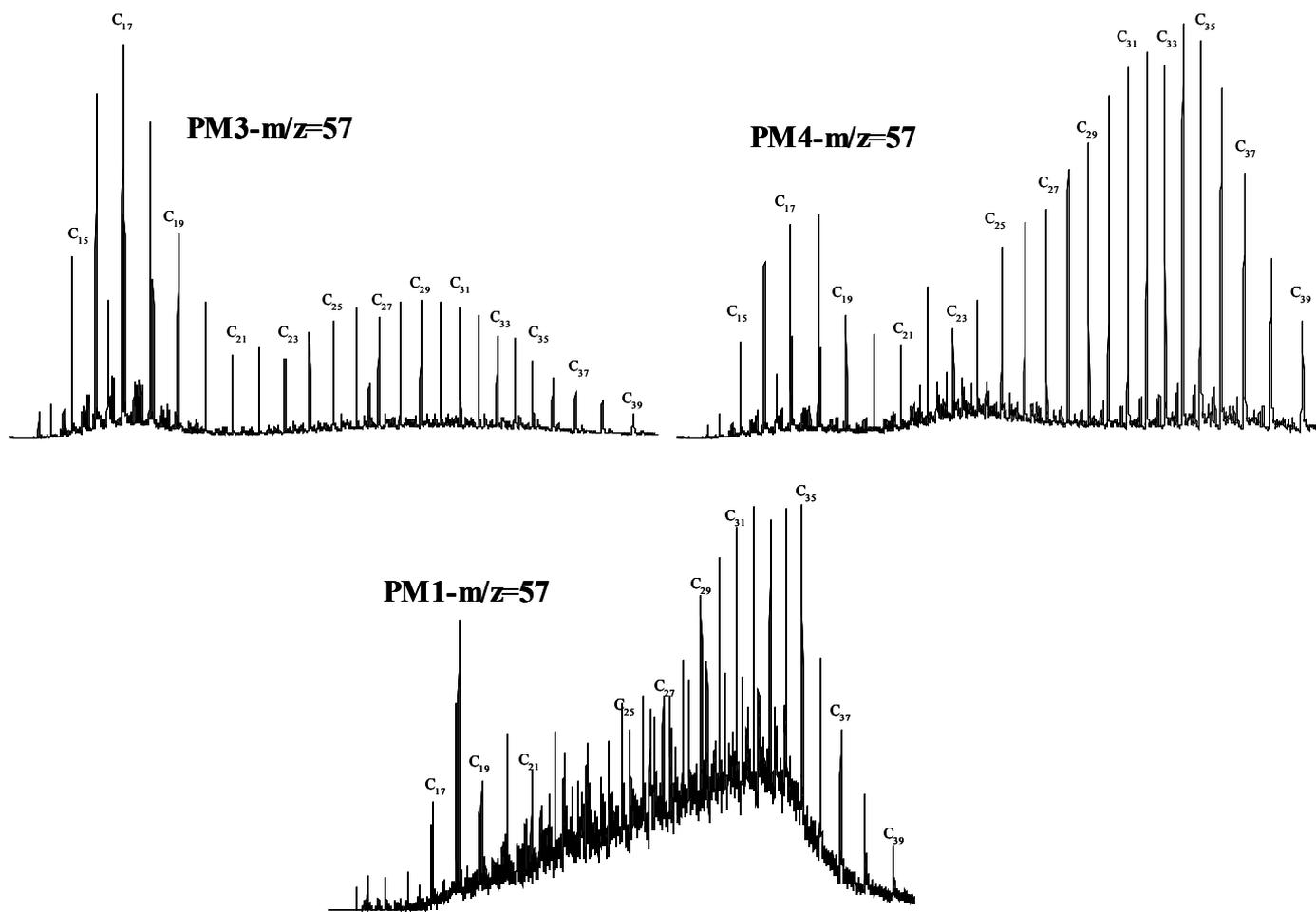


Figure III.1. 9. Chromatograms of the aliphatic fraction of paper-mill sludges characteristic of group 2.

### Group 3

The distributions of the aliphatic fractions of group 3 (figure III.1.10) are characterised by the presence of an unresolved complex mixture (UCM). It is composed of branched and cyclic aliphatic hydrocarbons, and elutes in the range of C<sub>13</sub> to C<sub>36</sub>. These samples are also characterised by the presence of hopanes which are typical of mature fossil organic matter. UCM are frequently present in petroleum-polluted sediments and are often attributed to microbially degraded petroleum residue resulting in the preferential degradation of *n*-alkanes. (Siefert & Moldowan, 1980). However, they are also characteristic of refined petroleum products (Farrington & Quinn, 1973; Eganhouse & Kaplan, 1982; Volkman *et al.*, 1997). The comparison between the aliphatic fractions of motor oil or tars and those of the samples of group 3 reveals strong similarities in their distributions and could evidence a possible contribution of these kind of products in sewage sludges (figure III.1.11). According to

Stronguilo *et al.*, (1994), sewage sludges can be contaminated with high concentrations of hydrocarbons resulting from small industrial and commercial spills.

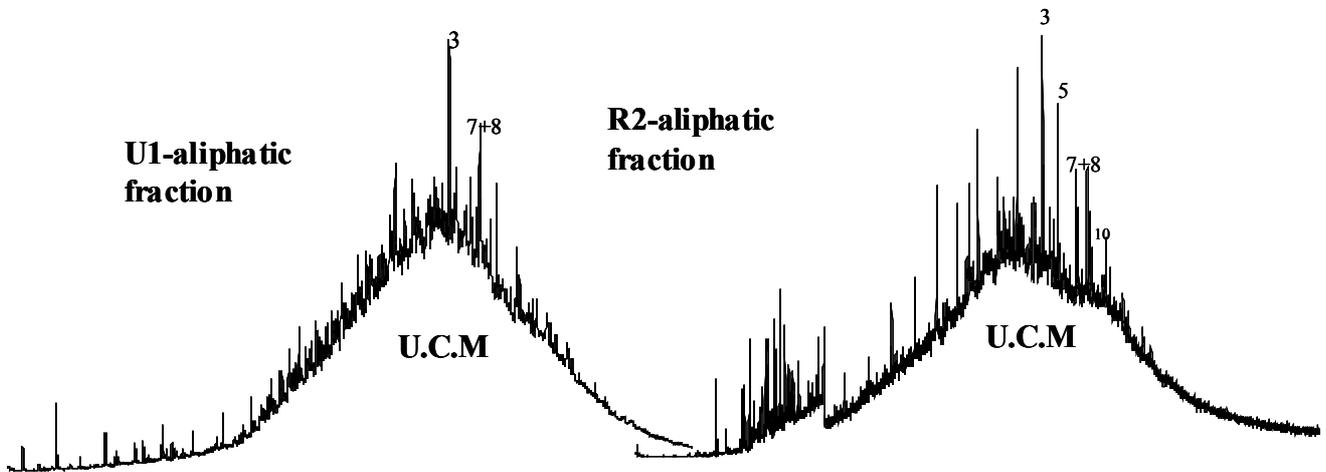


Figure III.1. 10 Chromatograms of the aliphatic fraction of 2 sewage sludges characteristic of group 3. (see table III.1.9 for identification)

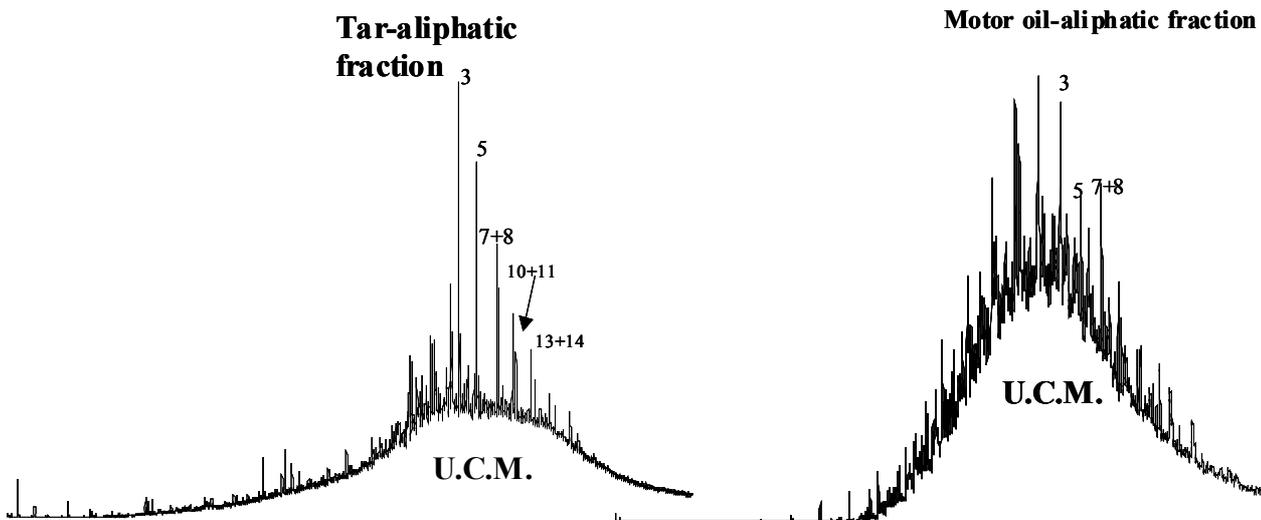


Figure III.1. 11. Chromatograms of the aliphatic fraction of tar and motor oil (see table III.1.9 for identification).

Among these samples, R2 and U1 are characterised by high amount of PAHs (20.43 and 17.41 mg/ kg respectively), whereas the wastewater-treatment plants they come from are located in a rural area (R2) and a small agglomeration (U1) with relatively medium urban areas in comparison with bigger urban stations such as U10. The correlation between the

occurrence of UCM observed in U1 and R2 and the abundance of PAHs suggest, as previously shown (Stronguilo *et al.*, 1994), the genetic relation between PAHs and a contamination by refined petroleum products. While it is not possible to determine whence the PAHs come from on the basis of their identification and quantification, the analysis of the aliphatic fraction might be a complementary tool to obtain information on the origin of PAHs. The high amount of PAHs in the stations of R2 and U1 and the distributions of the aliphatic fraction might indicate either that refined petroleum products were abnormally rejected in the domestic sewer systems of these stations.

#### 4. Conclusion

The molecular analysis of the lipidic fraction of a large number of sewage sludges enabled us to identify the major families of compounds characterising the different sewage sludges analysed.

Sewage sludges have been distinguished according to the nature of the treated effluent (domestic, food-processing or paper-mill). LABs are typical of domestic sludges,  $\beta$ -sitosterol and cholesterol of food-processing sludges, coprostanol of domestic sludges, and paper mill sludges are characterised by a specific distribution of *n*-alkanes typical of products of paraffinic nature. There is a relative homogeneity from one sludge to another belonging to each group evidencing an average organic composition typical of each group. Domestic sludges are characterised by an organic geochemical background essentially defined by two contributions, natural (higher plant) and petroleum. The petroleum contribution can be due to a regular input of a mixture of petroleum products which enters the sewer system of all domestic sludges. Nevertheless, some differences appear according to the distribution of the aliphatic fraction, a few domestic sludges are characterised by distributions very similar to those of heavy refined petroleum products. The correlation between this distribution and the abundance of PAHs in corresponding samples, suggest the genetic relation between PAHs and a contamination by refined petroleum products. The aliphatic distributions could also be used in order to determine accidental or petroleum contributions and consequently to provide tools to manage wastewater-treatment plant.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Agence de l'eau Rhin-Meuse and the Conseil Regional of Lorraine for their financial support.

## REFERENCES

- Berset, J.D. & Holzer, R. (1995) Organic micropollutants in Swiss agriculture: distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in soil, liquid manure, sewage sludge and compost samples; a comparative study. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, **59**, 145-165.
- Berset, J.D. & Holzer, R. (1999) Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sewage sludges using supercritical fluid extraction and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, **852**, 545-558.
- Bieri, R.H., Hein, C., Huggett, R.J., Shou, P., Slone, H., Smith, C. & Su, C.-W. (1986) Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from the Elizabeth river subestuary. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **26**, 97-113.
- Boocock, D.G.B., Konar, S.K., Leung, A. & Ly, L.D. (1992) Fuels and chemicals from sewage sludge. 1. The Solvent extraction and composition of a lipid from a raw sewage sludge. *Fuel*, **71**, 1283-1297.
- Bortlitz, J. & Malz, F. (1982) The influence of agricultural utilization of domestic sludge on the quality of the soil. In: *The influence of sewage sludge application on physical and biological properties of soils* (Ed. by G. Catroux, P. L'hermitte & E. Sues), pp. 87-106. Reidel, Dordrecht/Boston/London.
- Bray, E.E. & Evans, E.D. (1961) Distribution of *n*-paraffins as a clue to recognition of source beds. *Geochimica Cosmochimica Acta*, **22**, 2-15.
- Codina, G., Vaquero, M.T., Comellas, L. & Broto-Puig, F. (1994) Comparison of various extraction and clean-up methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soils. *Journal of Chromatography A.*, **673**, 21-29.

- Duarte-Davidson, R. & Jones, K.C. (1996) Screening the environmental fate of organic contaminants in sewage sludge applied to agricultural soils: 2. The potential for transfers to plants and grazing animals. *The Science of the Total Environment.*, **185**, 59-70.
- Eganhouse, R.P. (1982) Organic matter in municipal wastes and storm runoff: characterization and budget to the coastal waters of southern California. In: *Geochemistry*, pp. 230. University of California, Los Angeles.
- Eganhouse, R.P. & Kaplan, I.R. (1982) Extractable Organic Matter in Municipal Wastewater. 2. Hydrocarbons: Molecular Characterization. *Environment Science and Technology*, **16**(9), 541-552.
- Eganhouse, R.P., Blumfield, D.L. & Kaplan, I.R. (1983) Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment. *Environment Science and Technology*, **17**, 523-550.
- Eganhouse, R.P. & Gossett, R.W. (1991) Historical deposition and biogeochemical fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments near a major submarine wastewater outfall in southern California. In: *Organic Substances and Sediments in Water* (Ed. by R. A. Baker), pp. 191-220. Lewis, Boca Raton.
- Eganhouse, R.P. & Sherblom, P.M. (2001) Anthropogenic organic contaminants in the effluent of a combined sewer overflow: impact on Boston Harbor. *Marine Environmental Research*, **51**, 51-74.
- Eglinton, G. & Hamilton, R.J. (1967) Leaf epicuticular waxes. *Science*, **156**, 1322-1335.
- Farrington, J.W. & Quinn, J.G. (1973) Petroleum hydrocarbons and fatty acids in wastewater effluents. *Journal Water Pollution Control Federation*, **45**, 704-712.
- Férézou, J., Gouffier, E., Coste, T. & Chevallier, F. (1978) Daily elimination of faecal sterols by humans. *Digestion*, **18**, 201-212.
- Gaskell, S.J. & Eglinton, G. (1975) Rapid hydrogenation of sterols in contemporary lacustrine sediment. *Nature*, **254**, 209-211.
- Gunstone, F.D. (1967) *An introduction to the chemistry and biogemistry of fatty acids and their glycerides*. Chapman & Hall, London.
- Holt, M.S. & Bernstein, S.L. (1992) Linear Alkylbenzenes in sewage sludges and sludge amended soils. *Water Research*, **26**(5), 613-624.
- Ishiwatari, R., Takada, H., Yun, S.J. & Matsumoto, E. (1983) Alkylbenzene pollution of Tokyo Bay sediments. *Nature*, **301**, 599-600.

- Jambu, P., Fustec, E. & Jacquessy, R. (1978) Les lipides des sols: nature, origine évolution, propriétés. *Bull. de l'association française pour l'étude du sol*, **4**, 229-240
- Larson, W.E., Clapp, C.E. & Dowdy, R.D. (1972) Inrerim report on the agricultural values of sewage sludges. USDA-Agricultural Research Service and Department of Soil Science, St Paul, Minnesota.
- Leeming, R., Ball, A., Asholt, N. & Nichols, P.D. (1996) Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Research*, **30**(12), 2893-2900.
- Li, Y., Michels, R., Mansuy, L., Fleck, S. & Faure, P. (2002) Comparison of pressurized liquid extraction with classical solvent extraction and microwave-assisted extraction-application to the investigation of the artificial maturation of Mahakan coal. *Fuel*, **81**, 747-755.
- Linster, M. (1991) The impact of sewage sludge in agriculture. In: *Towards Sustainable Agricultural Development* (Ed. by M. D. Young), pp. 120-336. Belhaven Press, London/New York.
- Mangas, E., Vaquero, M.T., Comellas, L. & Broto-Puig, F. (1998) Analysis and Fate of Aliphatic hydrocarbons, linear alkylbenzenes, polychlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soils. *Chemosphere*, **36**(1), 61-72.
- Mansuy, L., Bourezgui, Y., Garnier-Zarli, E., Jardé, E. & Réveillé, V. (2001) Characterisation of humic substances in highly polluted river sediments by pyrolysis mehylation-gas chromatography-mass spectrometry. *Organic Geochemistry*, **32**, 223-231.
- Marcé, R.M. & Borrull, F. (2000) Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *Journal of Chromatography A.*, **885**, 273-290.
- Martin, W.J., Ravi Subbiah, M.T., Kottke, B.A., Birk, C.C. & Naylor, M.C. (1973) Nature of fecal sterols and intestinal bacterial flora. *Lipids*, **8**(208-215).
- Marty, Y., Quéméneur, M., Aminot, A. & Le Corre, P. (1996) Laboratory study on degradation of fatty acids and sterols from urban wastes in seawater. *Water Research*, **30**(5).
- McCalley, D.V., cooke, M. & Nickless, G. (1981) Effect of sewage treatment on faecal sterols. *Water Research*, **15**, 1019-1025.
- Metcalf, L.D. (1974) Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base-catalyzed transesterification. In: *American Oil Chemists' Society*, Mexico.
- Miège, C., Bouzige, M., Nicol, S., Dugay, J., Pichon, V. & Hennion, M.C. (1999) Selective immunoclean-up followed by liquid or gas chromatography for the monitoring of

- polycyclic aromatic hydrocarbons in urban wastewater and sewage sludges used for soil amendment. *Journal of Chromatography A*, **859**, 29-39.
- Milne, R.A. & Graveland, D.H. (1972) Sewage sludge as a fertilizer. *Canadian Journal of Soil Science*, **52**, 270-273.
- Moreda, J.M., Arranz, A., Fdez de Betono, S., Cid, A. & Arranz, J.F. (1998) Chromatographic determination of aliphatic hydrocarbons and polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in a sewage sludge. *The Science of the Total Environment*, **220**, 33-43.
- Muller, G., Kanazawa, A. & Teshima, S. (1979) Sedimentary record of fecal pollution in Lake Constance by coprostanol determination. *Naturwissenschaften*, **66**, 520-522.
- O'Connor, G.A. (1996) Organic Compounds in sludge-amended soils and their potential for uptake by crop plants. *The Science of Total Environment*, **185**, 71-81
- Ollivon, D., Blanchard, M. & Garban, B. (1999) PAH fluctuations in rivers in the Paris region (France): impact of floods and rainy events. *Water, Air, and Soil Pollution*, **115**, 429-444.
- Ourisson, G., Albrecht, P. & Rhomer, M. (1979) The hopanoids. Paleochemistry and biochemistry of a group of natural products. *Pure and Applied Chemistry*, **51**, 709-729.
- Perry, G.J., Volkman, J.K., Johns, R.B. & Bavor, J.H. (1979) Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **43**(1715-1725).
- Peters, K.E. & Moldowan, J.M. (1993) *The biomarker guide- Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediment*. Peters and Moldowan.
- Phillips, C.R., Venkatesan, M.I. & Bowen, R. (1997) Interpretations of contaminant sources to San Pedro Shelf sediments using molecular markers and principal component analysis. In: *Molecular markers in environmental geochemistry* (Ed. by E. R.P.), pp. 242-260, Washington.
- Philp, R.P. (1985) *Fossil fuel biomarkers- Applications and Spectra*. Elsevier Science, New York.
- Piccolo, A., Zaccheo, P. & Genevini, P.G. (1992) Chemical characterization of humic substances extracted from organic-waste-amended soils. *Bioresource Technology*, **40**, 275-282.

- Rao, K.S., Dominic, R., Singh, K., Kaluwin, C., Rivett, D.E. & Jones, G.P. (1990) Lipid fatty acid, amino acid and mineral compositions of five edible plant leaves. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **38**, 2137-2139.
- Rogers, H.R. (1996) Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. *The Science of the Total Environment*, **185**, 3-26.
- Seguel, C.G., Mudge, S.M., Salgado, C. & Toledo, M. (2001) Tracing sewage in the marine environment: altered signatures in concepcion bay, Chile. *Water Research*, **17**, 4166-4174.
- Sherblom, P.M., Henry, P.S. & Kelly, D. (1997) Questions remains in the use of coprostanol and epicoprostanol as domestic waste markers: examples from coastal Florida. In: *Molecular Markers in Environmental Geochemistry* (Ed. by R. P. Eganhouse), pp. 306-319.
- Siefert, W.K. & Moldowan, J.M. (1980) The effect of thermal stress on source-rock quality as measured by hopane stereochemistry. In: *Physics and chemistry of the earth, 12* (Ed. by D. A.G. & M. J.R.), pp. 230-259. Pergamon.
- Sommers, L.E. (1977) Chemical composition of sewage sludges and anlysis of their potential use as fertilizers. *Journal of environmental quality*, **6**, 225-232
- Stefanova, M. & Disnar, J.R. (2000) Composition and early diagenesis of fatty in lacustrine sediments, lake Aydat (France). *Organic geochemistry*, **31**, 41-55.
- Stevenson, F.I. (1985) Geochemistry of soil humic substances. In: *Humic substances in soil, sediments and water* (Ed. by A. G. R. e. a. eds.), pp. 13-52. Wiley Intersciences.
- Stronguilo, M.L., Vaquero, M.T., Comellas, L. & Broto-Puig, F. (1994) The fate of petroleum aliphatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soils. *Chemosphere*, **29**(2), 273-281.
- Takada, H. & Eganhouse, R.P. (1998) Molecular markers of anthropogenic waste. In: *Encyclopedia of environmental analysis and remediation* (Ed. by R. A. Meyers), pp. 2883-2940. John Wiley & Sons, Inc.
- Takada, H. & Ishiwatari, R. (1987) Linear alkylbenzenes in urban riverine environments in Tokyo: distribution, sources and behavior. *Environment Science and Technology*, **21**, 875-883.
- Taylor, C.D., Smith, S.O. & Gargosian, R.B. (1981) Use of microbial enrichments for the study of the anaerobic degradation of cholesterol. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **45**, 2161-2168.

- Tissot, B.P. & Welte, D.H. (1984) *Petroleum formation and occurrence*. Springer-Verlag, Berlin.
- Tunlid, A. & White, D.C. (1990) Use of lipid biomarkers in environmental samples. In: *Analytical microbiology methods* (Ed. by P. Press), pp. 259-274. Fox Alvin.
- Viswanathan, C.V. & Kukar, T.J. (1962) Fatty matter in aerobic and anaerobic sewage sludges. *Journal of Water Pollution Control Federal*, **34**, 189.
- Volkman, J.K. (1986) A review of sterol for marine and terrigenous organic matter. *Organic Geochemistry*, **9**(2), 83-99.
- Volkman, J.K., Revill, A.T. & Murray, A.P. (1997) Application of biomarkers for identifying sources of natural and pollutant hydrocarbons in aquatic environments. In: *Molecular markers in environmental geochemistry* (Ed. by R.P.Eganhouse), pp. 110-132. American Chemical Society Symposium Series 671, Washington D.C.
- Walker, R.W., Wun, C.K. & Litsky, W. (1982) Coprostanol as an indicator of fecal pollution. *Critical Reviews in Environmental Control*, **10**(91-112).
- Walter, L. (1961) Composition of sewage and sewage effluents-II. *Water and Sewage Works*, **108**, 478.
- William, J.A., Sharma, A., Morris, J.L. & Holman, R.T. (1960) Fatty acids composition of feces and fecaliths. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **105**(192-195).

## X. CONCLUSION

Les boues d'épuration correspondent à des mélanges complexes de composés provenant de la dégradation des produits transportés par les eaux usées de cuisine, sanitaires et toutes les eaux usées entrant accidentellement ou intentionnellement dans le système de collecte des stations d'épuration. En raison du nombre de contributions possibles, la fraction organique des boues est un compartiment complexe, rarement analysé dans son intégralité. Le but de notre étude était de mieux caractériser le contenu organique des boues d'épuration, le premier volet de cette étude s'est intéressé à l'analyse de la fraction organique soluble (FOS) aux solvants organiques.

L'analyse de la composition de la FOS des 48 boues d'épuration analysées met en évidence que les composés polaires sont les composés majoritaires (48 à 90%) dans toutes les boues. Un autre trait commun à toutes les boues quelle que soit leur origine et la taille de la station, est la mise en évidence d'une contribution bactérienne importante quantifiée par le rapport  $AG_{\text{bact}}/\Sigma AG$  tout à fait attendue du fait de la nature même de la boue.

Les boues peuvent toutefois être différenciées en fonction de leur origine par la présence ou l'absence de certains composés. Les boues de papeterie sont caractérisées par des distributions de n-alkanes typiques de produits pétroliers paraffiniques, par l'absence de stérols et de LABs. Ces derniers sont également absents des fractions aromatiques des boues agro-alimentaires. Les boues domestiques se distinguent par la présence des LABs et par une distribution de stérols dominée par le coprostanol typique des matières fécales humaines. Par ailleurs, les fractions aliphatiques de la majorité des boues domestiques ont des distributions caractérisées par une double contribution, pétrolière et naturelle. La contribution pétrolière est identifiée par la présence systématique de hopanes dans les boues domestiques dont la distribution est typique de produits pétroliers. La distribution similaire des hopanes dans toutes les boues souligne une source commune à ces produits pétroliers dans les boues et peut être imputée à un apport diffus d'un mélange de produits provenant du lessivage des infrastructures routières. L'analyse de la fraction aliphatique de quelques boues domestiques a également permis de mettre en évidence des distributions de n-alkanes très atypiques et similaires à des distributions de produits pétroliers hautement raffinés tels que des huiles moteurs ou des asphaltes routiers. De telles distributions peuvent être corrélées aux fortes teneurs en HPAs mesurées dans les fractions aromatiques correspondantes. Une station en milieu rural (R2) est notamment caractérisée par des quantités très importantes de HPAs qui ne peuvent pas être imputées à une pollution diffuse. Par ailleurs, une station urbaine de taille

moyenne (U1) est également concernée avec des teneurs en HPAs mesurées trois fois supérieures à celles mesurées dans la plus grande station urbaine étudiée (U10). L'analyse des fractions aliphatiques des boues peut amener des éléments de réponse quant à la source des fortes teneurs en HPAs mesurées dans des boues où le trafic routier seul ne peut pas justifier de telles quantités. Les distributions de n-alkanes typiques de produits pétroliers raffinés pourraient indiquer des déversements accidentels ou ponctuels de produits pétroliers d'origine industrielle ou domestique dans le réseau d'assainissement.

L'analyse qualitative de la FOS dans son intégralité a donc permis tout d'abord de différencier les boues en fonction de leur origine (domestiques, laiterie ou papeterie). Une relative homogénéité de composition a également pu être mise en évidence au sein de chaque groupe déterminant un fonds géochimique organique typique de chaque groupe de boues. Deux contributions particulières définissent essentiellement le fonds géochimique organique de la majorité des boues domestiques, une contribution de matière organique récente (végétale) et une contribution de matière organique fossile (apport diffus de produits pétroliers). Une certaine variabilité peut toutefois être mise en évidence à partir de ce fonds géochimique pour certaines boues domestiques, notamment grâce à l'analyse des composés aliphatiques caractérisant des pollutions accidentelles ou ponctuelles de produits pétroliers raffinés dans le système de collecte des eaux usées domestiques.

L'application d'une méthodologie pétrolière à l'analyse des boues est pleinement justifiée, puisqu'une partie des composés analysés est d'origine pétrolière. D'autre part, cette étude a montré l'intérêt de travailler sur d'autres composés que les HPAs ou PCBs habituellement ciblés, puisque l'analyse de la FOS et notamment des composés aliphatiques fournit des éléments de réponse quant à la source de ces micropolluants organiques. Il serait maintenant intéressant de poursuivre dans cette voie en réalisant une étude à l'échelle d'une station d'épuration en milieu faiblement urbanisé, caractérisée par des fortes teneurs en HPAs.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence certaines variations qualitatives selon la nature de l'effluent traité d'une part, et selon la nature des produits entrant accidentellement ou ponctuellement dans le système de collecte d'autre part. Afin de confirmer les tendances observées, une quantification des différentes familles de composés identifiés est nécessaire. D'une part, la quantification des composés aliphatiques permettrait d'évaluer avec plus de précision la proportion des contributions pétrolières et naturelles dans les boues domestiques, d'autre part une quantification des acides gras et des stérols est essentielle puisque ces

composés hydrophobes pourront avoir entre autres, des conséquences néfastes sur la capacité de rétention en eau du sol.

## **CHAPITRE II**

*Caractérisation moléculaire de la  
fraction organique insoluble de boues  
résiduaire de stations d'épuration*



## I. INTRODUCTION

Parallèlement aux études concernant les composés extractibles, certains auteurs se sont intéressés à la caractérisation du contenu organique des fractions insolubles (FOI). En effet, l'étude de la FOI permet d'acquérir une meilleure connaissance de la composition chimique des boues, laquelle est essentielle puisqu'elle gouverne leur réactivité et les interactions potentielles avec des composés organiques et inorganiques des sols après épandage (Senesi *et al.*, 1996). Les auteurs s'intéressent le plus souvent à la caractérisation des substances humiques des boues pour les comparer avec celles des sols (Albiach *et al.*, 2001; Deboz *et al.*, 2002). A cette fin, des techniques globales ou de spectroscopie (IR, NMR) sont employées afin d'obtenir des informations sur la nature des groupements fonctionnels des substances humiques. D'autres techniques, comme la pyrolyse analytique couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à un spectromètre de masse ont également été utilisées pour l'analyse des boues (Miikki *et al.*, 1999; Réveillé, 2001; Réveillé *et al.*, 2002) puisqu'elles permettent d'obtenir des informations sur la composition chimique de la structure macromoléculaire à l'échelle moléculaire (Barrio *et al.*, 1996).

Deux applications de l'utilisation de la pyrolyse analytique à l'étude de la FOI des boues d'épuration ont été développées dans ce chapitre. Les données ainsi que les interprétations sont présentées sous forme d'articles.

Le premier article traite de la caractérisation de l'ensemble des échantillons de boues d'épuration par la technique de méthylation et hydrolyse assistée couplée à la GC-MS (THM-GC-MS) largement décrite par Challinor (2001). Une méthodologie basée sur la semi-quantification des pyrogrammes et sur leur analyse qualitative a été développée dans le but de déterminer les différences ou les points communs entre les boues étudiées. Il a été accepté par la revue *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* comme acte du 15<sup>th</sup> International Symposium on Analytical and Applied Pyrolysis qui a eu lieu à Leoben (Autriche) du 17 au 20 septembre 2002.

Le second article s'intéresse au développement d'une méthode statistique à partir des données de pyrolyse analytique - chromatographie en phase gazeuse - détecteur à émission atomique (Py-GC-AED). Cette technique a été développée en complément de la semi-quantification effectuée sur les FOI à partir des pyrogrammes de Py-GC-MS, puisque le détecteur AED permet une analyse multi-élémentaire (analyse sur les canaux de carbone, de l'azote et du soufre). Le détecteur à émission atomique s'est révélé particulièrement

intéressant dans l'étude des échantillons riches en hétéroatomes tels que les boues d'épuration. Cependant, avec un grand nombre d'échantillon, il est difficile de dégager l'information importante générée par les pyrogrammes. C'est pourquoi des méthodes statistiques ont été appliquées aux résultats obtenus afin de classer les échantillons en fonction de leur composition élémentaire et d'identifier les composés qui permettent de différencier ces groupes. Il a été soumis à la revue *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*.

## **XI. CARACTERISATION DES RESIDUS SOLIDES PAR METHYLATION ET HYDROLYSE ASSISTEE (THM) COUPLEE A LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE ET A LA SPECTROMETRIE DE MASSE.**

### **Characterisation of the macromolecular organic content of sewage sludges by thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography-mass spectrometer (THM-GC-MS)**

Emilie JARDE, Laurence MANSUY and Pierre FAURE

UMR7566, G2R UHP, BP 239-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

---

#### **ABSTRACT**

The aim of this study is to determine a methodology enabling us to simplify the information generated by THM-pyrograms of sludges and to provide an insight into the sludges according to their chemical composition. The insoluble organic fractions of 48 sewage sludges originating from industrial (food-processing and paper-mill) and domestic (urban, small urban, and rural) wastewater treatment plants of the region of Lorraine (Northeast of France) were characterised by THM-GC-MS. A relative quantification of the pyrograms by integration of the major peaks was then carried out. The results of this integration were plotted in a triangular diagram defined by the poles corresponding to the three major families evidenced in the pyrograms (lignin-derived, lipid-derived and nitrogenous compounds).

This type of representation enables us to separate paper-mill sludges from the others, because they are characterised by high amounts of lignin-derived compounds. The majority of domestic sludges and food-processing sludges are gathered and characterised by an intermediate composition in lipid-derived, lignin-derived and nitrogenous compounds, but seven urban sludges show an evolution of their chemical composition towards the lipid pole. The domestic sludges can be separated from the others on the basis of their molecular nitrogenous distribution. Such a methodology is complementary with the qualitative analysis of pyrograms and makes it possible to approach the chemical composition of sludges, which governs their reactivity once they are disposed on soil.

**Key words:** *THM-GC-MS, sewage sludges, triangular diagram, insoluble organic fraction*

## 1. Introduction

Besides regulations, there is a strong need to understand the structure and the chemical composition of sewage sludges better in order to monitor their fate once disposed on soils.

Moreover, the understanding of the chemical composition of sludges is important since it allows to foresee their reactivity and the interactions with the organic and inorganic compounds of soil (Senesi *et al.*, 1996). Many studies deal with the fate of organic and inorganic micropollutants extracted by organic solvents (Moreda *et al.*, 1998; Berset & Holzer, 1999). However, this fraction accounts for less than 10% of the total organic content of sewage sludges. The macromolecular content of sewage sludges is generally studied for its influence on soil (Albiach *et al.*, 2001; Deboz *et al.*, 2002) with a time-consuming extraction of sewage sludges (based on the IHSS method) to recover humic substances (which only represent a part of the solid organic fraction). Because of the complexity of the protocol used, main studies treat a small number of samples. An important limitation is that the protocol used is not fully adapted to sewage sludges because the humic substances of sewage sludges are very different from those of soils, and co-extraction of non-humidified compounds can occur (Riffaldi *et al.*, 1983). Therefore, according to Boyd *et al.*, (1980) and Riffaldi *et al.* (1983), some contradictions appear in the determination of the functionality of the humic substances of sludges. Such differences may be attributed to different methods for the extraction and purification of humic substances and the determination of functional groups. The macromolecular content of sewage sludges is often studied for the determination of bulk parameters such as pH, elemental analysis or by spectroscopic analyses (IR or NMR) which provide global data on the nature and functionality of the humic substances of sewage sludges (Gonzalez-Vila *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002).

Few data have been collected on the molecular composition of sewage sludges (Garcia *et al.*, 1992; Miikki *et al.*, 1999; Réveillé *et al.*, 2002), while such a characterisation is important to provide molecular markers to trace sludges in different environments and to identify potential abnormal accumulation of these wastes (Mansuy *et al.*, 2001). Moreover, the chemical composition of the macromolecular content of sludges governs its reactivity and its behaviour once disposed on soils. Pyrolytic techniques coupled to mass spectrometry or gas chromatography-mass spectrometry have proven to be particularly useful to get information on the chemical composition of solid organic material at a molecular level (Barrio *et al.*, 1996), even if we know that pyrolysis products correspond only to a part of the insoluble organic fraction. Pyrolysis is very reproducible, and modifications to the pyrolysis process

such as high-temperature chemical reactions provide additional chemical structure information not readily obtainable by conventional Py-GC-MS (Challinor, 2001). The technique of thermally assisted hydrolysis and methylation (THM) coupled to GC-MS has been applied to the chemical characterisation of a large number of materials. These applications have been compiled in detail by Challinor (2001). Among them, we can emphasize the use of THM for the characterisation of synthetic and natural materials such as humic substances from recent sediments (Hatcher & Clifford, 1994; Saiz-Jimenez, 1994), organic macromolecules (del Rio *et al.*, 1998) or sewage sludges (Miikki *et al.*, 1999; Réveillé *et al.*, 2002). Degradation products can be identified, possibly quantified, and related to original moieties present in the structure of the organic macromolecular material. THM-GC-MS gives structural information and an organic fingerprint of the organic macromolecular material, enabling us to compare the samples to one another.

However, when numerous samples are studied, it becomes very complicated to highlight the important information of the pyrograms. This problem can be overcome by submitting the pyrograms to a relative quantification. To achieve that, the insoluble organic matter of 48 sewage sludges from domestic (rural, small urban and urban samples) and industrial (food-processing and paper-mill samples) wastewater-treatment plants of Lorraine (Northeast of France) were analysed by THM-GC-MS before the relative quantification took place and the quantitative data were plotted in a triangular diagram.

## 2. Experimental

### 2.1. Sampling and sample preparation

Sewage sludges were sampled at domestic (4 rural, 12 small urban and 21 urban samples), paper-mill (5), food-processing (2 dairy and 1 cheese-dairy) wastewater treatments plants of Lorraine located in the Northeast of France. Moreover one sample originating from a purifying lagoon system and two samples of cow-manure (raw and composted samples) were collected. This sampling corresponds to various wastewater-treatments (activated or bacterial bed) and the characteristics of the samples have been summed up in table III.2.1.

<i>Name of wastewater treatment plant</i>	<i>Capacity (eqh)</i>	<i>Type of station</i>	<i>Recycling by land disposal</i>
FP1		Food-processing	yes
FP2		Food-processing	Yes
FP3		Food-processing	Yes
PM1		Paper-mill	No
PM2		Paper-mill (compost)	Yes
PM3		Paper-mill	Yes
PM4		Paper-mill	Yes
PM5		Paper-mill	Yes
L1	477	Purifying lagoon system	Yes
R1	1150	Rural	Yes
R2	2000	Rural	Yes
R3	1600	Rural	Yes
R4	550	Rural	Yes
SU1	4200	Small urban	Yes
SU2	3800	Small urban	no
SU3	5800	Small urban	No
SU4		Small urban	Yes
SU5	3375	Small urban	Yes
SU6	7400	Small urban	Yes
SU7		Small urban	No
SU8	8300	Small urban	Yes
SU9	7400	Small urban	Yes
SU10	3500	Small urban	Yes
SU11	9000	Small urban	Yes
SU12	4200	Small urban	Yes
U1	24500	Urban	No
U2	11200	Urban	Yes
U3	16166	Urban	Yes
U4	65000	Urban	No
U5	44333	Urban	Yes
U6	22000	Urban	Yes
U7	21000	Urban	Yes
U8	49635	Urban	Yes
U9	33000	Urban	No
U10a	480000	Urban	Yes
U10b	480000	Urban	
U10c	480000	Urban	
U10d	480000	Urban	
U10e	480000	Urban	
U11a	340000	Urban	No
U11b	340000	Urban	No
U12	20385	Urban	Yes
U13	83000	Urban	Yes
U14	25375	Urban	Yes
U15	15000	Urban	Yes
U16	52500	Urban	Yes
M1		Cow Manure	
M2		Composted manure	

Table III.2 1: Characteristics of the samples collected in wastewater treatment plants of Lorraine.

Note : U for urban sludge, SU for small urban sludge, R for rural sludge, PM for paper-mill sludge, FP for food-processing sludge and M for manure

The difference between urban, small urban and rural sludges is based on the capacity (eqhab) of the stations: rural when the capacity is below 2000 eqhab, small urban when the capacity is between 2000 and 10,000, and urban when the capacity is above 10,000.

After sampling, the initial sewage sludge was frozen during five days, and then freeze-dried during ten days. The samples were then crushed and sieved (<500 µm). Then, each freeze-dried sample was extracted by accelerated solvent extractor (ASE2000 Dionex®) with a dichloromethane / methanol (65/35) mixture. The protocol used is a modification of the one described by Li *et al.* (2002) by extracting four times 5 g of freeze-dried samples, with samples dispersed by silica glass in order to improve the extraction. The residues from the extraction containing insoluble organic matter (called insoluble residues in this article) were then analysed by THM-GC-MS to characterise their organic macromolecular content.

The total organic content (TOC) was determined by combustion under oxygen at 1400°C with a Carbon-Nitrogen LECO SC 144DRPC analyser at the SARM-CRPG laboratory (Vandoeuvre-lès-Nancy, France).

## **2.2. Thermally assisted hydrolysis methylation- GC-MS (THM-GC-MS)**

The insoluble residues of each sample were mixed with tetramethylammonium hydroxide (1/10 by weight) according to the procedure described by Hatcher and Clifford (1994). The mixture of insoluble residue and TMAH (1-2 mg) was then placed into a quartz tube and the THM-GC-MS analyses were carried out on an HP 5890 Series II GC, using a split/splitless injector, coupled to an HP 5971 mass spectrometer. On-line pyrolysis at 620°C was performed with a CDS 2000 Pyroprobe during 15 seconds. Pyrolysis products were separated on a 60 m DB-5 J&W, 0.25 mm diameter, 0.1 µm film-fused silica column. After cryofocusing, the temperature program was 0°C for 1 min, 70°C/min to 40°C followed by an isothermal stage at 40°C for 6 min, then 6°C/min to 300°C, followed by an isothermal stage at 300°C for 20 minutes.

All the compounds present in the pyrograms were identified by their mass spectra, by comparison with those found in literature (Challinor, 1995; Fabbri & Helleur, 1998) or with compounds identified in pyrograms of standards analysed in the same conditions (especially for lignin-derived compounds).

## **2.3. Relative quantification**

Integration of mass chromatograms of relevant m/z values was performed and the peak areas obtained were multiplied with a correction factor accounting for differences in mass spectrometric responses of the targeted compounds. The correction factor was calculated from

the mass spectrum of each compound by taking the inverse of the percentage of the total ion current of the relevant  $m/z$  value and multiplying it by 100 (Hartgers *et al.*, 1994). The integration of the pyrograms was performed by a program realised in Basic in order to automate it. The data were then plotted in a triangular diagram defined by three poles corresponding to lipid-derived compounds, lignin-derived compounds and nitrogenous ones.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Global analysis

The results of the total organic carbon (TOC) contents of the sewage sludges are given in Table III.2.2 and figure III.2.1.

<i>Samples</i>	<i>T.O.C (%)</i>	<i>FOI (mg/g T.O.C)</i>
FP1	15.29	607.6
FP2	12.68	613.9
FP3	18.19	435
PM1	14	809.6
PM2	21.96	660.5
PM3	12.32	717.3
PM4	n.d	n.d
PM5	13.21	773.6
L1	23.89	n.d
R1	19.78	734.7
R2	18.55	666
R3	14.82	297.5
R4	n.d	n.d
SU1	18.17	171
SU2	19.15	634
SU3	21.90	662
SU4	21.29	129.3
SU5	18.60	205.6
SU6	21.71	499.8
SU7	27.58	n.d
SU8	15.87	547.7
SU9	10.87	704.9
SU10	n.d	n.d
SU11	17.73	85.6
SU12	19.56	747.3
U1	18.68	667.2
U2	21.76	98.3
U3	21.02	586.3
U4	15.21	218.6
U5	15.60	425.6
U6	20.24	451.3
U7	20.60	616
U8	6.49	666.5

U9	16.29	528.8
U10a	14.86	683
U10b	14.22	649.6
U10c	n.d	n.d
U10d	15.46	660.9
U10e	n.d	n.d
U11a	29.15	423.5
U11b	30.73	n.d
U12	8.20	734.6
U13	20.21	123.6
U14	10.88	347.9
U15	19.78	567.8
U16	14.82	325.7
M1	n.d	n.d
M2	26.48	867.7

Table III.2 2. Results of the TOC

(n.d : not determined because not enough amount of sample)

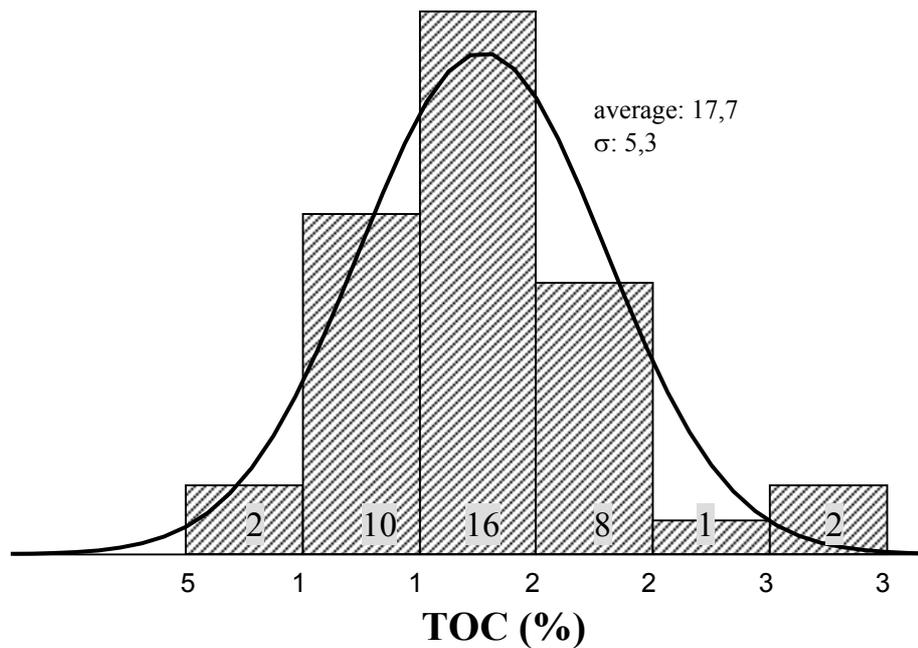


Figure III.2. 1. TOC (%) in the samples of domestic and industrial sludges

The results can be summed up by groups of sludges:

- Food-processing sludges : 12.68 % and 18.19 %
- Paper-mill sludges: 12.32 to 14%, and 21.96 % for PM2 which is the composted sludge of PM1. The TOC for composted sample PM2 (21.96%) is higher than the raw sample PM1 (14%).
- Domestic sludges: 6.49 to 30.73% divided into:
  - Rural sludges : 14.82 to 19.78%

Semi-urban sludges : 10.87 to 27.58%

And urban sludges: 6.49 to 30.73 % The lowest values of TOC (6.49 and 8.20% for U8 and U12 respectively) correspond to sludges with lime addition, which is in agreement with the study of Réveillé *et al.* (2002).

The TOC is quite uniform in food-processing and paper-mill sludges and extremely variable for the domestic sludges.

### 3.2. Description of the pyrograms

The analysis of the insoluble residues of sewage sludges by THM-GC-MS makes it possible to identify the main families of compounds in all the samples analysed (figure III.2.2 and III.2.3). For a better legibility of the figure, only the major peaks have been annotated. The identification of each peak is summed up in table III.2.3.

Figure III.2.2. represents the distributions of the insoluble residues of four domestic sludges. The majority of the sludges are characterised by the same distributions as R3, SU11 or U1, but a small number of sludges shows distributions similar to that of U11. The pyrograms of all domestic sludges are dominated by aliphatic compounds and especially fatty acids which are the most abundant pyrolysis products in our samples. This observation tallies with previous studies on the molecular characterisation of sewage sludges by THM-GC-MS and especially with those of Miikki *et al.* (1999) and Réveillé *et al.* (2002). Some other compounds can also be evidenced, for instance aromatic compounds which are essentially methoxy-benzenes, comprising those deriving from lignin, but also nitrogenous compounds.

Figure III.2.3 represents the distributions of the insoluble residues of food-processing and industrial sludges. The distributions of these samples are characterised by approximately the same compounds as those evidenced in the pyrograms of domestic sludges, with always a high aliphatic nature due to the presence of fatty acids (especially for food-processing sludges). The pyrograms of paper-mill sludges are characterised by the presence of methoxy-benzenes and methoxy-phenols and those of PM3 and PM4 are dominated by the aromatic units, contrary to the other sludges.

<i>Chemical name (by molecular weight for each family)</i>	<i>Formula</i>	<i>Symbols</i>	
<i>Methoxy-benzenes and methoxy-phenols</i>	Toluene	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	mB1
	Styrene	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub>	mB2
	Methoxybenzene (anisole)	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	mB3
	Benzene, 1-methylethenyl	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub>	mB4
	4-Methoxytoluene	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	mB5
	Benzoic acid, methyl ester	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	mB6
	4-methoxystyrene (4-vinylanisole) (P)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	P1
	2-methoxyphenol (guaiacol) (V)	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	V1
	1,2-dimethoxybenzene (veratrole) (V)	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	V2
	4-vinyl-2-methoxyphenol (G)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	V3
	1-(2-methoxyphenol)-2-propene (G)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	V4
	3,4-dimethoxy benzoic acid, methyl ester (vanillic acid) (V)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	V5
	2,6-dimethoxyphenol (syringol)	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	S1
1,2,3-trimethoxybenzene (S)	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	S2	
<i>Nitrogenous compounds</i>	1H-pyrrole, 1-methyl	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N	N1
	Acetamide, N,N-dimethyl	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO	N2
	2,5-pyrrolidone, 1-methyl	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	N3
	N-methyl-L-prolinol	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO	N4
	1H-indole, 1-methyl	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N	N5
	1H-indole, 1,3-dimethyl	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N	N6
	2,4(1H,3H)-pyrimidinedione, 1,3-dimethyl	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N7
	2,4(1H,3H)-pyrimidinedione, 1,3,5-trimethyl	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N8
	Adenine, N,N,N'-trimethyl	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub>	N9
	Hexadecanamide	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> NO	N10
	Octadecanamide	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	N11
<i>Lipid-derived compounds</i>	Dodecanoic acid, methyl ester	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>12:0</sub>
	Tetradecanoic acid, methyl ester	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>14:0</sub>
	Tetradecanoic acid, 13-methyl, methyl ester	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	iC <sub>15:0</sub>
	Tetradecanoic acid, 12-methyl, methyl ester	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	aC <sub>15:0</sub>
	Pentadecanoic acid, methyl ester	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>15:0</sub>
	9-hexadecenoic acid, methyl ester	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16:1</sub>
	Hexadecanoic acid, methyl ester	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16:0</sub>
	Heptadecanoic acid, methyl ester	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>17:0</sub>
	9-octadecenoic acid, methyl ester	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18:1</sub>
	Octadecanoic acid, methyl ester	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18:0</sub>
	Docosanoic acid, methyl ester	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>22:0</sub>
	Tetracosanoic acid, methyl ester	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>24:0</sub>
<i>Other compounds</i>	Furan, 2-methoxymethyl	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	F1
	2-furancarboxaldehyde	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	F2
	Butanedioic acid, methyl ester	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Bt
	Ethylbenzene	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	Et
	Phosphoric acid, trimethyl ester	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> P	P

Table III.2 3. Identification of peaks in the pyrograms of insoluble residues of sewage sludge.

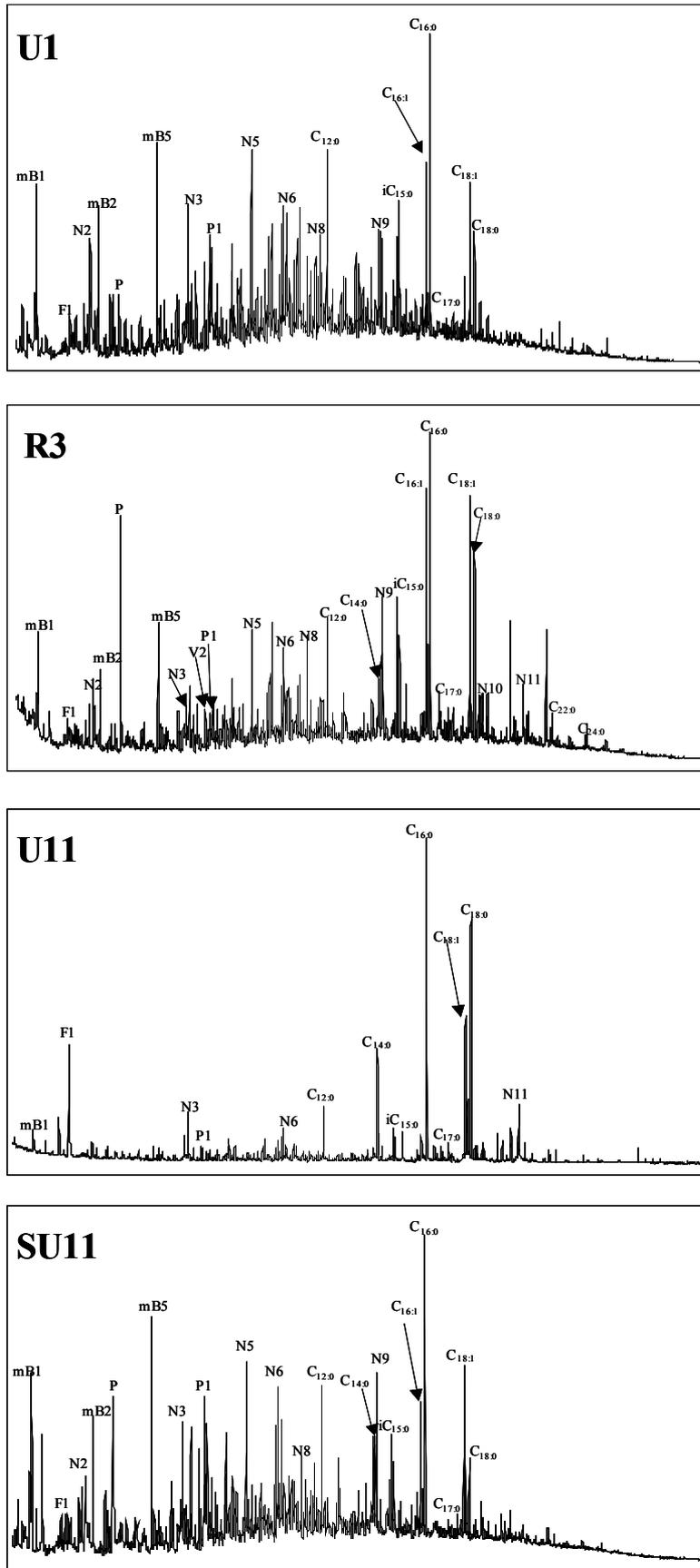


Figure III.2.2. THM-GC-MS pyrograms of domestic sludges

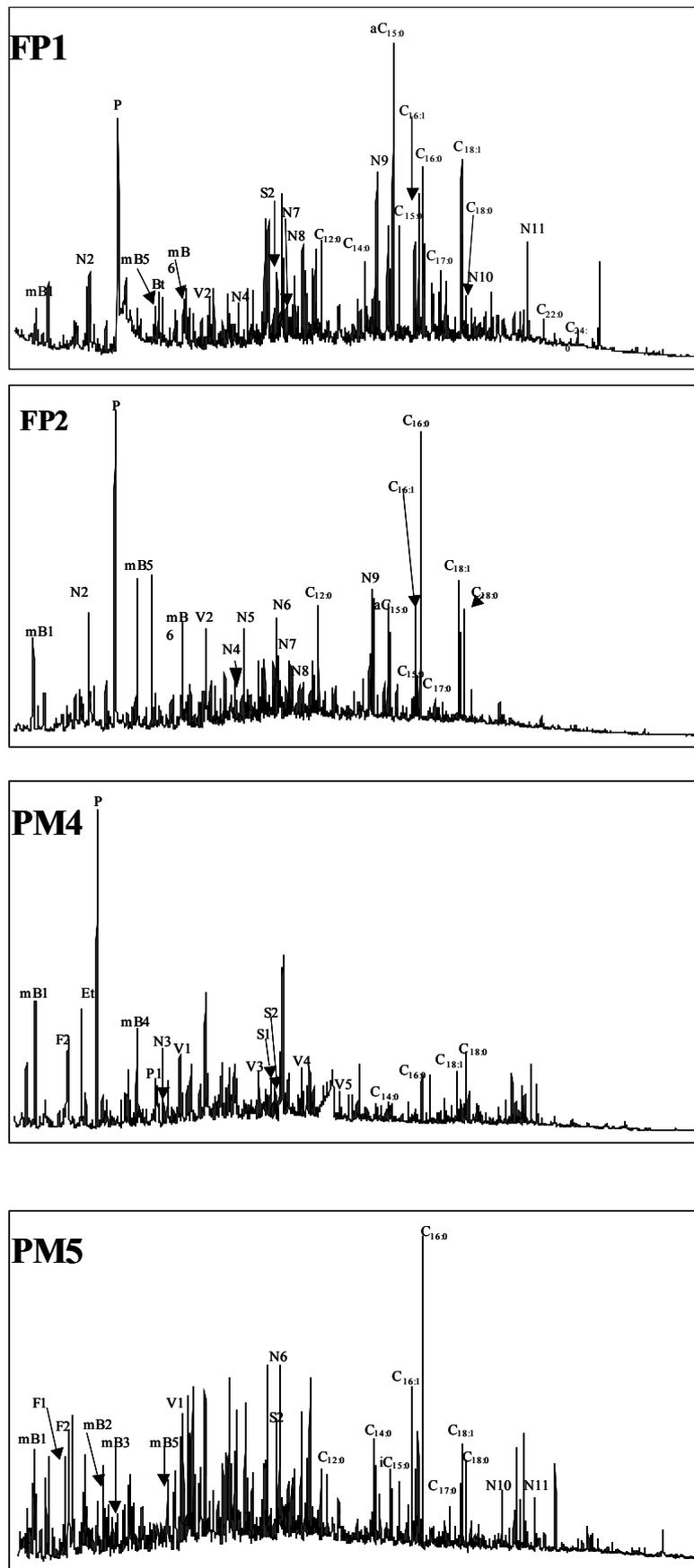


Figure III.2.3. THM-GC-MS pyrograms of food processing and paper mill sludges

For a deeper analysis of the pyrograms, each family of the main compounds identified has been studied in detail.

### 3.2.1. Methoxy-benzenes and methoxy-phenols :

The pyrograms of the 48 sludges show some differences in the distributions of these compounds :

- a) Distributions in paper-mill sludges: (S for syringyl units, V for vanillyl units and p-C for *p*-coumaryl units)
  - *methoxy-phenols* such as 2-methoxyphenol (guaiacol), 4-vinyl-2-methoxyphenol, 2,6-dimethoxyphenol (syringol) or 4-(1-propenyl)-2-methoxyphenol
  - *methoxy-benzenes* such as 3,4-dimethoxybenzoic acid (V), 3,4-dimethoxybenzaldehyde (V), 1,2,3-trimethoxybenzene (S), 3,4,5-trimethoxybenzoic acid, methyl ester (S), 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde (S) or 4-vinylanisole (p-C).
- b) Domestic and food-processing sludges are essentially characterised by methoxy-benzenes such as anisole, 4-methoxytoluene, benzoic acid, methyl ester, 1,2-dimethoxybenzene (V), 3,4-dimethoxybenzoic acid (V), 3,4-dimethoxybenzaldehyde (V), 1,2,3-trimethoxybenzene (S), 3,4,5-trimethoxybenzoic acid, methyl ester (S), 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde (S) or 4-vinylanisole (p-C).

These compounds are lignin-derived (Saiz-Jimenez & de Leeuw, 1986) and originate from natural sources, industrial use (coal, wood or chemical industries) or have a domestic origin (toilet paper). They are present in large amount in paper-mill sludges because these samples come from the treatment of effluents rich in paper fibers. In domestic and food-processing sludges, their presence could be due to rainwater which washed down higher plant debris and collected by the wastewater-treatment plants, or could be explained by the presence of degraded toilet paper in wastewater. THM-GC-MS cleaves the  $\beta$ -O-4 ether bonds that form the primary link between methoxyphenolic units of lignin, releasing the monomers which subsequently become methylated. (Clifford *et al.*, 1995). Different families of compounds can be distinguished according to the substitute of the benzenic ring: vanillyl (V), syringyl (S) *p*-coumaryl (or *p*-hydroxyphenol) (p-C). Generally, gymnosperms are composed primarily of vanillyl units, woody angiosperms are composed of syringyl but also substantial

amounts of vanillyl units and the nonwoody angiosperms contain a mixture of the three lignin monomeric units but also analogues of cinnamyl (Clifford *et al.*, 1995; del Rio *et al.*, 1998).

All sludges are characterised by compounds originating from syringyl, vanillyl and cinnamyl units. So, in order to differentiate the sludges more easily, conventional ratios between the different units of the lignin have been calculated. The S/V ratio is a measure of the relative contribution of angiosperms and gymnosperms (Hedges & Mann, 1979) and has been calculated between 3,4,5-trimethoxybenzoic acid and 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde versus 3,4-dimethoxybenzoic acid and 3,4-dimethoxybenzaldehyde, the C/V ratio provides information on the origin of the lignin (contribution of nonwoody and woody plants) (Clifford *et al.*, 1995; del Rio *et al.*, 1998). In order to measure the degree of oxidative degradation of the lignin component, the (Ac/Al)<sub>v</sub> ratio is generally calculated as well (Ertel & Hedges, 1984). It corresponds to carboxylic acid-containing (Ac) lignin phenols to aldehyde-containing phenols (Ad), and makes it possible to evidence the increase in the functionalities of carboxylic acid with the increase in degradation. A similar (Ac/Al)<sub>v</sub> ratio between acid methyl esters and benzaldehyde can be calculated from the TMAH thermochemolysis products (Clifford *et al.*, 1995). It can be used to infer the state of degradation of lignin, which tends to increase in samples containing highly degraded lignin.

The results for each sludge are given in table III.2.4, and the ratios by group of sludges are summed up in the following table with the typical value for gymnosperm (pine), woody angiosperm (birch) and nonwoody angiosperm (Clifford *et al.*, 1995).

<i>Samples</i>	<i>S/V</i>	<i>C/V</i>	<i>(Ac/Al)<sub>s-v</sub></i>
Domestic sludges	0.2-5.5	0.4-3.6	0.7-3.5
Food processing sludges	0.4-1	0.2-1.7	0.2-1.9
Paper mill sludges	0.1-0.8	0.1-0.6	0.4-1
Gymnosperm (pine) <sup>1</sup>	0.06	0.01	0.15
Woody angiosperm (birch) <sup>1</sup>	3.23	0.10	1.30
Nonwoody angiosperm <sup>1</sup>	1.04	1.92	0.38

<sup>1</sup> according to (Clifford *et al.*, 1995)

<i>Samples</i>	<i>S/V</i>	<i>C/V</i>	<i>(Ac/Al)<sub>s-v</sub></i>
FP1	0.4	0.2	0.2
FP2	1	1.1	1.7
FP3	1	1.6	1.8
PM1	0.8	0.6	0.6
PM2	0.2	0.2	0.7
PM3	0.2	0.1	0.8
PM4	0.1	0.1	0.4
PM5	0.7	0.2	1
L1	0.7	1.3	1.4
R1	0.7	0.8	1.6
R2	1.2	0.6	3.3
R3	0.3	0.5	1.8
R4	0.7	1.4	3.4
SU1	1	3.2	1.8
SU2	0.4	0.6	2.4
SU3	0.9	0.7	1.7
SU4	0.6	0.8	2.3
SU5	0.4	0.9	2
SU6	0.7	1.6	2.7
SU7	0.4	0.6	1.9
SU8	5.5	1.1	1.9
SU9	0.2	0.8	0.9
SU10	0.5	0.8	1.1
SU11	1.5	0.5	2.3
SU12	2.1	1.6	2.6
U1	0.6	0.6	1.8
U2	0.5	0.9	2.2
U3	1.3	0.7	2.2
U4	0.2	0.6	0.7
U5	0.9	0.9	1.8
U6	0.7	1	0.8
U7	0.4	1	2.3
U8	0.8	1	1.5
U9	0.5	0.8	2
U10a	0.4	0.9	1.2
U10b	0.4	0.9	1.6
U10c	0.7	0.8	3.5
U10d	0.4	1.2	2.2
U10e	0.7	0.9	2.3
U11a	0.2	0.9	0.8
U11b	0.5	1.2	1.7
U12	0.5	0.6	1.1
U13	0.3	1.3	1.3
U14	0.4	0.9	2.2
U15	0.7	1	1.8
U16	0.6	3.6	0.9
M1	1.5	7.1	0.4
M2	1.2	3.9	0.6

Table III.2 4. Results of the ratio between lignin-derived compounds (*S/V*, *C/V* and *(Ac/Al)<sub>v</sub>*)

Paper-mill sludges are characterised by the lower C/V (3 to 32 smaller than that of nonwoody plant) and (Ac/Al)<sub>v</sub> ratios, which suggests a higher contribution of woody plants and a low degradation of the lignin. For domestic and food-processing sludges C/V ratios are higher than those of pine or birch, which suggests a mixture of origins with a high contribution of nonwoody plants in these samples. Food-processing sludges are also characterised by an S/V ratio similar to that of nonwoody angiosperms.

These ratios (and especially C/V and (Ac/Al)<sub>v</sub>) and the molecular distribution of these compounds enable us to separate the paper-mill sludges well from the others.

### 3.2.2. Methyl ester of fatty acids:

As described in previous studies (Miikki *et al.*, 1999; Réveillé *et al.*, 2002), fatty acids in their methylated form are the main compounds present in all sludges. The distributions of fatty acids for the 48 sewage sludges show an even carbon predominance (in the range of C<sub>14:0</sub> to C<sub>24:0</sub>). The ratio of even versus odd fatty acids has been calculated and is comprised between 1.7 and 30.5 (results are given in details in table III.2.5 and in figure III.2.4).

Domestic sludges and food-processing sludges are characterised by hexadecanoic (C<sub>16:0</sub>), octadecenoic (C<sub>18:1</sub>), hexadecenoic (C<sub>16:1</sub>), octadecanoic (C<sub>18:0</sub>) acids and by the presence of some odd fatty acids and especially *iso*-, *anteiso*- pentadecanoic (iC<sub>15:0</sub> and aC<sub>15:0</sub>) and pentadecanoic acid (C<sub>15:0</sub>).

Paper-mill sludges are dominated by C<sub>16:0</sub>, characterised by C<sub>16:1</sub> and quite the same proportion of C<sub>18:1</sub> and C<sub>18:0</sub>. The ratio of C<sub>18:1</sub> versus C<sub>18:0</sub> is around 1 for paper-mill sludges (results are given in table III.2.5).

<i>Samples</i>	<i>C<sub>18:1</sub>/C<sub>18:0</sub></i>	<i>Even/ Odd</i>
FP1	2.1	1.70
FP2	1.3	4.7
FP3	2.2	4.7
PM1	1	2.7
PM2	0.7	2.7
PM3	0.7	2.3
PM4	0.7	2.9
PM5	0.9	3.4
L1	0.3	30.5
R1	2.6	3.6
R2	1.9	6.4
R3	1.6	4.2
R4	2.1	2
SU1	3.7	2.5
SU2	1.9	3
SU3	2.2	4.8
SU4	3.3	3.7
SU5	2.5	3.1
SU6	3.5	3.5
SU7	3.8	3
SU8	4.6	3.9
SU9	1.2	4.6
SU10	3.9	2.3
SU11	2.3	3.3
SU12	3	4.2
U1	1.4	4.9
U2	n.d	n.d
U3	2.7	3.4
U4	0.1	16.6
U5	2.3	4
U6	4.7	4.6
U7	2.2	3
U8	1.1	12.2
U9	1.6	3.7
U10a	1.5	4.
U10b	1.4	5.8
U10c	3	3.2
U10d	1.6	7.1
U10e	1.8	10.1
U11a	0.4	16
U11b	0.4	26.4
U12	1.5	12.2
U13	1.8	4.3
U14	1.1	10.2
U15	2.4	2.3
U16	1.3	12.5
M1	1	1.7
M2	0.8	2.8

Table III.2 5. Ratios between fatty acids

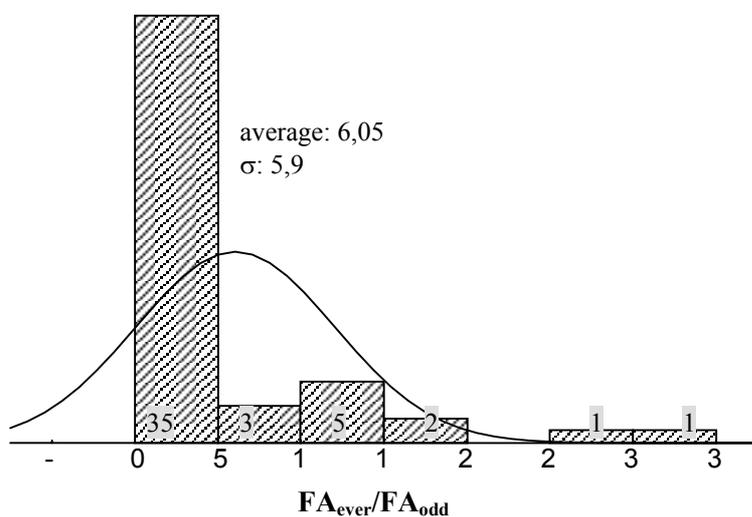
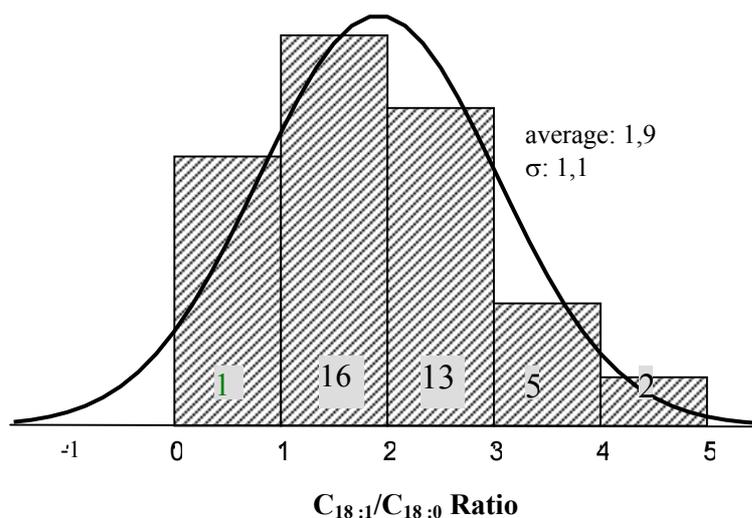


Figure III.2. 4.  $C_{18:1}/C_{18:0}$  and  $FA_{\text{even}}/FA_{\text{odd}}$  in FOI of sewage sludges

Fatty acids are important compounds present in the majority of living organisms, and are the most abundant lipid compounds found in recent sediments. These compounds can have several origins in such sediments (bacteria, microalgae, higher plants and animals for example) but according to their distribution, it is possible to relate them to their origin (except for the ubiquitous ones such as hexadecanoic and octadecanoic acids). Fatty acids originating from higher plants and animals are characterised by even carbon number predominance (from  $C_{12:0}$  to  $C_{32:0}$ ) with a dominance of the chain containing 16 or 18 carbons (Rao *et al.*, 1990). Odd carbon number fatty acids are characteristic of bacterial materials, especially the *iso*- and *anteiso*- saturated acids (such as  $iC_{15:0}$  and  $aC_{15:0}$ ) (Boon *et al.*, 1977; Perry *et al.*, 1979).

Bacterial material is also characterised by mono-unsaturated acids such as hexadecenoic acid ( $C_{16:1}$ ) (Tunlid & White, 1990; Volkman *et al.*, 1998) and by hexadecanoic and octadecanoic acid ( $C_{16:0}$  and  $C_{18:0}$  respectively) (Eganhouse, 1982).

The distributions of fatty acids in the 48 sewage sludges correspond to a mixture of sources constituted among other things of faeces, which are dominated by  $C_{16:0}$  and  $C_{18:1}$  (Quéméneur & Marty, 1994), kitchen residues such as kitchen greases characterised by  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:1}$  and  $C_{18:0}$  (Quéméneur & Marty, 1994), but also bacterial material characterised by odd fatty acids (and especially the *iso*- and *anteiso*- form). The distributions of fatty acids enable us to differentiate the paper-mill sludges from the other ones.

The distributions of fatty acids in the insoluble residue can be compared to those observed in the polar fractions extracted from the corresponding samples by organic solvents. Indeed, the distributions of fatty acids in the polar fraction have enabled us to differentiate samples according to the type of treated effluent (part III, chapter 1). The presence of fatty acids in insoluble residues might suggest that the extraction technique is not efficient enough, but this hypothesis can be neglected because the samples were extracted exhaustively to remove the free organic fraction, and the distributions of fatty acids in soluble and insoluble fractions are not the same. Figure III.2.5 shows the fatty acids distributions in the polar fractions (extracted by organic solvent) and in the insoluble residues of three characteristic samples of domestic, food-processing and paper-mill sludges.

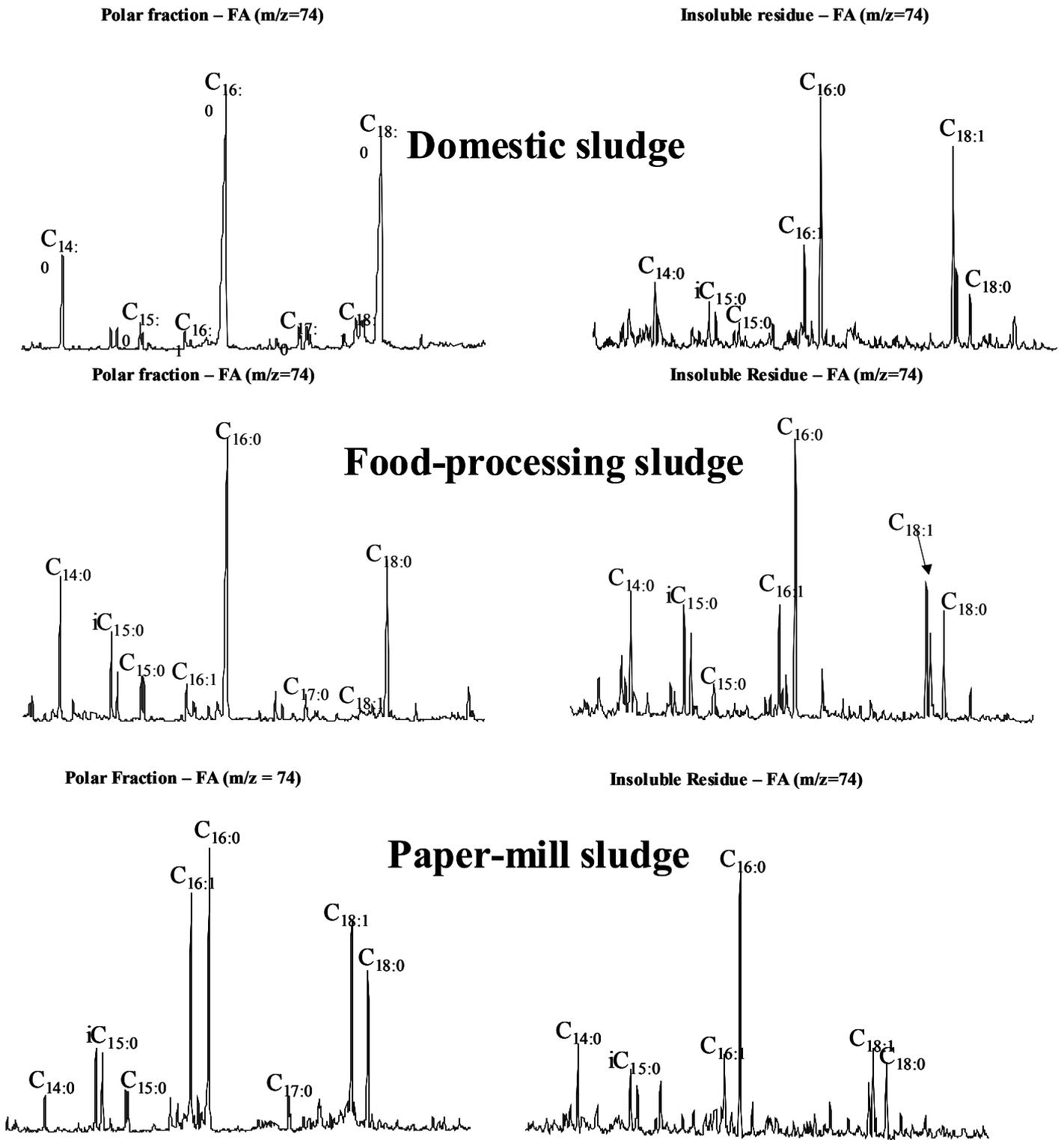


Figure III.2. 5. Distributions of fatty acids in insoluble residues and polar fractions of domestic, paper-mill and food-processing sludges.

The main difference is that the insoluble residues of food-processing and domestic sludges are characterised by higher amount in mono-unsaturated fatty acids (especially C<sub>18:1ω9</sub> and C<sub>16:1ω7</sub>) than the soluble fraction except for paper-mill sludges. According to Garcia *et al.* (1992), the persistence of fatty acids resistant to microbial degradation in composted sludges may reveal that these compounds are integrated to the macromolecular structure. Our results may suggest that the fatty acids identified in the insoluble organic fraction are, either considered as molecular entities esterified and chemically bound to the matrix of sludges (Amblès *et al.*, 1991 ; Grasset *et al.*, 2002), or present in a « free » form strongly and physically trapped in the macromolecular structure and not accessible to the solvent (Grasset *et al.*, 2002). All these compounds are present under methyl ester form because of the use of TMAH which lead to transesterification of ester and methylation of fatty acids. In order to discriminate between free and esterified fatty acids present in the sludges, it will be necessary to work with other alkyl agents such as tetramethylammonium acetate (TEAAc- Grasset *et al.*, 2002).

### 3.2.3. Nitrogenous compounds:

The major compounds found are alkyl-indoles, which are pyrolysis products of proteins, polypeptides and amino acids (Ishiwatari *et al.*, 1995). We can also find other nitrogenous compounds.

All the sludges, whatever their origin, are characterised by pyrolysis products of proteins such as alkyl-indoles (1H-indole, 1-methyl or 1H-indole, 1,3-dimethyl), adenine, pyrimidinediones (which are nitrogenous bases) or N-methyl-L-prolinol, and other nitrogenous compounds such as amides (hexadecanamide and octadecanamide). The domestic sludges can be distinguished from the other sludges by the presence of urea, N-ethyl-N,N'-dimethyl and caffeine (both originating from human urine).

### **3.3. Triangular diagram**

The main compounds identified were gathered into three families according to their origin:

- lignin-derived compounds (Lg) represented essentially by methoxy-benzene and methoxy-phenols,

- nitrogenous compounds (N) represented by alkyl-indoles, amides, and others (caffeine; urea, N-ethyl-N,N'-dimethyl ester, N-methyl-L-prolinol and adenine, N, N'-trimethylester),
- lipid-derived compounds (Lp) essentially represented by methyl ester of fatty acids in the range of C<sub>10:0</sub> to C<sub>24:0</sub>.

These families are represented by forty-nine compounds, which have been submitted to relative quantification. The results of this quantification are expressed by the construction of a triangular diagram defined by three poles corresponding to the three families of compounds (expressed in percentage). The sum of the three families for each sewage sludge is brought back to 100. The triangular representation (figure III.2.6) enables us to separate paper-mill sludges and manure samples from the other samples.

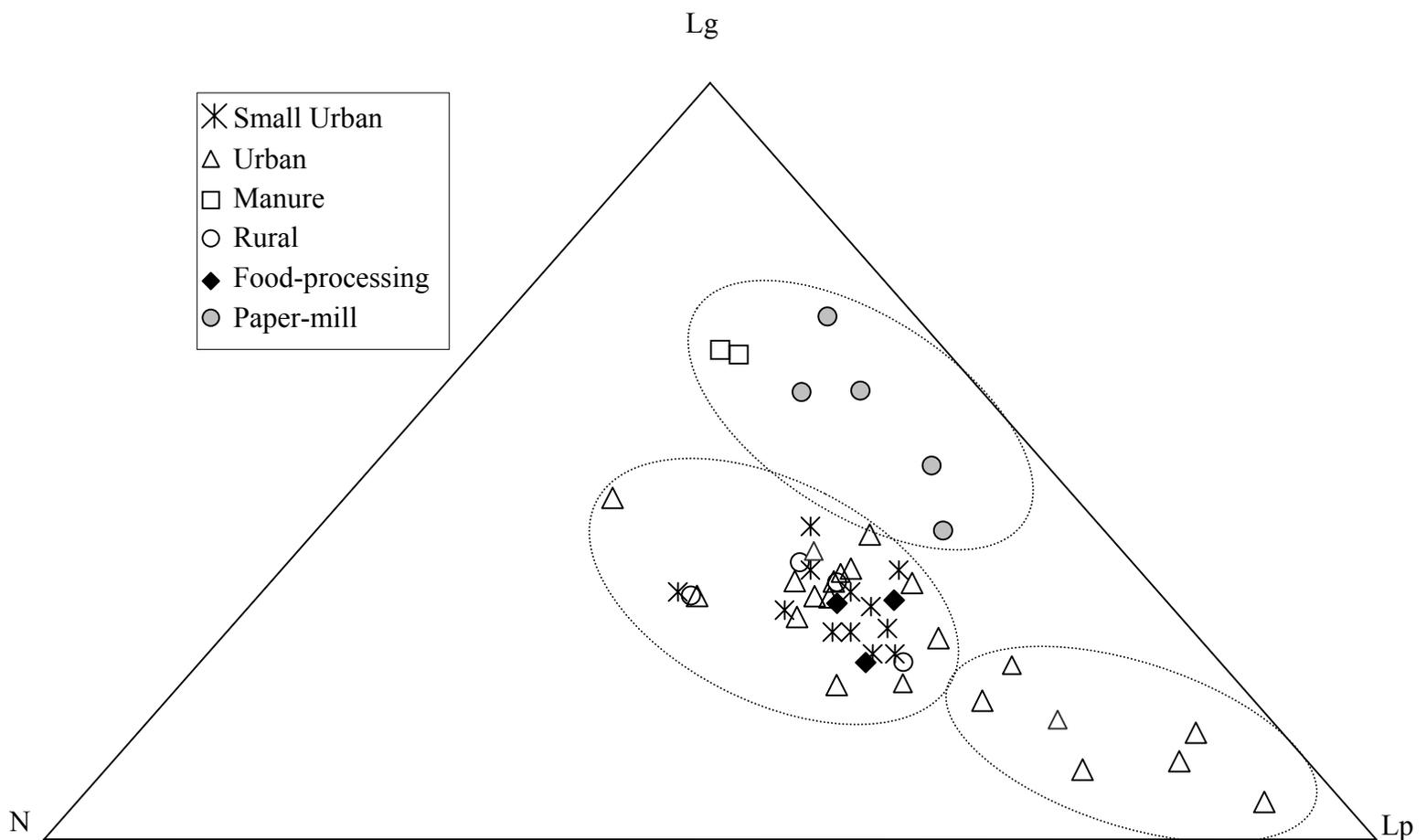


Figure III.2. 6. Triangular representation based on lignin-, lipid-derived and nitrogenous compounds present in the insoluble residues of sewage sludge.

Paper-mill sewage sludges and manure samples (fresh and composted) are characterised by higher amounts of lignin-derived compounds (ranging from 35 to 75%), and low amounts of lipid-derived and nitrogenous compounds (45 to 20% and 20 to 5% respectively). Like we have already pointed out above, paper-mill sewage sludges are enriched in lignin-derived compounds because they contain essentially paper fibers, and manure samples are constituted by the remains of higher plants which were digested by cows.

Concerning the domestic and the food-processing sludges, some points can be emphasized:

- Thirty-two sludges are characterised by an intermediate composition in lignin (20 to 30 %) or lipid-derived compounds (25 to 40%) and nitrogenous compounds (25 to 40%) without sub-gathering, neither according to the type of sludge (between food-processing and domestic sludges) nor with the capacity for the domestic ones (urban, rural or small-urban). This suggests that the average macromolecular composition of domestic and food-processing sludges is approximately the same. Domestic sludges can be distinguished from the food-processing ones only on the basis of the molecular distribution of nitrogenous compounds. The food-processing and domestic sludges are characterised by a relatively high amount of nitrogenous compounds, which tallies with previous studies on the characterisation of the macromolecular content of sewage sludges (Miikki *et al.*, 1999; Réveillé *et al.*, 2002)
- Seven urban sludges show a trend towards the lipid pole, up to 90 % of lipid-derived compounds (for U11b) without correlation with the treatment plant in terms of capacity or with the type of treatment. This trends could be explained by the fact that some sludges (and especially U11) are biological ones used to resow the biological basin, enriched in bacterial material.

#### 4. Conclusion

First, this study performed on a large panel of sewage sludges showed that the results of the THM-GC-MS characterisation agree with previous studies (aliphatic nature of the macromolecular structure of sewage sludges and high content of nitrogenous compounds (Miikki *et al.*, 1999; Réveillé *et al.*, 2002) which permits to validate our methodology based

on a simple sample preparation. The results of the THM-GC-MS characterisation enable us to put to evidence three main families of compounds (lipid-derived compounds, lignin-derived compounds and nitrogenous compounds) in the 48 sewage sludges. The qualitative analysis of the pyrograms and their semi-quantification reveal some variations in the chemical composition of the macromolecular content. Paper-mill sludges are well separated from the others on the basis of the lignin-derived compounds content (according to the triangular diagram), of the molecular distributions of fatty acids, and of the low nitrogen content. According to the quantitative data, domestic and food-processing sludges show a quite homogenous average composition. Domestic sewage sludges can be differentiated only by the qualitative interpretation of the nitrogenous distribution (presence of urea and caffeine). Thus, the quantitative analysis appears to be well adapted to the discrimination of samples with contrasted composition, but it failed to evidence subtle differences.

Second, the knowledge of the chemical composition of the macromolecular content of sludges enables us to approach their reactivity and their behaviour after land disposal (complexation with inorganic or organic compounds, mobilisation,...) (Chen *et al.*, 2002). The reactivity is often linked to the presence of some functional groups such as COOH, OH and C=O (Stevenson, 1994). Carboxylic and phenolic acids are very important and can generate complexes with inorganic or organic compounds (Cornejo & Hermosin, 1996). The results of the triangular diagram evidenced a high uniformity in the chemical composition of sludges belonging to each group, which is confirmed by the qualitative analysis of the pyrogram. One might expect the reactivity to be approximately the same in each group. Moreover, the fact that food-processing and domestic sludges show very similar compositions could suggest that they will have the same reactivity, while the reactivity of paper-mill sludges will be very different because of the enrichment in lignin-derived compounds.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank the Agence de l'Eau Rhin-Meuse and the Conseil Regional of Lorraine for their financial support.

## REFERENCES

- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F. & Ingelmo, F. (2001) Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilised with different rates of two sewage sludges during ten years. *Bioresource Technology*, **77**, 109-114.
- Amblès, A., Jacquesy, J.C., Jambu, P., Joffre, J. & Maggi-Churin, R. (1991) Polar lipid fraction in soil: a kerogen-like matter. *Organic geochemistry*, **17**(3), 341-349.
- Barrio, M.E., Lliberia, J.L., Comellas, L. & Broto-Puig, F. (1996) Pyrolysis-gas chromatography applied to the study of organic matter evolution in sewage sludge-amended soils using nitrogen-phosphorus, flame ionisation and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A.*, **719**, 131-139.
- Berset, J.D. & Holzer, R. (1999) Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sewage sludges using supercritical fluid extraction and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, **852**, 545-558.
- Boon, J., De Leeuw, J.W., Van der Hoek, G.J. & Nosjan, J.H. (1977) Significance and taxonomic value of iso and anteiso monoenoic fatty acids and branched  $\beta$ -hydroxy acids in *desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of Bacteriology*, **129**, 1183-1191.
- Boyd, S.A., Sommers, L.E. & Nelson, D.W. (1980) Changes in humic acid fraction of soil resulting from sludge application. *Soil Science Society American Journal*, **44**, 1179-1186.
- Challinor, J.M. (1995) Characterisation of wood by pyrolysis derivatization-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **35**, 93-107.
- Challinor, J.M. (2001) Review: the development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **61**, 3-34.
- Chen, J., Gu, B., LeBoeuf, E.J., Pan, H. & Dai, S. (2002) Spectroscopic characterisation of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, **48**, 59-68.
- Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D.E., Bortiatynsky, J.M. & Hatcher, P.G. (1995) A new rapid technique for the characterisation of lignin in vascular plants:

- thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. *Organic Geochemistry*, **23**(2), 169-175.
- Cornejo, J. & Hermosin, M.C. (1996) Interaction of humic substances and soil clays. In: *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems* (Ed. by P. A. ed), pp. 507-529.
- Debosz, K., Petersen, S.O., Kure, L.K. & Ambus, P. (2002) Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. *Applied Soil Ecology*, **567**, 1-12.
- del Rio, J.C., McKinney, D.E., Knicker, H., Nanny, M.A., Minard, R.D. & Hatcher, P.G. (1998) Structural characterisation of bio- and geo-macromolecules by off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Chromatography A*, **823**, 433-448.
- Eganhouse, R.P. (1982) Organic matter in municipal wastes and storm runoff: characterization and budget to the coastal waters of southern California. *Ph-D thesis in Geochemistry*, 230 p, University of California, Los Angeles.
- Ertel, J.R. & Hedges, J.I. (1984) The lignin component of humic substances: distribution among soil and sedimentary humic fulvic and base insoluble fractions. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **48**, 2065-2074.
- Fabbri, D. & Helleur, R. (1998) Characterisation of the tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis products of carbohydrates. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **47**, 111-127.
- Farrington, J.W. & Quinn, J.G. (1973) Petroleum hydrocarbons and fatty acids in wastewater effluents. *Journal of Water Pollution Control Federation*, **45**, 704-712.
- Garcia, C., Hernandez, T. & Costa, F. (1992) Characterisation of humic acids from uncomposted and composted sewage sludge by degradative and non-degradative techniques. *Bioresource Technology*, **41**, 53-57.
- Gonzalez-Vila, F.J., Lankes, U. & Lüdemann, H.-D. (2001) Comparison of the information gained by pyrolytic techniques and NMR spectroscopy on the structural features of aquatic humic substances. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **58-59**, 349-359.
- Grasset, L., Guignard, C. & Amblès, A. (2002) Free and esterified aliphatic carboxylic acids in humin and humic acids from a peat sample as revealed by pyrolysis with tetramethylammonium acetate. *Organic Geochemistry*, **33**, 181-188.

- Hartgers, W.A., Sinninghe Damsté, J.S. & de Leeuw, J.W. (1994) Geochemical significance of alkylbenzene distributions in flash pyrolysates of kerogens, coals, and asphaltenes. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **58**(7), 1759-1775.
- Hatcher, P.G. & Clifford, D.J. (1994) Flash pyrolysis and in situ methylation of humic acids from soils. *Organic Geochemistry*, **21**(10-11), 1081-1092.
- Hedges, J.I. & Mann, D.C. (1979) The characterisation of plant tissues by their lignin oxidation products. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **43**, 1803-1807.
- Ishiwatari, R., Yamamoto, S. & Handa, N. (1995) Characterisation of sinking particles in the ocean by pyrolysis-gas chromatography/ mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **32**, 75-89.
- Kralert, P.G., Alexander, R. & Kagi, R.I. (1995) An investigation of polar constituents in kerogen and coal using pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry with in situ methylation. *Organic Geochemistry*, **23**(7), 627-639.
- Kunito, T., Saeki, K., Goto, S., Hayashi, H., Oyaisu, H. & Matsumoto, S. (2001) Copper and zinc fractions affecting micro-organisms in long-term sludge-amended soils. *Bioresource technology*, **79**, 135-146.
- Li, Y., Michels, R., Mansuy, L., Fleck, S. & Faure, P. (2002) Comparison of pressurised liquid extraction with classical solvent extraction and microwave-assisted extraction-application to the investigation of the artificial maturation of Mahakan coal. *Fuel*, **81**, 747-755.
- Mansuy, L., Bourezgui, Y., Garnier-Zarli, E., Jardé, E. & Réveillé, V. (2001) Characterisation of humic substances in highly polluted river sediments by pyrolysis methylation-gas chromatography-mass spectrometry. *Organic Geochemistry*, **32**, 223-231.
- McKinney, D.E. & Hatcher, P.G. (1996) Characterisation of peatified and coalified wood by tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis. *International Journal of Coal Geology*, **32**, 217-228.
- Miikki, V., Hänninen, K., Knuutinen, J. & Hyötyläinen, J. (1999) Pyrolysis of humic acids from digested and composted sewage sludge. *Chemosphere*, **38**(2), 247-253.
- Moreda, J.M., Arranz, A., Fdez de Betono, S., Cid, A. & Arranz, J.F. (1998) Chromatographic determination of aliphatic hydrocarbons and polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in a sewage sludge. *The Science of the Total Environment.*, **220**, 33-43.

- Perry, G.J., Volkman, J.K., Johns, R.B. & Bavor, J.H. (1979) Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **43**(1715-1725).
- Quéménéur, M. & Marty, Y. (1994) Fatty acids and sterols in domestic wastewaters. *Water Research*, **28**(5), 1217-1226.
- Rao, K.S., Dominic, R., Singh, K., Kaluwin, C., Rivett, D.E. & Jones, G.P. (1990) Lipid fatty acid, amino acid and mineral compositions of five edible plant leaves. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **38**, 2137-2139.
- Réveillé, V., Mansuy, L., Jardé, E. & Garnier-Sillam, E. (2002) Characterisation of sewage sludge-derived organic matter: lipids and humic acids. *Organic Geochemistry- in press*.
- Riffaldi, R., Levi-Minzi, R. & Saviozzi, A. (1983) Humic fractions of organic wastes. *Agriculture, ecosystems and environment*, **10**, 353-359.
- Saiz-Jimenez, C. (1994) Application of Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry to soil Chemistry. In: *15<sup>th</sup> World Congress of Soil Science.*, 3a, pp. 65-84, Acapulco Mexico.
- Saiz-Jimenez, C. & de Leeuw, J.W. (1986) Lignin pyrolysis products: Their structures and their significance as biomarkers. *Organic Geochemistry*, **10**, 869-876.
- Senesi, N., Miano, T.M. & Brunetti, G. (1996) Humic-like substances in organic amendments and effect on native soil humic substances. In: *Humic substances in terrestrial ecosystems* (Ed. by A. Piccolo), pp. 14.
- Stevenson, F.J. (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. John Wiley and Sons.
- Tunlid, A. & White, D.C. (1990) Use of lipid biomarkers in environmental samples. In: *Analytical microbiology methods* (Ed. by P. Press), pp. 259-274. Fox Alvin.
- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.I., Mansour, M.P., Sikes, E.L. & Gelin, F. (1998) Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. *Organic Geochemistry*, **29**(5-7), 1163-1179.

## **XII. CARACTERISATION PAR PY-GC-AED ET CHIMIOMETRIE**

### **Py-GC/AED and chemometric correlation to characterise sewage sludges of different origins**

Emilie JARDE, Franck VILMIN, Laurence MANSUY, Pierre FAURE, Raymond MICHELS  
and Patrick LANDAIS.

G2R UHP UMR7566, BP 239-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

---

#### **ABSTRACT**

The solid organic fractions of sewage sludges originating from food-processing and domestic (rural and urban) depuration systems of Lorraine (Northeast of France) were characterised by flash pyrolysis coupled with gas chromatography/atomic emission detector (Py-GC/AED). These analyses generated a high amount of data which could not be processed without a further step using a chemometric approach. Thus, a heuristic methodology was developed, relying on the application of pattern recognition methods, such as principal components analysis, hierarchical classification and the k-means method generally used in chemometry. In order to avoid subjective selection and reduction of data, a signal treatment relying on the alignment and the segmentation of pyrograms was performed before statistical analysis. The gathering of test-samples analysed several times validated this methodology. The main chemometric results provided a typology of sludges which consisted in a classification in different groups, and allowed to display the characteristic peaks of each group. This chemometric analysis gathered a group of sludges with an average chemical composition characterising stable organic material and pointed out the atypical chemical composition of several sewage sludges. These results demonstrated the efficiency of Py-GC-AED associated to chemometric methods for the global characterisation of the insoluble organic fraction of sewage sludges. It could be possible to apply this approach, with further calibration, to the monitoring of sludge composition during its treatment.

## 1. Introduction

The reactivity of sewage sludges partly depends on the molecular composition of organic matter. Indeed, once applied to soils or accumulated in the environment, the organic matter of sewage sludges can contribute to various biochemical transformations and trap micropollutants into its structure by different processes (adsorption, covalent linkages, complexation...) (Hernandez *et al.*, 1993; Iakimenko *et al.*, 1996; Sadovnikova *et al.*, 1996; Unsal & Sozudogru Ok, 2001). Consequently, it appears important to improve our knowledge of the composition of macromolecular organic matter in sewage sludges.

Analytical pyrolysis coupled to gas chromatography-mass spectrometry (Py-GC/MS) is widely applied to the investigation of macromolecular organic matters in various organic wastes (Barrio *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1992; Göbbels & Püttmann, 1997; Gonzales-Vila *et al.*, 1999; Miikki *et al.*, 1999). Fewer studies using Py-GC/Atomic Emission Detector (Py-GC/AED) have been reported although AED is one of the most efficient detectors because of its versatility, elemental selectivity and sensitivity (Andersson, 2002; Quimby & Sullivan, 1990). This analytical technique is particularly valuable to characterise organic matrix enriched in heteroatoms and organohalogens. There are two aims when performing Py-GC/AED : one is to detect and quantify specific compounds and then used the selectivity and sensitivity properties of AED (Faure *et al.*, 2002; Flodin *et al.*, 1997; Wang, 1996); the other is to provide a molecular elemental composition of bio- or geomacromolecules and to fingerprint these materials (Pörschmann *et al.*, 1996; Voisin *et al.*, 1999).

Py-GC-AED analyses provide several pyrograms for each sample corresponding to the detected elements (C, N, and S). Each pyrogram containing an average of more than fifty compounds, it becomes difficult to highlight objectively the relevant information. Moreover, it is not possible to identify precisely all these compounds without the help of standard analyses or the association with Py-GC-MS. Finally, the correlation of numerous samples appears impossible without a further treatment.

Chemometric approaches are widely used in analytical chemistry to classify and correlate organic materials such as oils (Clark & Jurs, 1979), coals (Schulten *et al.*, 1988), soils (Wilcken *et al.*, 1997) and micro-organisms (Smith *et al.*, 1990). Most of these chemometric methods require data reduction processes such as the extraction of selected peaks (identified or not) introducing subjectivity in the chromatographic peak selection. Nielsen *et al.* (1998, 1999) have developed an approach allowing to perform chemometric analysis of all the chromatographic data based on methods applied in the field of image

analysis. It has been applied successfully to the classification of microbiological samples and has helped to identify characteristic components.

The purpose of this study is the development of a statistical methodology inspired from the work of Nielsen *et al.* (1998, 1999) in order to overcome the problem of the complexity of the information generated by Py-GC-AED. After a first step consisting in a signal treatment where attention is paid to avoid a subjective reduction of data, the pyrograms are submitted to a pattern recognition method (PCA, classifications) using a heuristic approach. This methodology has been validated for the characterisation of the macromolecular organic fractions of 25 sewage sludges collected in Lorraine (Northeast of France). The aim of the statistical treatment was to classify sewage sludges into various groups according to their elemental composition and to identify their major characteristic compounds.

## **2. Samples and Methods**

### **2.1. Sampling and sample preparation**

Sewage sludges were sampled at domestic (3 rural, 9 semi-urban and 9 urban samples) and food-processing (3 samples) depuration stations of Lorraine (Northeast of France.) A sewage sludge from a purifying lagoon system was also collected (L1). This sampling represents a large variety of wastewater treatments and various storage periods (Table III.2.6). Before the analyses took place, the different samples were treated by centrifugation during 30 minutes at 6000 rpm. in order to eliminate the water and the aqueous fraction. Then the sludge was extracted with a 150 ml dichloromethane-methanol mixture (65/35) on a stirrer heated at 50°C for 45 minutes. The insoluble solid fraction was recovered by filtration on glass fiber filter. After drying, crushing and sieving of this residue, the 40-160 µm fraction was recovered for elementary and molecular analyses.

<i>Depuration station</i>	<i>Capacity<sup>3</sup> (pop. equiv.)</i>	<i>Type of station</i>	<i>Recycling of the sewage sludges</i>
FP1	150000	Food-processing	Land disposal
FP2		Food-processing	Land disposal
FP3		Food-processing	Land disposal
L1	477	Lagoonal system	Rubbish Dump
R2	2000	Rural	Land disposal
R3a and R3b <sup>1</sup>	1600	Rural	Land disposal
SU1	4200	Semi-Urban	Land disposal
SU3	5800	Semi-Urban	Land disposal
SU6	7400	Semi-Urban	Land disposal
SU9	7400	Semi-Urban	Rubbish Dump
SU10	3500	Semi-Urban	Land disposal
SU11	9000	Semi-Urban	Land disposal
SU13	5000	Semi-Urban	Land disposal
SU14	9000	Semi-Urban	Land disposal
SU15	3200	Semi-Urban	Land disposal
U1	24500	Urban	Land disposal
U4	65000	Urban	Land disposal
U6	22000	Urban	Land disposal
U7	21000	Urban	Land disposal
U10	480000	Urban	Land disposal
U11a and U11b <sup>2</sup>	340000	Urban	Land disposal
U15	15000	Urban	Land disposal
U16	52500	Urban	Land disposal

Table III.2 6. Description of the samples collected in different wastewater treatment plants

<sup>1</sup> In order to follow the evolution of one sludge, the same sewage sludge has been collected in a silo of storage just after wastewater treatment (called R3a) and in a area of storage on sand after a few months of manuring (called R3b).

<sup>2</sup> U11a and U11b correspond respectively to the primary and secondary sludges of an urban wastewater-treatment plant.

<sup>3</sup> U for urban sludge, SU for small urban sludge, R for rural sludge, FP for food processing sludge.

The difference between urban, small urban and rural sludges is based on the capacity of the stations (defined as the number of inhabitants that can be connected on the sewer line): rural when the capacity is below 2,000 population equivalents (pop. equiv.), small urban when the capacity is between 2,000 and 10,000 pop. equiv., and urban when the capacity is above 10,000 pop. equiv.

## 2.2. Analytical methods

The Py-GC-AED analyses were carried out on a HP 6890 Gas Chromatograph (GC) equipped with a split/splitless injector operating in split mode, coupled to an HP G2350A Atomic Emission Detector, the second generation of the HP 5921A detector which was described in detail by Quimby & Sullivan (1990). All GC gas flows and pressures were controlled electronically. An auxiliary pressure control module was used to control the AED reagent gas pressures. The whole system was controlled with an HP GC-AED Chemstation. Chromatography was carried out on a 60 m DB-5 J&W, 0.25 mm diameter and 0.1  $\mu\text{m}$  film-fused silica column. On-line pyrolyses at 620°C were performed with a SGE Pyrojector II. Samples were introduced in the vertical quartz liner of the pyrolysis oven with a Pellitiser Solids Injector Head. A transfer tube of 0.5 mm diameter was used for coupling with GC injection port. The operating conditions of Py-GC-AED have been optimised and are summarised in table III.2.7. C, N and S were simultaneously detected using the atomic emission wavelengths 193, 174 and 181 nm respectively.

The Py-GC/MS analyses were carried out on an HP 5890 Series II GC, using a split/splitless injector, coupled to an HP 5971 mass spectrometer. On-line pyrolysis at 620°C was performed with a CDS 2000 Pyroprobe. The solid residues (1-2 mg) were introduced into quartz tubes and heated at 620°C during 15 seconds. Pyrolysis products were separated on a 60 m DB-5 J&W, 0.25 mm diameter, 0.1  $\mu\text{m}$  film fused silica column. After cryofocusing, the temperature program was 0°C for 1 minute, 6°C/min to 300°C, followed by an isothermal stage at 300°C for 20 minutes.

In order to complete the first analyses, elemental analyses have been carried out on typical sludges of each depuration system so as to measure C, O, N, S and to determine the evolution of the N/C, O/C and S/C atomic ratios. Analyses for carbon, nitrogen and hydrogen were performed in a Carlo Erba elemental analyser, model EA 1108. Oxygen was determined by a second run of an aliquot with a silvered active charcoal (Ni-Pt) as a catalyst. H/C, O/C, N/C and S/C atomic ratios have also been calculated by integrating the total area of the pyrograms.

		<i>Analytical Conditions</i>
	Sample weight	0.8 to 1.2 mg
<b>Pyrolyzer</b>	Septum purge	0 ml/min
	Helium flow	25 ml/min during 1 min then 0 ml/min
	Temperature program	620°C
	Injector temperature	300°C
<b>GC</b>	Septum purge	2 ml/min
	Split ratio	75/1 during 1 min then 50/1
	Column flow	1 ml/min (constant flow)
	Temperature program	0°C during 1 min, 6°C/min to 300°C, then isothermal stage at 300°C during 20 min
	Transfer line temp.	300°C
	Cavity temp.	310°C
	Spectrometer purge	0.3l/min
	Helium supply pressure	30 Psi
	Cavity pressure	1.5 Psi
<b>AED</b>	Spectrometer window purge	25 ml/min
	Ferrule purge	30 ml/min
	Solvent vent	On: 4.9 min-off:5.5 min
	Make up flow	C1479: 10 ml/min C193, S181, N174: 20ml/min
	Reagent gas pressures	use of O <sub>2</sub> for C1479, C496 analyses use of O <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> mixture for C193, S181, N174 analyses use of N <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub> mixture for O171 analysis

Table III.2 7. Analytical conditions for flash pyrolysis coupled with gas chromatography/atomic emission detector.

### 3. Chemometric approach

The C, N, S elementary analyses of the 25 samples with the atomic emission detector provided a large number of pyrograms (75), each containing 2300 points of acquisition. The complexity of the pyrograms often makes it difficult to differentiate objectively one pyrogram from another for the same element. In order to discriminate these pyrograms and extract the essential information, multivariate analyses were required. Principal components analyses (PCA) and classifications were performed after a preliminary step of signal treatment to enhance the quality of the data. Hence, the difficulty to identify all the peaks will not be considered as a limitation since the purpose of the study is to define some general chemical trends for each group of sludges.

### 3.1. Signal treatment:

All the operations are summarised on figure III.2.7; they are defined according to the four following steps:

Step 1: Selection of the window to be analysed. The beginning (with solvent delay and non reproducible low molecular weight compounds) and the end (with non significant peaks) of the pyrogram are eliminated so as to preserve the relevant information.

Step 2: Baseline correction. A routine was programmed with Visual Basic® for Excel®, in order to eliminate the fluctuations and the hazardous deviations of the baseline, the unresolved background and the drifts of peaks generated by gaseous compounds (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S...) (figure III.2.7).

Step 3: Alignment of retention times. The application of the statistical methods on the entire pyrograms relies on the prerequisite that all the pyrograms provide the same kind of information at the same retention time. In an ideal case, all the retention times would be properly reproducible. But minor variations of the operating conditions and interactions between analytes of the samples generate small retention time shifts between two successive acquisitions. An output method was developed by (Nielsen *et al.*, 1998). The shifts between a reference profile and the profile to be aligned are corrected by a method of optimisation named COW® (correlation optimal warping). In order to evaluate the quality of the alignment, the criterion of optimisation used is the correlation coefficient  $\rho$  between the two matrixes representing the two profiles (figure III.2.7). This criterion integrates the temporal dimension of the pyrogram (two dimensions), but also the spectral (C,N, and S) one (three dimensions). Thus, this method is appropriate for aligning simultaneously the three selective pyrograms (C,N, and S) for each sample.

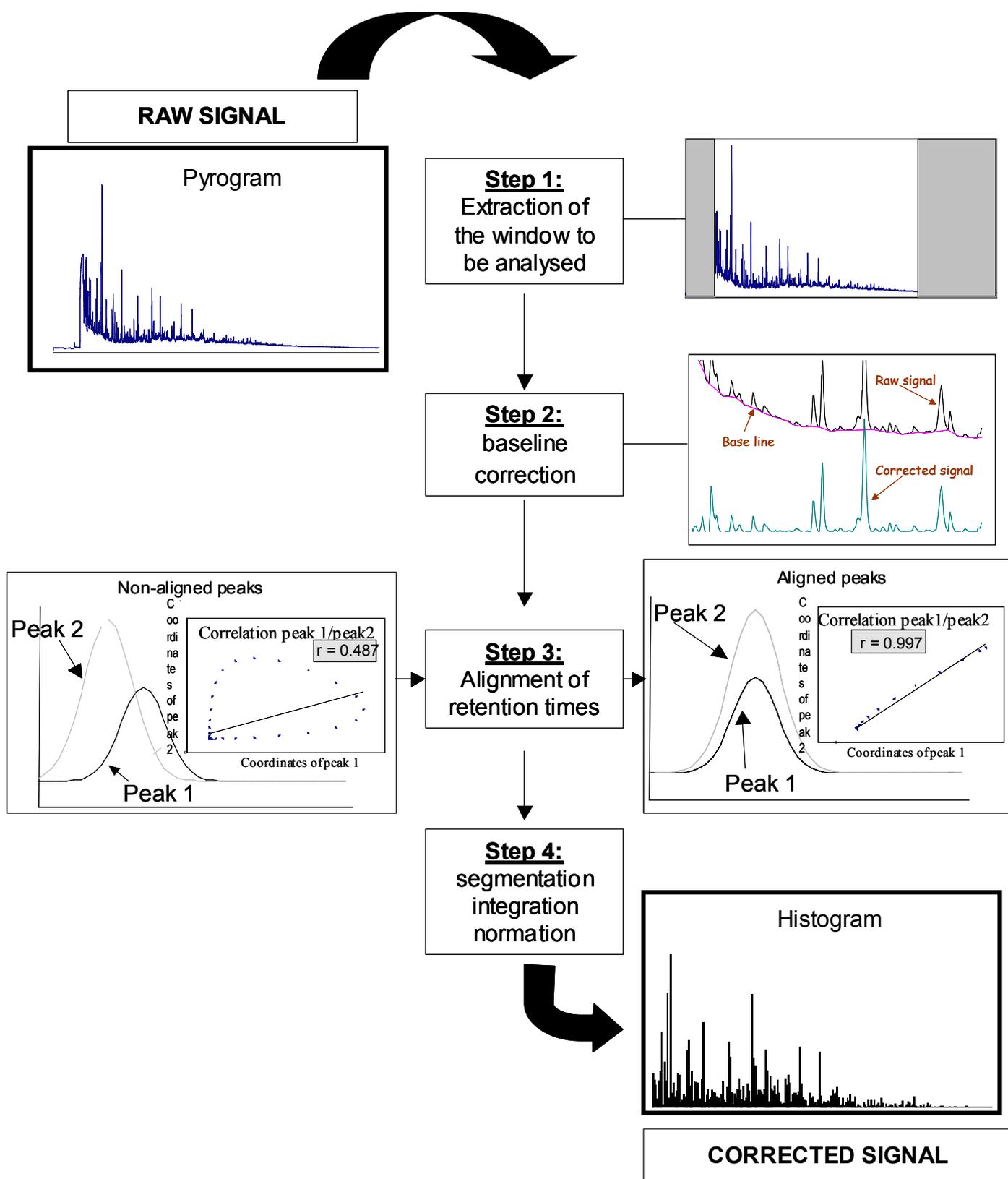


Figure III.2. 7. The different steps of pyrograms processing prior to the chemometric approach.

Step 4: Segmentation, integration, and normation. A routine was programmed to eliminate all the values smaller than a selected threshold, to cut up the pyrogram into time windows, and to integrate and normalise the peaks to a total area of 100. The method used in this study is comparable to that developed by Smith et al. (1990), and consists in a division of the pyrogram in defined time windows of 0.1 minutes, followed by an integration of the peaks of each window. This phase of segmentation makes it possible to preserve approximately one peak per window in order to minimise the possible superpositions of peaks. The width of the time window is a compromise between loss of information and width of the final table (250 variables).

### 3.2. Data analyses

For all analyses, each pyrogram is considered as an individual and the retention times are defined as the variables. For example, the variable named C12.3 represents the compound eluting at 12.3 min in the AED carbon trace pyrogram; N33.3 stands for the variable that represents the compound eluting at 33.3 min in the AED nitrogen trace pyrogram. In order to simplify the writing, the notation "C + retention time" is systematically used in the following paragraphs.

The statistical treatment was performed by a heuristic approach:

(i) Initially, the analysis was performed on individual elements (C, N, and S) by covariance matrix PCA and classifications, in order to select the more discriminative variables offering the highest covariance for each element. This first step allows to retain the zones of high absolute variability of the pyrogram. This is a step of pattern recognition, in which a preponderant weight has been attributed to the higher peaks (more reproducible than the small ones). This first step has been carried out on 25 individuals (n) and 230 variables (p) for each element in average.

(ii) Then, correlation matrix PCA and classification are carried out on separate elements on the significant variables retained in the first step (39 variables for C, 32 variables for N and 22 for S). This second step allows the classification of the individuals and enables us to study the correlation between variables. Whatever the element, several individuals show a systematic opposition and some others are always gathered on the factorial plane formed by the first and second principal components, which suggests that the elements are not completely independent. A simultaneous analysis of the three elements can thus be useful to provide an entire interpretation. A selection of a small number of variables has been carried

out by the observation, for each element, of the well-correlated variables in the initial pyrograms. The aim of this selection is to preserve the variables corresponding to well-determined peaks, which makes them potentially identifiable by Py-GC-MS. This analysis on separate element thus acts as a filter to retain only the variables providing essential information.

(iii) Finally, correlation matrix PCA and classifications are carried out using simultaneously the three elements (C, N, and S) and the 29 variables retained for the three channels. Only the results of this third phase are presented here.

The application of these methods requires a minute examination of the significance of the results. Thus, two samples (FP1 and U10) have been analysed two or three times in Py-GC-AED in order to test the reproducibility and the repeatability of the results. During the first two phases of the statistical treatment these test-samples have been considered as supplementary individuals, and during the third phase the multivariate analyses have been carried out on all 30 individuals but by arranging the metric of weight in order to give an equal weight to each individual.

All the data analyses have been carried out on two statistical softwares; ADE-4® which is a software of multivariate analyses (Thioulouse *et al.*, 1997) for the principal components analyses, and STATISTICA® for the classifications.

#### **4. Results and discussion:**

The final chemometric analyses have been performed on 29 variables (which are the retention times selected from the first chemometric steps) and on 30 individuals (25 initial samples and the repetitions of FP1 and U10). The analysis of the eigenvalues shows that the first three axes explain 75 % of the inertia with 48% for the first axis. Figure III.2.8a represents the correlation circle, and figure III.2.8b the factorial plane (F1-F2) for the simultaneous principal components analysis.

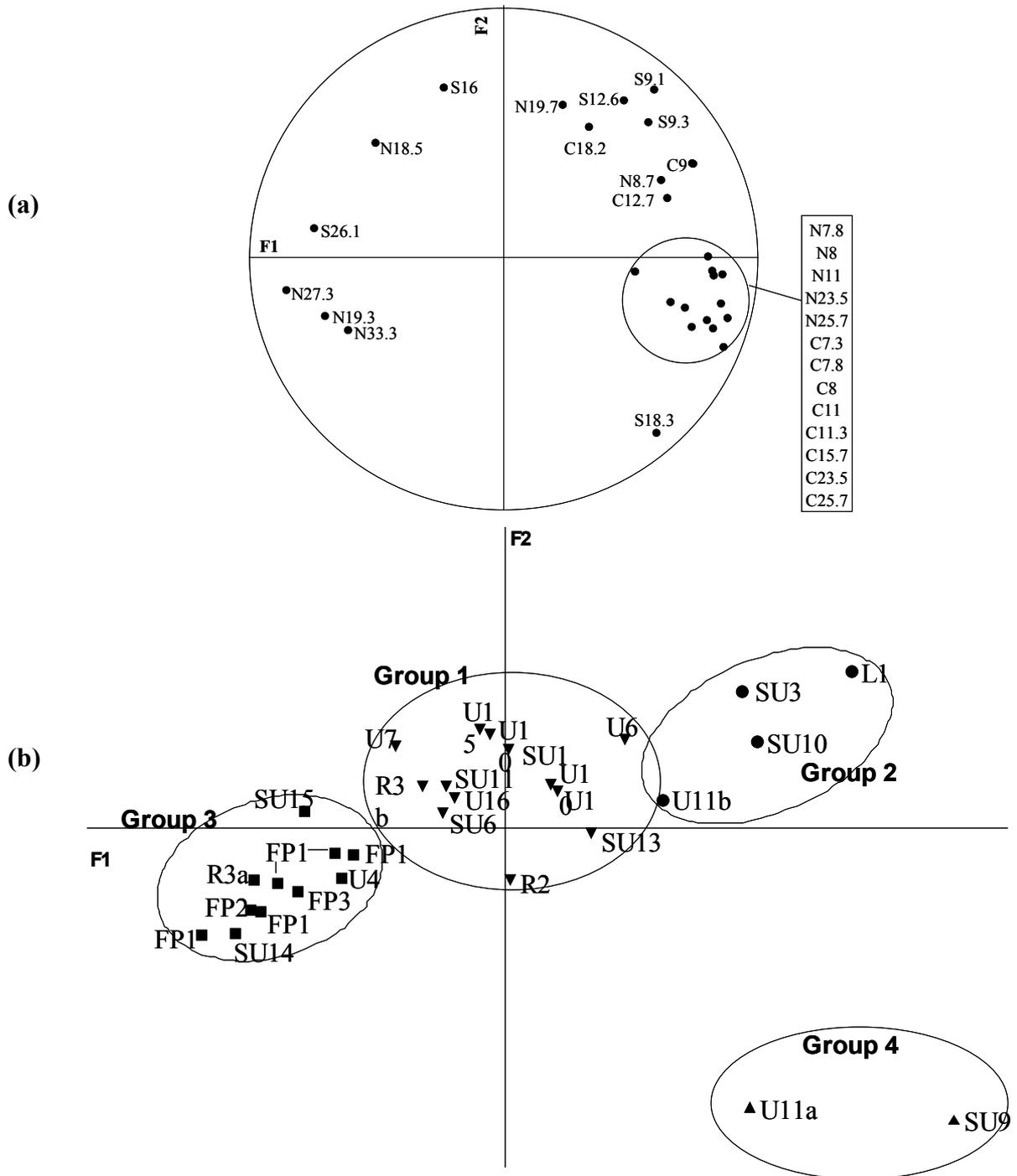


Figure III.2. 8. Simultaneous analysis of C, N, and S: (a) correlation circle showing the selected variables and (b) factorial plane representing the individuals. The groups are defined by a hierarchical classification.

The hierarchical classification and the method of k-means lead us to retain 4 groups, materialised by their ellipsoidal shell on the factorial plane, between the 30 individuals. Group 1 gathers more than half of the domestic sludges and amongst them most of the urban sludges. The three food-processing sludges and four domestic sludges are gathered in Group 3. Group

2 contains a sewage sludge coming from lagoonal system, and Group 4 contains only two sludges (U11a and SU9).

The k-means method shows a minor dispersion of the individuals around their centre of class. It is thus possible to represent the 4 groups by their gravity centre in order to obtain a simultaneous representation of variables and groups of individuals in the F1-F2 plane (figure III.2.9). This graphic representation shows the relationships between variables and individuals.

In order to interpret the results of the chemometric analysis in terms of chemical composition of the sludges, the trends of evolution of O/C and N/C atomic ratios have been plotted on figure III.2.8, and the results of the elemental analysis are summarised in table III.2.8. Since elemental analyses have been performed on the raw sludges without a preliminary demineralization process, the data are only indicative and have been complemented by the calculation of atomic ratios by Py-GC/AED.

In order to facilitate the interpretation of the results, the peaks associated to the 29 characteristic variables corresponding to pyrolytic fragments have been located on the AED-pyrograms representative of each group (figure III.2.10). Py-GC-MS allowed to identify most of the characteristic variables. Alkyl-phenols (C15.7, C18.2), an alkene (C12.7), a furfuraldehyde (C9) and a series of nitrogenous compounds such as alkyl-pyrridine (N8.7), imidazole (N11), alkyl-amine (N8), phenylpropionitrile (N23.5) were identified. However, Py-GC-MS failed to identify sulphur compounds.

This is mainly due to the high sensitivity and selectivity of Py-GC/AED compared to Py-GC-MS. Indeed, sulphur is found in low concentration in the sludges, less than 0.5% as determined by the elemental analyses and could only be detected by Py-GC-AED. Anyway, as explained above, the difficulty to identify the chemical composition of all the variables is not considered as a limitation since the purpose of the study is to define some general chemical trends for each group of sludges.

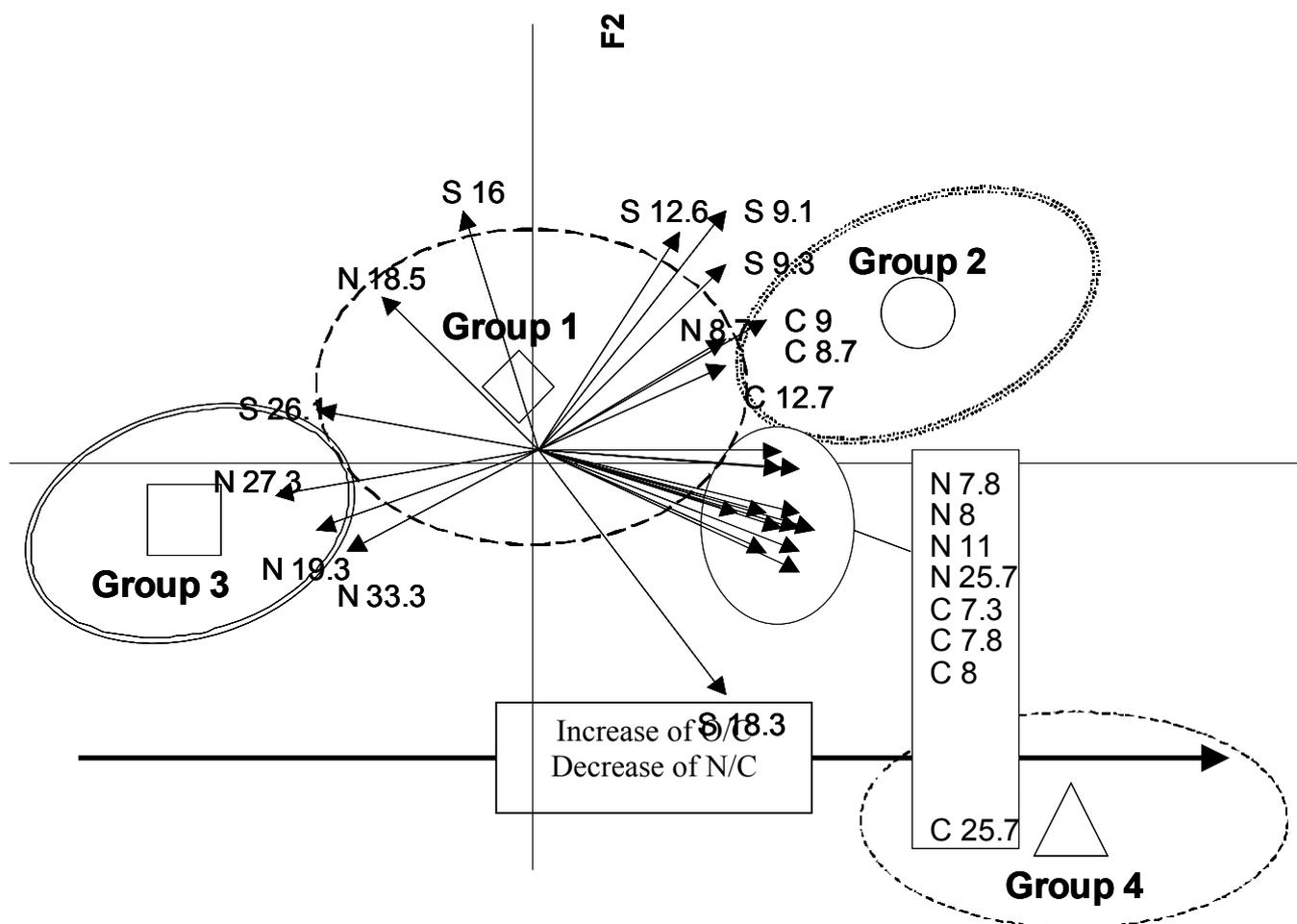


Figure III.2. 9. Simultaneous representation of variables and groups of individuals in the F1-F2 factorial plane.

Sewage Sludge	Atomic ratios calculated from Py-GC/AED analyses				Atomic ratios calculated from elemental analyses			
	H/C	N/C	O/C	S/C	H/C	N/C	O/C	S/C
<i>U10 (Group 1)</i>	1.97 ±0.25	0.184 ±0.024	0.81 ±0.09	0.02 ±0.003	1.85	0.18	0.69	0.005
<i>L1 (Group 2)</i>	2.19 ±0.25	0.156 ±0.024	1.11 ±0.09	0.044 ±0.003	1.74	0.10	0.93	0.016
<i>FPI (Group 3)</i>	2.11 ±0.25	0.19 ±0.024	0.77 ±0.09	0.022 ±0.003	1.67	0.15	0.64	0.004
<i>U11a (Group 4)</i>					2.18	0.14	1.19	ND

Table III.2 8. Atomic ratios calculated from Py-GC/AED and elemental analyses of 3 samples: FPI, U10 and L1 representative respectively of Group 3, Group 1 and Group 2 defined in figure III.2.6.

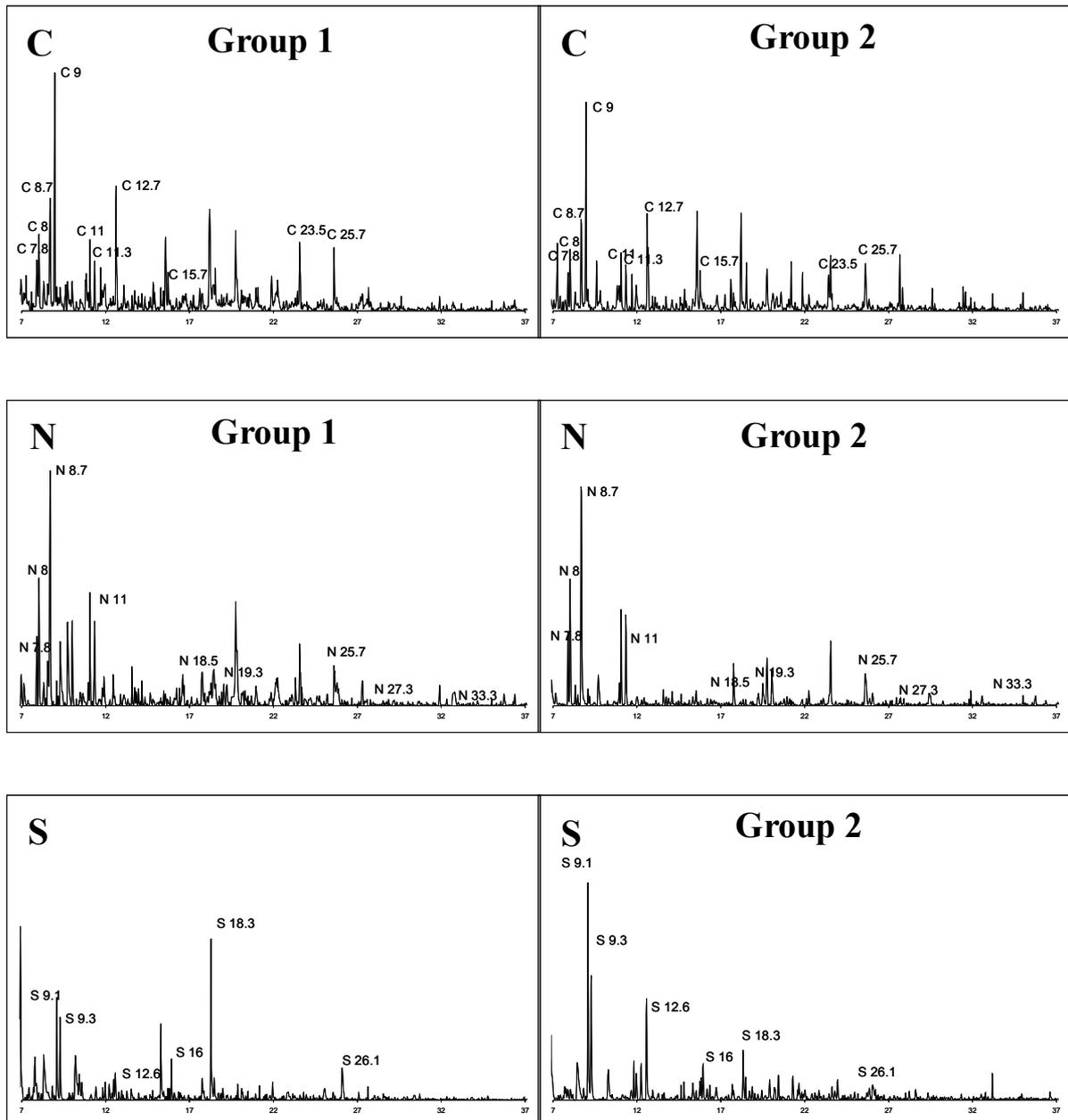


Figure III.2. 10. Carbon-, Nitrogen- and Sulphur-specific pyrograms of four sludges representative of each group, and identification of the significant variables.

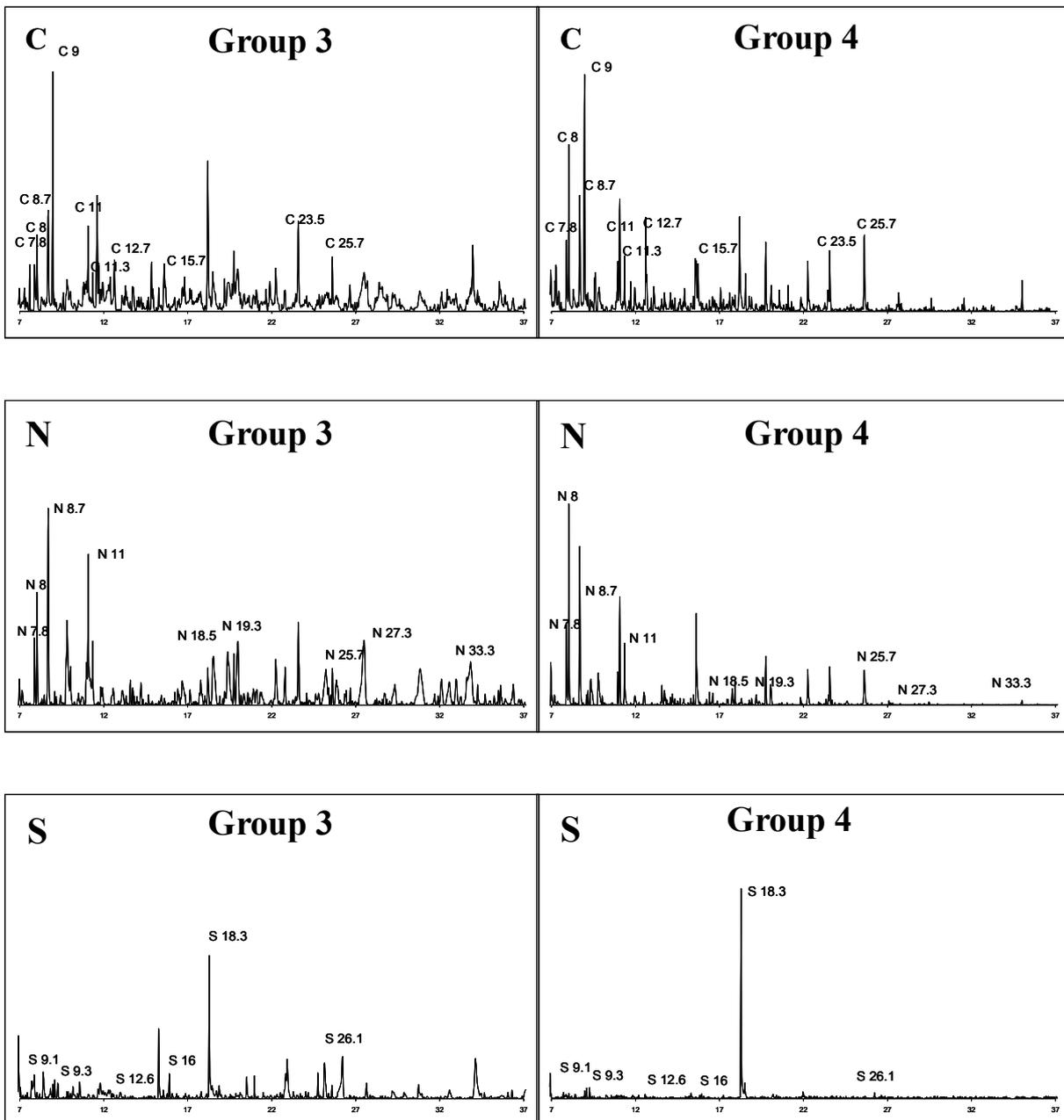


Figure III.2.10 (Continued)

F1 factorial plane mainly represents a cluster of variables or compounds observed in equivalent proportions in all the sewage sludges that constitute their molecular background. Some compounds such as alkylphenols and sulphur compounds such as S9.1, S9.3 and S12.6 are characteristic of individuals located on the right part of the F1 factorial plane and especially members of Group 2. Relatively high molecular-weight nitrogenous compounds (N19.3, N27.3 and N33.3) and one sulphur compound (S26.1) characterise individuals located on the left part of the F1 factorial plane and particularly individuals from Group 3. F2 factorial plane mainly sets the two individuals from Group 4 which represents 52% of inertia

against the other individuals. The two samples of this group are always gathered in all the analyses (covariance matrix PCA, correlation matrix PCA on separate elements and correlation matrix PCA on simultaneous elements) and always in opposition to the other samples. These two individuals are mainly characterised by the predominance of the S18.3 sulphur compound in the sulphur trace pyrogram.

Group 1 includes most of the urban sludges (U1, U6, U7, U10, U15 and U16) and several semi-urban sludges. Among these sludges, U10 is the result of a thorough wastewater treatment and an advanced sludge treatment including anaerobic digestion and dehydration. U10 represents the gravity centre of Group 1 (Figure III.2.9). The statistical analysis suggests that this group represents the average composition of most of sewage sludges.

Group 2 gathers samples discriminated by the abundance of alkylphenols which are lignin-derived compounds. It is at least consistent with sewage sludge L1, which is constituted of sediments originating from a lagoonal system. Indeed, these sediments contain the residue from the lagoonal wastewater treatment and also plant debris enriched in lignin which have been accumulated over years. The presence of these characteristic compounds in the two domestic sludges SU3 and SU10 collected in wastewater treatment plants from rural areas might be explained by the accumulation of plant debris in the sewage system because of rainwater runoff. This group is also characterised by relatively high O/C and low N/C atomic ratios compared to the other samples, which might be explained by the presence of lignin-derived compounds.

Group 3 gathers all the food-processing sewage sludges and is characterised by specific nitrogen compounds as evidenced by PCA analysis. Although most of these compounds could not be identified by Py-GC/MS, their presence can be attributed to the types of wastewater that are processed by these wastewater treatment plants, enriched in by-products from dairy industry. The detailed molecular analysis of these sewage sludges by Py-GC/MS confirmed the discrimination of food-processing sewage sludges on the basis of nitrogenous compounds (Jardé *et al.*, 2002). Apart from U4 which comes from the sewage treatment plant of a town of average size, the three other domestic sludges from the Group 3 come from small sewage treatment plants in rural areas. No explanation can be put forward to justify their gathering with food-processing sludges even though part of the answer might be found in a more thorough study of R3 sludges. Sludges R3a and R3b come from a rural wastewater-treatment plant. R3a was sampled in the storage silo right after its production,

whereas R3b was collected in a disposal field where it had been stored for several months. The evolution of this sludge from Group 3 towards Group 1 suggests that R3 underwent a biochemical degradation inducing a modification of its chemical composition and probably the degradation of the nitrogenous compounds characteristic of Group 3. Consequently it reached a more stable chemical structure corresponding to the average composition defined in Group 1.

Finally, Group 4 corresponds to two unclassified sewage sludges, U11a and SU9, mainly characterised by the sulphur compound S18.3 and by relatively low S/C atomic ratios compared to samples from other groups. U11a comes from the primary wastewater treatment and is rich in organic pollutants, whereas U11b, located in Group 2, results from the secondary sewage treatment. Detailed molecular analyses of U11a (not presented in this paper) showed that, contrary to U11b, sludge U11a had a high polyaromatic hydrocarbon (PAH) content and was enriched in petroleum products. These observations could explain why U11a is not gathered with sludges from Group 1 although it comes from one of the biggest sewage treatment plants in Lorraine.

## 5. Conclusion

The Py-GC/AED is a powerful technique to characterise the insoluble solid fraction of sewage sludges. However, the visual discrimination of the numerous pyrograms is difficult and it is necessary to develop a statistical approach in order to bring out the relevant information. This methodology was developed so that the steps of data reduction and selection were as objective as possible prior to the application of chemometric methods. The statistical analysis provided a classification of the 25 sewage sludges into four groups. The characteristics of each group are summarised in a graphic displaying the correlation between variables, the classification of individuals, and the variables typical of each group. Complementary analyses by Py-GC/MS provide an identification of the major compounds associated to the characteristic variables. The methodology is validated by the good reproducibility of the results obtained for the supplementary individuals.

The main group gathers almost half of the samples and includes most of the urban sewage sludges. It characterises the average or standard chemical composition of a sludge which evolved towards a stable organic material. The second important group gathers sludges containing three specific nitrogenous compounds and allows to distinguish clearly food-processing sludges. It could also evidence the unstable or biodegradable nature of some

sewage sludges. The other two groups allow to evidence the atypical composition of some sludges based on the presence of specific compounds.

Thus, this methodology is particularly efficient to discriminate sludges and to extract the relevant information often found in the distribution of polar compounds which are usually difficult to identify or even to detect using Py-GC/MS. However, it shows some limitations, and needs to be perfected. Indeed, the different steps of signal treatment are tedious despite the automation of the main parts of data processing. Moreover, the elimination of variables in order to extract the global information involves the elimination of specific characteristics of each individual. However, it requires a simple preparation of sludges (a solvent extraction before the analytical pyrolysis) and the readability and the simplicity of the representation obtained by the chemometric methods compensate these limitations.

An application of this methodology with further calibration might consist in the monitoring of the evolution of a sample throughout the sludge treatment, as a rapid way of controlling its efficiency by considering the position of the final sludges on the factorial plane. A location on the factorial plane far from the average composition could allow to detect a malfunction of the process.

## REFERENCES

- Andersson, J.T. (2002) Some unique properties of gas chromatography coupled with gas chromatography coupled with atomic-emission detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **373**, 344-355.
- Barrio, M.E., Lliberia, J.L., Comellas, L. & Broto-Puig, F. (1996) Pyrolysis-gas chromatography applied to the study of organic matter evolution in sewage sludge-amended soils using nitrogen-phosphorus, flame ionization and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A.*, **719**, 131-139.
- Clark, H.A. & Jurs, P.C. (1979) Classification of crude oil gas chromatograms by patterns recognition techniques. *Analytical chemistry*, **51**, 616-623.
- Faure, P., Vilmin, F., Michels, R., Jarde, E., Mansuy, L., M., E. & Landais, P. (2002) Application of thermodesorption and pyrolysis-GC-AED to the analysis of river sediments and sewage sludges for environmental purpose. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **62**, 297-318.

- Flodin, C., Ekelund, M., Boren, H. & Grimwall, A. (1997) Pyrolysis-GC/AED and Pyrolysis-GC/MS analysis of chlorinated structures in aquatic fulvic acids and chlorolignins. *Chemosphere*, **34**, 2319-2328.
- Garcia, C., Hernandez, T. & Costa, F. (1992) Characterization of Humic Acids from Uncomposted and Composted Sewage Sludge by Degradative And Non-Degradative Techniques. *Bioresource Technology*, **41**, 53-57.
- Göbbels, F.-J. & Püttmann, W. (1997) Structural investigation of isolated aquatic fulvic and humic acids in seepage water of waste deposits by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Water Research*, **31**, 1609-1618.
- Gonzales-Vila, F.J., Almendros, G. & Madrid, F. (1999) Molecular alterations of organic fractions from urban waste in the course of composting and their further transformation in amended soils. *The Science of Total Environment*, **236**, 215-229.
- Hernandez, T., Moreno, J.I. & Costa, F. (1993) Infrared spectroscopic characterization of sewage sludge humic acids. Evidence of sludge organic matter-metal interactions. *Agrochimica*, **37**, 12-17.
- Iakimenko, O., Otabong, E., Sadovnikova, L., Persson, J., Nilsson, I., Orlov, D. & Ammosova, Y. (1996) Dynamic transformation of sewage sludge and farmyard manure components. 1. Content of humic substances and mineralisation of organic carbon and nitrogen in incubated soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **58**, 121-126.
- Jardé, E., Mansuy, L. & Faure, P. (2002) Characterization of the macromolecular organic content of sewage sludges by THM-GC-MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, Submitted.
- Miikki, V., Hänninen, K., Knuutinen, J. & Hyötyläinen, J. (1999) Pyrolysis of humic acids from digested and composted sewage sludge. *Chemosphere*, **38**, 247-253.
- Nielsen, N.-P.V., Carstensen, J.M. & Smedsgaard, J. (1998) Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analyses using correlation optimised warping. *Journal of Chromatography A*, **805**, 17-35.
- Nielsen, N.-P.V., Smedsgaard, J. & Frisvad, J.C. (1999) Full second-order chromatographic/spectrometric data matrices for automated sample identification and component analysis by non-data-reducing image analysis. *Anal. Chem*, **71**, 727-735.
- Pörschmann, J., Kopinke, F.-D., Remmler, M., Mackenzie, K., Geyer, W. & Mothes, S. (1996) Hyphenated techniques for characterizing coal wastewaters and associated sediments. *Journal of chromatography*, **750**, 287-301.

- Quimby, B.D. & Sullivan, J.J. (1990) Evaluation of microwave cavity discharge tube and gas flow system for combined gas chromatography-atomic emission detection. *Analytical Chemistry*, **62**, 1027-1034.
- Sadovnikova, L., Otabbong, E., Iakimenko, O., Nilsson, I., Persson, J. & Orlov, D. (1996) Dynamic transformation of sewage sludge and farmyard manure components. 2. Copper, lead and cadmium forms in incubated soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **58**, 127-132.
- Schulten, H.R., Simmleit, N. & Marzec, A. (1988) Liquefaction behavior of coals: a study by field ionization mass spectrometry and pattern recognition. *Fuel*, **67**, 619-625.
- Smith, C.S., Morgan, S.L., Parks, C.D. & Fox, A. (1990) Discrimination and Clustering of Streptococci by pyrolysis gas chromatography/Mass Spectrometry and multivariate data analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.*, **18**, 97-115.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S. & Olivier, J.M. (1997) ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*, **7**, 75-83.
- Unsal, T. & Sozudogru Ok, S. (2001) Description of characteristics of humic substances from different waste materials. *Bioresource Technology*, **78**, 239-242.
- Voisin, S., Renaud, F.N.R., Freney, J., de Montclos, M., Bouliou, R. & Deruaz, D. (1999) Pyrolysis-gas-liquid chromatography with atomic emission detection for the identification of Corynebacterium species. *Journal of Chromatography A*, **863**, 243-248.
- Wang, F.C.-Y. (1996) Determination of polyacrylamide in polyvinyl alcohol by pyrolysis-gas chromatography with atomic emission detection. *Journal of Chromatography A*, **753**, 101-108.
- Wilcken, H., Sorge, C. & Schulten, H.-R. (1997) Molecular composition and chemometric differentiation and classification of soil organic matter in Podzol B-horizons. *Geoderma*, **76**, 193-219.

### **XIII. DETECTION DE MICROPOLLUANTS ORGANOCHLORES PAR PY-GC-AED**

Outre l'approche multiélémentaire couplée à une analyse chimométrique développée dans l'article précédent, la Py-GC-AED peut également être utilisée sur un canal spécifique afin de déterminer le statut de micropolluants organiques présents dans les boues. L'efficacité de ce couplage a été démontrée pour rechercher des structures halogénées dans les matières organiques naturellement ou industriellement halogénées (Flodin *et al.*, 1997). Parmi les échantillons collectés au cours de notre campagne d'échantillonnage, FP1 est issu d'une station traitant à la fois les effluents d'une laiterie (82%) et les effluents d'une usine chimique fabricant des produits chlorés (8%). L'application de la Py-GC-AED à l'analyse de cet échantillon peut nous permettre de détecter les composés organochlorés incorporés à la matrice macromoléculaire. Les analyses ont été effectuées sur les boues FP1 et U10 en se focalisant sur le canal du chlore (479 nm). Les conditions expérimentales sont décrites dans la deuxième partie, cette analyse a été réalisée avec le pyrolyseur CDS Pyroprobe 1000.

La figure III.2.11 présente les pyrogrammes de ces échantillons. La boue U10 est caractérisée par la présence de composés chlorés en traces. La confirmation de la nature des pics chlorés est obtenue par la réalisation d'une empreinte spectrale. Le triplet d'émission caractéristique à 479.5, 481 et 481.9 nm confirme formellement la présence du chlore pour les pics repérés (notés \*). Dans le cas de la boue FP1, l'abondance du chlore est beaucoup plus marquée. Un pic de gaz chloré (probablement HCl) et plusieurs composés organochlorés résolus sont mis en évidence; parmi eux des composés légers qui éluent avant huit minutes ainsi que des composés de plus haut poids moléculaire très bien résolus éluant entre 8 et 26 minutes.

L'application d'un palier de thermodésorption à l'échantillon FP1, apporte des informations complémentaires. Les résultats détaillés de cette analyse ont été publiés dans la revue «*Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*» (cf annexe). Trois pas de température ont été retenus, 150°C qui est la température habituellement utilisée pour éliminer l'eau libre et les composés volatils adsorbés sur l'échantillon, 300°C qui est considérée comme la limite haute entre la thermodésorption des produits lourds et le début de craquage des macromolécules et 620°C qui est la température de pyrolyse utilisée. Les résultats sont en accord avec les travaux de Flodin et al (1997) et montrent qu'à 150°C seule la présence d'eau est mise en évidence, aucun pic chloré n'est détecté, ce qui indique l'absence de composés chlorés adsorbés. Lors du palier à 300°C, des composés gazeux chlorés sont générés

(probablement HCl), ainsi que des composés organochlorés légers. A 620°C, des composés de plus haut poids moléculaire bien résolus sont détectés, mettant en évidence la présence de composés chlorés liés à la structure macromoléculaire des boues. L'analyse de cet échantillon par Py-GC-MS en mode «fullscan» n'a pas permis de détecter les composés chlorés et de les identifier en raison du manque de sensibilité de la technique. Pour parvenir à une identification, il serait nécessaire de mener de nouvelles investigations en mode SIM (Selective Ion Monitoring).

Cette étude nous a permis de détecter la présence de composés chlorés incorporés à la structure macromoléculaire de la boue FP1, le devenir de ces composés au cours de la biodégradation sera l'étape suivante de cette étude.

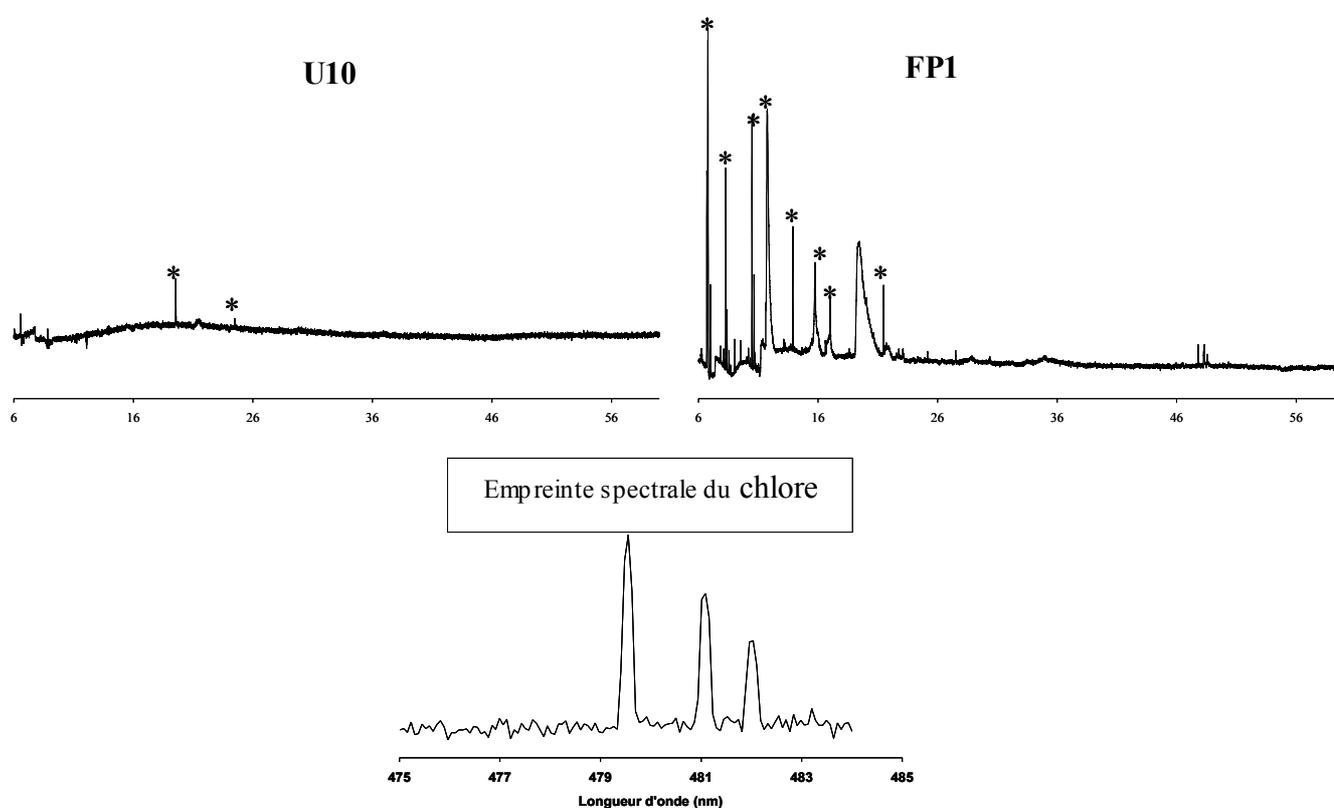


Figure III.2. 11. Pyrogrammes de U10 et FP1 sur le canal du chlore

## XIV. CONCLUSION

Les études sur la nature de la matière organique macromoléculaire des déchets organiques tels que les boues sont nécessaires afin de mieux appréhender les conséquences sur la réactivité avec la matière organique des sols ou leur influence sur les propriétés physico-chimiques du sol. (Senesi *et al.*, 1996).

L'analyse de la FOI par la semi-quantification des pyrogrammes a permis de bien différencier les boues de papeterie et le fumier des autres échantillons. Cette distinction s'est faite essentiellement sur la base des composés dérivés de la lignine. La majorité des boues domestiques et les trois boues de laiterie sont regroupées et sont caractérisées par une composition moyenne en composés azotés, dérivés de la lignine et acides gras. L'analyse qualitative des pyrogrammes a toutefois permis de séparer les boues domestiques par la présence de deux composés dérivés de la caféine et de l'urée qui ne sont pas présents dans les boues de papeterie et de laiterie. La méthodologie développée dans cet article est adaptée à la discrimination d'échantillons dont les compositions sont contrastées, mais montre certaines limites en ce qui concerne les différences subtiles. D'autre part, elle se concentre seulement sur les composés principaux azotés, lipidiques et ligneux, si bien que les différences potentielles qui auraient pu être mises en évidence par la présence de composés minoritaires ne sont pas prises en compte selon cette classification.

Afin d'approfondir la différenciation des boues, une deuxième étude a été entreprise, en utilisant un détecteur spécifique, l'AED, qui permet une analyse multi-élémentaire. Des échantillons de boues domestiques et de boues de laiterie ont été analysés en se focalisant sur les canaux du carbone, du soufre et de l'azote. En raison du nombre élevé de pyrogrammes, il est difficile de réaliser une analyse objective et d'en extraire l'information pertinente. Une analyse statistique basée sur l'analyse en composante principale (ACP) et sur la méthode de classification hiérarchique a donc été développée après une étape préliminaire de traitement du signal. Cette méthodologie est basée sur une intégration de la totalité des pics afin de limiter la réduction subjective de données. L'approche statistique développée dans cette étude permet de mettre en évidence un ensemble de boues, de composition élémentaire similaire, centré autour de la boue U10 qui apparaît comme la boue de référence. Cette analyse permet en outre, d'identifier un certain nombre de boues dont la composition diffère de celle de la boue de référence et de définir les composés les plus caractéristiques de ces boues.

L'application de ces deux méthodologies nous a donc permis de mieux approcher la composition de la FOI de boues de stations d'épuration de différentes origines. Ces deux techniques montrent tout d'abord des résultats similaires dans le sens où une grande homogénéité de la composition chimique de la majorité des boues domestiques a été mise en évidence. Ces deux méthodologies mettent également en évidence une composition plus atypique de certaines boues domestiques, qui peut être imputée soit à des contributions organiques particulières dans ces boues, soit directement au mode de traitement des eaux usées et des boues. La réactivité des boues et leur comportement après épandage dépend essentiellement de leur composition chimique. La relative homogénéité des boues domestiques permet d'envisager des réactivités assez similaires après épandage en agriculture.

D'autre part, ces deux approches sont complémentaires, puisque l'analyse par Py-GC-AED grâce à la plus grande sensibilité du détecteur, a permis d'améliorer sensiblement la séparation des boues de laiterie par la présence de pics azotés spécifiques. Les boues de papeterie ont quant à elles, clairement été différenciées des autres boues par l'analyse en Py-GC-MS, grâce à la présence de composés dérivés de la lignine et grâce à la faible teneur en composés azotés. D'autre part, l'étude spécifique du statut des composés organochlorés dans le boue FP1 par Py-GC-AED nous a permis de mettre en évidence des composés incorporés à la structure chimique de la FOI.

Les analyses en Py-GC-AED ont été effectuées initialement avec un pyrolyseur SGE qui souffre de certaines limitations dans la programmation de la température. De plus l'utilisation d'un pelletiseur empêche d'un point de vue pratique, la méthylation des FOI. Le couplage Py-GC-AED a depuis été amélioré par l'acquisition d'un CDS 1000 pyroprobe. Ce type de pyrolyseur améliore sensiblement la reproductibilité des analyses et permet d'effectuer des analyses dans des conditions similaires à celles effectuées par Py-GC-MS. Notamment il est maintenant tout à fait possible de faire une analyse par THM-GC-AED qui permettrait d'améliorer la chromatographie des FOI des boues qui sont riches en composés polaires. Il serait donc intéressant de faire des analyses complémentaires avec ce nouveau couplage dans ces nouvelles conditions analytiques afin de confirmer les résultats obtenus et éventuellement d'affiner les interprétations.

D'autre part, les échantillons utilisés pour l'étude en Py-GC-AED proviennent d'une campagne d'échantillonnage antérieure à celle réalisée pour la thèse, comportant moins d'échantillons et surtout aucune boue de papeterie. Aussi l'application de la méthodologie statistique sur les 48 échantillons analysés au cours de la thèse avec les conditions analytiques

utilisées lors de l'analyse par THM-GC-MS devrait permettre d'accréditer cette méthodologie sur un nombre de boue plus important et plus varié.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F. & Ingelmo, F. (2001) Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. *Bioresource Technology*, **77**, 109-114.
- Barrio, M.E., Lliberia, J.L., Comellas, L. & Broto-Puig, F. (1996) Pyrolysis-gas chromatography applied to the study of organic matter evolution in sewage sludge-amended soils using nitrogen-phosphorus, flame ionization and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A.*, **719**, 131-139.
- Challinor, J.M. (2001) Review: the development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **61**, 3-34.
- Debosz, K., Petersen, S.O., Kure, L.K. & Ambus, P. (2002) Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. *Applied Soil Ecology*, **567**, 1-12.
- Miikki, V., Hänninen, K., Knuutinen, J. & Hyötyläinen, J. (1999) Pyrolysis of humic acids from digested and composted sewage sludge. *Chemosphere*, **38**(2), 247-253.
- Réveillé, V. (2001) Caractérisation de mélanges sol/boues: complexe d'échange, matière organique et répartition des métaux.- thèse en Science et Techniques de l'Environnement, pp. 277. Université de Paris XII- Val de Marne, Paris XII.
- Réveillé, V., Mansuy, L., Jardé, E. & Garnier-Sillam, E. (2002) Characterisation of sewage sludge-derived organic matter: lipids and humic acids. *Organic Geochemistry-submitted*
- Senesi, N., Miano, T.M. & Brunetti, G. (1996) Humic-like substances in organic amendments and effect on native soil humic substances. In: *Humic substances in terrestrial ecosystems* (Ed. by A. Piccolo), pp. 14.
- Unsal, T. & Sozudogru Ok, S. (2001) Description of characteristics of humic substances from different waste materials. *Bioresource Technology*, **78**, 239-242.

## **CHAPITRE III**

*Effets de la biodégradation sur le  
contenu organique des boues*



## I. INTRODUCTION

Les deux chapitres précédents étaient consacrés à la caractérisation du contenu organique moléculaire de 48 boues d'épuration. L'analyse de la FOS permet de différencier les boues en fonction de leur origine (domestiques, agro-alimentaires, papeterie) selon la présence ou l'absence de certains composés (LABs, stéroïdes) mais également selon des distributions de *n*-alcanes typiques de contributions particulières (produits paraffiniques, végétaux supérieurs, huiles moteurs, particules d'asphaltes). L'analyse de la FOI des boues permet de distinguer trois familles de composés majoritaires: les composés dérivant de la lignine, ceux dérivant des lipides et les composés azotés. La quantification relative de ces trois familles de composés ainsi que l'analyse qualitative des pyrogrammes nous a permis de bien séparer les boues de papeterie des boues domestiques et de laiterie. Les boues domestiques peuvent quant à elles être différenciées des autres à partir de la distribution moléculaire des composés azotés mais aussi par l'analyse élémentaire moléculaire (Py-GC/AED).

Les différences observées entre les types de boues ou les similarités au sein de certains groupes nous amènent à nous interroger sur leur réactivité une fois épandue en agriculture. En effet, en fonction de la nature des composés présents dans la boue, son application au sol peut en affecter la nature et les propriétés (Boyd *et al.*, 1980; Senesi *et al.*, 1996). De nombreux auteurs se sont intéressés à l'analyse des substances humiques de mélange de sol et de boue (Boyd *et al.*, 1980; Hiroux *et al.*, 1983; Piccolo *et al.*, 1992; Iakimenko *et al.*, 1996; Réveillé, 2001). Ces études ont montré que les acides humiques issus des sols amendés présentent une composition intermédiaire entre celle des boues et celle des sols non amendés, de plus les effets de l'application de la boue semble se diluer avec le temps d'expérimentation (Boyd *et al.*, 1980). La boue va jouer un rôle sur la structure du sol en augmentant la micro- et la macro-porosité des sols (Pagliai & Vittori Antisari, 1993).

Cependant certains composés organiques présents dans les boues, et notamment les lipides, vont influencer sur la capacité de rétention en eau des sols amendés, sur leur stabilité, et pourront induire des retards dans la croissance des plantes (Stevenson, 1994; Gonzalez-Vila *et al.*, 1999).

Une des limitations dans ces expérimentations avec des mélanges sol-boue est que les résultats obtenus vont dépendre pour beaucoup du type de sol, de la nature des boues utilisées, du temps d'incubation et du taux d'application (Hsieh *et al.*, 1981; Chae & Tabatabai, 1986;

Wiseman & Zibilske, 1988; Serna & Pomares, 1992). Il n'est alors pas toujours aisé de déterminer l'effet de l'application des boues sur la composition chimique des sols. Afin de mieux comprendre les effets de la biodégradation sur les boues seules, nous nous sommes donc intéressés à l'étude de la modification de leur contenu organique, avant d'envisager dans une étude future de travailler avec des mélanges plus complexes de type sol-boues. Les échantillons retenus dans le cadre de ce travail sont des boues domestiques, de laiterie et de papeterie. Les principales caractéristiques des échantillons bruts seront brièvement rappelées dans ce chapitre avant de s'intéresser à la caractérisation moléculaire des échantillons biodégradés et à la comparaison avec les échantillons bruts.

## XV. ECHANTILLONS RETENUS POUR LES EXPERIMENTATIONS

Quatre échantillons représentatifs ont été utilisés: deux échantillons de boues domestiques, U1 et U10, une boue de laiterie (FP1) et une boue de papeterie (PM1). Les caractéristiques de ces quatre échantillons sont brièvement exposées dans les paragraphes qui suivent. L'ensemble des composés présents dans les chromatogrammes et pyrogrammes exposés dans ce chapitre ont été identifiés et le symbolisme utilisé est répertorié dans le tableau III.3.1

<i>Nom des composés</i>	<i>Formule</i>	<i>Symbole</i>
Pentadécane	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	C <sub>15</sub>
Heptadécane	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	C <sub>17</sub>
Nonadécane	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	C <sub>19</sub>
Hénéicosane	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	C <sub>21</sub>
Tricosane	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	C <sub>23</sub>
Pentacosane	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	C <sub>25</sub>
Heptacosane	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	C <sub>27</sub>
Nonacosane	C <sub>29</sub> H <sub>62</sub>	C <sub>29</sub>
Hentriacontane	C <sub>31</sub> H <sub>66</sub>	C <sub>31</sub>
Tritriacontane	C <sub>33</sub> H <sub>70</sub>	C <sub>33</sub>
Pentatriacontane	C <sub>35</sub> H <sub>74</sub>	C <sub>35</sub>
Heptatriacontane	C <sub>37</sub> H <sub>78</sub>	C <sub>37</sub>
Nonatriacontane	C <sub>39</sub> H <sub>82</sub>	C <sub>39</sub>
Toluène	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	mB1
Styrène	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub>	mB2
Methoxybenzène (anisole)	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	mB3
Benzène, 1-méthyléthényl	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub>	mB4
4-Méthoxytoluène	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	mB5
Acide benzoïque, méthyle ester	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	mB6
4-methoxystyrène (4-vinylanisole) (P)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	P1

2-méthoxyphenol (guaiacol) (V)	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	V1
1,2-diméthoxybenzène (vératrole) (V)	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	V2
4-vinyl-2-méthoxyphénol (G)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	V3
1-(2-méthoxyphénol)-2-propène (G)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	V4
Acide benzoïque, 3,4-diméthoxy méthyle ester (acide vanillique) (V)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	V5
2,6-diméthoxyphénol (syringol)	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	S1
1,2,3-triméthoxybenzène (S)	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	S2
1H-pyrrole, 1-méthyle	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N	N1
Acétamide, N,N-diméthyle	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO	N2
2,5-pyrrolidone, 1-méthyle	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	N3
N-méthyl-L-prolinol	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO	N4
1H-indole, 1-méthyle	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N	N5
1H-indole, 1,3-diméthyle	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N	N6
2,4(1H,3H)-pyrimidinedione, 1,3-diméthyle	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N7
2,4(1H,3H)-pyrimidinedione, 1,3,5-triméthyle	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N8
Adénine, N,N,N'-triméthyle	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub>	N9
1H-purine, 2,6-dione (caféine)	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	C
Hexadécaneamide	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> NO	N10
Octadécaneamide	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	N11
Acide octanoïque, méthyle ester	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>8.0</sub>
Acide décanoïque, méthyle ester	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>10.0</sub>
Acide dodécanoïque, méthyle ester	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>12.0</sub>
Acide tétradécanoïque, méthyle ester	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>14.0</sub>
Acide 13-méthyle-tétradécanoïque, méthyle ester	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	iC <sub>15.0</sub>
Acide 12-méthyle-tétradécanoïque, méthyle ester	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	aC <sub>15.0</sub>
Acide pentadécanoïque, méthyle ester	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>15.0</sub>
Acide 9-hexadécanoïque, méthyle ester	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16.1</sub>
Acide hexadécanoïque, méthyle ester	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16.0</sub>
Acide heptadécanoïque, méthyle ester	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>17.0</sub>
Acide 9-octadécanoïque, méthyle ester	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18.1</sub>
Acide octadécanoïque, méthyle ester	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18.0</sub>
Acide docosanoïque, méthyle ester	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>22.0</sub>
Acide tétracosanoïque, méthyle ester	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>24.0</sub>
Furan, 2-méthoxyméthyl	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	F1
2-furancarboxaldehyde	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	F2
Acide butanedioïque, méthyle ester	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Bt
Ethylbenzène	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	Et
Acide phosphorique, triméthyle ester	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> P	P
Benzo(a)anthracène	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	Baa
Phénanthrène	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	Ph
Phénanthrène, 1-méthyle-7-(1-méthyléthyle)	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub>	MPh
Fluoranthène	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	Fluo
Pyrène	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	Pyr
Chrysène	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	Chry
Benzo(a)pyrène	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	Bap
Dibenzo(a,h)anthracène	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	Db
Benzo(a)fluoranthène	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	Baf
Benzo(k)fluoranthène	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	Bkf
Benzo(g,h,i)perylène	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	BP
Triphénylène	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	3T
Pérylène	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	Per
Cholest-5-èn-3-ol (cholestérol)	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O	2
5β-cholestan-3β-ol (coprostanol)	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O	4

5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol (cholestanol)	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O	6
5 $\beta$ -cholestan-3 $\alpha$ -ol (épicoprostanol)	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub>	7
3-methoxy-cholest-5-ene	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	1
5 $\alpha$ -Ergostan-3 $\alpha$ -ol	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O	8
5 $\alpha$ -stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	5

Tableau III.3.1. Formules chimiques et symboles des principaux pics identifiés dans les fractions extractibles et les résidus solides.

## XV.1. Boue domestique U10

### Caractéristiques générales :

- capacité: 480 000 eqhab
- station traitant les eaux usées urbaines et les eaux usées de brasserie.
- boue activée et séchée,
- boue épandue en agriculture.

### Quantifications des HPAs et EDPH

<i>Composés</i>	<i>Teneur (mg/ kg M.S.)</i>
Anthracène	< 0,15
Benzo(a)pyrène	0,6
Benzo(b)fluoranthène	0,66
Benzo(a)anthracène	0,62
Benzo(ghi)pérylène	0,55
Benzo(k)fluoranthène	0,34
Chrysène	0,65
Dibenzo(a, h)anthracène	< 0,25
Fluoranthène	1
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	0,56
Phénanthrène	0,68
Pyrène	1,17
E.D.P.H.	129

Tableau III.3.2. Quantification des HPAs présents dans l'échantillon U10.

Analyse élémentaire et organique

<b>Analyse élémentaire</b>	C %	22,89
	H %	3,80
	N %	3,20
	S %	0,92
<b>Composition organique</b>	Taux extrait (mg/g éch.)	47,1
	ALI (mg/g éch.)	9,5
	ARO (mg/g éch.)	7,
	POL (mg/g éch.)	30,6
	COT (%)	14,89
	Taux extrait (mg/g C.O.T)	317
	ALI (mg/g C.O.T)	64,8
	ARO (mg/g C.O.T)	43
	POL (mg/g C.O.T)	209,2
Résidu solide (mg/g C.O.T)	683	

Tableau III.3.3. Résultats de l'analyse élémentaire et composition de l'extrait de l'échantillon U10.

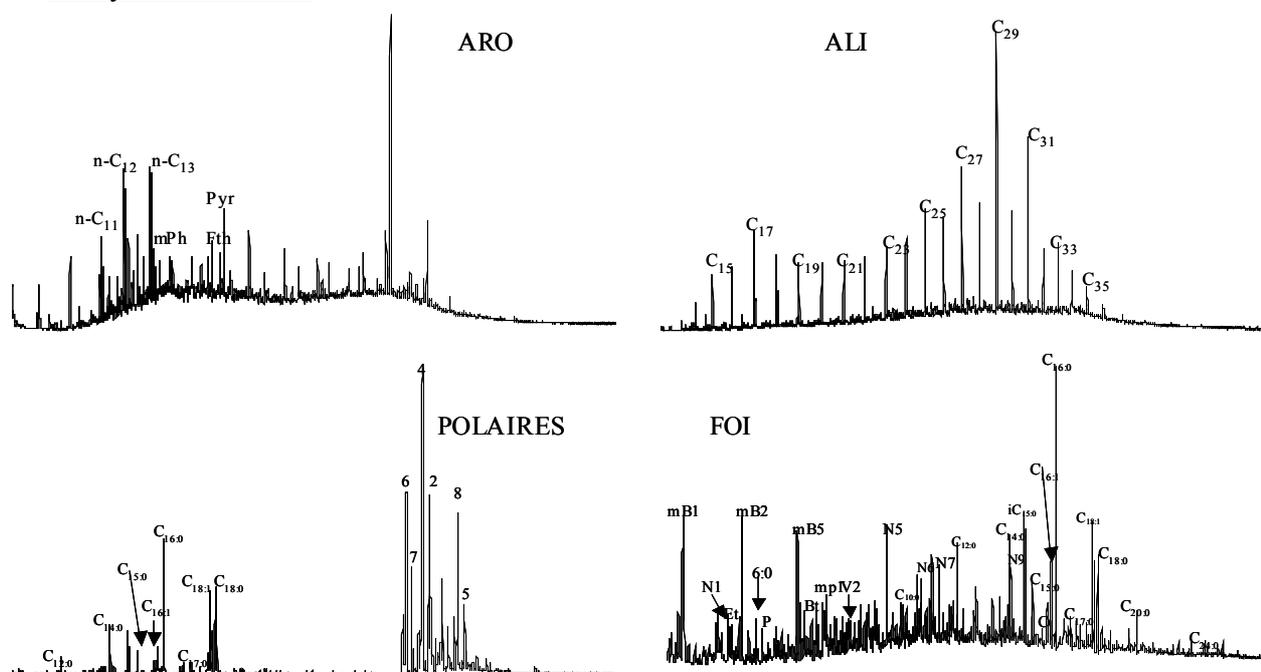
Analyse moléculaire

Figure III.3.2. Chromatogrammes des fractions aromatiques, aliphatiques, polaires et pyrogramme du résidu solide de l'échantillon U10.

La boue U10 est issue d'un traitement des eaux usées très complet qui inclue après les pré-traitements habituels (dégrillage, désablage, dégraissage), un traitement biologique avec deux bassins d'aération et cinq clarificateurs permettant de séparer l'eau traitée des boues, celles-ci étant dirigées vers une filière de traitement des boues par digestion anaérobie (où la matière organique est transformée en biogaz par l'action de micro-organismes spécifiques).

Les boues ainsi stabilisées sont ensuite épaissies gravitairement puis déshydratées par centrifugation avant d'être séchées pour réduire leur volume final. Cette station d'une grande agglomération est bien contrôlée et suivie, si bien que la boue U10 peut être considérée comme une boue de référence, justifiant son utilisation pour les expériences de biodégradation.

Elle est caractérisée par des teneurs en HPAs inférieures aux valeurs limites définies par les normes. L'extrait organique est essentiellement constitué de composés polaires (66%). Le chromatogramme de la fraction aliphatique est caractérisé par un C.P.I de 1,98 et par une distribution bimodale des *n*-alcanes, typique d'un mélange de deux contributions: une contribution pétrolière (du C<sub>15</sub>-C<sub>25</sub>) et une contribution végétale naturelle (du C<sub>25</sub> au C<sub>35</sub>) avec une prédominance de *n*-alcanes à nombre de carbone impair (*cf. partie III, chapitre 1-fraction soluble*). La fraction polaire est caractérisée par la présence d'acides gras et de stérols avec des distributions typiques de la majorité des boues domestiques étudiées. Les acides gras à nombre de carbone pair sont majoritaires, avec la prédominance des C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, C<sub>18:1</sub> et C<sub>16:1</sub>. On note également la présence d'acides gras impairs tel que le C<sub>15:0</sub> et le C<sub>17:0</sub>. Les stérols présents sont le cholest-5 $\alpha$ -en-3 $\beta$ -ol (cholestanol), le coprostanol, le cholestérol, le 3-ethoxycholestane, l'épicoprostanol et le stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol. Le contenu macromoléculaire de cette boue est caractérisé par une composition moyenne typique de la plupart des boues domestiques (composés azotés : 17,9%, dérivés de la lignine : 40,3% et dérivés des lipides : 41,8%) (*cf. partie III, chapitre 2- résidu solide*).

## **XV.2. Boue domestique U1**

### Caractéristiques générales

- station urbaine (24500 eqhab),
- boue activée et déshydratation par filtre presse,
- boue non épandue.

Quantifications des HPAs et EDPH

<i>Composés</i>	<i>Teneur (mg/ kg M.S.)</i>
Anthracène	0,31
Benzo(a)pyrène	2,53
Benzo(b)fluoranthène	3,2
Benzo(a)anthracène	2,12
Benzo(ghi)pérylène	2,47
Benzo(k)fluoranthène	1,57
Chrysène	1,93
Dibenzo(a,h)anthracène	0,63
Fluoranthène	3,74
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	2,7
Phénanthrène	1,27
Pyrène	3,13
E.D.P.H.	44

Tableau III.3.4. Quantification des HPAs présents dans l'échantillon U1.

Analyse élémentaire et organique

<i>Analyse élémentaire</i>	C %	31,16
	H %	5,31
	N %	5,12
	S %	0,72
<i>Composition organique</i>	Taux extrait (mg/g éch.)	62,2
	ALI (mg/g éch)	20,7
	ARO (mg/g éch)	8,9
	POL (mg/g éch)	32,6
	C.O.T (%)	18,68
	Taux extrait (mg/g C.O.T)	332,7
	ALI (mg/g)	110,8
	ARO (mg/g)	47,4
	POL (mg/g)	174,5
	Résidu solide (mg/g C.O.T)	667,3

Tableau III.3.5. Résultats de l'analyse élémentaire et composition de l'extrait de l'échantillon U1.

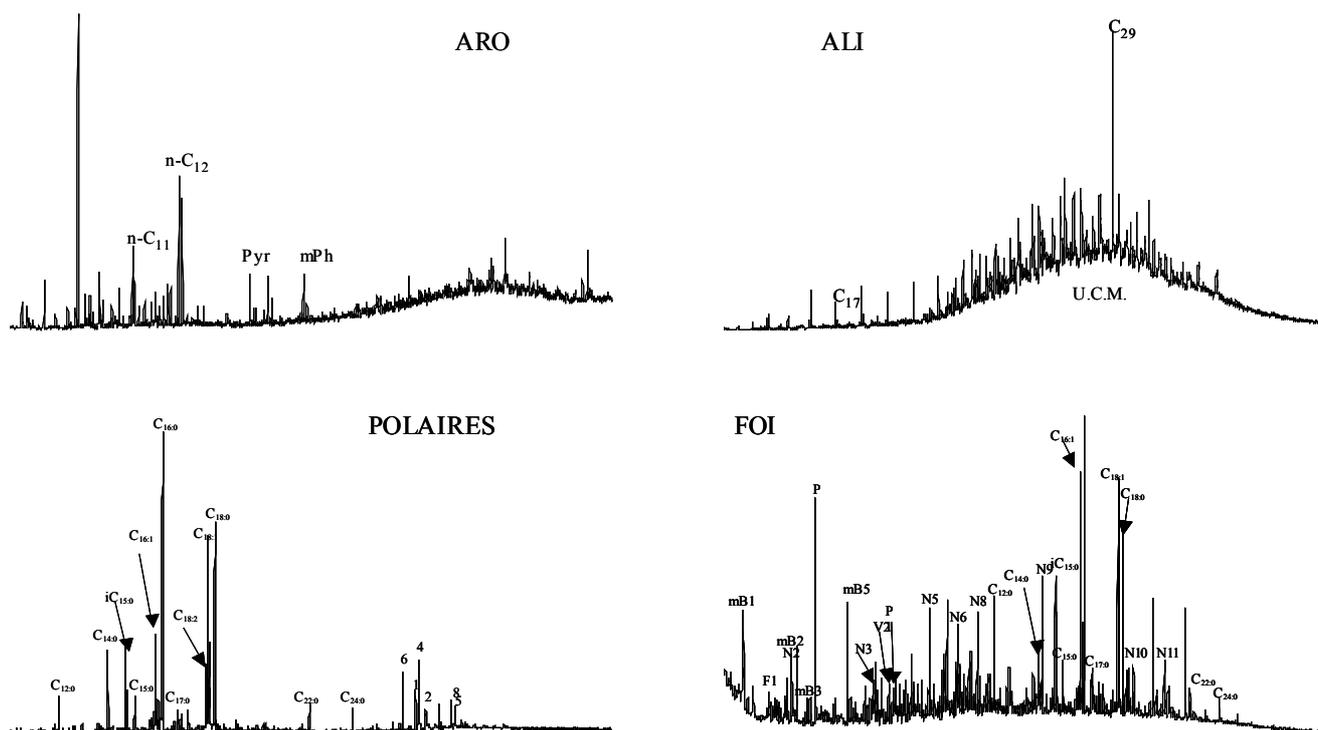
Analyse moléculaire

Figure III.3.3. Chromatogrammes des fractions aromatiques, aliphatiques, polaires et pyrogramme du résidu solide de l'échantillon U1.

La station d'épuration des eaux usées de U1 se compose d'une unité de pré-traitement (éliminant les déchets les plus volumineux) et d'une unité de traitement biologique comprenant un bassin d'aération et un clarificateur séparant les eaux épurées des boues. Ces dernières vont ensuite subir une déshydratation par filtre presse avant d'être placées en aire de stockage. La boue U1 est caractérisée par des teneurs en HPAs supérieures aux valeurs limites recommandées dans les normes de l'arrêté du 8 janvier 1998, elle n'est donc pas recyclée par épandage agricole. Cette boue a donc été retenue dans le but d'analyser le devenir des HPAs au cours des expériences de biodégradation, et également en raison de sa composition organique différente de celle de la majorité des boues domestiques.

L'analyse de la composition organique de cette boue montre qu'elle est riche en composés aliphatiques (33%) et polaires (52%). La fraction aliphatique est essentiellement constituée de composés irrésolus formant un U.C.M. (unresolved complex mixture). Cette distribution montre des similitudes avec celles de produits pétroliers lourds tels que des huiles moteurs ou des asphaltes (*cf. partie III, chapitre 1- fraction soluble*). La fraction polaire est

caractérisée par la présence d'acides gras et de stérols présentant des distributions typiques de la majorité des boues domestiques étudiées. Les acides gras pairs sont majoritaires avec la prédominance des C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, C<sub>18:1</sub> et C<sub>16:1</sub>. On note également la présence d'acides gras impairs tels que le C<sub>15:0</sub> et le C<sub>17:0</sub>. Les stérols présents sont le cholest-5 $\alpha$ -en-3 $\beta$ -ol (cholestanol), le coprostanol, l'épicoprostanol, le 3-methoxy-cholest-5-ene-, le cholestérol et l'ergost-5-en-3 $\beta$ -ol. Le contenu macromoléculaire est caractérisé par un enrichissement en composés azotés par rapport à la composition moyenne définie pour les boues domestiques (composés azotés : 35,34%, dérivés de la lignine : 32,26% et dérivés des lipides : 32,41%).

### XV.3. Boue de laiterie FP1

#### Caractéristiques générales :

- station traitant des effluents laitiers (92%) et d'industrie chimique (8%),
- boue activée et semi-déshydratée,
- boue épandue en agriculture.

#### Quantifications des HPAs et EDPH

<i>Composés</i>	<i>Teneur (mg/kg M.S.)</i>
Anthracène	< 0,15
Benzo(a)pyrène	< 0,05
Benzo(b)fluoranthène	< 0,05
Benzo(a)anthracène	< 0,05
Benzo(ghi)pérylène	< 0,25
Benzo(k)fluoranthène	< 0,05
Chrysène	< 0,15
Dibenzo(a, h)anthracène	< 0,25
Fluoranthène	< 0,05
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	< 0,25
Phénanthrène	< 0,15
Pyrène	< 0,15
E.D.P.H.	< 10

Tableau III.3.6. Quantification des HPAs présents dans l'échantillon FP1.

#### Analyse élémentaire et organique

<i>Analyse élémentaire</i>	C %	31.79
	H %	5.42
	N %	6.77
	S %	0.78
<i>Composition organique</i>	Taux extrait (mg/g éch)	60
	ALI (mg/g éch)	2,5
	ARO (mg/g éch)	3,6
	POL (mg/g éch)	53,9
	C.O.T (%)	15.29
	Taux extrait (mg/g C.O.T)	392,4
	ALI (mg/g C.O.T)	16
	ARO (mg/g C.O.T)	23,8
	POL (mg/g C.O.T)	352,6
Résidu solide (mg/g C.O.T)	607,6	

Tableau III.3.7. Résultats de l'analyse élémentaire et composition de l'extrait de l'échantillon FP1.

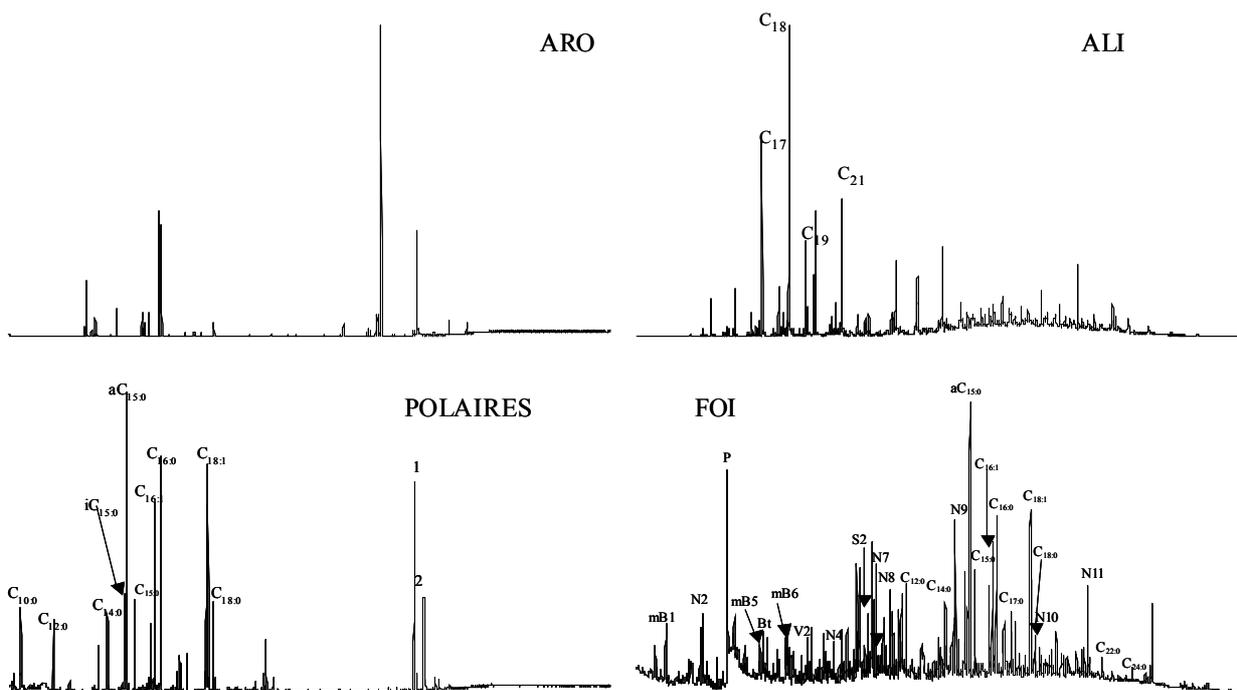
Analyse moléculaire

Figure III.3.4. Chromatogrammes des fractions aromatiques, aliphatiques, polaires et pyrogramme du résidu solide de l'échantillon FP1.

Dans cette station, les eaux usées sont traitées dans un bassin biologique. Les boues générées sont ensuite dirigées vers une filière de séchage par filtre presse puis stockées en attendant d'être épandues. Cette station traite non seulement des effluents de laiterie, mais

aussi des effluents d'une usine chimique produisant des composés chlorés, dont la présence a été détectée dans la structure macromoléculaire des boues produites par Py-GC/AED. Cette boue a donc été retenue, non seulement pour suivre l'évolution du contenu organique d'une boue de laiterie, mais également pour s'intéresser au devenir de ces composés organo-chlorés.

La boue FP1 est caractérisée par des teneurs en HPA's toujours inférieures aux limites de détection, par une forte teneur en azote (6,77%), et par un extrait organique presque exclusivement constitué de composés polaires (89 %). Le chromatogramme de la fraction aliphatique montre une distribution essentiellement dominée par la présence de *n*-alcane's de bas poids moléculaire (du C<sub>15</sub>-C<sub>25</sub>) avec une prédominance du *n*-C<sub>18</sub>. Le chromatogramme de la fraction aromatique comporte un nombre limité de composés qui en majorité ne sont pas identifiés. La boue FP1, comme les autres boues agro-alimentaires et industrielles, est dépourvue de LABs (*cf. partie III, chapitre 1- fraction soluble*). La fraction polaire est caractérisée essentiellement par la présence d'acides gras avec des distributions dominées par le C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:1</sub>, C<sub>16:1</sub> et C<sub>18:0</sub>. On notera également la présence du 3-methoxy-cholest-5-ene, et du cholestérol. Le contenu macromoléculaire de FP1 est caractérisé par une composition moyenne similaire à celle des boues domestiques (composés azotés : 26,60%, dérivés de la lignine : 23,54% et dérivés des lipides : 49,85%) (*cf. partie III, chapitre 2 - résidu solide*).

#### **XV.4. Boue de papeterie PM1**

##### Caractéristiques générales :

- station traitant les effluents de papeterie,
- boue non épanchée en agriculture mais dirigée vers une usine de compostage.

Quantifications des HPAs et EDPH

<b>Composés</b>	<b>Teneur (mg/ kg M.S.)</b>
Anthracène	< 0,15
Benzo(a)pyrène	< 0,05
Benzo(b)fluranthène	< 0,05
Benzo(a)anthracène	< 0,05
Benzo(ghi)pérylène	< 0,25
Benzo(k)fluoranthène	< 0,05
Chrysène	< 0,15
Dibenzo(a, h)anthracène	< 0,25
Fluoranthène	< 0,05
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	< 0,25
Phénanthrène	< 0,15
Pyrène	< 0,15
E.D.P.H.	< 10

Tableau III.3.8. Quantification des HPAs présents dans l'échantillon PM1.

Analyse élémentaire et organique

<b>Analyse élémentaire</b>	C %	23.98
	H %	2.90
	N %	0.52
	S %	0.30
<b>Composition organique</b>	Taux extrait (mg/g éch)	26,7
	ALI (mg/g éch)	10,5
	ARO (mg/g éch)	2,7
	POL (mg/g éch)	13,5
	C.O.T (%)	14
	Taux extrait (mg/g C.O.T)	190,4
	ALI (mg/g C.O.T)	74,8
	ARO (mg/g C.O.T)	19,5
	POL (mg/g C.O.T)	96,1
	Résidu solide (mg/ g C.O.T)	809,6

Tableau III.3.9. Résultats de l'analyse élémentaire et composition de l'extrait de l'échantillon PM1.

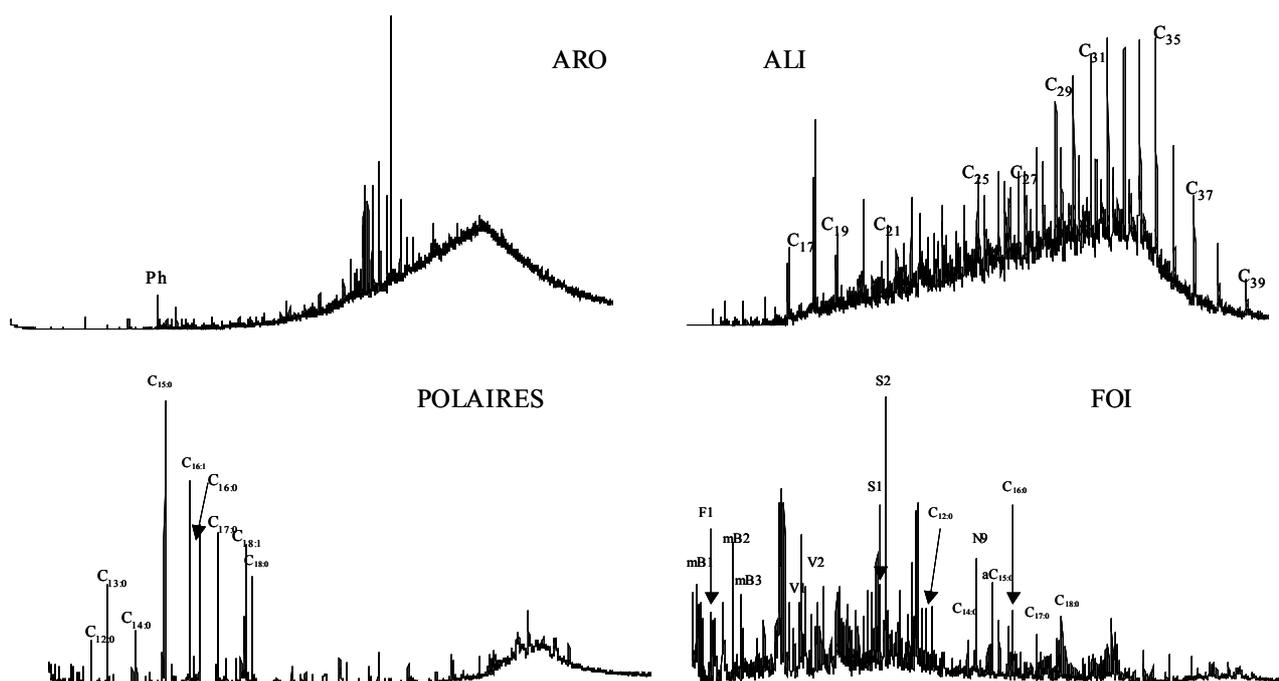
Analyse moléculaire

Figure III.3.5. Chromatogrammes des fractions aromatiques, aliphatiques, polaires et pyrogramme du résidu solide de l'échantillon PM1.

La boue PM1 est issue d'un traitement biologique et d'un séchage par filtre presse, elle a été choisie afin de suivre les modifications éventuelles du contenu organique des boues de papeterie.

Elle est caractérisée par des teneurs en HPAs inférieures aux limites de détection, et par une faible teneur en azote (0,52%). Le chromatogramme de la fraction aliphatique est dominé par des *n*-alcanes de haut poids moléculaire sans dominance marquée des pairs sur les impairs. Une telle distribution est typique de produits pétroliers paraffiniques utilisés dans le process de fabrication du papier (*cf. partie III, chapitre 1- fraction soluble*). La boue de papeterie est également dépourvue de LABs. La fraction polaire est caractérisée par une distribution d'acides gras dominée par le C<sub>15:0</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>17:0</sub>, C<sub>18:1</sub> et C<sub>18:0</sub>. Le contenu macromoléculaire de PM1 est dominé par des composés dérivés de la lignine et des composés lipidiques (composés azotés : 8,63%, dérivés de la lignine : 49,48% et dérivés des lipides : 41,89%) (*cf. partie III, chapitre 2- résidu solide*). Cette boue fait partie du groupe des boues de papeterie, lesquelles se différencient des boues domestiques et agro-alimentaires sur la base de leur composition macromoléculaire.

## **XVI. RESULTATS**

### **XVI.1. Nomenclature utilisée**

Pour simplifier les notations, la nomenclature suivante sera utilisée dans ce chapitre:

FP1 : boue de laiterie brute non biodégradée.

FP1-BI (18 ou 49) : boue brute de laiterie biodégradée à 24°C lors de la première phase à 18 ou 49 jours.

FP1-BII (30, 62, 104 ou 140) : boue brute de laiterie biodégradée à 24°C lors de la deuxième phase à 30, 62, 104 et 140 jours.

PM1 : boue de papeterie brute non biodégradée.

PM1-BI (18 ou 49) : boue brute de papeterie biodégradée à 24°C lors de la première phase à 18 ou 49 jours.

PM1-BII (30, 62, 104 ou 140) : boue brute de papeterie biodégradée à 24°C lors de la deuxième phase à 30, 62, 104 et 140 jours.

U1 : boue domestique brute non biodégradée.

U1-BI (18 ou 49) : boue brute domestique biodégradée à 24°C lors de la première phase à 18 ou 49 jours.

U1-BII (30, 62, 104 ou 140) : boue brute domestique biodégradée à 24°C lors de la deuxième phase à 30, 62, 104 et 140 jours.

U10 : boue domestique brute non biodégradée.

U10-BI (18 ou 49) : boue brute domestique biodégradée à 24°C lors de la première phase à 18 ou 49 jours.

U10-BII (30, 62, 104 ou 140) : boue brute domestique biodégradée à 24°C lors de la deuxième phase à 30, 62, 104 et 140 jours.

### **XVI.2. Minéralisation du CO<sub>2</sub>**

Les figures III.3.5, III.3.6 et les tableaux III.3.10 et III.3.11 montrent l'évolution de la production de CO<sub>2</sub> (en ppm/mg d'échantillon) cumulée et moyennée (puisque 3 répliques du même échantillon ont été incubées dans les mêmes conditions) en fonction du temps d'incubation au cours de deux phases d'expérimentation. La production de CO<sub>2</sub> permet de suivre l'avancement des réactions de biodégradation des boues en fonction du temps.

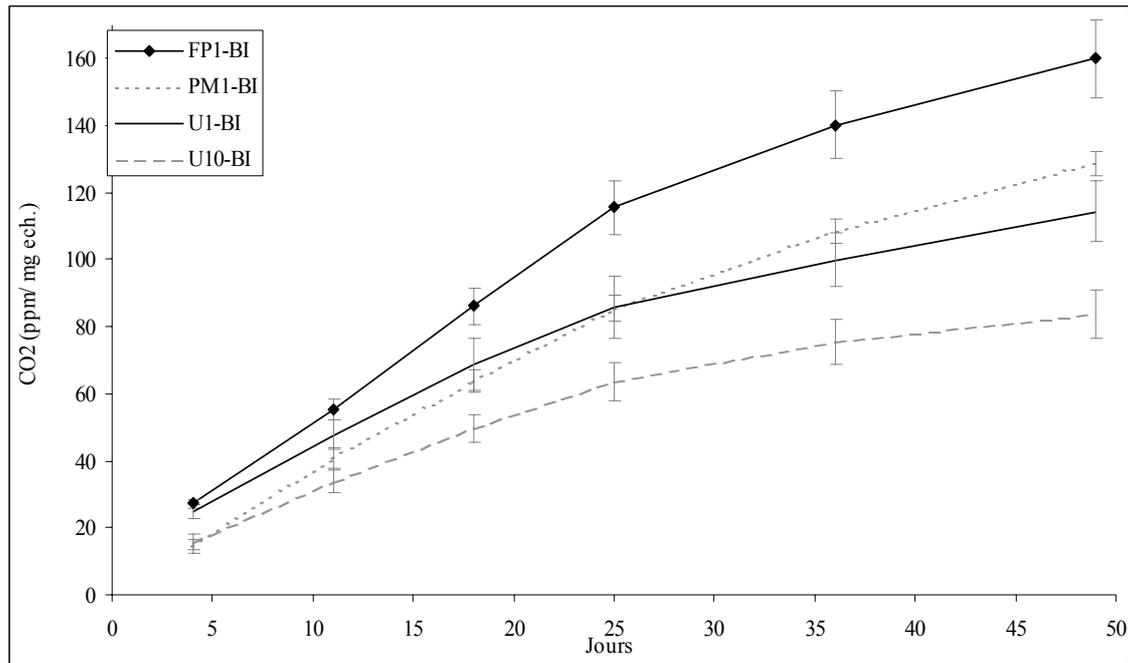


Figure III.3.6. Evolution cumulée du CO<sub>2</sub> lors de la première phase de biodégradation.

Nombre de jours	4	11	18	25	36	49
FP1-BI	27,1	55,2	86,2	115,6	140,3	160,1
PM1-BI	14,4	40,6	63,7	85,4	108,7	128,8
U1-BI	24,9	47,8	68,6	85,8	99,9	114,5
U10-BI	15,7	33,8	49,5	63,4	75,5	83,7

Tableau III.3.10. Evolution cumulée et moyennée (en ppm / mg éch) de la production de CO<sub>2</sub> lors de la première phase de biodégradation.

Au cours de la première phase, les taux de production de CO<sub>2</sub> varient de 0 à 160 mg/g d'échantillon (valeur la plus haute observée pour FP1). Une forte augmentation du taux de CO<sub>2</sub> produit est observée pendant les 25 premiers jours, puis la quantité générée par les boues U1 et U10 se stabilise. Par contre, la production de CO<sub>2</sub> continue à augmenter dans les expériences de biodégradation des boues FP1 et PM1, laissant supposer que l'activité de biodégradation est encore très importante. Pour cette raison, une deuxième phase d'expérimentation a été réalisée en augmentant la durée d'incubation et en stimulant l'activité bactérienne grâce à l'ajout d'une solution nutritive et par l'agitation des flacons en chambre d'incubation.

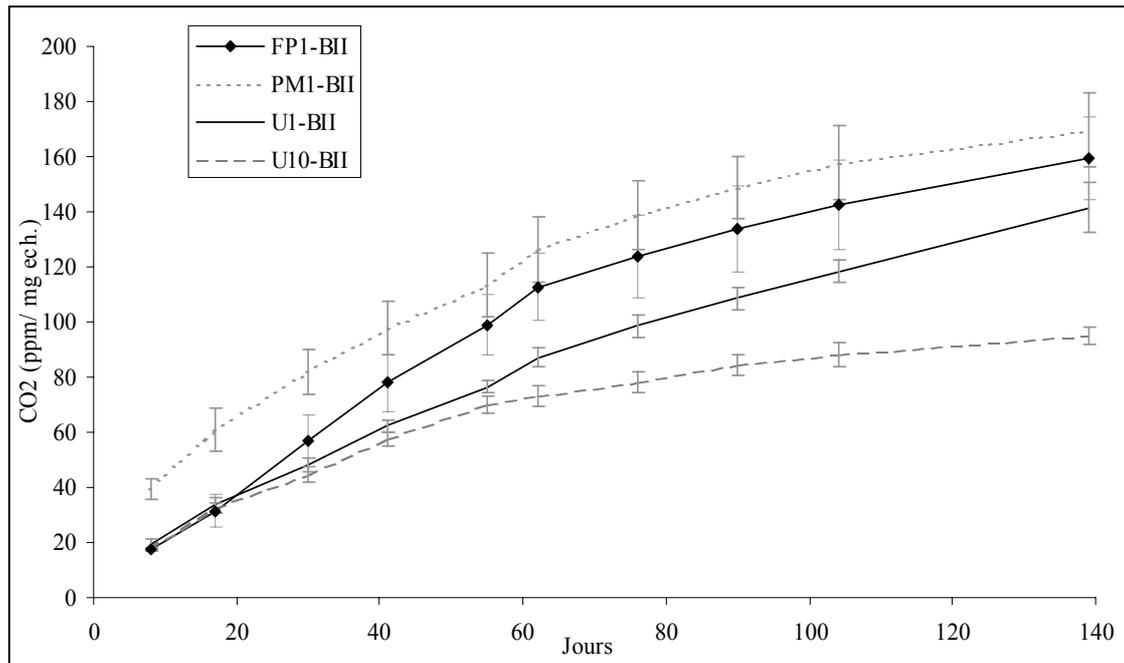


Figure III.3.7. Evolution cumulée du CO<sub>2</sub> lors de la deuxième phase de biodégradation.

Nombre de jours	8	17	30	41	55	62	76	90	104	139
FP1-BII	17,6	31,6	56,7	77,8	99	112,6	123,8	133,7	142,5	159,3
PM1-BII	39,4	60,9	81,8	97,6	113,4	126,5	138,8	149	157,6	169,6
U1-BII	19,5	33,5	48,3	62,3	76,3	86,9	98,5	108,6	118,2	141,4
U10-BII	17,3	32,5	44,6	57,3	69,9	73	78	84,3	88,3	94,9

Tableau III.3.11. Evolution cumulée et moyennée (en ppm / mg éch) de la production de CO<sub>2</sub> lors de la deuxième phase de biodégradation.

Lors de la deuxième phase d'expérimentation la production de CO<sub>2</sub> reste proche de celle observée au cours de la première phase avec des quantités de CO<sub>2</sub> libéré comprises entre 0 et 169 mg / g d'échantillon. Cependant, seule la boue U10 semble se stabiliser après 80-100 jours d'expérimentation, alors que la production de CO<sub>2</sub> ne cesse de croître dans les trois autres cas.

Cette production de CO<sub>2</sub> s'accompagne également d'une diminution de la teneur en carbone organique dans les quatre boues (tableau III.3.12). La diminution la plus importante (46%) est enregistrée dans l'échantillon PM1, lequel produit le plus de CO<sub>2</sub> au cours des expériences de biodégradation. Les diminutions des teneurs en carbone organique total dans les autres échantillons sont beaucoup moins marquées, la boue U10 accusant une diminution de moins de 10%. On notera que les forts taux de production de CO<sub>2</sub> ne sont pas exactement proportionnels à la diminution des teneurs en carbone organique total. En effet, si le taux de

production de CO<sub>2</sub> de l'échantillon FP1 est proche de celui de PM1, la diminution du COT dans FP1 est moins importante que dans PM1. Cependant, tout le carbone présent dans les échantillons n'est pas sous forme organique (tableau III.3.13). 35% (U10) à 52% (FP1) sont sous forme inorganique, probablement sous forme de carbonates. Ainsi, la production de CO<sub>2</sub> mesurée peut être imputée pour une part à une attaque des carbonates provoquée par les acides organiques générés par les échantillons. Cette hypothèse pourrait expliquer la non-proportionnalité précédemment observée, puisque FP1 est plus riche en carbone inorganique que PM1.

<i>Echantillon</i>	<i>C.O.T.</i>
<b>FP1 brut</b>	<b>15,29</b>
FP1-BII-140	11,19
<b>PM1 brut</b>	<b>14</b>
PM1-BII-140	7,66
<b>U1 brut</b>	<b>18,68</b>
U1-BII-140	15,48
<b>U10 brut</b>	<b>14,86</b>
U10-BII-140	13,58

Tableau III.3.12. Mesure du COT des échantillons bruts et biodégradés après 140j (phase II).

	C <sub>total</sub> (%)	COT (%)	C <sub>inorg</sub> (%)
FP1	32,10	15,29	16,81
PM1	22,62	14,00	8,62
U1	30,80	18,68	12,12
U10	23,18	14,86	8,32

Tableau III.3.13. Mesure du carbone total, du COT et du carbone inorganique des échantillons bruts.

Nous allons maintenant nous intéresser à l'analyse du contenu organique des fractions solubles (fraction organique soluble notée FOS) et des fractions insolubles (fraction organique insoluble notée FOI) des échantillons au cours des expériences de biodégradation, en analysant essentiellement les échantillons bruts et les échantillons biodégradés après 140 jours d'incubation (phase 2).

## XVI.3. Caractérisation des échantillons biodégradés

### XVI.3.1. Analyse globale

Le tableau III.3.14 donne les résultats des évolutions de la quantité d'extrait organique pour les quatre échantillons entre t<sub>0</sub> et t<sub>140</sub>. Les résultats sont exprimés en mg/g d'échantillon

initial et en mg/g COT à  $t_0$  afin de pouvoir déterminer la quantité de FOS et de FOI dégradée ou générée au cours des expérimentations à partir de la matière organique présente initialement dans la boue. Les résultats montrent une diminution du taux d'extrait rapporté à la quantité de boue pour FP1 et U1 (perte de 2 % et 11 % respectivement) et une augmentation de ce taux dans le cas des boues PM1 et U10 (de 25 et 36 % respectivement). Les mêmes tendances sont observées lorsque le taux d'extrait (teneur en FOS) est ramené à la teneur en carbone organique total à  $t_0$ . De plus, une diminution de la teneur en carbone organique présent dans les FOI des quatre échantillons est observée. Celle-ci est très significative dans le cas de la boue de papeterie (-46%) et moins marquée dans les autres cas (-9% pour U10).

	<i>FOS</i>	<i>COT</i>	<i>Perte COT</i>	<i>FOS</i>	<i>FOI</i>
	<i>mg/g échantillon</i>		<i>%</i>	<i>mg/g COT<sub>0</sub></i>	
<b>FP1</b>	<b>60</b>	<b>15,29</b>		<b>392,4</b>	<b>607,6</b>
FP1-BII-140	58,7	11,19	- 27	384,1	347,8
<b>PM1</b>	<b>26,7</b>	<b>14,00</b>		<b>190,4</b>	<b>809,6</b>
PM1-BII-140	48,8	7,66	- 46	348,8	198,4
<b>U1</b>	<b>62,2</b>	<b>18,68</b>		<b>332,8</b>	<b>667,2</b>
U1-BII-140	55,1	15,48	- 17	295,2	533,5
<b>U10</b>	<b>47,1</b>	<b>14,86</b>		<b>317</b>	<b>683</b>
U10-BII-140	73,6	13,58	- 9	495,2	418,6

Tableau III.3.14. Evolution de la quantité de fraction organique soluble (FOS) et insoluble (FOI) au cours des expérimentations.

Le tableau III.3.15 et la figure III.3.7 présentent l'évolution de la composition de la FOS au cours des expériences de biodégradation. Au cours de la biodégradation, les teneurs en composés aromatiques et polaires de U1 diminuent, alors que la quantité de composés aliphatiques reste relativement stable. Les boues PM1 et U10 présentent des comportements assez proches, avec une forte augmentation de composés polaires et une teneur en composés hydrocarbonés (aliphatiques et aromatiques) relativement constante. La boue FP1 par contre se caractérise par un comportement assez différencié avec un appauvrissement en composés polaires au profit des composés aliphatiques et aromatiques.

	<i>FOS</i>	<i>ALI</i>	<i>ARO</i>	<i>POL</i>	<i>Teneur en FOS</i>	<i>ALI</i>	<i>ARO</i>	<i>POL</i>
	<i>mg/g échantillon</i>				<i>mg/g COT<sub>0</sub></i>			
<b>FP1</b>	<b>60</b>	<b>2,5</b>	<b>3,6</b>	<b>53,9</b>	<b>392,4</b>	<b>16,1</b>	<b>23,8</b>	<b>352,6</b>
FP1-BII-140	58,7	13,2	15,8	29,8	384,1	86	103,2	194,9
<b>PM1</b>	<b>26,7</b>	<b>10,5</b>	<b>2,7</b>	<b>13,5</b>	<b>190,4</b>	<b>74,8</b>	<b>19,5</b>	<b>96</b>
PM1-BII-140	48,8	3,6	4,2	44,2	348,8	66,6	24,3	257,9
<b>U1</b>	<b>62,2</b>	<b>20,7</b>	<b>8,9</b>	<b>32,6</b>	<b>332,8</b>	<b>110,8</b>	<b>47,5</b>	<b>174,5</b>
U1-BII-140	55,1	19,2	5,8	30,1	295,2	103	30,9	161,3
<b>U10</b>	<b>47,1</b>	<b>7</b>	<b>9,5</b>	<b>30,6</b>	<b>317</b>	<b>47,2</b>	<b>63,8</b>	<b>206,1</b>
U10-BII-140	73,6	8,5	10,5	54,6	495,2	57,5	70,6	367,1

Tableau III.3.15. Composition des fractions organiques solubles des échantillons bruts et après 140 jours de biodégradation

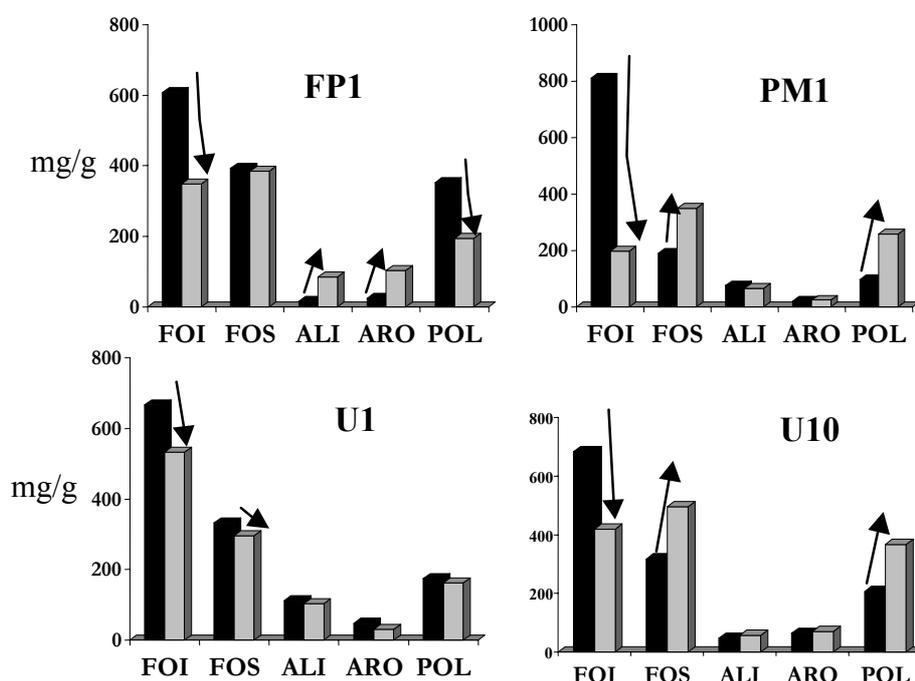


Figure III.3. 8. Evolution de la composition organique des quatre boues au cours de la biodégradation

Le résultat important de ces quantifications est que, en plus de la minéralisation de la matière organique mesurée par la production de  $\text{CO}_2$ , la biodégradation entraîne des modifications profondes du contenu organique des boues. Ces modifications se traduisent essentiellement par une dégradation des composés présents dans la FOI, conduisant à la production de molécules extractibles.

Nous allons maintenant nous intéresser à l'analyse moléculaire des échantillons bruts et biodégradés, afin de déterminer d'une part des indices de biodégradation et d'autre part quels sont les composés préférentiellement dégradés.

### XVI.3.2. Fraction aliphatique

Les figures III.3.8, III.3.9, III.3.10 et III.3.11 présentent les chromatogrammes des fractions aliphatiques des quatre échantillons étudiés. L'identification des principaux composés présents dans les différents chromatogrammes est répertoriée dans le tableau III.3.1.

Le C.P.I. (Carbon Preference Index) des échantillons bruts et biodégradés de U10 et PM1 a été déterminé (tableau III.3.16). Ce rapport quantifie la proportion des *n*-alcanes à nombre de carbones impair sur les *n*-alcanes à nombre de carbones pair (Bray & Evans, 1961) et a été calculé comme suit :

$$CPI = 0.5 \times \left( \frac{\sum(C_{25}-C_{33})}{\sum(C_{24}-C_{32})} + \frac{\sum(C_{25}-C_{33})}{\sum(C_{24}-C_{34})} \right)$$

<i>Echantillon</i>	<i>C.P.I</i>
<b>PM1</b>	<b>1</b>
PM1-BI-18	1
PM1-BII-30	1,1
PM1-BII-62	1
PM1-BII-104	0,9
PM1-BII-140	1,1
<b>U10a</b>	<b>1,9</b>
U10a-BI-18	1,8
U10a-BI-49	2
U10a-BII-30	2,1
U10a-BII-62	2,1
U10a-BII-104	1,9
U10a-BII-140	2,1

Tableau III.3.16. Résultats du C.P.I pour les boues PM1 et U10

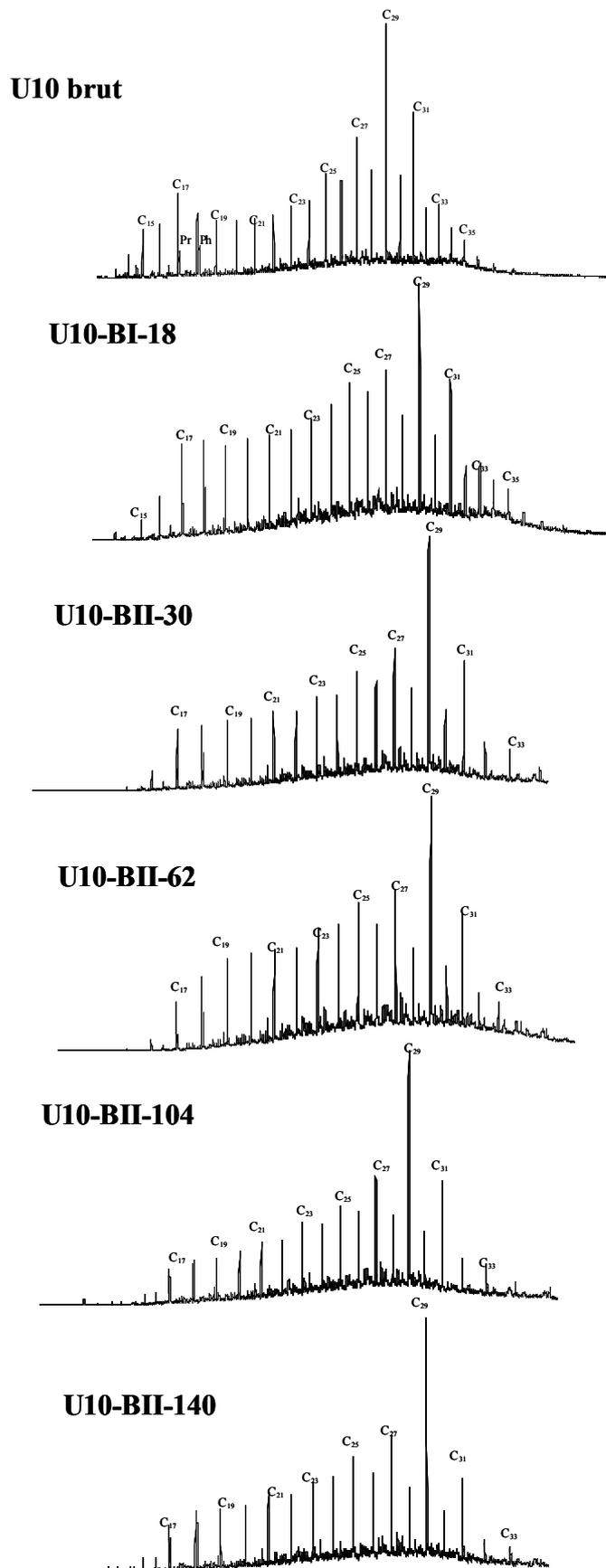


Figure III.3.9. Chromatogrammes des n-alcane ( $m/z = 85$ ) de la boue domestique U10 (de U10 brut à U10-BII-140)

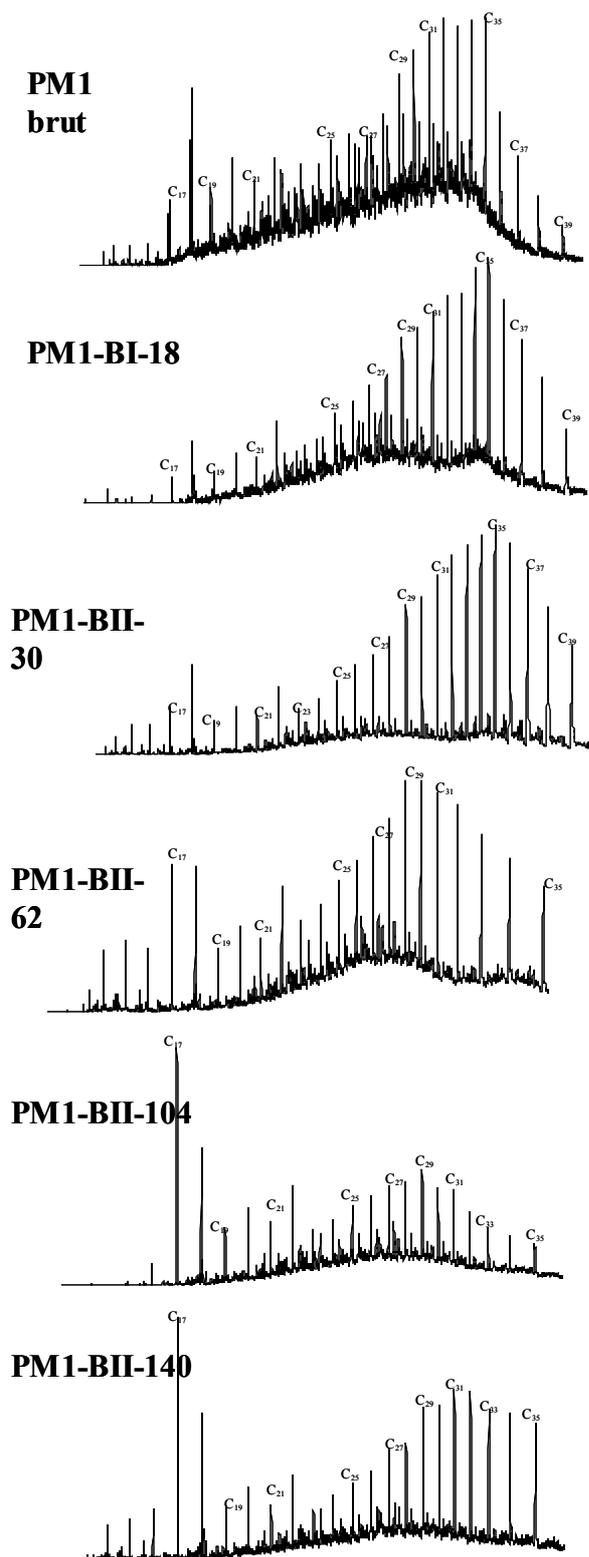


Figure III.3.10 Chromatogrammes des *n*-alcanes ( $m/z = 85$ ) de la boue de papeterie PM1 (de PM1 brut à PM1-BII-140)

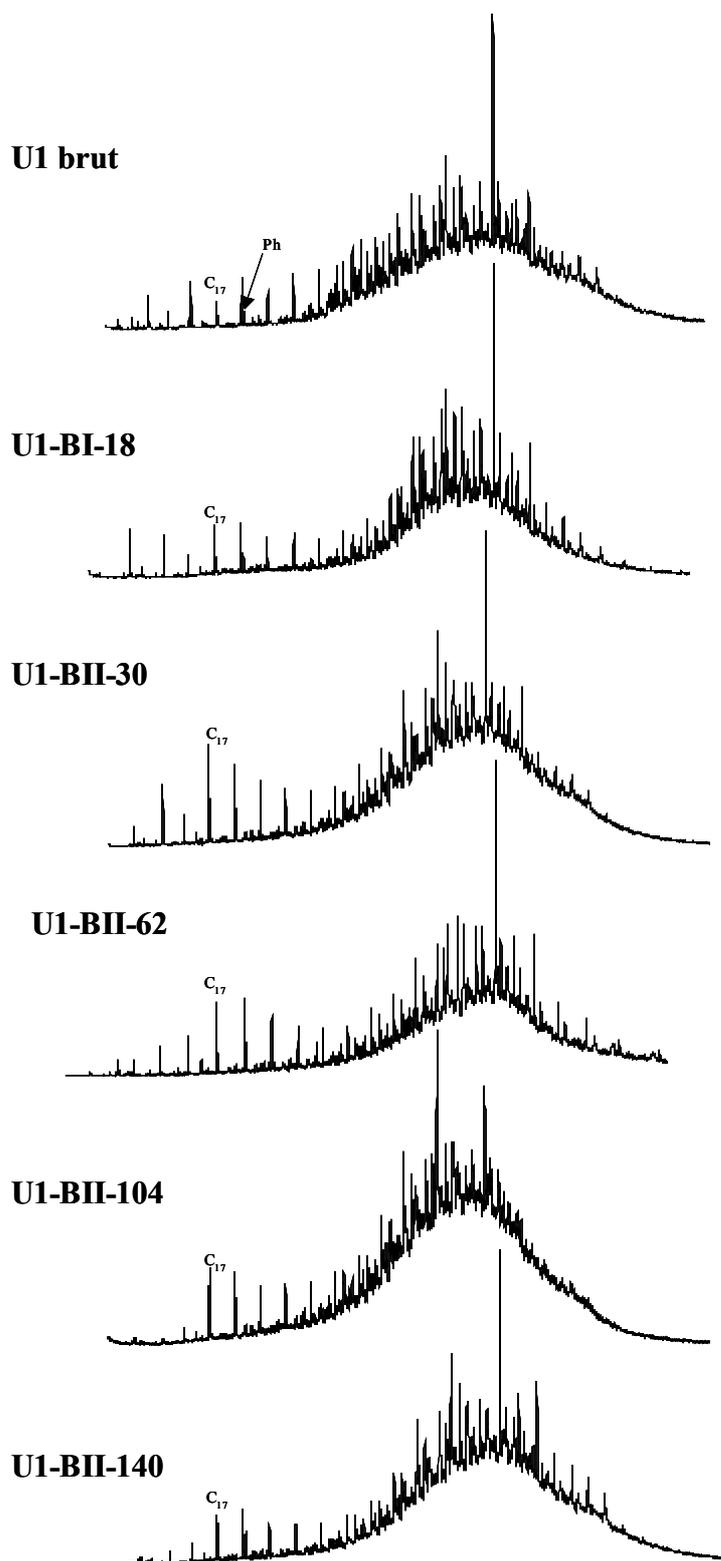


Figure III.3.11 Chromatogrammes des n-alcane ( $m/z = 85$ ) de la boue U1 (de U1 brut à U1-BII-140)

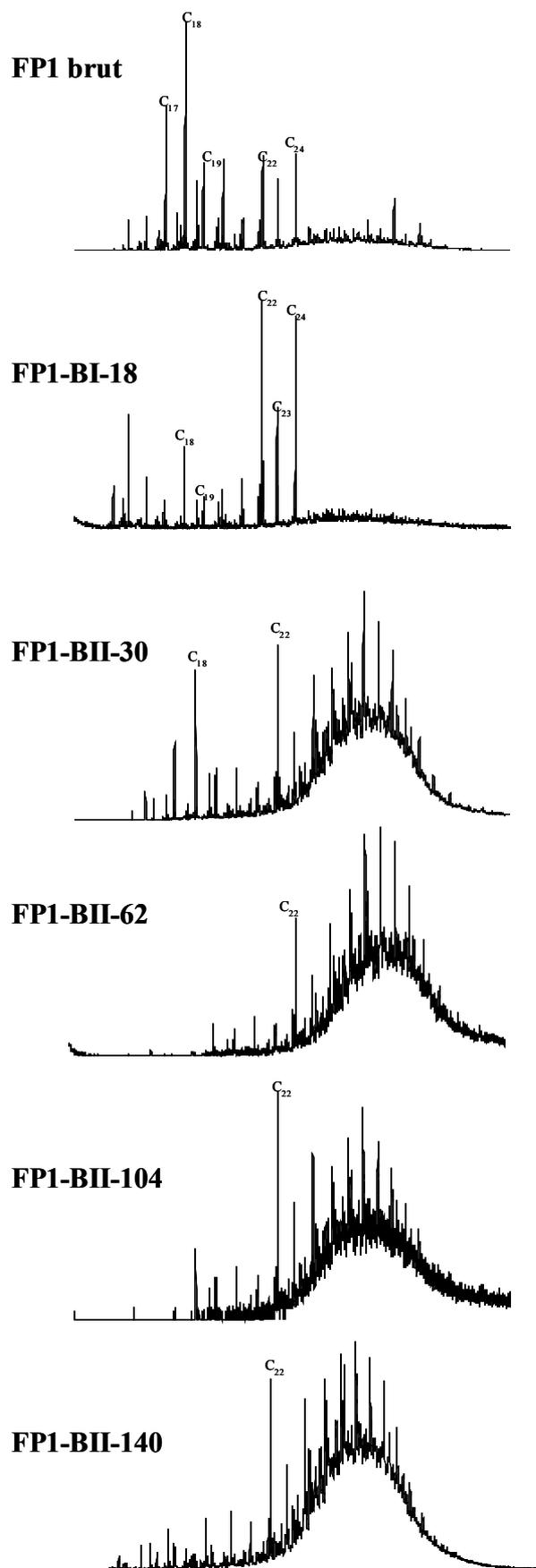


Figure III.3.12 Chromatogrammes des n-alcane ( $m/z = 85$ ) de la boue de laiterie FP1 (de FP1 brut à FP1-BII-140)

Des modifications de la distribution des composés aliphatiques peuvent être mises en évidence au cours de la biodégradation dans les quatre échantillons, avec toutefois certains contrastes.

Le chromatogramme de l'échantillon brut U10 (figure III.3.8) se caractérise par une distribution bimodale. Les *n*-alcanes de bas poids moléculaire ( $C_{15}$ – $C_{25}$ ), dominés par le *n*- $C_{17}$  et la présence du phytane et du pristane, soulignent une contribution pétrolière. Les *n*-alcanes de haut poids moléculaire ( $C_{25}$ – $C_{33}$ ), marqués par un CPI supérieur à 1 (1,9), sont caractéristiques des végétaux supérieurs (Bray & Evans, 1961; Moreda *et al.*, 1998). Au cours des expérimentations, on observe une décroissance relative de l'abondance des *n*-alcanes de bas poids moléculaire (0,2 à  $t_0$  et 0,1 à  $t_{140}$ ), et les rapports Pr/ $C_{17}$  et Ph/ $C_{18}$  augmentent significativement (respectivement 1 à 1,7 et 1 à 1,8 de  $t_0$  à  $t_{140}$ ). En revanche, la distribution des *n*-alcanes de plus haut poids moléculaire n'évolue quasiment pas, toujours caractérisée par un fort CPI (2,1). Enfin, l'abondance du mélange de composés non résolus (UCM), relativement faible à  $t_0$ , semble rester constante au cours des expérimentations.

La figure III.3.9 présente les chromatogrammes de la boue PM1 de  $t_0$  à  $t_{140}$ . La distribution des *n*-alcanes de l'échantillon brut est caractéristique de produits pétroliers paraffiniques. Au cours de la biodégradation, l'abondance relative des *n*-alcanes de bas poids moléculaire augmente ( $C_{17}$ – $C_{19}$ ). Le rapport  $(C_{17}$ – $C_{19})/(C_{27}$ – $C_{31})$  croît de 0,2 à 0,4 après 140 jours d'incubation. Le pristane et le phytane, initialement présents à  $t_0$ , ne sont plus détectés à  $t_{140}$ . L'abondance relative de l'UCM fluctue tout au long des expériences mais tend globalement à diminuer de  $t_0$  à  $t_{140}$ .

Les chromatogrammes des fractions aliphatiques de U1 de  $t_0$  à  $t_{140}$  sont présentés sur la figure III.3.10. La distribution des *n*-alcanes de l'échantillon U1 brut est caractérisée par la présence de *n*-alcanes de bas poids moléculaire, ainsi que par un UCM très marqué, qui peut traduire soit une dégradation partielle des *n*-alcanes, soit la présence de produits pétroliers lourds. Au cours des expérimentations, la proportion des *n*-alcanes de bas poids moléculaire varie faiblement, avec toutefois une diminution globale de  $t_0$  à  $t_{140}$ , le rapport Ph/ $C_{18}$  augmentant de 0,5 à 0,9. De plus, on notera une augmentation relative de l'abondance de l'UCM jusqu'à 104 jours, puis une légère décroissance jusqu'au 140<sup>ième</sup> jour.

La figure III.3.11 regroupe les chromatogrammes de FP1 de  $t_0$  à  $t_{140}$ . Le chromatogramme de l'échantillon brut est caractérisé par la présence des *n*-alcanes de  $C_{15}$  à  $C_{24}$  avec une prédominance des *n*-alcanes  $C_{18}$  et  $C_{17}$ . Avec des temps d'incubation croissants, on observe une diminution des *n*-alcanes de plus bas poids moléculaire ( $< C_{19}$ ) et une augmentation des *n*-alcanes intermédiaires, notamment les  $C_{22}$  et  $C_{24}$ . Ces derniers diminuent

ensuite à leur tour, parallèlement à la formation d'un UCM à partir du 30<sup>ième</sup> jour d'expérimentation, alors qu'aucun UCM n'était détecté initialement. L'abondance relative de cet UCM ne cesse de croître avec l'augmentation des durées d'incubation. De plus au cours de la biodégradation, on observe une augmentation relative des hopanes, alors que leur présence était masquée par l'abondance des *n*-alcane à  $t_0$ . Nous avons vu dans le chapitre I de la deuxième partie que les hopanes sont typiques de produits pétroliers fossiles imputables à des contributions diffuses par des particules d'asphaltes, d'huiles usagées apportés par le lessivage d'infrastructures routières. Ainsi ces résultats soulignent une préservation de ces produits pétroliers au cours de la biodégradation.

L'analyse des pétroles biodégradés naturellement et en laboratoire met en évidence qu'au cours de la biodégradation, on observe une décroissance des *n*-alcane au profit d'un UCM très marqué, ainsi que la préservation des composés isoprénoides (pristane et phytane) et des hopanes, qui sont plus résistants à la biodégradation (Palmer, 1991). Ainsi l'évolution des distributions des composés aliphatiques de FP1 et U1 est tout à fait en accord avec les observations habituellement faites sur la dégradation des pétroles, alors que les boues PM1 et U10 ont des évolutions qui diffèrent considérablement de ces schémas classiques.

La distribution des composés aliphatiques dans la boue FP1 évolue significativement avec la biodégradation dans le sens d'une augmentation de l'abondance des iso-, cyclo-alcane, ainsi que des isoprénoides (pristane et phytane) et de l'UCM. Cette observation peut être corrélée avec les résultats quantitatifs sur l'évolution de la composition de la FOS de FP1 (tableau III.3.15): une augmentation significative de la teneur en composés aliphatiques est effectivement observée entre  $t_0$  et  $t_{140}$  (de 16,1 mg/g à 86 mg/g). La distribution des composés aliphatiques dans la boue U1 évolue très peu, puisque l'augmentation de l'UCM et la diminution des *n*-alcane de plus bas poids moléculaire sont très modérées. De la même manière, les boues U10 et PM1 évoluent relativement peu, quelle que soit la durée d'expérimentation. L'analyse de la composition de la FOS de ces deux boues met en évidence de très légères variations de la teneur en composés aliphatiques entre  $t_0$  et  $t_{140}$ . Ceci pourrait indiquer une faible dégradation des composés aliphatiques, ou être imputé à un processus de synthèse de nouveaux métabolites en parallèle à une dégradation des composés extractibles, et qui viendrait compenser la quantité de composés dégradés (Brassel *et al.*, 1978).

### XVI.3.3. Fraction aromatique

Les chromatogrammes des fractions aromatiques des échantillons des boues domestiques analysés en mode fullscan sont dominés par la présence de LABs, alors que les HPAs sont présents en traces.

#### I.1.1.1 HPAs

Les HPAs ont été quantifiés dans les échantillons bruts des quatre boues. Les résultats (tableau III.3.17) montrent que U1 est caractérisée par des teneurs en HPAs très supérieures aux teneurs maximales fixées par les normes (17,41 mg/ kg de MS), alors que dans les trois autres boues, les teneurs sont inférieures à ces valeurs limites.

	$\Sigma$ HPAs* (mg/ kg MS)
U1 brut	17,41
U10 brut	4,9
FP1 brut	0
PM1 brut	0

Tableau III.3.17. Teneurs en HPAs dans les échantillons bruts

\*  $\Sigma$ HPAs somme de acénaphthène, benzo(a)pyrène, benzo(g,h,i)perylène, benzo(k)fluoranthène, fluorène, fluoranthène, indéno(1,2,3-cd)pyrène, phénanthrène, pyrène. (6 mg/ kg M.S. selon le Draft de la directive Européenne du 27 avril 2000).

Une analyse en mode SIM (Single Ion Monitoring) a été effectuée afin de cibler les HPAs et d'étudier l'évolution de leur distribution au cours des expérimentations (figure III.3.12)

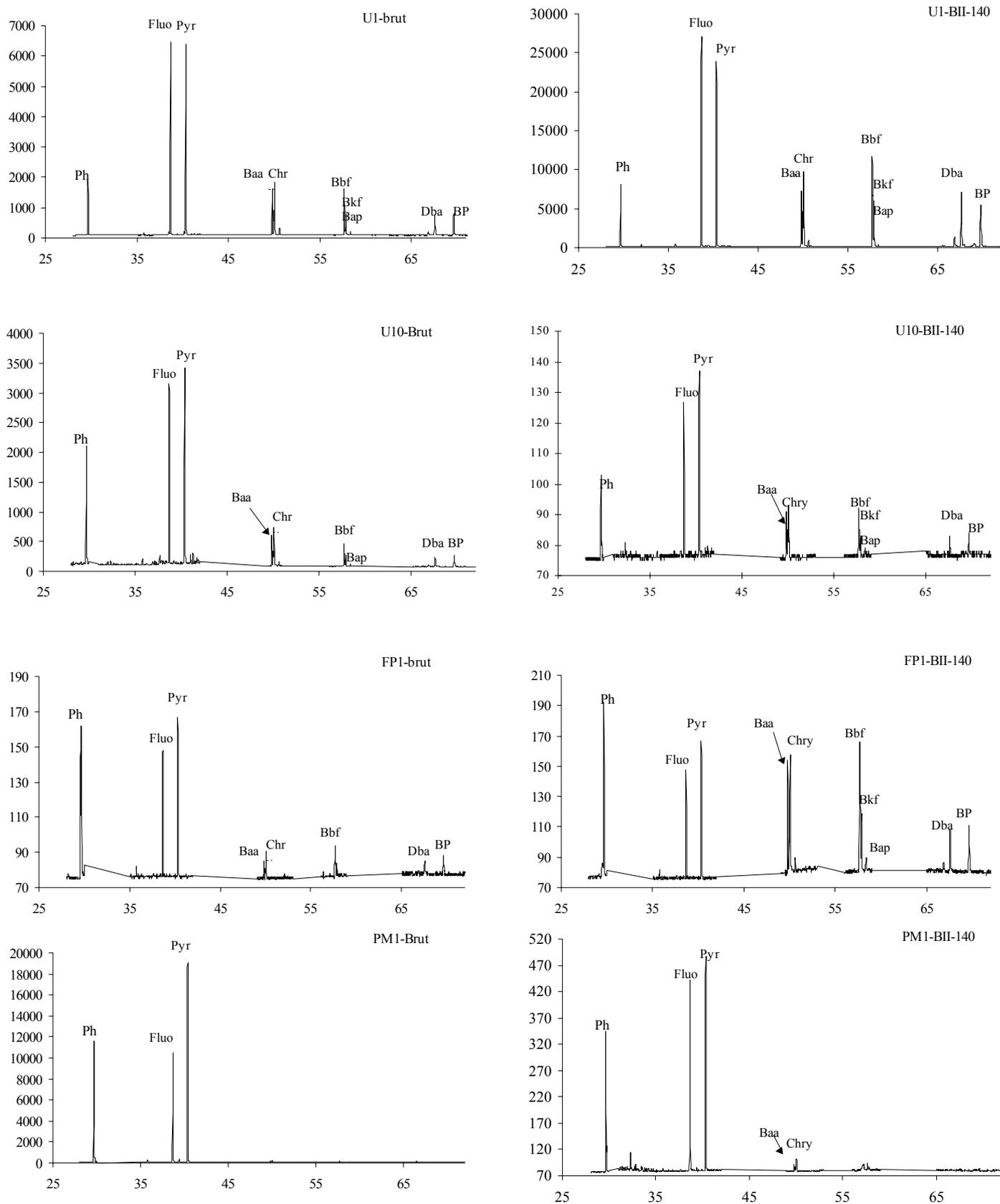


Figure III.3.13. Chromatogrammes de la fraction aromatiques des échantillons U1, U10, FP1 et PM1 bruts et après 140 jours d'expérimentations.

Les chromatogrammes des échantillons bruts de U1, U10, FP1 sont caractérisés par la présence de HPAs de 3 à 6 noyaux. La boue PM1 brute est essentiellement caractérisée par des HPAs de bas poids moléculaire tels que le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène.

Les rapports de l'abondance relative des HPAs à 5-6 noyaux (Bbf, Bkf, Bap, BP et Db) sur celle des HPAs à 3-4 noyaux (Ph, Fluo, Pyr, Baa et Chry) (5-6/3-4) ainsi que celui de l'abondance des HPAs à 4 noyaux sur celle des HPAs à 3 noyaux (4/3) ont été calculé (tableau III.3.18). Avec des durées d'expérimentation croissantes, ces rapports augmentent dans le cas des quatre échantillons. Cette augmentation est légère dans le cas de PM1 (rapport 4/3), et plus marquée pour U10 et FP1. Ceci indique une dégradation préférentielle des HPAs de plus bas poids moléculaire et est en accord avec les études antérieures sur la biodégradation de ces composés. (Sims & Overcash, 1983; Bossert & Bartha, 1986; Mangas *et al.*, 1998).

	5-6/4-3	4/3
U1 brut	<b>0,6</b>	<b>8,7</b>
U1-BII-140	0,8	9,6
<b>U10 brut</b>	<b>0,2</b>	<b>3,6</b>
U10-BII-140	0,4	7,3
<b>FP1 brut</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>
FP1-BII-140	0,4	4,9
<b>PM1-brut</b>	<b>n.d</b>	<b>2,7</b>
PM1-BII-140	n.d	2,8

Tableau III.3.18. Résultats des rapports 5-6/3-4 et 4/3

### I.1.1.2

### LABs

L'analyse de la fraction soluble nous a permis de déterminer que les LABs n'étaient présents que dans les fractions aromatiques des boues domestiques. En effet, les LABs avec des chaînes alkyles à 10-14 atomes de carbone sont considérés comme des marqueurs des boues d'épuration et des déchets domestiques (Takada & Eganhouse, 1998).

La figure III.3.13 présente les distributions des LABs dans les échantillons bruts et biodégradés de U1 et U10. Dans les échantillons bruts, les distributions sont dominées par les homologues  $^{n}C_{12}$ ,  $^{n}C_{13}$  et  $^{n}C_{11}$ . Au cours des expérimentations, la proportion des homologues  $^{n}C_{13}$  augmente par rapport à celle des  $^{n}C_{12}$  dans U1. De plus, l'abondance relative des

isomères  $^{13}\text{C}$  de chaque homologue diminue progressivement dans cet échantillon. Aucune tendance similaire n'est observée dans le cas de l'échantillon U10.

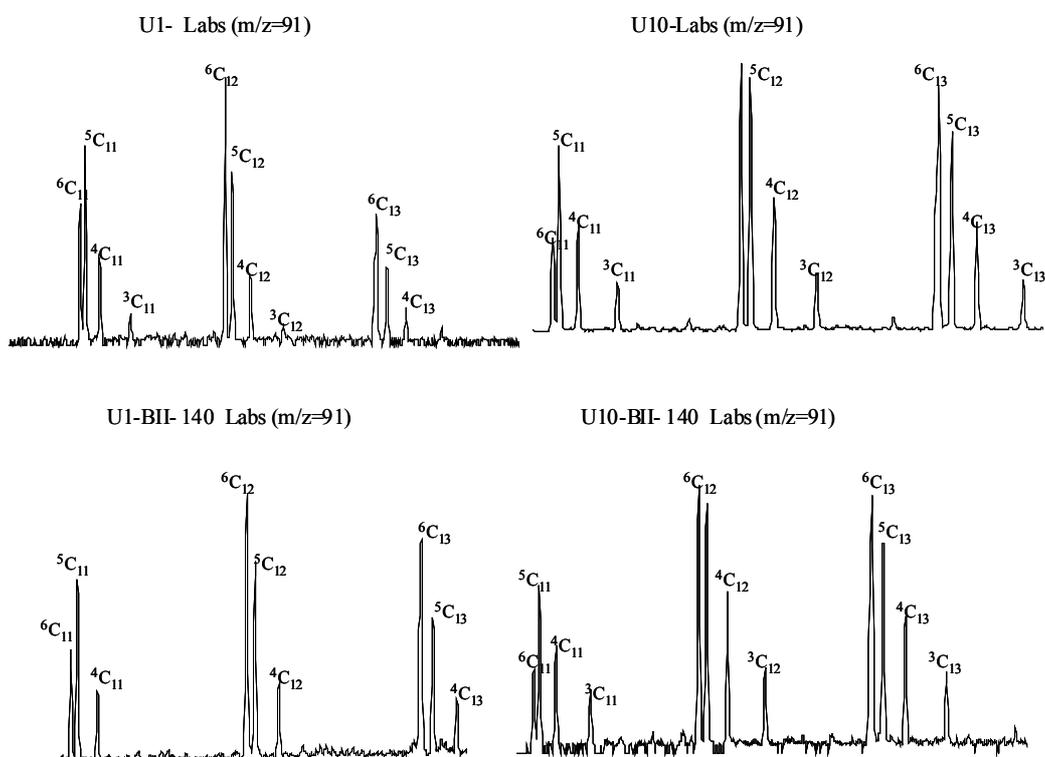


Figure III.3.14. Distributions des LABs dans les échantillons bruts et biodégradés de U1 et U10

Le rapport I/E reflète l'abondance relative des isomères internes (c'est à dire 5, 6 et 7) par rapport aux isomères externes (c'est à dire 2, 3 et 4). Ce rapport a été proposé comme indice de la biodégradation préférentielle des LABs puisque des études de laboratoire ont montré que les isomères externes étaient plus rapidement dégradés que les isomères internes (Eganhouse *et al.*, 1983; Takada & Ishiwatari, 1987). Ce rapport a été calculé avec les isomères de l'homologue  $\text{C}_{12}$  dans les boues domestiques (tableau III.3.19).

	I/E ratio
<b>U1 brut</b>	<b>3,6</b>
U1-BII-140	5,3
<b>U10 brut</b>	<b>2,8</b>
U10-BII-140	2,2

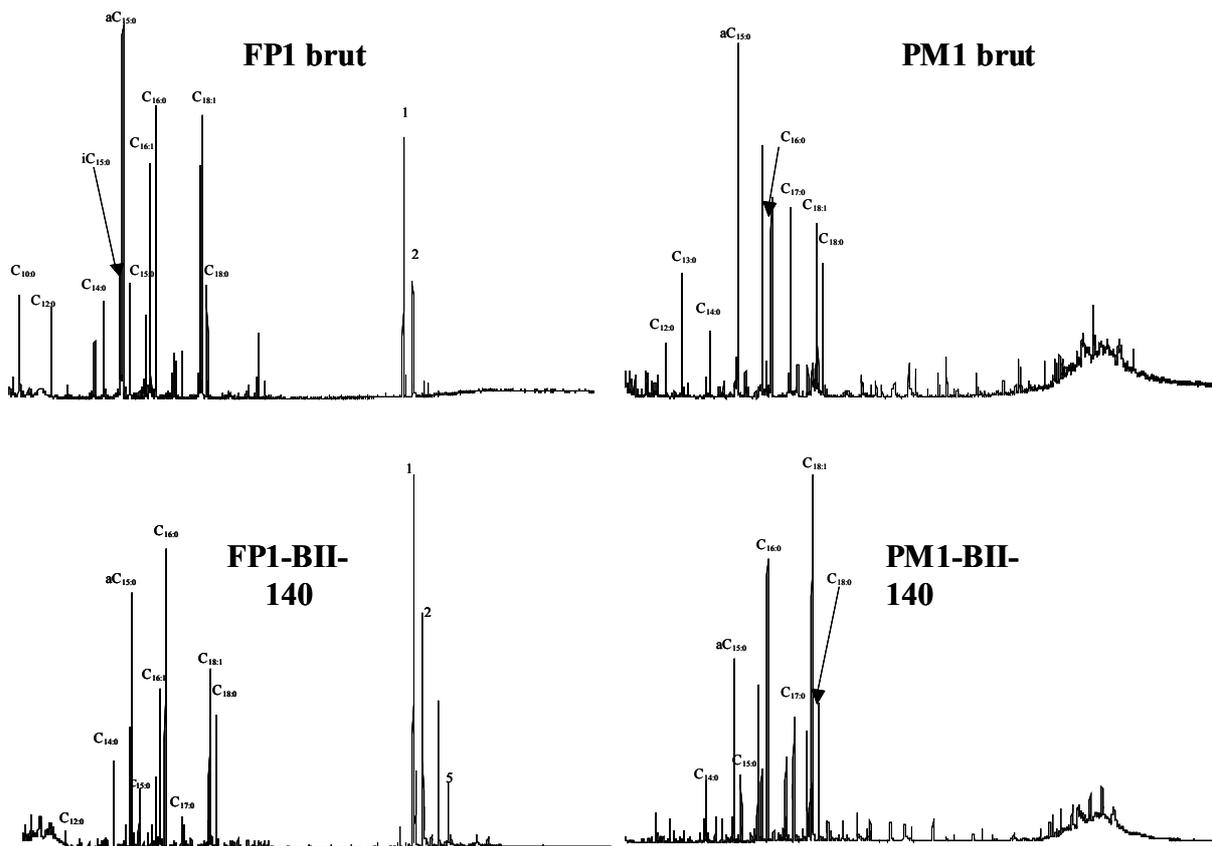
Tableau III.3.19. Calcul du rapport I/E avec les isomères du  $n\text{-C}_{12}$  pour les boues U1 et U10.

Le rapport I/E augmente fortement dans U1 de  $t_0$  à  $t_{140}$ . Des études antérieures sur la dégradation des LABs au cours du temps ont montré des résultats similaires (Ishiwatari *et al.*,

1983; Eganhouse *et al.*, 1988; Takada & Eganhouse, 1998). Dans le cas de la boue U10, le rapport I/E chute légèrement de  $t_0$  à  $t_{140}$ , contrairement aux résultats obtenus par les précédents auteurs. Toutefois ces résultats doivent être nuancés. L'analyse de la composition de la FOS a mis en évidence une augmentation des composés aromatiques de U10 au cours de la biodégradation. On peut alors supposer que la biodégradation de la boue U10 se traduit par, entre autre, une augmentation de la quantité de matière organique extractible et en particulier par la genèse de composés aromatiques dont la distribution est typique d'un matériel peu altéré comme semble l'indiquer le rapport I/E.

### XVI.3.4. Fraction polaire

La figure III.3.14 représente les chromatogrammes des fractions polaires des quatre échantillons bruts et après 140 jours d'incubation.



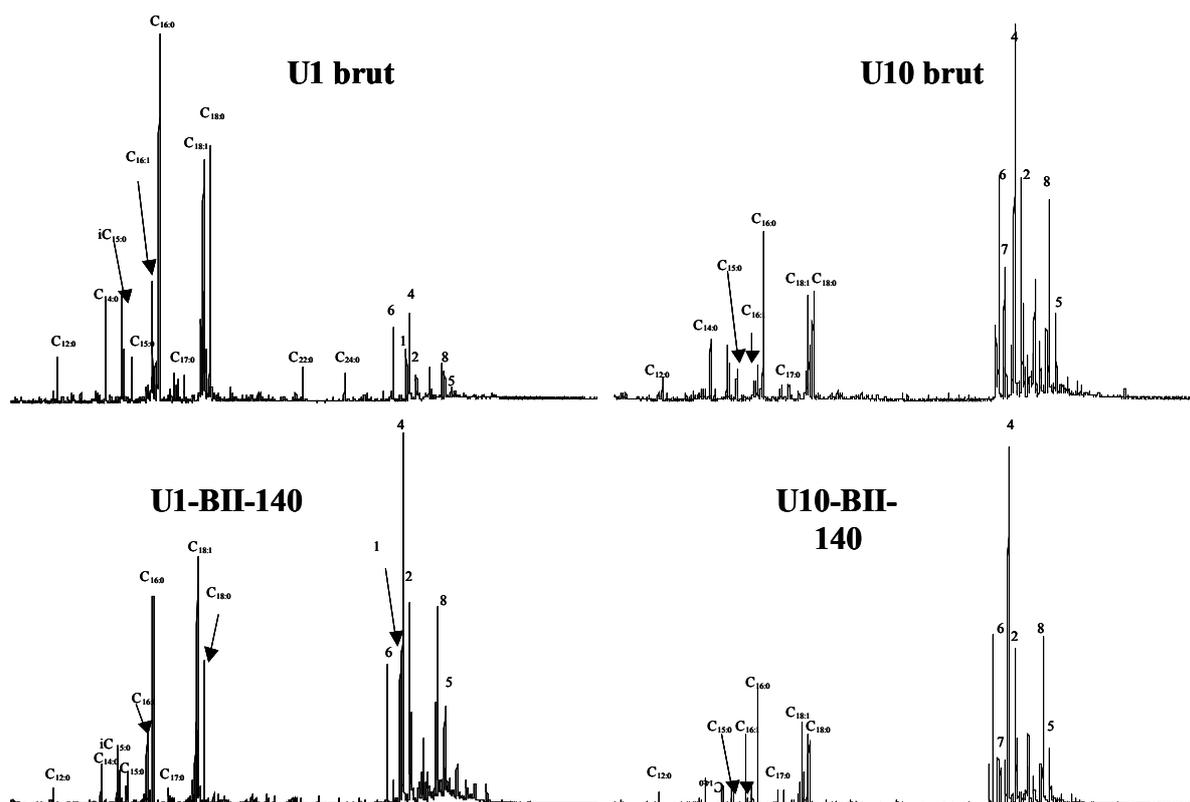


Figure III.3.15. Chromatogrammes des fractions polaires des quatre échantillons bruts et après 140 jours d'expérimentation (voir le tableau III.3.1 pour les identifications).

Les distributions des composés polaires des boues biodégradées restent dominées par les deux familles de composés précédemment mises en évidence dans les échantillons bruts, les acides gras et les stérols (*cf. partie III, chapitre 1- analyse de la fraction soluble*). Seule PM1 est dépourvue de stérols.

Les boues domestiques ainsi que la boue de laiterie sont caractérisées par une diminution systématique de l'abondance des acides gras par rapport à celle des stérols. Cette diminution a été quantifiée par le rapport de la somme des acides gras sur celle des stérols  $\Sigma_{\text{acides gras}} / \Sigma_{\text{stérols}}$  (tableau III.3.20). La diminution de ce rapport est cependant plus ou moins prononcée selon les échantillons. Elle est très marquée pour U1 (3 à  $t_0$  et 0,3 à  $t_{140}$ ), moyenne pour FP1 (1,2 à  $t_0$  et 0,7 à  $t_{140}$ ) et très faible pour U10 (0,2 à  $t_0$  et 0,1 à  $t_{140}$ ).

Dans les échantillons bruts et biodégradés des boues d'épuration domestiques, le coprostanol (pic 6), l'épicoprostanol (pic 7), le cholestanol (pic 4) le cholestérol (pic 2), mais également l'ergostérol (pic 8) et le stigmastérol (pic 5), typiques des végétaux supérieurs, ont pu être identifiés. Seuls le cholestérol (pic 2), le 3-methoxy-cholest-3-ene (pic 1) et le stigmastérol (pic 5) sont présents dans les échantillons bruts et biodégradés de la boue de

laiterie FP1. Le rapport de l'abondance relative du coprostanol sur la somme des stérols a été calculé pour les boues domestiques (tableau III.3.20). Au cours des expérimentations, il diminue dans la boue U1 (de 0,2 à 0,1) et reste relativement stable dans la boue U10. Les études de Kirchmer (1971), Barlett (1987) et Marty *et al.* (1996) ont mis en évidence une dégradation microbienne du coprostanol dans des conditions aérobies. Takada & Eganhouse (1998) ont compilé les données de la littérature sur l'incubation d'échantillons riches en coprostanol et ont montré que sa demi-vie dépend beaucoup des conditions expérimentales, telles la température d'incubation ou le type d'échantillon. Ainsi, Barlett (1987) qui a travaillé sur l'incubation aérobie de boues brutes à 20°C en laboratoire a mis en évidence une diminution de la quantité de coprostanol de 85 % en 29 jours. Par contre, en conditions anaérobies, la dégradation microbienne du coprostanol est beaucoup plus lente.

Le rapport de l'abondance relative des acides gras saturés linéaires de bas poids moléculaire de C<sub>12:0</sub> à C<sub>15:0</sub> (LMFA) sur la somme totale des acides gras (LMFA/Σ<sub>AG</sub>) a été calculé. Au cours des expérimentations, les boues PM1 et FP1 sont caractérisées par une diminution marquée de ce rapport, alors que la diminution est très limitée pour les boues domestiques.

Le rapport de l'abondance relative des acides gras impairs ramifiés *iso* et *antéiso* (iC<sub>15:0</sub> et aC<sub>15:0</sub>) et des acides gras pairs mono-insaturés (C<sub>16:1</sub> et C<sub>18:1</sub>) par rapport à la somme totale des acides gras (AG<sub>bact</sub>/ Σ<sub>Acides Gras</sub>) permet de quantifier l'évolution des acides gras d'origine bactérienne (Gunstone, 1967; Shaw, 1974; Boon *et al.*, 1977; Eganhouse, 1982; Gillan & Hogg, 1984). Au cours des expérimentations, il augmente nettement dans les échantillons PM1 et U1 et diminue dans le cas de FP1. En revanche, ce rapport évolue faiblement au cours de la biodégradation dans la boue U10.

	$\Sigma_{\text{acides gras}} / \Sigma_{\text{stérols}}$	$\text{Cop} / \Sigma_{\text{stérols}}$	$(\text{LMFA}^*) / (\Sigma_{\text{AG}})$	$\text{AG}_{\text{bact}} / \Sigma_{\text{acides gras}}$
<b>FP1</b>	<b>1,2</b>	<b>n.d</b>	<b>0,4</b>	<b>2,4</b>
FP1-BII-140	0,7	n.d	0,2	1,9
<b>PM1</b>	<b>n.d</b>	<b>n.d</b>	<b>0,5</b>	<b>1,1</b>
PM1-BII-140	N0d	n.d	0,2	1,9
<b>U1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>1,3</b>
U1-BII-140	0,3	0,1	0,2	1,9
<b>U10a</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>1,3</b>
U10a-BII-140	0,1	0,2	0,2	1,5

Tableau III.3.20. Calcul des rapports d'acides gras et de stérols dans les fractions polaires des échantillons bruts et après 140 jours d'expérimentations.

Ces résultats trahissent une activité bactérienne importante dans les boues se traduisant par la production de métabolites. Il est possible de corréliser ces résultats avec l'évolution de la composition de la FOS au cours de la biodégradation. Les boues PM1 et U10 sont caractérisées par une augmentation de la teneur en composés polaires, alors que celle des boues U1 et FP1 diminue.

Dans le cas de PM1, la biodégradation est la plus marquée avec une forte augmentation du rapport  $AG_{\text{bact}}/\Sigma_{\text{acides gras}}$  (73%), expliquant la forte augmentation de la proportion des composés polaires observée précédemment. Ces composés peuvent avoir été générés par la dégradation de la structure de la FOI. La diminution des composés de plus bas poids moléculaire pourrait s'expliquer par une dégradation bactérienne conduisant à la production de  $\text{CO}_2$  et / ou à la synthèse de nouveaux composés synthétisés par les bactéries.

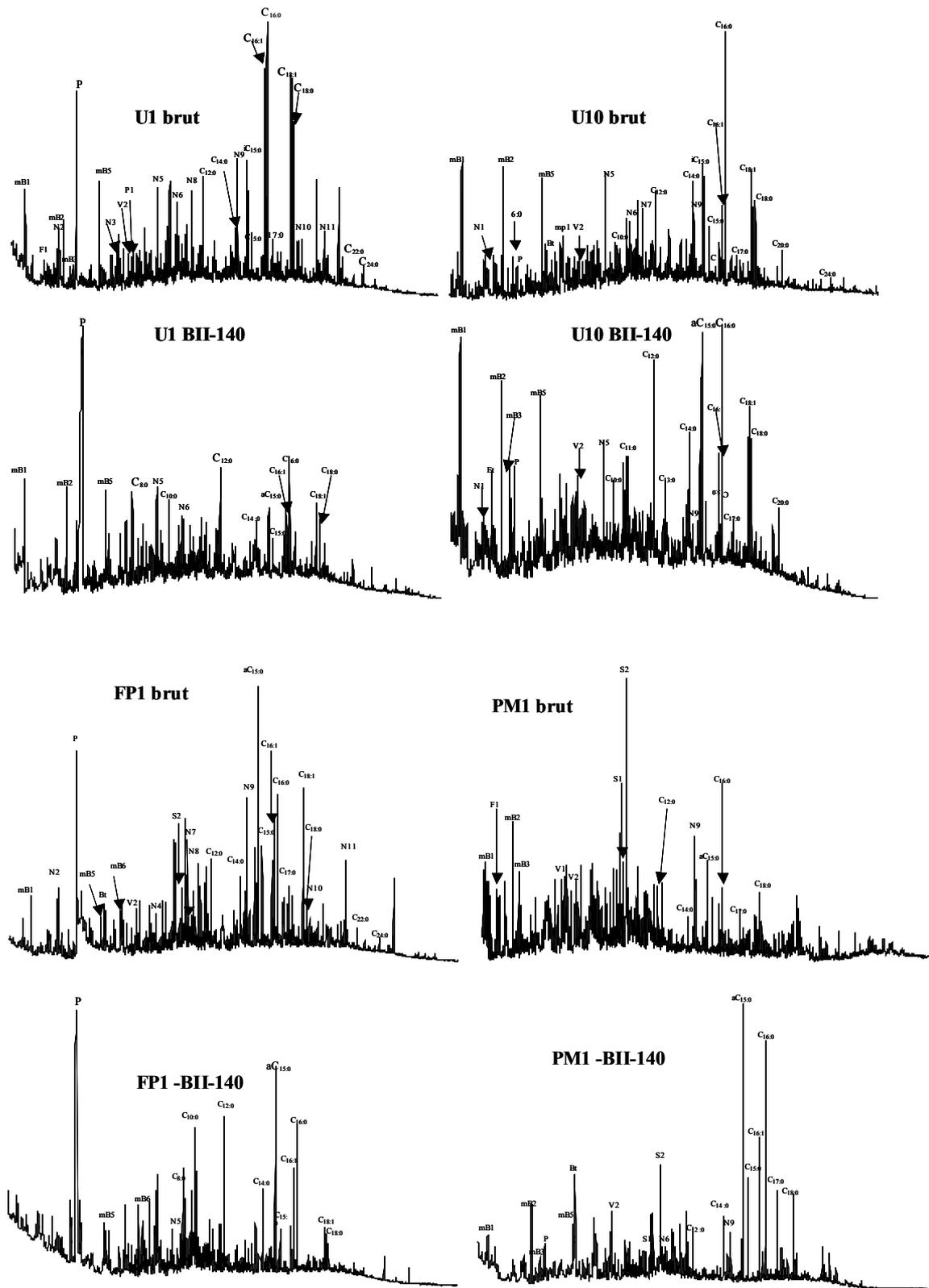
L'augmentation de la proportion des composés polaires de U10 peut être mise en relation avec l'augmentation des acides gras bactériens. De plus, le rapport des LMFA sur la somme des acides gras est relativement stable. Ces observations suggèrent que la dégradation des composés de la FOI va permettre la formation de LMFA mais que ceux-ci pourront être eux-mêmes dégradés. La stabilité des indices suggère un processus avec des apports réguliers de composés parallèlement à une dégradation des LMFA.

La quantité des composés polaires de FP1 diminue, ainsi que les trois rapports calculés. Une forte diminution de la teneur en FOI est également observée entre  $t_0$  et  $t_{140}$  (607,6 mg/g  $\text{COT}_0$  à 347,8 mg/g  $\text{COT}_0$ ). Il est alors possible d'envisager une dégradation des composés polaires parallèlement à la dégradation des composés de la FOI. D'autre part, la diminution des indices calculés et de la proportion des composés polaires peut suggérer que la quantité des composés générés par la dégradation de la FOI n'est pas suffisante pour compenser les pertes en composés polaires.

La boue U1 est caractérisée par une augmentation du rapport  $AG_{\text{bact}}/\Sigma_{\text{acides gras}}$  alors que les autres indices sont plus ou moins stables. Il est possible d'envisager une dégradation des LMFA parallèlement à un apport constant de nouveaux métabolites générés par la dégradation de la FOI.

### **XVI.3.5. Fraction organique insoluble (FOI)**

La figure III.3.15 présente les pyrogrammes des résidus solides des quatre échantillons bruts et après 140 jours d'incubation.



Les pyrogrammes des boues d'épuration montrent des variations significatives dans la distribution des principaux composés identifiés. Ils ont été regroupés en trois familles selon la méthodologie proposée au chapitre 2: dérivés de la lignine, dérivés des lipides et composés azotés. Cependant, la semi-quantification effectuée sur les FOI des échantillons bruts n'a pas été appliquée aux échantillons biodégradés. En effet, cette méthodologie est adaptée à la caractérisation des FOI des boues brutes, mais n'est pas satisfaisante pour suivre les évolutions du contenu organique au cours de la biodégradation. C'est pourquoi une analyse moléculaire qualitative a été préférée.

### Acides gras

Les rapports  $LMFA/\Sigma_{AG}$  et  $AG_{bact}/\Sigma_{AG}$  décrits précédemment ont été calculés et les résultats sont présentés dans le tableau III.3.21. Avec des durées d'incubation croissantes, on observe une augmentation de la proportion des acides gras de bas poids moléculaire dans tous les échantillons, à l'exception de U10, pour lequel le rapport reste stable. L'évolution du rapport  $LMFA/\Sigma_{AG}$  des FOI est donc tout à fait contraire à celle observée pour le rapport  $LMFA/\Sigma_{AG}$  calculé à partir des acides gras présents dans la fraction polaire. Elle pourrait s'expliquer par une dégradation préférentielle des chaînes les plus longues qui sont libérées dans la fraction extractible des boues. Ces résultats sont comparables à ceux de Jenisch-Anton *et al.* (2000) qui ont mis en évidence une dégradation des acides gras de plus haut poids moléculaire et un enrichissement relatif en acides gras de plus bas poids moléculaire lors de la biodégradation de géomacromolécules.

On peut également mettre en évidence une augmentation dans tous les échantillons (excepté dans le cas de FP1) de la proportion des acides gras d'origine bactérienne, quantifiée par le rapport  $AG_{bact}/\Sigma_{acides\ gras}$  traduisant la présence d'une population bactérienne associée à la structure macromoléculaire de la boue.

	$(LMFA^*)/(\Sigma_{AG})$	$AG_{bact}/\Sigma_{acides\ gras}$
<b>FP1</b>	<b>0,3</b>	<b>1,4</b>
FP1-BII-140	0,6	1,4
<b>PM1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>
PM1-BII-140	0,4	0,9
<b>U1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,8</b>
U1-BII-140	0,4	1
<b>U10a</b>	<b>0,3</b>	<b>0,8</b>
U10a-BII-140	0,4	1,3

Tableau III.3.21. Evolution des rapports d'acides gras dans les résidus solides au cours de la biodégradation

Dérivés de la lignine :

Afin de déterminer l'influence des expériences de biodégradation sur les composés dérivés de la lignine, les rapports de pics entre les composés dérivant des différentes unités ligneuses (unités vanillyles, syringyles et cinnamyles) ont été utilisés. Les résultats sont présentés dans le tableau III.3.22.

	$(Ac/Al)_{v-s}$	$S/\Sigma_{lig}$	$S/V$	$C/V$
<b>FP1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>
FP1-BII-140	0,5	0,2	0,4	0,3
<b>PM1</b>	<b>0,6</b>	<b>0,3</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>
PM1-BII-140	0,9	0,2	0,4	0,4
<b>U1</b>	<b>1,6</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>
U1-BII-140	2	0,2	0,3	0,7
<b>U10a</b>	<b>1,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,9</b>
U10a-BII-140	1,3	0,1	0,3	1

Tableau III.3.22. Evolution des rapports entre les unités de la lignine au cours de la biodégradation

Le rapport  $(Ac/Al)_{v-s}$  est le rapport de l'acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque et de l'acide 3,4-diméthoxybenzoïque sur le 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde et 3,4-diméthoxybenzaldéhyde. (Clifford *et al.*, 1995; McKinney & Hatcher, 1996). Les rapports S/V ratio et C/V ont été calculés comme le préconisent Hedges & Mann (1979) et Garcette-Lepecq *et al.* (2001). S/V est le rapport de l'acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque et du 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde sur l'acide 3,4-diméthoxybenzoïque et le 3,4-diméthoxybenzaldéhyde. C/V est le rapport entre l'acide *p*-coumarique (acide 2-propénoïque-3-4-méthoxyphényle) et l'acide ferrulique (acide 2-propénoïque-3-3,4-diméthoxyphényle) sur l'acide 3,4-diméthoxybenzoïque et 3,4-diméthoxybenzaldéhyde.

Les résultats permettent de mettre en évidence :

- une augmentation du rapport  $(Ac/Al)_{v-s}$  pour les quatre échantillons,
- une diminution du rapport  $S/\Sigma_{lig}$  pour les quatre échantillons,
- une diminution du rapport  $S/V$  pour PM1, U1 et U10,
- et une augmentation du rapport  $C/V$  pour FP1, U1, U10, et une diminution de ce rapport pour PM1.

Dans les sols et les sédiments, l'oxydation microbienne très poussée de la lignine produit l'acide 3,4-diméthoxybenzoïque (acide vanillique) et l'acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque (Ertel & Hedges, 1985; Saiz-Jimenez & de Leeuw, 1986; Eriksson *et al.*, 1990; Hatcher *et al.*, 1995; Hedges & Oades, 1997; Vane *et al.*, 2001). Ainsi, le rapport  $(Ac/Al)_{v-s}$  peut être utilisé pour déterminer l'état de dégradation de la lignine (Ertel & Hedges, 1985; Hatcher *et al.*, 1995; McKinney & Hatcher, 1996). Ce rapport tend à augmenter dans les échantillons contenant de la lignine dégradée. Cette augmentation traduit l'oxydation de la lignine et plus particulièrement la rupture des liaisons  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  (Kirk, 1984). D'autre part, les unités syringyles seraient plus sensibles à la dégradation que les unités vanillyles ou *p*-coumaryles (cinnamyles) (Huang *et al.*, 1998).

Les expériences de biodégradation effectuées sur les quatre échantillons de boues d'épuration permettent donc de traduire l'augmentation de l'état de dégradation des composés dérivés de la lignine (mis en évidence par l'augmentation du rapport  $Ac/Al_{v-s}$ ). Le rapport  $C/V$  augmente dans les échantillons U1, U10 et FP1, mettant en évidence une augmentation des unités cinnamyles relativement aux unités vanillyles. Ceci est cohérent avec l'étude de Huang *et al.* (1998) qui soulignent la plus grande résistance à la dégradation des unités cinnamyles et plus particulièrement de l'acide *p*-coumarique par rapport aux unités vanillyles et syringyles. En revanche, la diminution du rapport  $C/V$  dans l'échantillon PM1 peut signifier un état de dégradation plus avancé allant jusqu'à la dégradation de ces unités cinnamyles.

### Composés Azotés :

Les composés azotés principaux identifiés dans les FOI des échantillons bruts des quatre boues sont les produits de pyrolyse des protéines, de polypeptides et d'acides aminés tels que les indoles ou les pyrroles (Ishiwatari *et al.*, 1995; Peulvé *et al.*, 1996). D'autres dérivés protéiques sont également présents, tels que les pyrimidinediones (1,3-diméthyl-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione ou 1,3,5-triméthyl-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione), l'adénine (N,N,N'-triméthyl-adenine) ou des dérivés d'acides aminés méthylés (plutôt présents dans les boues FP1, U1 et U10). L'analyse des distributions des composés azotés des échantillons biodégradés FP1, U1 et U10 montre une diminution relative de l'abondance des amides (jusqu'à une disparition de l'octadécénamide), des pyrimidinediones et de la proline. L'adénine, les alkyl-indoles et la caféine (dans U1 et U10) sont relativement bien préservés. Le pyrogramme de PM1 est essentiellement caractérisé par la présence d'alkyl-indoles qui sont toujours abondants après 140 jours de biodégradation.

Ainsi, une diminution relative de l'abondance des composés linéaires et de certains composés azotés cycliques est observée au cours de la biodégradation.

### Composés chlorés

La station d'épuration de FP1 traite non seulement des effluents de laiterie mais également des effluents d'une usine chimique (8%) produisant des composés chlorés. Afin de déterminer le statut des composés chlorés au cours des expériences de biodégradation, des analyses en Py-GC-AED sur le canal du chlore ont été effectuées. L'efficacité du détecteur à émission atomique a été démontrée précédemment pour rechercher des structures halogénées dans les matières organiques naturellement ou industriellement halogénées (Flodin *et al.*, 1997; Faure *et al.*, 2002).

La figure III.3.16 présente les pyrogrammes Py-GC-AED sur le canal du chlore (Cl479) des échantillons bruts et biodégradés de FP1.

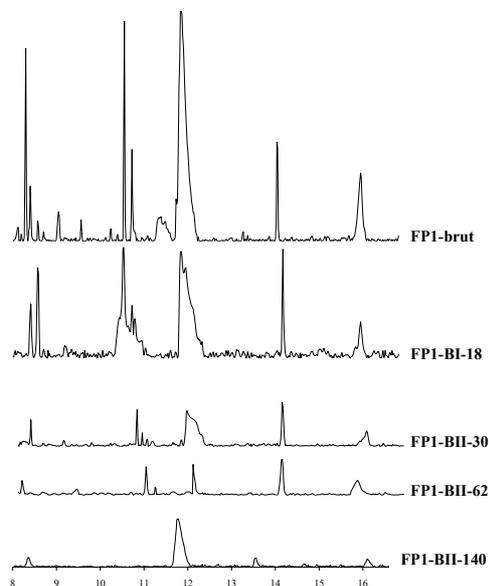


Figure III.3.17. Pyrogrammes Py-GC-AED sur le canal Cl479 pour les échantillons bruts et biodégradés de FP1.

Cette analyse nous permet de mettre en évidence la présence de composés chlorés incorporés à la matrice solide dans l'échantillon brut de départ. Il s'agit de composés bien résolus qui éluent entre 7 et 17 min. L'abondance de ces composés chlorés tend à diminuer avec l'augmentation du temps d'incubation. C'est tout d'abord l'abondance des composés de plus haut poids moléculaire qui diminue, puis celle des composés de plus bas poids moléculaire. La présence de ces composés dans les résidus solides suggère qu'ils sont fortement liés à la structure macromoléculaire. La dégradation de cette structure, mise en évidence précédemment, affecte également ces composés chlorés, qui pourront être libérés sous forme volatile ou retrouvés en composés extractibles.

## XVII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Deux phases d'expérimentation ont été effectuées sur quatre échantillons de boues d'épuration d'origines différentes (deux boues domestiques, une de laiterie et une de papeterie). Les taux de CO<sub>2</sub> générés à l'issue des deux phases sont très comparables. Ces résultats sont assez étonnants dans la mesure où la deuxième phase avait été initiée afin

d'accélérer la dégradation de la matière organique des boues ; aucune donnée cependant ne nous permet actuellement d'expliquer ce phénomène. Au cours de la deuxième phase d'expérimentation, la production de CO<sub>2</sub> diffère suivant les 4 boues et s'exprime selon un ordre décroissant : PM1, FP1, U1, U10. En outre, une diminution de la teneur en carbone organique total est également observée. Les écarts entre les taux de CO<sub>2</sub> produits et la différence de COT observée d'une boue à l'autre ne sont toutefois pas corrélables, du fait de la présence éventuelle de carbonates dans certains échantillons (FP1 et U1) dont l'attaque par les acides organiques peut également générer du CO<sub>2</sub>.

L'analyse de l'évolution de la composition organique de tous les échantillons a mis en évidence une diminution de l'abondance relative de la quantité de FOI. Cette diminution, très marquée dans le cas de PM1 (-46%), est forte pour FP1 et U10 et moins forte pour U10 (-9%). Elle s'accompagne d'une augmentation de la teneur en FOS dans les échantillons U10 et PM1, et d'une décroissance modérée dans les échantillons FP1 et U1. Ces observations suggèrent une dégradation de la structure macromoléculaire de la FOI permettant la genèse de composés extractibles. Ces derniers pourront à leur tour soit être dégradés pour former des nouveaux métabolites, soit produire du CO<sub>2</sub>. La dégradation de la FOI a été mise en évidence au moyen d'indices calculés à partir des dérivés de la lignine. D'autre part, les indices calculés grâce aux acides gras présents de la FOI soulignent une dégradation préférentielle des acides gras de haut poids moléculaire au profit de la formation de composés de plus bas poids moléculaire ou / et de composés extractibles.

L'analyse quantitative et moléculaire de la composition de la FOS indique une réactivité vis à vis des processus de biodégradation différente selon les boues. Ainsi, les échantillons U10 et PM1 enregistrent une augmentation de la quantité de FOS, alors que les échantillons FP1 et U1 voient leur quantité de FOS diminuer.

Les composés générés par la dégradation chimique de la FOI de PM1 vont permettre de produire des composés extractibles, essentiellement polaires. L'analyse de la fraction aliphatique de cet échantillon met en avant une augmentation des composés de plus bas poids moléculaire pouvant être générés par les bactéries. Parallèlement à cette augmentation, l'ensemble des composés aliphatiques est dégradé ; ce qui justifie ainsi l'observation d'aucune variation quantitative de la fraction aliphatique. La forte diminution de la quantité de FOI n'est pas exactement compensée par l'augmentation de la quantité de FOS. De ce fait, une partie des composés produits par la dégradation de la FOI doit être minéralisée afin de contribuer à la production de CO<sub>2</sub> au cours des expériences

La dégradation des composés de la FOI de U10 va permettre, comme dans le cas de PM1, de générer des composés extractibles polaires. Les indices calculés à partir des composés polaires restent constants au cours de la biodégradation. Ceci suggère une dégradation des composés polaires compensant alors la quantité de composés générés par la dégradation de la structure macromoléculaire de la FOI. La distribution des composés aliphatiques des échantillons biodégradés n'est pas typique d'une biodégradation avancée. En effet, on observe une diminution des composés de plus bas poids moléculaire, ainsi qu'une relative stabilité des composés de plus haut poids moléculaire. La dégradation chimique des composés de la FOI pourrait permettre de libérer des chaînes linéaires aliphatiques de haut poids moléculaire dans la fraction extractible. Afin d'expliquer cette production de composés aliphatiques, il est possible d'envisager une rupture de liaison au sein de la structure macromoléculaire de la boue lors de sa dégradation conduisant ainsi à la libération de matériel initialement piégé dans cette structure.

La quantité de FOS de U1 diminue au cours du temps, cette diminution est essentiellement enregistrée dans les fractions aromatiques et polaires. L'abondance relative des acides gras bactériens augmente avec en parallèle une constance des indices de dégradation des LMFA et du coprostanol. Il est ainsi possible d'envisager comme dans le cas de U10, un processus grâce auquel la dégradation des composés polaires serait plus ou moins compensée par la libération de composés extractibles. La teneur en composés polaires diminue Ceci pourrait ainsi signifier qu'une grande partie de ces composés servent de précurseurs à la genèse de nouveaux métabolites ou bien sont minéralisés.

La boue FP1 a un comportement très différent, avec une diminution des composés de la FOI et des composés polaires. Les composés générés pourront alors servir de précurseurs à la synthèse de composés aliphatiques ou aromatiques, ou encore permettre la production de CO<sub>2</sub>. Il est important de noter que l'évolution de la distribution des composés aliphatiques de cette boue est tout à fait comparable aux schémas classiques de biodégradation de ces composés, avec entre autre une augmentation significative de l'abondance relative d'un UCM. En outre, la dégradation préférentielle des *n*-alcanes révèle la présence d'hopanes typiques de produits pétroliers fossiles à t<sub>140</sub>, dont la présence était masquée à t<sub>0</sub>. Cette observation souligne la préservation de ces produits pétroliers fossiles au cours de la biodégradation dans la boue FP1.

L'ensemble des résultats des expériences de biodégradations mettent en évidence la présence de matière organique insoluble non réfractaire dans les boues. Les pertes en quantité

de FOI n'étant pas les mêmes d'un échantillon à l'autre, ceci pourrait être l'expression de proportions initiales de matière organique réfractaire et non-réfractaire variables dans les échantillons bruts. Il est possible également d'imputer ces différences à la présence de métaux lourds incorporés à la structure macromoléculaire, jouant le rôle d'inhibiteur de l'activité bactérienne, ou encore à des populations bactériennes différentes dans les quatre échantillons aux potentiels de dégradation différents. Aucune donnée ne nous permet pour le moment de trancher en faveur de l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Des indices de biodégradation ont été calculés au cours de cette étude ; tous n'apportent pas une information satisfaisante. Le calcul du rapport  $AG_{bact}/\Sigma_{AG}$  peut être discuté, en effet les acides gras ramifiés  $aC_{15:0}$  et  $iC_{15:0}$  sont principalement d'origine bactérienne, en revanche les acides gras  $C_{18:1}$  et  $C_{16:1}$  peuvent également avoir comme origine les fèces ou les graisses. Aussi, ce rapport n'est pas très pertinent, puisqu'il y a une forte contribution des matières fécales et des eaux de cuisines dans les boues domestiques U1 et U10 alors que dans les boues FP1 et PM1 la contribution est principalement bactérienne. Des indices de biodégradation plus pertinents sont les rapports calculés à partir des dérivés de la lignine et le rapport  $LMFA/\Sigma_{AG}$  dans les FOI et le rapport  $Cop/\Sigma_{stérols}$  dans les FOS. Ils permettent de quantifier la dégradation de la structure chimique de la FOI avec une dégradation préférentielle des unités syringyles et vannillyles et des acides gras de haut poids moléculaire. La biodégradation se traduit également par une dégradation préférentielle des acides gras par rapport au stérols dans les FOS, quantifiée par le calcul du rapport  $AG/\Sigma_{stérols}$ .

Malgré les différences moléculaires mises en évidence entre les échantillons, un schéma global de biodégradation des boues peut être déterminé. Au cours de la biodégradation la structure chimique des boues va se dégrader partiellement afin de générer des composés extractibles. Ceux-ci seront alors eux-mêmes dégradés pour produire de nouveaux métabolites ou bien seront minéralisés. Cependant, afin de proposer un schéma réactionnel plus précis, il serait nécessaire de poursuivre ces expériences en travaillant non seulement sur des boues pré-extraites, mais aussi sur des fractions extractibles isolées.

Au cours des expérimentations, la dégradation de la FOI peut induire la libération de composés lipidiques tels que les acides gras. Ce sont des composés hydrophobes qui pourront altérer les propriétés physiques du sol, telles que sa rétention en eau et sa stabilité structurale. D'autre part, certains composés lipidiques pourront avoir des effets néfastes sur la croissance des plantes (Chang & Patrick, 1976; Jambu *et al.*, 1978; Stevenson, 1994). Les composés

hydrophobes produits au cours de la biodégradation des boues devront être quantifiés afin de mieux appréhender leur impact sur la qualité des sols.

Un des paramètres importants pris en compte au cours des épandages est la teneur en azote des déchets épandus. En effet, il est essentiel d'évaluer la contribution réelle des boues à l'alimentation azotée des plantes. L'analyse des FOI a mis en évidence une diminution relative de certains composés azotés dans les quatre échantillons. A la fin des expériences, des composés tels que les alkyl-indoles sont encore présents et constituent un pool d'azote organique réfractaire. Les résultats de l'analyse des composés azotés ne nous apparaissent pas satisfaisants au terme de ce travail. En effet, peu d'information pertinente ont pu être extraites de leur analyse qualitative et la méthodologie développée au chapitre 2, fournissant des données semi-quantitatives, n'a pas pu être appliquée aux échantillons biodégradés, car elle ne permet pas de suivre des évolutions au cours du temps. Afin d'approfondir le travail sur les composés azotés, une analyse élémentaire sur les échantillons déminéralisés permettrait de déterminer les évolutions de la teneur en azote. L'utilisation de la Py-GC-AED devrait également permettre une meilleure caractérisation des produits azotés dans la mesure où sa sensibilité est plus fine que celle d'un spectromètre de masse et permet une analyse élémentaire à l'échelle moléculaire.

A ce stade de l'étude, les résultats obtenus nous ont permis de déterminer les grandes tendances quant à l'évolution du contenu organique des boues. Ces tendances doivent être maintenant appuyées non seulement par des résultats quantitatifs mais aussi par une analyse fonctionnelle de la structure chimique de la matière organique macromoléculaire. Ceci implique par exemple l'utilisation des techniques de micro-spectroscopie infrarouge, qui, bien que nécessitant de s'affranchir de la fraction minérale des boues par des attaques acides s'avère très complémentaire de la pyrolyse analytique.

Finalement, si nous avons préconisé de travailler sur des fractions isolées des boues (extractibles ou insolubles) dans les paragraphes précédents afin de préciser le schéma réactionnel de dégradation des boues, il apparaît tout aussi important de compléter cette étude par des expériences sur des mélanges plus complexes permettant de mieux comprendre l'influence de la fraction minérale sur les réactions de biodégradation.

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Barlett, P.D. (1987) Degradation of coprostanol in an experimental system. *Marine Pollution Bulletin*, **18**, 27-29.
- Boon, J., De Leeuw, J.W., Van der Hoek, G.J. & Nosjan, J.H. (1977) Significance and taxonomic value of iso and anteiso monoenoic fatty acids and branched  $\beta$ -hydroxy acids in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of Bacterial Marine*, **129**, 1183-1191.
- Bossert, I.P. & Bartha, R. (1986) Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *Bulletin of Environmental and Contaminant Toxicology*, **37**, 490-495.
- Boyd, S.A., Sommers, L.E. & Nelson, D.W. (1980) Changes in humic acid fraction of soil resulting from sludge application. *Soil Science Society American*, **44**, 1179-1186.
- Brassel, S.C., Eglinton, G., Maxwell, J.R. & Philip, R.P. (1978) Natural background of alkanes in the aquatic environment. In: *Aquatic pollutants* (Ed. by O. Hutzinger, I. H. Van Leleyveld & B. C. J. Zoeteman), pp. 69-86. Pergamon Press, Oxford.
- Bray, E.E. & Evans, E.D. (1961) Distribution of *n*-paraffins as a clue to recognition of source beds. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **22**, 2-15.
- Chae, Y.M. & Tabatabai, M.A. (1986) Mineralization of nitrogen in soils amended with organic wastes. *Journal of Environmental Quality*, **15**(2), 193-198.
- Chang, H. & Patrick, Z.A. (1976) Identification and phytotoxic activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residues in soil. *Journal of Chemistry Ecology*, **2**, 369-387.
- Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D.E., Bortiatynsky, J.M. & Hatcher, P.G. (1995) A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. *Organic Geochemistry*, **23** (2), 169-175.
- Eganhouse, R.P. (1982) Organic matter in municipal wastes and storm runoff: characterization and budget to the coastal waters of southern California. Thesis in: *Geochemistry*, pp. 230. University of California, Los Angeles.
- Eganhouse, R.P., Blumfield, D.L. & Kaplan, I.R. (1983) Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment. *Environment Science and Technology*, **17**, 523-550.

- Eganhouse, R.P., Olaguer, D.P., Gould, B.R. & Phinney, C.S. (1988) Use of molecular markers for the detection of municipal sewage sludge at sea. *Marine Environmental Research*, **25**, 1-22.
- Eriksson, K.E.L., blanchette, R.A. & Ander, P. (1990) *Microbial Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. Springer, New York.
- Ertel, J.R. & Hedges, J.I. (1985) Sources of sedimentary substances: vascular plant debris. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **49**, 2097-2107.
- Faure, P., Vilmin, F., Michels, R., Jarde, E., Mansuy, L., Elie, M. & Landais, P. (2002) Application of thermodesorption and pyrolysis-GC-AED to the analysis of river sediments and sewage sludges for environmental purpose. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **62**, 297-318.
- Flodin, C., Ekelund, M., Boren, H. & Grimwall, A. (1997) Pyrolysis-GC/AED and Pyrolysis-GC/MS analysis of chlorinated structures in aquatic fulvic acids and chlorolignins. *Chemosphere*, **34**(11), 2319-2328.
- Garau, M.A., Felipo, M.T. & Ruiz de Villa, M.C. (1986) Nitrogen mineralization of sewage sludges in soils. *Journal of Environmental Quality*, **15**(3), 225-228.
- Garcette-Lepecq, A., Derenne, S., Largeau, C., Bouloubassi, I. & Saliot, A. (2001) Thermally assisted hydrolysis and methylation of kerogen-like organic matter in a recent sediment of the Danube delta (northwestern Black Sea). *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **61**, 147-164.
- Gillan, F.T. & Hogg, R.W. (1984) A method for the estimation of bacterial biomass and community structure in mangrove-associated sediments. *Journal of Microbiological Methods*, **2**, 275-293.
- Gonzalez-Vila, F.J., Almendros, G. & Madrid, F. (1999) Molecular alterations of organic fractions from urban waste in the course of composting and their further transformation in amended soil. *The Science of the Total Environment*, **236**, 215-229.
- Gunstone, F.D. (1967) *An introduction to the chemistry and biogemistry of fatty acids and their glycerides*. Chapman & Hall, London.
- Hatcher, P.G., Nanny, M.A., Minard, R.D., Dibble, S.D. & Carson, D.M. (1995) Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with TMAH. *Organic Geochemistry*, **23**(10), 881-888.
- Hedges, J.I. & Mann, D.C. (1979) The characterisation of plant tissues by their lignin oxidation products. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **43**, 1803-1807.

- Hedges, J.I. & Oades, J.M. (1997) Comparative organic geochemistries of soils and marine sediments. *Organic Geochemistry*, **27**(319-361).
- Hiroux, G., Lefevre, G. & Gaffet, M.A. (1983) Composition organique et décomposition dans le sol de boues mixtes de station d'épuration urbaine. *Science du Sol*, **1**, 17-26.
- Hsieh, Y.P., Douglas, L.A. & Motto, H.L. (1981) Modelling sewage sludge decomposition in soil. 2-nitrogen transformations. *Journal of Environmental Quality*, **10**(1), 59-64.
- Huang, Y., Eglinton, G., Van der Hage, E.R.E., Boon, J.J., Bol, R. & Ineson, P. (1998) Dissolved organic matter and its parent organic matter in grass upland soil horizons studied by analytical pyrolysis techniques. *European Journal of Soil Science*, **49**, 1-15.
- Iakimenko, O., Otabbong, E., Sadovnikova, L., Persson, J., Nilsson, I., Orlov, D. & Ammosova, Y. (1996) Dynamic transformation of sewage sludge and farmyard manure components. 1. Content of humic substances and mineralisation of organic carbon and nitrogen in incubated soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **58**, 121-126.
- Ishiwatari, R., Takada, H., Yun, S.J. & Matsumoto, E. (1983) Alkylbenzene pollution of Tokyo Bay sediments. *Nature*, **301**, 599-600.
- Ishiwatari, R., Yamamoto, S. & Handa, N. (1995) Characterization of sinking particles in the ocean by pyrolysis-gas chromatography/ mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **32**, 75-89.
- Jambu, P., Fustec, E. & Jacquessy, R. (1978) Les lipides des sols: nature, origine évolution, propriétés. *Bulletin de l'Association Française pour l'Etude du Sol*, **4**, 229-240.
- Jenisch-Anton, A., Adam, P., Michaelis, W., Connan, J., Herrmann, D., Rohmer, M. & Albrecht, P. (2000) Molecular evidence for biodegradation of geomacromolecules. *Gecohimica and Cosmochimica Acta*, **64**, 20.
- Kirchmer, C.J. (1971) 5 $\beta$ -cholestan-3 $\beta$ -ol: an indicator of fecal pollution. Ph-D thesis- University of Florida, Gainesville.
- Kirk, T.K. (1984) Degradation of lignin. In: *Biochemistry of Microbial Degradation* (Ed. by D. T. Gibson), pp. 399-473. Marcel Dekker.
- Mangas, E., Vaquero, M.T., Comellas, L. & Broto-Puig, F. (1998) Analysis and Fate of Aliphatic hydrocarbons, linear alkylbenzenes, polychlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soils. *Chemosphere*, **36**(1), 61-72.
- Marty, Y., Quéméneur, M., Aminot, A. & Le Corre, P. (1996) Laboratory study on degradation of fatty acids and sterols from urban wastes in seawater. *Water Research*, **30**(5).

- McKinney, D.E. & Hatcher, P.G. (1996) Characterization of peatified and coalified wood by tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis. *International Journal of Coal Geology*, **32**, 217-228.
- Moreda, J.M., Arranz, A., Fdez de Betono, S., Cid, A. & Arranz, J.F. (1998) Chromatographic determination of aliphatic hydrocarbons and polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in a sewage sludge. *The Science of the Total Environment.*, **220**, 33-43.
- Pagliai, M. & Vittori Antisari, L. (1993) Influence of waste organic matter on soil micro- and macrostructure. *Bioresource Technology*, **43**, 205-213.
- Palmer, S.E. (1991) Effect of biodegradation and water washing on crude oil composition. In: *Organic Geochemistry* (Ed. by M. H. Engel & S. A. Macko), pp. 511-533. Plenum Press, New York.
- Peulvé, S., de Leeuw, J.W., Sicre, M.-A., Baas, M. & Saliot, A. (1996) Characterisation of macromolecular organic matter in sediment traps from the northwestern Mediterranean Sea. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **60**(7), 1239-1259.
- Piccolo, A., Zaccheo, P. & Genevini, P.G. (1992) Chemical characterization of humic substances extracted from organic-waste-amended soils. *Bioresource Technology*, **40**, 275-282.
- Réveillé, V. (2001) Caractérisation de mélanges sol/boues: complexe d'échange, matière organique et répartition des métaux.. Thèse en Science et Techniques de l'Environnement, pp. 277. Université de Paris XII- Val de Marne, Paris XII.
- Saiz-Jimenez, C. & de Leeuw, J.W. (1986) Lignin pyrolysis products: Their structures and their significance as biomarkers. *Organic Geochemistry*, **10**, 869-876.
- Senesi, N., Miano, T.M. & Brunetti, G. (1996) Humic-like substances in organic amendments and effect on native soil humic substances. In: *Humic substances in terrestrial ecosystems* (Ed. by A. Piccolo), pp. 14.
- Serna, M.D. & Pomares, F. (1992) Indexes of assessing N availability in sewage sludges. *Plant Soil*, **139**, 15-21.
- Shaw, N. (1974) *Advances in Applied Microbiology*, **17**, 63.
- Sims, R.C. & Overcash, M.R. (1983) Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Resources Review*, **88**, 1-67.
- Stevenson, F.J. (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. John Wiley and Sons.

- Takada, H. & Eganhouse, R.P. (1998) Molecular markers of anthropogenic waste. In: *Encyclopedia of environmental analysis and remediation* (Ed. by R. A. Meyers), pp. 2883-2940. John Wiley & Sons, Inc.
- Takada, H. & Ishiwatari, R. (1987) Linear alkylbenzenes in urban riverine environments in Tokyo: distribution, sources and behavior. *Environment Science and Technology*, **21**, 875-883.
- Vane, C.H., Abbot, G.D. & Head, I.M. (2001) The effect of fungal decay (*Agaricus bisporus*) on wheat straw lignin using pyrolysis-GC-MS in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **60**, 69-78.
- Vilmin, F. (2000) Le couplage chromatographie en phase gazeuse - détecteur à émission atomique: applications à l'analyse de la matière organique sédimentaire., pp. 138. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'ingénieur du Conservatoire national des arts et métiers- Paris, Nancy (France).
- Wild, S.R. & Jones, K.C. (1993) Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge. *Environmental Toxicology Chemistry*, **12**, 5-12.
- Wiseman, J.T. & Zibilske, L.M. (1988) Effect of sludge application sequence on carbon and nitrogen mineralization in soil. *Journal of Environmental Quality*, **17**(2), 334-339.



## *CONCLUSION GÉNÉRALE*



Cette étude s'est intéressée à la caractérisation du contenu organique de boues résiduelles de stations d'épuration de la région Lorraine. L'originalité de ce travail résidait dans l'analyse moléculaire d'un grand nombre d'échantillons d'origines variées afin de déterminer une éventuelle variabilité de la composition organique des boues selon la nature des effluents traités (domestiques, agro-alimentaires, papeteries) et la taille de la station (rurale à urbaine). A cette fin, notre démarche a consisté à dresser l'inventaire des composés organiques présents dans les boues sous forme libre (dans la fraction organique extractible), mais également ceux liés à la structure macromoléculaire de la fraction organique insoluble et à déterminer les éventuelles relations entre les différentes familles de composés identifiées. Des expériences de biodégradation ont ensuite été réalisées sur quatre échantillons représentatifs de l'ensemble des boues, afin de simuler les modifications pouvant affecter le contenu organique des boues et donc leur réactivité au cours des épandages agricoles.

Les échantillons de boues lyophilisées ont été extraits aux solvants organiques afin de séparer une fraction lipidique (ou fraction organique soluble- FOS) d'une fraction organique insoluble (FOI). La FOS a ensuite été fractionnée en composés aliphatiques, aromatiques et polaires grâce à des solvants de polarités différentes. Ces fractions ont ensuite été analysées par GC-MS afin de déterminer l'empreinte moléculaire de chaque échantillon pour les comparer les uns avec les autres. Les FOI ont été analysées par THM-GC-MS et par Py-GC-AED. En raison de la complexité de l'information générée par les pyrogrammes, deux méthodologies ont été développées afin d'essayer d'extraire l'information la plus pertinente des résultats obtenus sur un grand nombre d'échantillons. La première méthodologie couplée à l'analyse THM-GC-MS est basée sur une semi-quantification des composés des trois familles majoritaires présentes : les acides gras, les dérivés de la lignine et les composés azotés. La deuxième méthodologie développée à partir des résultats de Py-GC-AED fait appel aux méthodes chimiométriques de classification et d'analyse en composante principale.

L'analyse des FOS et FOI des boues nous a permis de les distinguer selon la nature des effluents traités (domestiques, papeteries et agro-alimentaires). Les boues de papeterie sont caractérisées par des distributions des *n*-alcanes typiques de produits paraffiniques ainsi que par la présence de composés dérivés de la lignine liés à la structure macromoléculaire et par une faible abondance en composés azotés. Les boues agro-alimentaires se différencient par la présence de sitostérol et cholestérol dans la FOS ainsi que par la présence de pics azotés spécifiques mis en évidence en Py-GC-AED. Les boues domestiques, quant à elles, se

distinguent par des distributions de *n*-alcanes typiques d'une double contribution : pétrolière diffuse et végétale mais aussi par la présence de LABs, de coprostanol et également par la présence d'urée et de caféine dans les FOI.

Ces résultats soulignent une adéquation entre les informations obtenues par l'analyse de la FOS et de la FOI. D'autre part, une relative homogénéité de la composition organique a été mise en évidence au sein des boues de papeterie et agro-alimentaires. Une composition moyenne caractérise la majorité des boues domestiques permettant de définir un fonds géochimique organique avec une contribution de matière organique récente végétale et de matière organique fossile. Cette dernière traduit la présence d'une pollution diffuse dans toutes les boues domestiques par un mélange de produits pétroliers apporté par le lessivage des infrastructures routières. Une certaine variabilité autour de ce fonds géochimique a également pu être mise en évidence pour certaines boues domestiques, sans corrélation avec l'environnement industriel, ni la taille de l'agglomération à laquelle est reliée la station d'épuration. Ces variations sont essentiellement observées au niveau de la FOS et trahissent la présence de pollutions ponctuelles ou accidentelles imputables à des déversements de produits pétroliers raffinés dans le système de collecte des eaux usées domestiques.

Cette étude a mis en évidence que l'analyse des fractions aliphatiques est très prometteuse pour fournir des éléments de réponse quant à la source possible des HPAs. Il est essentiel de poursuivre les investigations dans cette voie, en effectuant des études à l'échelle d'une station d'épuration de taille moyenne en milieu faiblement urbanisé et caractérisée par des teneurs en HPAs importantes telle que la station R2 étudiée dans ce mémoire. A partir d'un réseau d'assainissement de faible envergure et relativement bien connu, le prélèvement d'échantillons d'eaux usées en différents points du réseaux et d'effluents industriels raccordés au réseau doit permettre de mieux comprendre les différentes contributions organiques dans les eaux usées de la station d'épuration et par conséquent celles dans les boues résiduaire. Des analyses moléculaires et des mesures isotopiques du rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  permettraient de définir des paramètres discriminants de l'origine des produits pétroliers et devraient donc fournir des outils d'aide à la gestion d'une station d'épuration.

D'autre part, il paraît important d'analyser les variations temporelles affectant la composition organique des boues d'épuration en réalisant une étude dans une station donnée et en effectuant des prélèvements réguliers à l'échelle d'une année de façon à mieux comprendre les variations saisonnières. Les variations liées aux précipitations importantes

seront particulièrement étudiées de façon à mieux comprendre et à quantifier l'importance de l'apport d'hydrocarbures par les eaux pluviales qu'ils soient d'origine naturelle et anthropique.

Pour faciliter ces investigations futures, il est important de dresser une base de données moléculaires des différents produits pétroliers susceptibles d'être accumulés dans les boues d'épuration (essence, fuel, asphaltes...) ainsi que de leur produits de dégradation pour déterminer avec plus de précision les sources potentielles de pollutions par les produits fossiles dans les boues.

De plus, des améliorations méthodologiques doivent être apportées. Il est essentiel de réaliser un meilleur fractionnement des composés polaires en développant une méthode analytique de séparation soit par poids moléculaire, soit par famille de composés afin de permettre une meilleure analyse chromatographique de ces composés. Ceci pourrait permettre d'explorer de nouvelles voies dans la définition de paramètres moléculaires pertinents caractéristiques de contributions organiques spécifiques.

L'analyse de la FOI doit également être améliorée. D'une part la technique de THM-GC-MS s'est révélée peu satisfaisante pour l'analyse des composés azotés. Peu de composés azotés ont pu être clairement identifiés, alors que les teneurs en azote étaient relativement importantes dans les boues domestiques et les boues agro-alimentaires. Ceci peut être imputé à l'utilisation d'une température de pyrolyse trop importante (620°C) conduisant à la formation de produits secondaires difficiles à relier aux structures des composés initiaux. L'utilisation de température de l'ordre de 300°C pourrait permettre de réduire considérablement la formation de ces produits secondaires. D'autre part, les tendances observées par la méthodologie statistique devront être confirmées en utilisant la THM-GC-AED dans des conditions analytiques similaires à celles de la THM-GC-MS et sur les 48 échantillons prélevés au cours de la thèse.

L'analyse de l'évolution du contenu organique a été effectuée sur deux boues urbaines, U10 et U1, une boue de laiterie, FP1 et une boue de papeterie, PM1. L'aspect novateur de ce travail résidait dans l'étude des échantillons de boues seuls, et également dans l'analyse de l'évolution du contenu organique dans sa globalité (FOS et FOI), alors que généralement les auteurs s'intéressent à des mélanges complexes sol-boues et à l'évolution de micropolluants

organiques spécifiques (HPAs, PCBs...) ou à l'évolution des substances humiques seules sans analyser les transferts possibles d'un compartiment organique à l'autre.

Cette étude nous a permis de déterminer un schéma global réactionnel pour les quatre boues. Au cours de la biodégradation, l'altération de la structure macromoléculaire génère des composés extractibles qui sont eux-mêmes dégradés en composés de plus bas poids moléculaire ou minéralisés en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. Des indices ont permis de quantifier les effets de la biodégradation sur le contenu organique des boues. Les indices les plus pertinents à ce stade de l'étude sont les rapports S/V, C/V, (Ac/Al)<sub>v-s</sub>, LMFA/Σ<sub>AG</sub> qui permettent de quantifier la dégradation de la FOI, et le rapport AG/Σ<sub>stérois</sub> soulignant la dégradation préférentielle des acides gras de la FOS par rapport aux stérois.

L'analyse des modifications du contenu organique par des expériences de biodégradation nous a permis de définir les grandes tendances d'évolution des boues. Cependant, il est nécessaire de poursuivre ce travail afin de mettre en place un schéma réactionnel plus élaboré. En effet, il est encore difficile d'expliquer certaines variations et notamment la quantité de FOI dégradée qui semble dépendre du type de boue. De telles variations pourraient être imputées à des proportions différentes de matière organique réfractaire et non réfractaire et donc directement liée à la nature même de la boue, soit être liées à la présence de métaux lourds dans la boue ou à la présence de matière minérale, l'ensemble pouvant inhiber l'activité bactérienne. Pour préciser ce schéma réactionnel, il est donc essentiel de réaliser tout d'abord des expérimentations avec des fractions plus simples (boues pré-extraites, fractions extractibles seules), puis en compliquant le système en ajoutant des mélanges de minéraux, de métaux lourds, jusqu'à poursuivre vers l'étude de mélanges complexes (sol-boues). D'autre part, il est important de quantifier les composés identifiés et notamment les composés polaires. En effet, le statut de ces composés hydrophobes, complexants et pour certains solubles est rarement déterminé, alors qu'ils ont une influence sur les propriétés des sols telles que la rétention en eau ou la mobilité des éléments traces métalliques. Dans ce sens, une amélioration méthodologique importante serait la mise au point d'un système d'incubation permettant de ne pas perdre la fraction organique la plus volatile des boues au cours des expérimentations.

Deux perspectives essentielles apparaissent donc à l'issue de ce travail. La première d'ordre pratique est de pouvoir proposer à terme des paramètres moléculaires discriminants

permettant de caractériser les différentes contributions organiques et tout particulièrement les produits fossiles qui comportent, pour certains, de fortes concentrations en hydrocarbures polyaromatiques. La seconde perspective plus fondamentale vise à mieux comprendre l'évolution des boues dans un contexte d'épandage en proposant des bilans quantitatifs et à terme un modèle de dégradation de la matière organique des boues.

