



HAL
open science

Devenir des perturbateurs endocriniens HAPs/NP/PCBs au cours de la digestion anaérobie de boues contaminées : rôle de la biodisponibilité et du cométabolisme

Maialen Barret

► **To cite this version:**

Maialen Barret. Devenir des perturbateurs endocriniens HAPs/NP/PCBs au cours de la digestion anaérobie de boues contaminées : rôle de la biodisponibilité et du cométabolisme. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2009. Français. NNT : . tel-02822250

HAL Id: tel-02822250

<https://hal.inrae.fr/tel-02822250>

Submitted on 6 Jun 2020

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.

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

***Discipline : Biotechnologie - Microbiologie
Ecole Doctorale : Sciences des Procédés - Sciences des Aliments***

par

Maialen BARRET

Soutenue le Vendredi 20 Novembre 2009

**Devenir des perturbateurs endocriniens HAPs/NP/PCBs au
cours de la digestion anaérobie de boues contaminées :
rôle de la biodisponibilité et du cométabolisme**

JURY

M. Christof HOLLIGER Professeur associé, EPF Lausanne	, Rapporteur
M. Pierre BENOIT Chercheur, INRA Grignon	, Rapporteur
M. Charles GHOMMIDH Professeur, Univ. Montpellier II	, Examineur
M. Christophe DAGOT Professeur, Univ. Limoges	, Examineur
M^{me} Christelle WISNIEWSKI Professeur, Univ. Montpellier I	, Invitée
M^{me} Marie-Christine DICTOR Ingénieur de Recherche, BRGM Orléans	, Invitée
M^{me} Dominique PATUREAU Directrice de recherche, INRA Narbonne	, Co-directrice de Thèse
M^{me} Hélène CARRERE Directrice de recherche, INRA Narbonne	, Co-directrice de Thèse

RESUME : Cette étude porte sur les mécanismes qui déterminent la biodégradation des HAPs/NP/PCBs au cours de la digestion anaérobie de boues contaminées. Etant admis que les phénomènes de sorption conditionnent la biodisponibilité des HAPs/NP/PCBs envers les microorganismes épurateurs, les transferts de sorption/désorption ont tout d'abord été étudiés. Il a été démontré qu'ils s'opèrent quasi-instantanément, en référence aux cinétiques de biodégradation, et sont réversibles, même après un long temps de contact. Ensuite, une méthodologie a été conçue afin de mesurer les constantes d'équilibre qui déterminent la répartition de HAPs/NP/PCBs entre les trois compartiments de la boue : libre, sorbé à la matière dissoute et colloïdale (DCM), et sorbé aux particules. L'influence des caractéristiques des HAPs/NP/PCBs et des caractéristiques physiques et chimiques des boues sur les constantes d'équilibre a été quantifiée. Les modèles générés ont rendu possible la prédiction de la distribution des HAPs/NP/PCBs entre les trois compartiments, dans 5 digesteurs continus alimentés en différentes boues. La confrontation de cette répartition aux vitesses de dégradation des HAPs a mis en évidence que les HAPs libres mais aussi ceux sorbés à la DCM sont biodisponibles. De plus, la coexistence des influences de la biodisponibilité et du cométabolisme sur la biodégradation des HAPs a été suggérée, de sorte qu'aucun de ces processus ne peut être admis comme l'unique limitation.

TITLE : Fate of endocrine disruptors during the anaerobic digestion of contaminated sewage sludge: involvement of bioavailability and cometabolism

ABSTRACT : This study deals with the mechanisms which determine the biodegradation of PAHs/NP/PCBs during the anaerobic digestion of contaminated sludge. As the bioavailability of micropollutants is widely assumed to be linked to sorption phenomena, these were firstly investigated. It was demonstrated that PAHs sorption/desorption transfers are instantaneous, in comparison to biodegradation kinetics. Moreover, these transfers are reversible, even after a long period of contact between PAHs and sludge. To study the equilibrium state resulting from these transfers, a methodology was designed, considering sludge as a three-compartment matrix. Indeed, micropollutants in sludge can be either free, sorbed-to-DCM (dissolved and colloidal matter) or sorbed-to-particles. The influence of micropollutants characteristics and of physical and chemical sludge characteristics on equilibrium constants was quantified. The subsequent models allowed to predict the distribution of micropollutants between the three compartments within 5 continuous anaerobic digestors, fed with different sludge. The confrontation of compartment distributions to biodegradation rates revealed that both free and sorbed-to-DCM PAHs are bioavailable. Moreover, a shared limitation by bioavailability and by cometabolism flux was stated, suggesting that micropollutants removal is not limited by only one phenomenon.

DISCIPLINE : Biotechnologie – Microbiologie

MOTS-CLES : Biodégradation, hydrocarbures aromatiques polycycliques, hystérésis, méthanisation, micropolluant, nonylphénol, polychlorobiphényles, pré-traitement thermique, sorption, xénobiotique

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : Institut National de Recherche Agronomique – Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (INRA-LBE), UR050, Avenue des Etangs, F-11100 NARBONNE

REMERCIEMENTS

La conduite de trois années de recherche, la rédaction du manuscrit de thèse et des articles associés sont autant d'éléments qui contribuent à ouvrir et façonner une graine de petit chercheur au monde de la recherche. A cet apprentissage scientifique s'ajoute une intense aventure humaine, et c'est aussi pour leur contribution à cette riche expérience personnelle que je souhaite remercier les personnes impliquées.

En premier lieu, ce sont mes encadrantes **Hélène Carrère** et **Dominique Patureau** que je remercie chaleureusement. Merci pour votre accompagnement, votre disponibilité, votre souci de mon bien-être, votre grande confiance, votre soutien dans les moments difficiles et vos encouragements dans les moments forts. Vos contributions étaient complémentaires et complètes : c'est un bien beau tripode que nous avons formé durant trois ans... Merci, Hélène, pour cette mémorable PLS extrêmement touchante, et merci, Domi, pour ces riches échanges que je vais moi aussi profondément regretter !

Je suis reconnaissante envers les deux directeurs qui se sont succédés à la tête du LBE, **Jean-Philippe Delgenès** et **Jean-Philippe Steyer**, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire, pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à ce projet de thèse, et pour avoir veillé à son bon déroulement.

Je remercie aussi les scientifiques du LBE qui m'ont solidement épaulée pour certains volets de ce travail : **Eric Latrille**, le roi du traitement des données, **Jérôme Hamelin**, mon guide en biologie moléculaire, et **Nadine Delgenès**, tu m'as appris et donné tellement plus que du scientifique !... Merci pour votre implication très précieuse, et pour votre patience ! Merci aussi à **Yves Dudal** de l'INRA de Montpellier et **Christelle Wisniewski** de l'Université Montpellier I pour m'avoir offert l'opportunité de collaborer avec leur laboratoire respectif, et ainsi de profiter de leurs savoir-faire et expertise.

Je tiens par ailleurs à exprimer ma gratitude aux membres du jury, **Pr Charles Ghommidh** de l'Université Montpellier II, **Pr Christophe Dagot** de l'Université de Limoges, **Pr Christelle Wisniewski** de l'Université Montpellier I, **Dr Marie-Christine Dictor** du Bureau des Recherches Géologiques et Minières d'Orléans, et plus particulièrement aux rapporteurs **Pr Christof Holliger** de l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne et **Dr Pierre Benoît** de l'INRA de Grignon, pour s'être investis dans l'évaluation de ce travail.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse **Dr Claire Albasi** du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse, **Pr Robert Duran** de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour et **Dr Gaël Plantard** de l'Université de Perpignan Via Domitia pour leur accompagnement au cours des trois années.

Ensuite, je remercie **Amélie Guillon, Aude Ourrouspoure** et **Matthieu Patau** pour avoir consacré leur stage de master à cette thèse. Merci pour votre coup de pouce dans l'avancée du projet, et merci aussi de m'avoir accompagnée dans mes premiers pas d'encadrement !

J'adresse des remerciements très chaleureux à ceux avec qui j'ai partagé mon bureau, et avec qui une complicité particulière s'est forgée au fil du temps, des moments heureux et malheureux : **Mathieu M. , Bruno, Sarah** et **Yano**. Un grand merci aussi à **Magali**, au camarade **Maximo**, à **Père Mottet** et **Père Guendouz**, de la génération « Art Bar », et à **Marie-Laure, Flo, Xin Mei, Juanito, Mathieu L., Romimy, Domi, Jean-Phi, Renaud, Eric T.** et **Marianne** pour tous les moments partagés au-dedans et en-dehors du laboratoire : parties de squash, ski, escalade, repas, soirées... Merci aussi à **Kiki, Diana, Gaëlle, Thierry, Sylvie, Nadine LT, Véronique** et **Annie** pour contribuer à faire flotter cette fameuse bonne humeur dans le LBE...un Lieu de Bien-Etre...

En-dehors de cette sphère LBE, mes amis ont joué un rôle primordial en termes de soutien et d'équilibre : merci à **Polo, Mateo, Che, Jako, Camille, Véro, Charav**, et un encore plus grand merci à mes « compagnonnes de galères » **Camila, Kloé, Emma, Laure, Pauline** et **Emilie** ! Nos rendez-vous annuels de la Crique, du Noël à Surba, du Correfoc à Gérone, de Toques et Clochets et les fêtes à la Mine ont été des moments exceptionnels de partage et d'amitié !

Et bien sûr, je remercie ma famille pour son soutien inconditionnel et ses encouragements.
Merci pour tout, **Claude**...
Et MERCI **Bernard** !

LISTE DES COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS DANS DES JOURNAUX A COMITE DE LECTURE :

Barret, M., Patureau, D., Latrille, E. & Carrère, H. (2009). A three-compartment model for micropollutants sorption in sludge: methodological approach and implication. *Water Research*, In press (DOI: 10.1016/j.watres.2009.08.029).

Barret, M., Carrère, H., Latrille, E., Wisniewski, C. & Patureau, D. (2009). Micropollutants and sludge characterization to model sorption equilibria. *Environmental Science & Technology*, In press (DOI: 10.1021/es902575d).

Barret, M., Carrère, H., Patau, M. & Patureau, D. (2009). Kinetics and reversibility of micropollutants sorption in sludge. *Process Biochemistry*, Submitted.

Barret, M., Cea Barcia, G., Guillon, A., Carrère, H. & Patureau, D. (2009). Influence of feed characteristics on the removal of micropollutants during the anaerobic digestion of contaminated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, Submitted.

Barret, M., Carrère, H., Delgadillo, L. & Patureau, D. (2009). PAH fate during the anaerobic digestion of contaminated sludge: do bioavailability and/or cometabolism limit their biodegradation? *Water Research*, Submitted.

COMMUNICATIONS ORALES :

Barret M., Carrère H., Latrille E., Wisniewski C. & Patureau D. (2009). A three-compartment model for contaminants adsorption in sludge. *2nd International Conference on Occurrence, Fate, Effects and Analysis of Emerging Contaminants in the Environment* . 4-7th, August. Fort Collins, Colorado.

Barret, M., Patureau, D., Latrille, E. & Carrère, H. (2009). A methodological approach to study xenobiotics adsorption in sludge. *International Conference on Xenobiotics in the Urban Water Cycle*, 11-13th, March. Paphos, Cyprus.

Barret M., Carrère H. & Patureau D. (2009). Réactivité des compartiments de matière organique des boues d'épuration envers les Composés Trace Organiques : Adsorption. *Séminaire du Réseau Matières Organiques de l'INRA*. 25-28th, January. Sainte-Maxime, France.

LISTE DES ABREVIATIONS

EN FRANÇAIS (EN ANGLAIS SI DIFFÉRENT)

AGV (VFA) : acide gras volatile

Ant : Anthracène

ASS : boue contaminée en HAP/NP/PCB
vieille au laboratoire

B_aA : benzo(a)anthracène

B_aP : benzo(a)pyrène

B_bF : benzo(b)fluoranthène

BES : bromoéthane sulfonate

B_{ghi}P : benzo(g,h,i)perylène

B_kF : benzo(k)fluoranthène

BP : biphényle

C_{aqu} : concentration de CTO en phase
aqueuse (par unité de volume)

C_{bio} : concentration de CTO biodisponibles
(par unité de volume)

C_{DCM} : concentration de CTO sorbés à la
DCM

Chr : chrysène

C_{in} : concentration dans l'alimentation d'un
réacteur

C_{libre} (C_{free}) : concentration de CTO libres,
strictement dissous (par volume)

CO (OC) : carbone organique

C_{out} : concentration en sortie de réacteur

C_{part} : concentration de CTO sorbés aux
particules

CSS : boue secondaire très forte charge
mélangée à de la cellulose

CTO : composé trace organique

C_{tot} : concentration totale de CTO

D_a : dalton

DBA : dibenzo(a,h)anthracène

DCM : matière dissoute et colloïdale

DCO (COD) : demande chimique en
oxygène

DCOC : carbone organique sous forme
dissoute/colloïdale

DSS : boue SS digérée en conditions
anaérobie thermophile au laboratoire

F_{lu} : fluorène

Fluora : fluoranthène

G_{lu} : glucose

HAP (PAH) : hydrocarbure aromatique
polycyclique

I_{nd} : indeno(1,2,3,c,d)pyrène

K_{DCM} : constante d'équilibre de sorption à la DCM (unité de volume/unité de masse de DCM)

K_{global} : coefficient de partage des CTO entre phase aqueuse et particules (unité de volume/unité de masse de particules)

K_{ow} : coefficient de partage entre octanol et eau (hydrophobicité)

K_{PAH} : vitesse spécifique maximale de biodégradation d'un HAP

K_{PAH} : constante de demi-saturation du métabolisme d'un HAP dans le formalisme de Monod

K_{part} : constante d'équilibre de sorption aux particules (unité de volume/unité de masse de particules)

K_{partition} : synonyme de K_{global}

M : masse molaire

MEEP (PEEM) : matières extractibles à l'éther de pétrole

MO (OM) : matières organiques

MS (DM) : matières sèches englobant la matière dissoute et colloïdale et les particules

MV (VM) : matières volatiles, synonyme de MO

n_{5c} : nombre de cycles à 5 atomes de carbone

n_{6c} : nombre de cycles à 6 atomes de carbone

n_{Cl} : nombre d'atomes de chlore

n_{OH} : nombre de substituant hydroxyles

NP : nonylphénol

P_{art} : particules

PCB : polychlorobiphényle

Phe : phénanthrène

PLS : méthode de régression linéaire à variables multiples, selon les moindres carrés

POC : carbone organique particulaire

PS : boue primaire issue de la station d'épuration de Muret

Pyr : pyrène

Q : débit d'alimentation d'un réacteur

r_{DM} : vitesse de biodégradation de la matière sèche

r_{PAH} : vitesse de biodégradation d'un HAP

rpm : rotation par minute

r_S : vitesse de biodégradation du substrat de croissance S

ρ_{min} : densité de la matière minérale

ρ_{org} : densité de la matière organique

ρ_{tot} : densité de la matière totale

S : solubilité dans l'eau à 25°C

SAB (BSA) : serum d'albumine bovine

SS : boue secondaire très forte charge issue de la station d'épuration de Cergy-Pontoise

STEP (WWTP) : station d'épuration

SupSS : boue secondaire supplémentée en matière dissoute et colloïdale

T_{PAH,S} : capacité de transformation d'un HAP par cométabolisme avec un substrat de croissance S (masse de HAP / masse de S)

TSH : temps de séjour hydraulique

TTDSS : boue SS traitée thermiquement puis digérée en condition anaérobie thermophile au laboratoire

TTPS : boue PS traitée thermiquement

TTSS : boue SS traitée thermiquement

V : volume réactionnel du réacteur

X : concentration en biomasse

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
---------------------------	----------

I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
---	----------

I.1 Les boues d'épuration et leur méthanisation	6
--	----------

I.1.1 Fonctionnement d'une station d'épuration : production des boues	6
I.1.2 Caractéristiques des boues générées	8
I.1.2.1 Types de boues	8
I.1.2.2 Structure macroscopique	8
I.1.2.3 Composition chimique	10
I.1.3 Le traitement des boues d'épuration par digestion anaérobie	11
I.1.3.1 Positionnement de la digestion anaérobie dans le devenir des boues d'épuration	11
I.1.3.2 Le processus de digestion anaérobie	13
I.1.3.3 Pré-traitements visant à améliorer les performances de la digestion anaérobie	16

I.2 Les perturbateurs endocriniens	17
---	-----------

I.2.1 Le système endocrinien	17
I.2.2 Définition des perturbateurs endocriniens	17
I.2.3 Exemples de mécanismes d'action et effets	17
I.2.4 Les composés perturbateurs endocriniens étudiés	18
I.2.4.1 Le nonylphénol	18
I.2.4.2 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	20
I.2.4.3 Les PolyChloroBiphényles	21
I.2.5 Devenir des HAPs/NP/PCBs dans les STEP s et positionnement du couplage pré-traitement thermique/méthanisation	22

I.3 Processus biologiques impliqués dans la biodégradation des HAPs/NP/PCBs au cours de la méthanisation	26
---	-----------

I.3.1 Déhalogénéation réductrice	26
I.3.1.1 Mécanisme	26
I.3.1.2 Acteurs	27
I.3.2 Biodégradation des molécules aromatiques HAPs/NP/BP	30
I.3.2.1 Mécanismes	30
I.3.2.2 Acteurs	34
I.3.3 Syntrophie	36
I.3.4 Cométabolisme	37
I.3.5 Accepteur final d'électrons	39

I.4 Processus physico-chimiques : sorption des HAPs/NP/PCBs dans les boues 41	
--	--

I.4.1 Phénomènes de sorption	41
I.4.1.1 Considérations thermodynamiques générales	41

I.4.1.2	Sorption aux particules	42
I.4.1.3	Sorption à la matière dissoute et colloïdale	46
I.4.1.4	Méthodologies de mesure des phénomènes de sorption.....	47
I.4.1.5	Influence des caractéristiques des boues et des CTOs sur les phénomènes de sorption	48
I.4.1.6	Influence de la compétition inter-CTOs sur les phénomènes de sorption	51
I.4.1.7	Influence des conditions opératoires sur les phénomènes de sorption.....	52
I.4.2	Impact des phénomènes de sorption sur le devenir des CTOs : biodisponibilité, bioaccessibilité et séquestration	53
I.4.2.1	Définitions	53
I.4.2.2	Méthodes de quantification de la bioaccessibilité	57
I.5	Conclusions	61

II MATERIEL & METHODES..... 65

II.1 Echantillons de boues d'épuration..... 66

II.2 Dispositifs expérimentaux..... 67

II.2.1	Standardisation des boues par dopage en CTOs	67
II.2.2	Traitement thermique des boues	67
II.2.3	Etude des phénomènes de sorption dans les boues	68
II.2.3.1	Cinétique	68
II.2.3.2	Equations d'équilibre et de partage dans le système tri-compartiment	69
II.2.3.3	Linéarité des équations d'équilibre.....	69
II.2.3.4	Effets de compétition inter-CTO sur l'équilibre.....	69
II.2.3.5	Hystérésis : comparaison des équilibres de sorption et de désorption, et effet du temps de contact.....	69
II.2.3.6	Détermination de K_{part} et K_{DCM}	70
II.2.4	Digestion anaérobie des boues contaminées	72
II.2.4.1	Mode batch.....	72
II.2.4.2	Mode semi-continu	72

II.3 Méthodes analytiques..... 74

II.3.1	Préparation des échantillons.....	74
II.3.1.1	Séparation particules / phase aqueuse.....	74
II.3.1.2	Lyophilisation	74
II.3.1.3	Broyage	74
II.3.2	Analyse des boues.....	74
II.3.2.1	Caractérisation chimique.....	74
II.3.2.2	Caractérisation physique	77
II.3.3	Analyse des HAPs/NP/PCBs	78
II.3.3.1	Extraction des HAPs/NP/PCBs en phase solide.....	78
II.3.3.2	Extraction de HAPs/NP/PCBs en phase liquide	78
II.3.3.3	Extraction de HAPs/NP/PCBs fixés sur cartouche ORBO	78
II.3.3.4	Quantification des HAPs/NP/PCBs dans les extraits	79
II.3.4	Analyse du biogaz	81

II.3.5	Détection du gène <i>bssA</i> dans les boues	81
II.3.5.1	Echantillonnage.....	81
II.3.5.2	Extraction de l'ADN génomique	81
II.3.5.3	Amplification de l'ADNr 16S.....	82
II.3.5.4	Conception du système d'amorces pour la détection du gène <i>bssA</i>	82
II.3.5.5	Amplification du gène <i>bssA</i>	83
II.4	Outils d'analyse des données	83
II.4.1	Calcul d'abattements en réacteurs.....	83
II.4.1.1	Méthode 1	83
II.4.1.2	Méthode 2	84
II.4.2	ANOVA	85
II.4.3	Régression linéaire multivariée par PLS.....	85
II.4.4	Régression non linéaire.....	86
III	MODELE de SORPTION des HAPs/NP/PCBs dans les BOUES	87
III.1	Identification des paramètres de sorption à intégrer au modèle.....	88
III.1.1	Avant-propos	88
	KINETICS AND REVERSIBILITY OF MICROPOLLUTANTS SORPTION IN SLUDGE.....	90
III.1.1.1	Introduction	90
III.1.1.2	Material and Method.....	92
III.1.1.3	Results and discussion	93
III.1.1.4	Conclusion	96
III.1.2	Discussion.....	96
III.2	Mise au point et validation d'un protocole de détermination des constantes d'équilibre K_{part} et K_{DCM}	99
III.2.1	Avant-propos	99
	A THREE-COMPARTMENT MODEL FOR MICROPOLLUTANTS SORPTION IN SLUDGE: METHODOLOGICAL APPROACH AND INSIGHTS	101
III.2.1.1	Introduction	101
III.2.1.2	Materials and Methods.....	103
III.2.1.3	Results and discussion	106
III.2.1.4	Conclusions.....	113
III.2.2	Discussion.....	113
III.3	Modèle de sorption en fonction des caractéristiques des CTOs et des boues : vers la prédiction.....	116
III.3.1	Avant-propos	116
	SLUDGE AND MICROPOLLUTANTS CHARACTERIZATION TO MODEL THE SORPTION EQUILIBRIA	117
III.3.1.1	Introduction	118
III.3.1.2	Experimental section	119
III.3.1.3	Results & Discussion.....	122
III.3.1.4	Supporting information	129
III.3.2	Discussion.....	132

IV	METHANISATION de BOUES CONTAMINEES en HAPs/NP/PCBs.....	143
IV.1	Avant-propos	144
IV.2	De la difficulté de quantifier les pertes abiotiques	145
IV.2.1	Tests en batch avec NaN ₃ et à pH 2	146
IV.2.2	Réacteurs continus avec NaN ₃ et à pH 2	148
IV.2.3	Stabilisation de la matrice dopée : réacteur bi-étagé.....	151
IV.3	Approche « boîte noire » : prédiction du devenir des HAPs/NP/PCBs à partir de l'entrant	153
	INFLUENCE OF FEED CHARACTERISTICS ON MICROPOLLUTANTS REMOVAL DURING THE ANAEROBIC DIGESTION OF CONTAMINATED SLUDGE	153
IV.3.1	Introduction	153
IV.3.2	Experimental section	155
IV.3.3	Results and discussion	157
IV.3.4	Conclusion	165
IV.4	Approche intégrée	166
IV.4.1	Etude du potentiel microbiologique.....	166
IV.4.2	Biodisponibilité et cométabolisme	171
	PAHs FATE DURING THE ANAEROBIC DIGESTION OF CONTAMINATED SLUDGE : DO BIOAVAILABILITY OR COMETABOLISM LIMIT THEIR REMOVAL ?	171
IV.4.2.1	Introduction	172
IV.4.2.2	Materials and Methods.....	174
IV.4.2.3	Results and discussion	176
IV.4.2.4	Conclusion	185
IV.5	Discussion.....	186
V	CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	193
VI	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	199
	LISTE DES FIGURES	223
	LISTE DES TABLEAUX.....	227

INTRODUCTION

Les connaissances acquises dans le domaine de la chimie ont permis d'accomplir une multitude de miracles quotidiens. Des composés peuvent être synthétisés qui permettent aujourd'hui à l'Homme de contrôler les naissances (hormone contraceptive), de soigner certaines maladies (anti-cancéreux, anti-épileptique), d'augmenter la productivité de ses ressources alimentaires animales et végétales (antibiotiques, pesticides), d'en faciliter la consommation en transformant ces ressources, en les conservant et en les emballant (conservateurs, plastifiants), de développer un minimum d'efforts pour entretenir son foyer (détergents)... L'utilisation-même de ces composés, s'additionnant entre autres aux activités liées à leur production, à la génération d'énergie et au transport, induisent leur introduction et celle de leurs métabolites dans l'environnement, de façon directe, ou bien via les rejets de station d'épuration lorsqu'ils n'y sont pas entièrement éliminés (Figure 0-1).

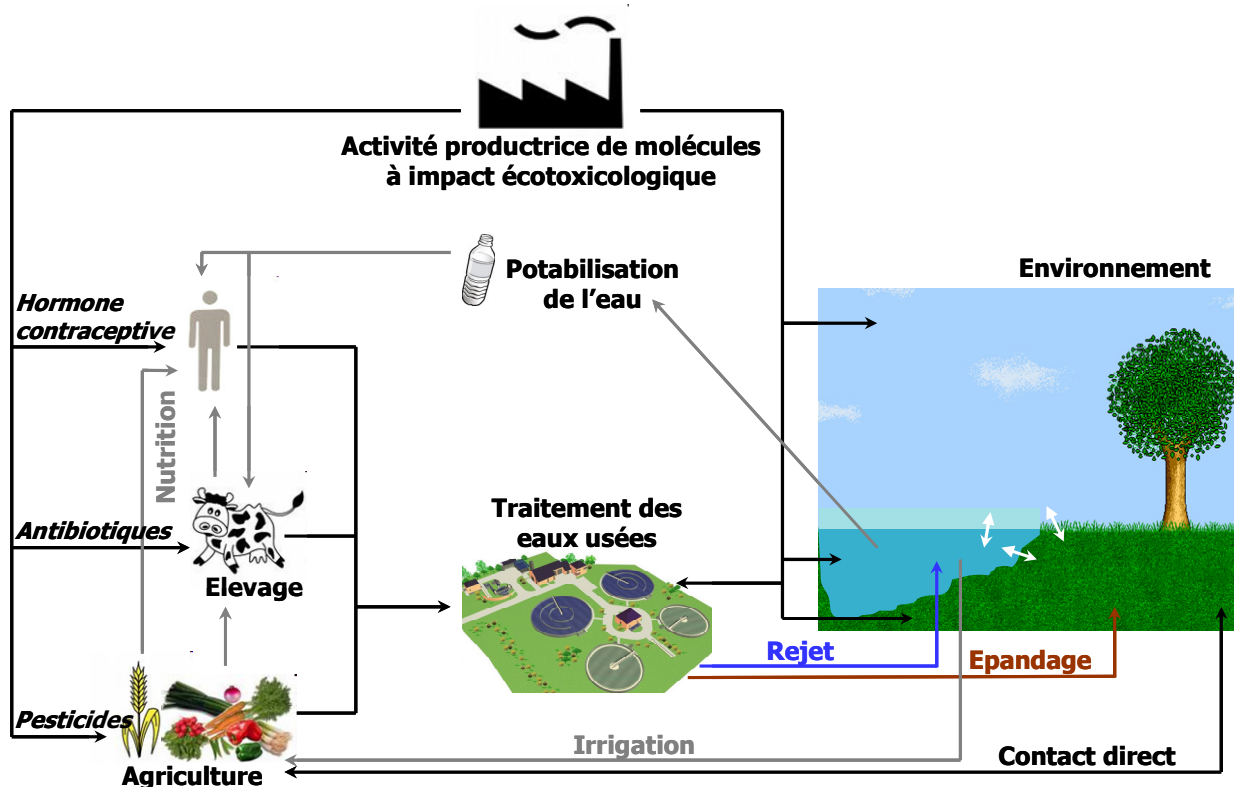


Figure 0-1 : Principales sources et voies de dissémination de molécules à impact écotoxicologique (exemples en italique).

Une fois introduits dans l'environnement, que ce soit par le compartiment atmosphérique, hydrosphérique ou géosphérique, ces composés sont disséminés au sein de ce compartiment mais aussi dans les autres compartiments. La faible capacité de rémédiation des milieux récepteurs peut entraîner l'accumulation des toxiques. Ainsi, les organismes qui habitent ces écosystèmes et en utilisent les ressources y sont exposés. Malgré leur très faible concentration dans ces milieux, certains composés peuvent provoquer un impact écotoxicologique important. Par exemple, de nombreuses études ont démontré que les rejets d'hormones contraceptives dans les eaux de surface peuvent induire la féminisation de poissons. De telles manifestations de la perturbation avérée du système endocrinien,

provoquant des problèmes de reproduction, placent les molécules responsables de cette forme de toxicité (les perturbateurs endocriniens) comme prioritaires dans les recherches en écotoxicologie.

Face à ce problème environnemental de taille, une réduction de la pollution à la source doit être envisagée. Cependant, les changements que cela implique sont considérables, et les efforts entrepris pour mener à bien cette stratégie préventive ne sont pas suffisants.

Si une réduction à la source est difficilement réalisable, les stations d'épuration des eaux usées apparaissent comme le maillon clé dans la chaîne de dissémination : elles occupent une position centrale dans le tableau dépeint en Figure 0-1. En tant que point de convergence, elles sont la cible privilégiée de la stratégie « curative ».

Les systèmes d'épuration sont aussi pointés par la problématique de gestion des boues urbaines. Les systèmes de traitement font face à des quantités d'effluents qui ne cessent d'augmenter, du fait de la croissance de la population et des activités. Leur fonctionnement génère donc des quantités croissantes de boue. Ainsi, la quantité de boues produites en France est passée de 850 000 tonnes de matières sèches en 1999 à 1 million de tonnes en 2005. Au niveau Européen, la production annuelle est passée de 5,5 millions de tonnes en 1992 à 9 millions de tonnes en 2005. Des solutions technologiques doivent donc être apportées pour traiter et éliminer ces boues.

Par ailleurs, l'approvisionnement durable en énergie constitue un enjeu majeur dans le contexte actuel d'épuisement des ressources fossiles et de besoins croissants.

Le procédé de digestion anaérobie des boues d'épuration se trouve à l'interface des trois problématiques précédemment évoquées : il permet (i) une réduction de la quantité de matière contenue dans les boues, (ii) une production d'énergie renouvelable sous forme de biogaz et (iii) une élimination partielle des perturbateurs endocriniens qui se concentrent dans les boues.

Dans ce contexte, les travaux de cette thèse seront concentrés sur le procédé de digestion anaérobie des boues d'épuration, et focalisés sur le devenir de perturbateurs endocriniens qui contaminent ces boues. L'objectif général de cette thèse est de développer une démarche d'ouverture de la boîte noire qui caractérise la manière dont ce procédé est actuellement appréhendé vis-à-vis du devenir des perturbateurs endocriniens. Les questions scientifiques liées à cet objectif seront précisées à l'issue de la synthèse bibliographique exposée dans le paragraphe I de ce manuscrit.

Le matériel et les méthodes employées pour répondre à ces questionnements et approfondir les connaissances sur les mécanismes qui conditionnent le devenir des perturbateurs endocriniens seront détaillés dans le paragraphe II.

Le mécanisme principalement étudié sera la biodisponibilité. Afin d'établir le lien entre les états des perturbateurs endocriniens dans les boues (libres ou sorbés) et leur biodisponibilité, les phénomènes de sorption seront dans un premier temps étudiés. Les résultats obtenus feront l'objet du premier chapitre de résultats (paragraphe III). Ces résultats seront exploités par la suite pour étudier le devenir de perturbateurs endocriniens

au cours de la digestion anaérobie de boues d'épuration (paragraphe IV). Dans ce deuxième chapitre de résultats, deux approches seront opposées. Les limites de la première approche dite « boîte noire » seront pointées, et la nécessité d'une approche plus mécanistique sera soulignée. Celle-ci sera donc développée, pour parvenir à intégrer et caractériser deux mécanismes : biodisponibilité et cométabolisme.

Ces travaux ont donc pour but d'améliorer notre compréhension des processus déterminants le devenir des perturbateurs endocriniens. Ils permettront une prédiction plus fiable du comportement des perturbateurs endocriniens, pour tendre *in fine* vers l'optimisation des systèmes d'épuration et la réduction de la dissémination de ces molécules toxiques dans l'environnement.

Les résultats obtenus seront présentés sous le format de leur valorisation par publication. Afin de rendre la lecture du manuscrit la plus fluide possible, les chapitres ainsi formatés seront brièvement introduits par un avant-propos, et seront succédés par une discussion plus approfondie que celle apparaissant dans l'article-même.

Ces recherches ont été menées au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRA à Narbonne, au sein de l'équipe d'Ingénierie des Procédés, et s'inscrivent dans l'objet thématique centré sur les Composés Minoritaires. L'appui du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, au travers d'une bourse de thèse, a permis la réalisation de cette thèse. L'Institut Languedocien de recherche sur l'Eau et l'Environnement (IFR 123) a par ailleurs contribué au financement de ces recherches.

I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Afin de replacer ce projet de thèse dans son contexte, la problématique de gestion des boues d'épuration ainsi que le positionnement du procédé de méthanisation face à cette problématique seront tout d'abord détaillés dans cette synthèse bibliographique.

Ensuite, après présentation du processus de perturbation endocrinienne et des molécules présentant cet effet toxique qui ont été sélectionnées pour l'étude, leur concentration depuis les effluents vers les boues sera évoquée.

Enfin, un état de l'art sur les connaissances acquises au sujet du devenir de ces molécules présentes dans les boues d'épuration au cours de leur méthanisation sera présenté. Pour cela, les processus biologiques et les processus physico-chimiques jouant tous deux un rôle déterminant seront distingués.

Cette synthèse bibliographique aboutira à la définition plus précise des objectifs fixés pour ce projet de recherche de trois années.

I.1 Les boues d'épuration et leur méthanisation

I.1.1 Fonctionnement d'une station d'épuration : production des boues

Les eaux usées produites par les activités domestiques et industrielles sont acheminées vers les stations d'épuration afin d'être traitées. Ce traitement consiste à réduire la charge en matières organiques et minérales d'un effluent liquide, par transfert depuis la phase liquide affluente vers une phase solide (boue) et une phase gazeuse (émission de CO₂ essentiellement).

La première phase d'épuration consiste en un pré-traitement qui vise à éliminer les plus grosses particules en suspension de manière physique. Il peut se décliner en différentes opérations unitaires successives telles que dégrillage, dessablage et déshuilage (Figure I-1). Les résidus ainsi séparés sont traités séparément.

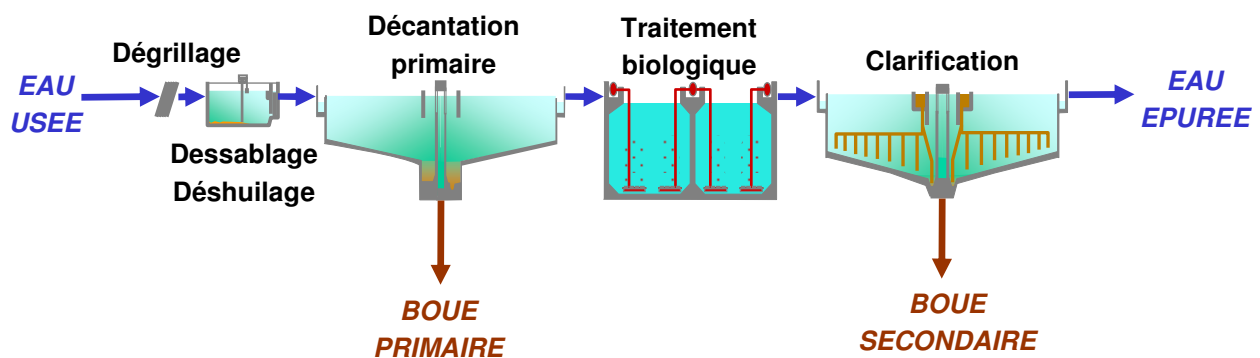


Figure I-1: Schéma de station d'épuration traditionnelle.

Le traitement primaire permet de récupérer par décantation une partie des particules non retenues lors du pré-traitement. En fond de décanteur se trouvent les boues primaires, de composition fortement organique. Cette étape est facultative, et la tendance actuelle est de l'occulter dans les stations d'épuration (STEPS) de construction récente ou de petite taille.

La phase suivante, le traitement secondaire, est une épuration biologique durant laquelle le consortium de microorganismes présents dans le réacteur dégrade la matière organique qui constitue une source de carbone et d'énergie. L'activité globale de l'écosystème conduit à l'incorporation d'une partie de la matière épurée sous forme de biomasse et à la minéralisation d'une autre partie. Un changement de phase s'opère donc : la matière organique consommée dans la phase liquide est en partie transférée à la fraction solide et à la phase gazeuse.

Deux modes de conduite peuvent être adoptés pour le traitement secondaire durant lequel une partie de la matière est minéralisée : (1) le mode **aérobie** implique l'utilisation d'oxygène comme accepteur d'électrons, (2) en anaérobiose, la matière organique peut être

oxydée grâce à des accepteurs d'électrons inorganiques telles que les ions nitrates, sulfates ou le dioxyde de carbone (Figure I-2), ou bien via un métabolisme fermentaire.

Les caractéristiques intrinsèques des populations microbiennes impliquées dans le métabolisme anaérobie, à savoir de faibles rendements et vitesses de croissance, ont constitué une limitation majeure au développement de ce mode de traitement. Toutefois, l'augmentation du coût énergétique lié à l'aération et la prise de conscience des problématiques environnementales ont favorisé les recherches sur la digestion anaérobie / méthanisation pour la production d'énergie sous forme de méthane. Une meilleure compréhension du processus microbiologique a été atteinte et des avancées technologiques (immobilisation de la biomasse) réalisées, de sorte que la position du traitement anaérobie face au traitement aérobie a été reconsidérée. Mais le traitement anaérobie ne peut s'avérer rentable sur des effluents dilués tels que les effluents urbains. En effet, la régulation de la température s'avère très coûteuse en énergie et la part perdue de méthane dissous dans la phase liquide est trop importante par rapport au méthane valorisable, récupéré sous forme gazeuse (Gijzen, 2001).

L'introduction de nouvelles normes plus strictes quant à la teneur en azote et phosphore des effluents rejetés a conduit à la combinaison des deux procédés. Les technologies les plus évoluées s'appuient sur la génération de phases aérobies, anoxiques et anaérobies au sein du même système. Mais dans la grande majorité des cas, le traitement secondaire se déroule en aérobiose.

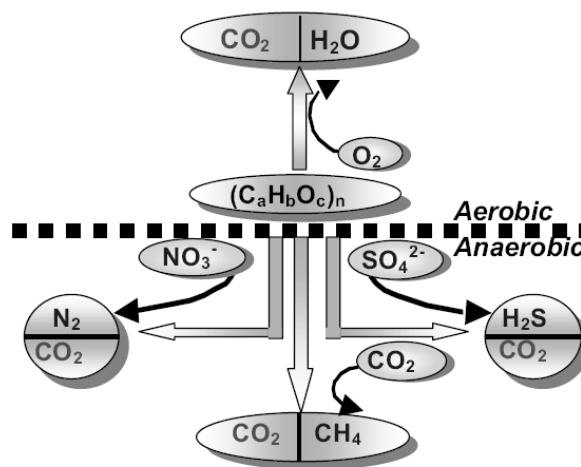


Figure I-2 : Voies de minéralisation de la matière organique en présence de différents accepteurs d'électrons (Gijzen, 2001).

Grâce au clarificateur, les boues secondaires ou boues activées (suspension de biomasse et matière réfractaire à l'épuration biologique) sont séparées de l'eau traitée par décantation. La phase liquide est alors soit dirigée vers un traitement tertiaire (non mentionné sur la Figure I-1), dont l'objectif principal est de traiter le phosphore, soit rejetée directement dans le milieu naturel. Une partie du flux de boues secondaires peut être recyclée dans le bassin de traitement biologique.

I.1.2 Caractéristiques des boues générées

I.1.2.1 Types de boues

Le fonctionnement d'une STEP telle que précédemment décrite génère trois types de boues :
Les boues primaires : Issues du traitement primaire par simple décantation, elles n'ont pas subi de digestion. Elles sont donc fraîches et fortement fermentescibles.

Les boues secondaires : Soutirées au niveau du clarificateur, elles assurent le rôle de purge du traitement secondaire. Elles sont donc composées majoritairement de biomasse et de matière réfractaire à la biodégradation aérobie. Leur pouvoir fermentescible dépend de leur temps de séjour dans le bassin aéré.

Les boues mixtes : Elles sont obtenues par mélange de boues primaires et secondaires, et présentent donc un caractère fermentescible marqué.

I.1.2.2 Structure macroscopique

En tant que matrices biologiques, les boues contiennent de nombreux microorganismes : essentiellement des bactéries à raison de 10^{12} à 10^{13} bactéries/g, dont 80% sont actives (Nielsen *et al.*, 2004), mais aussi des protozoaires et des champignons. Mais cette part vivante représente seulement 5 à 20% de la matière totale. Les 80 à 95% restants sont constitués de matières organiques et minérales extracellulaires (Nielsen *et al.*, 2004). Le mélange complexe que constituent les boues donne lieu à une structuration en amas de cellules et matières extracellulaires qui adoptent une géométrie fractale à deux dimensions ou plus (Figure I-3). En effet, un premier niveau d'observation révèle l'organisation en floccs de l'ordre de 50 à 100 μm de diamètre (Andreadakis, 1993), de 60 % de porosité et avec un diamètre de pores de l'ordre de 10 μm (Chu & Lee, 2004). A une échelle inférieure, les microflocs, beaucoup plus denses, peuvent être distingués. La taille de pore de 4 μm marque la transition entre les deux dimensions fractales floccs/microflocs (Chu & Lee, 2004).

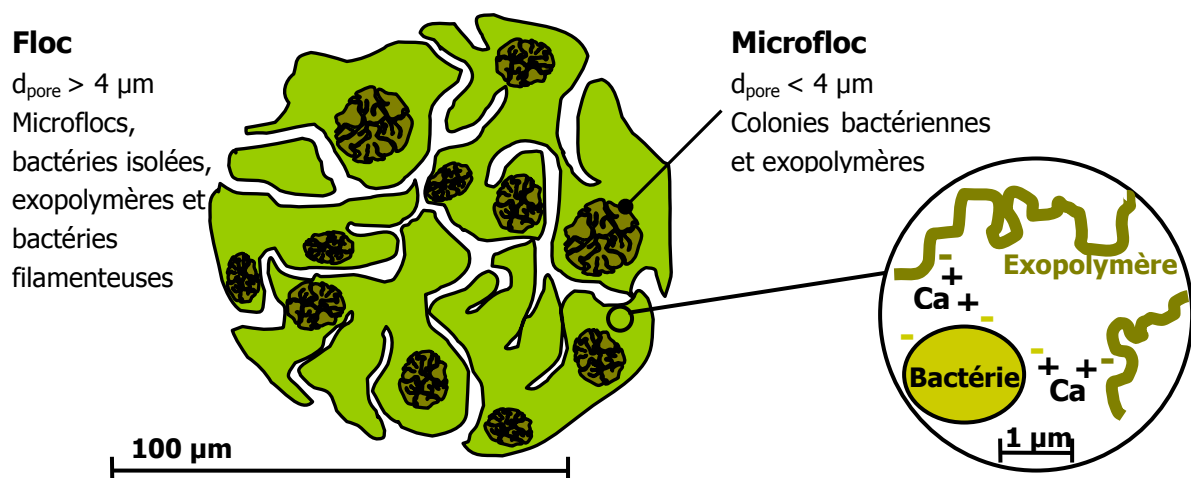


Figure I-3 : Structuration des floccs dans les boues.

Les bactéries filamenteuses contribuent à structurer les floccs, mais ce sont essentiellement les interactions entre microorganismes, exopolymères et ions métalliques qui permettent la mise en place de cette structuration. Les interactions sont de nature électrostatique : les cations tels que Ca^{2+} ou Mg^{2+} forment des ponts entre surface microbienne et exopolymères chargés négativement (Figure I-3), de façon à générer un réseau structurant.

Les exopolymères proviennent de deux origines différentes :

Origine endogène : ils sont sécrétés durant l'activité microbienne d'épuration, ou libérés par lyse cellulaire. Ces polymères sont majoritairement composés de protéines et de polysaccharides (Sponza, 2003), mais aussi de lipides, acides nucléiques et substances humiques (Nielsen *et al.*, 2004). Ils peuvent jouer un rôle de barrière protectrice vis-à-vis de certains toxiques (Henriques & Love, 2007)

Origine exogène : L'effluent lui-même peut contenir des polymères tels que de la cellulose et des acides humiques. Par ailleurs, l'exploitant d'une STEP peut être amené à introduire artificiellement des polymères afin de faciliter la floculation et donc la séparation par décantation.

La **structure macroscopique** des floccs au sein des boues varie en terme de morphologie, taille, porosité, tortuosité, masse volumique... Ces variations s'expliquent par de nombreux paramètres tels que la composition de l'effluent, son temps de séjour au sein du bassin d'aération, l'âge des boues, et la charge en substrat (Nielsen *et al.*, 2004). Par exemple, une boue âgée aura connu une importante lyse cellulaire, et par conséquent contiendra une forte concentration en exopolymères endogènes. Elle sera donc caractérisée par une taille de floccs beaucoup plus importante qu'une boue jeune.

Les propriétés physiques des floccs auront bien sûr un impact sur le procédé d'épuration, notamment sur les étapes de séparation gravitaire.

Ces floccs constituent la **phase particulaire**, ou matière en suspension, de la boue. La matière non particulaire peut faire partie de deux autres compartiments structurels de la boue : le compartiment colloïdal ou le compartiment soluble.

Les **colloïdes** sont des solides très finement divisés, caractérisés par une surface spécifique très importante et une charge électrostatique généralement négative qui s'accumule à l'interface avec le solvant eau (Degrémont, 1989). La phase colloïdale est donc un état intermédiaire entre phase particulaire et phase soluble.

La distinction entre ces trois compartiments est très délicate. Elle est liée à la stabilité des entités dans l'eau et à leur vitesse de décantation : l'ordre de grandeur du temps nécessaire pour parcourir un mètre d'eau sous l'effet de la gravité est de quelques heures pour les matières en suspension, et de quelques jours à des années pour les colloïdes. Le critère pratique de distinction le plus communément admis est la taille, en référence aux diamètres de pores des filtres et membranes utilisés pour la séparation (Figure I-4). En revanche, les grandeurs D_1 et D_2 qui délimitent les compartiments varient considérablement selon les sources : 10 nm et 5 μm (Degrémont, 2005), 0,5 nm et 500 nm (Degrémont, 1989), 1 nm et 1 μm (McCarthy & Zachara, 1989)... La norme NBN EN 872, spécifique à la caractérisation des eaux usées, préconise la filtration sur fibre de verre à seuil de coupure 1,2 μm pour la détermination des matières en suspension ($D_2=1,2 \mu\text{m}$). Les entités inférieures à 1,2 μm des

boues sont communément englobées dans un même groupe, bien souvent nommé « matière dissoute » même s'il contient aussi des colloïdes. Ce regroupement se justifie par le fait que les colloïdes et la matière dissoute ont un comportement proche, comparativement aux particules, en termes de mobilité notamment.

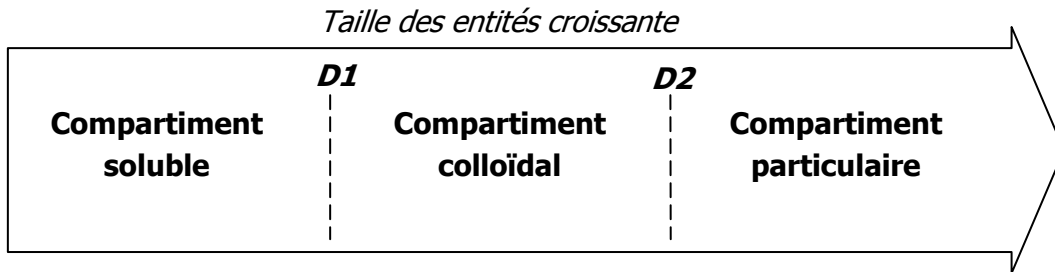


Figure I-4 : Répartition des entités dans les compartiments soluble / colloïdal / particulaire selon leur taille.

I.1.2.3 Composition chimique

La teneur en eau des boues avoisine généralement 95%. La matière organique représente environ 75 à 85% de la matière sèche totale. Elle englobe les protéines, lipides, glucides, acides nucléiques et autres acides organiques qui composent les microorganismes et la matière extracellulaire des boues, en proportions variables.

Ensuite, les boues urbaines contiennent trois nutriments essentiels sous forme organique ou bien minérale : azote, phosphore et potassium mais aussi du calcium, du magnésium et d'autres oligo-éléments. En revanche, elles contiennent aussi des composés indésirables car toxiques : les éléments traces métalliques (ETMs) et les composés traces organiques (CTOs). Les concentrations en ETM (chrome, cuivre, plomb, cadmium, mercure, etc) dans les boues varient considérablement en fonction de l'origine de l'effluent traité. Il apparaît aussi de fortes disparités entre ETM, avec par exemple des concentrations typiques en mercure inférieure à 1 mg/kg_{MS} alors qu'en zinc elles dépassent les 100 mg/kg_{MS}.

Les CTOs sont des composés organiques présents en très faibles quantités mais présentant un risque écotoxicologique important. Ils sont aussi nommés xénobiotiques, micropolluants organiques, polluants organiques persistants (POPs)... Les CTOs comprennent notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles, pesticides, dioxines, furanes, dérivés de détergents, plastifiants, hormones naturelles et synthétiques, etc... Globalement, les CTOs présentent une importante résistance à la biodégradation et une forte tendance à l'accumulation (Byrns, 2001). Leur concentration dans les boues varie fortement d'un composé à l'autre : de 0,1 mg/kg_{MS} environ pour les polychlorobiphényles (Katsoyiannis & Samara, 2004) à 100 mg/kg_{MS} pour le nonylphénol (Ghanem *et al.*, 2007).

I.1.3 Le traitement des boues d'épuration par digestion anaérobie

I.1.3.1 Positionnement de la digestion anaérobie dans le devenir des boues d'épuration

I.1.3.1.1 Traitements appliqués aux boues

Les boues collectées en sortie de STEP, décrites dans le paragraphe I.1.2, subissent différents traitements avant de pouvoir être valorisées ou « éliminées ». Cette étape de traitement permet d'atteindre trois objectifs majeurs : la réduction du pouvoir fermentescible, la réduction de la masse des boues, et la réduction du risque sanitaire.

La ligne générale de traitement se décline en **quatre étapes** :

L'épaississement : Afin de faciliter les étapes en aval dans la filière, il est intéressant de concentrer les boues. Cette opération est généralement effectuée par décantation gravitaire ou par flottation, ou bien par égouttage et centrifugation et permet d'atteindre une siccité de l'ordre de 1 à 10%. L'eau retirée est recyclée en tête de station.

La stabilisation : Cette étape permet de réduire le pouvoir fermentescible des boues, et par conséquent, leur potentialité de nuisances olfactives. Trois stratégies de procédés peuvent être mises en œuvre : biologique, chimique, ou physique. La voie biologique (digestion aérobie, anaérobie ou compostage) conduit à une dégradation de la matière organique (selon le principe détaillé en Figure I-2), et donc à une réduction de la quantité de matière. En revanche, les méthodes chimiques (chaulage, oxydation, stabilisation aux nitrites) et physique (séchage poussé) bloquent les activités microbiennes, sans diminuer la quantité de matière, voire même en l'augmentant dans les cas où il y a ajout de matière (chaulage, par exemple).

Durant la stabilisation, un phénomène d'hygiénisation des boues s'opère : l'abondance de certains microorganismes au pouvoir pathogène est fortement réduite, grâce à des effets biotiques (prédation) ou abiotiques (température, pH, absence d'oxygène) (Moletta, 2008).

Le conditionnement : Il permet de préparer les boues à l'étape finale de déshydratation. Une partie de l'eau étant liée aux floccs dans des structures poreuses similaires à des gels, il est nécessaire de les déstabiliser pour libérer cette eau. Cette déstabilisation peut être physique (traitement thermique entre 150 et 200°C) ou bien chimique (ajout de minéraux ou de polymères cationiques).

La déshydratation : Elle permet de réduire le volume des boues par élimination d'une fraction de l'eau. Les stratégies envisageables sont la filtration (à bandes, sous pression), l'évaporation (lits de séchage) et la centrifugation, et permettent d'atteindre jusqu'à 40% de siccité.

I.1.3.1.2 Devenir des boues traitées

Valorisation agricole : Les boues constituent une source potentielle de carbone et nutriments. Leur valorisation par épandage agricole est donc envisageable du fait de ces propriétés fertilisantes. Cette valorisation des boues peut s'intégrer dans des plans d'épandage. Sinon, les boues doivent obéir à une norme (NF 44-095) ou bien suivre une procédure d'homologation (option minoritaire) pour pouvoir être épandues. Selon la Commission Européenne en 2002, cette voie représentait 57% de l'élimination des boues en France et variait de 0 à 65% en Europe.

Cependant, l'exploitant se doit de s'assurer de l'innocuité des boues envers les écosystèmes dans lesquelles elles sont introduites : microorganismes, plantes et animaux peuplant le sol concerné. Cette innocuité doit être effective tant au niveau physico-chimique que biologique. La législation définie par la norme NF U44-041 (1985), la directive européenne du 12 juin 1986, la loi sur l'eau du 3 janvier 1992 et la loi de 1975 sur les déchets et le code de la santé publique, a été renforcée en 1997-98 par le décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 et l'arrêté du 8 janvier 1998. Cette réglementation fixe notamment des limites de concentrations et de doses cumulées sur dix années en CTOs (Tableau I-1). En effet, l'épandage de boues contaminées peut induire un transfert aux cultures et une entrée des contaminants dans la chaîne alimentaire, mais ils peuvent aussi être véhiculés par ruissellement des eaux vers les systèmes aquatiques. La législation vise seulement 10 molécules parmi la multitude de CTOs présents dans les boues : ces 10 CTOs jouent le rôle d'indicateurs de pollution. La Commission Européenne a proposé en 2000 un durcissement de la réglementation en cours, avec des concentrations maximales plus faibles, et une plus large gamme de CTOs visés. Neuf ans plus tard, cette proposition qui harmoniserait la législation à travers l'Europe n'est toujours pas entrée en vigueur.

Tableau I-1: Réglementation de l'épandage de boues contaminées en CTOs (arrêté du 8 Janvier 1998).

Composé trace organique	Concentration limite dans les boues (mg/kgMS)	Flux maximum cumulé sur une durée de 10 ans (mg/m ²)
Somme des PCBs n°28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180	0,8	1,2
Fluoranthène	5	7,5
Benzo(b)fluoranthène	2,5	4
Benzo(a)pyrène	2	3

Incinération ou co-incinération : L'incinération est une combustion : la matière organique est transformée en CO₂ et H₂O. Ce procédé ne peut s'appliquer qu'à des boues de siccité supérieure ou égale à 30%. Elle permet une réduction du volume des boues de 90%, pour une boue épaissie, et 30% des solides se retrouvent sous forme de cendres. Par ailleurs, le potentiel calorifique des boues permet une récupération d'énergie sous forme de

chaleur, d'autant plus importante lorsqu'il y a co-incinération, et ce procédé limite les nuisances olfactives. Cependant, l'incinération ne constitue pas une élimination totale des boues, et les cendres sont déposées en décharge (Fytili & Zabaniotou, 2008).

Mise en décharge : La mise en décharge des boues d'épuration est interdite depuis 2002, puisqu'elle est réservée aux déchets ultimes, c'est-à-dire des déchets pour lesquels il n'est pas techniquement possible de pousser le traitement. La mise en décharge des boues est seulement possible après incinération. Une directive européenne du 26 avril 1999 a donc planifié la réduction progressive de la mise en décharge des déchets municipaux biodégradables (dont les boues d'épuration) jusqu'en 2015.

Autres : Le rejet en mer, qui constituait 6% de l'élimination des boues en Europe en 1992, est interdit depuis 1998. Les filières d'élimination alternatives sont la sylviculture et la réhabilitation de terrains, mais restent marginales.

La **filière de traitement des boues d'épuration qui s'est révélée la plus durable** selon une approche d'analyse de cycle de vie est la **digestion anaérobie** productrice d'énergie, suivie de valorisation agricole des digestats (Suh & Rousseaux, 2002).

I.1.3.2 Le processus de digestion anaérobie

I.1.3.2.1 Principes généraux

La digestion anaérobie ou méthanisation des boues, comme évoquée au paragraphe I.1.1, conduit à la transformation de la matière organique en eau, CO₂ et CH₄ par la population microbienne. Cette transformation est réalisée en quatre phases (Figure I-5), chacune faisant intervenir des populations spécifiques.

Désintégration et hydrolyse : La désintégration des particules et l'hydrolyse de la matière englobent des processus non biologiques et biologiques qui conduisent à une solubilisation de la matière complexe sous forme de monomères (Batstone *et al.*, 2002).

Le processus d'hydrolyse biologique met en jeu les microorganismes pourvus d'enzymes de clivage des macromolécules en oligomères et monomères. Les populations impliquées sont des bactéries et parfois des champignons anaérobies stricts ou facultatifs.

Cette étape s'avère lente, et est admise comme limitante dans le procédé de digestion anaérobie des boues et des déchets solides.

Acidogénèse : L'acidogénèse consiste en la consommation des monomères par des bactéries au **métabolisme fermentaire**, ne nécessitant donc pas d'accepteur d'électrons, qui libèrent à leur tour certains intermédiaires métaboliques : des acides gras volatils (acides acétique, butyrique, propionique, etc), alcools, acides organiques (acide lactique), mais aussi de l'hydrogène et du gaz carbonique. A l'inverse de l'hydrolyse, cette phase est très rapide.

Acétogénèse : Durant l'acétogénèse, trois groupes bactériens participent à la transformation des intermédiaires métaboliques en acétate, hydrogène et gaz carbonique :

les bactéries acétogènes productrices d'hydrogène (qui ont la particularité d'être syntrophiques), les homoacétogènes, et les sulfato-réductrices (Ahring, 2003).

Les bactéries acétogènes syntrophiques produisent de l'acétate à partir d'acides organiques suivant des réactions présentant une enthalpie libre standard positive. De ce fait, leur activité productrice d'acétate doit être couplée à une activité qui élimine l'un des produits, de sorte que la réaction globale soit endergonique (ex : *Syntrophobacter wolinii*).

Parmi les bactéries homoacétogènes, certaines produisent de l'acétate à partir d'un substrat carboné, alors que d'autres, autotrophes, mettent en jeu la réduction de gaz carbonique par de l'hydrogène.

La sulfato-réduction n'est quant à elle possible qu'en présence de sulfate comme accepteur d'électron. Ce métabolisme reste mineur dans les boues, dans la mesure où les sulfates sont généralement présents à de faibles concentrations.

Globalement, les réactions d'acétogénèse sont lentes, et soumises à des phénomènes d'inhibition par l'hydrogène. L'acétogénèse n'est donc réalisable efficacement qu'en présence de microorganismes consommant l'hydrogène, tels que certaines bactéries homo-acétogènes, sulfato-réductrices et méthanogènes (Delbès, 2000), qui entrent en compétition pour ce substrat commun. L'équilibre des interactions concernant le transfert d'hydrogène entre espèces est un facteur clé pour la stabilité de l'écosystème entier.

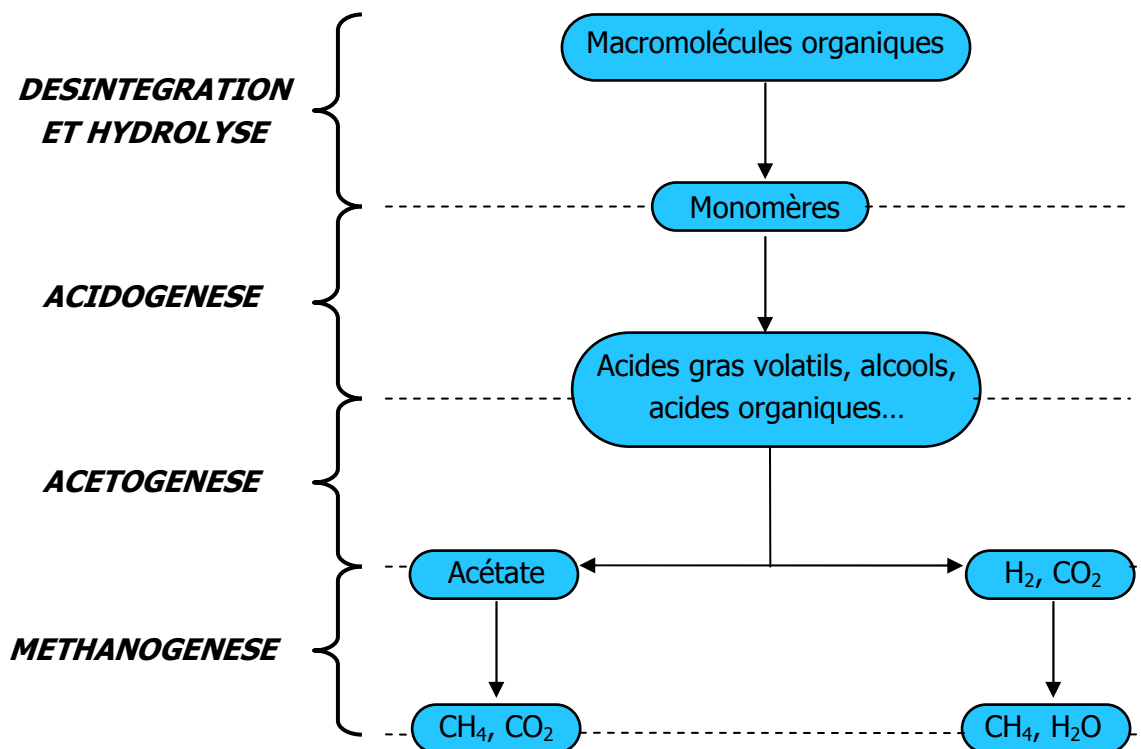


Figure I-5 : Etapes de la digestion anaérobie.

Méthanogénèse : Les microorganismes méthanogènes convertissent l'acétate, l'hydrogène, et le dioxyde de carbone en méthane. Ce sont des microorganismes nécessitant des conditions très strictes, entre autres des potentiels d'oxydo-réduction très bas (Pelmont,

2005). Les deux voies métaboliques principales, attribuées à des *Archaea* anaérobies strictes sont les suivantes :

Archaea méthanogènes acétoclastes : Acétate \rightarrow CO₂ + CH₄

Archaea méthanogènes hydrogénotrophes : CO₂ + 4H₂ \rightarrow 2H₂O + CH₄

Bien que 60 à 70% du méthane soit produit par la voie acétoclastique (Degrémont, 1989), seuls les genres *Methanosarcina* et *Methanosaeta* sont capables de dégrader l'acétate de cette façon. Par ailleurs, ces archaebactéries présentent des cinétiques très lentes (temps de doublement de population pouvant atteindre plusieurs jours) alors que les hydrogénotrophes qui réduisent le CO₂ croissent beaucoup plus rapidement (temps de doublement : quelques heures). Mais comme les méthanogènes sont les microorganismes les plus sensibles de l'écosystème (à l'inhibition par les AGVs et l'ammoniaque notamment), elles régissent le fonctionnement global du procédé (Trably, 2002).

I.1.3.2.2 Conditions opératoires

Pour une boue d'épuration donnée, la température, le pH, le temps de séjour et la présence d'inhibiteurs influencent les performances globales d'un réacteur de méthanisation.

Température : La digestion anaérobie peut être mise en œuvre à différentes températures : aux alentours de 10°C (digestion psychrophile), à 30–35°C (mésophile) et au-delà de 45°C (thermophile). La digestion anaérobie en condition thermophile est la plus efficace : les processus chimiques et biologiques sont activés par la chaleur. Cependant, elle nécessite un apport supplémentaire en énergie et les effets inhibiteurs peuvent être plus marqués (par le propionate notamment). De ce fait, les conditions mésophiles sont largement plus répandues, en tant que compromis entre coût de fonctionnement et performances.

pH : Il est indispensable de maintenir le pH très proche de la neutralité, le pH optimum se trouvant entre 6.5 et 8.5 (Moletta, 2008). Dans de bonnes conditions de fonctionnement, l'effet de la présence d'AGV est tamponné par les bicarbonates produits par certains méthanogènes (Bitton, 1994).

Temps de séjour : Dans le cas d'un digesteur à biomasse libre, le temps de séjour hydraulique (TSH) doit être de l'ordre de grandeur du temps de génération des microorganismes les plus lents (méthanogènes), afin d'éviter tout lessivage du réacteur. En conditions mésophiles, cela correspond à 20 jours environ. En revanche, lorsque le procédé met en jeu une biomasse fixée, le TSH peut être abaissé à quelques jours.

Inhibitions : La présence stricte ou bien une trop forte concentration en certains composés peut avoir des conséquences désastreuses sur le fonctionnement du procédé.

D'une part, la méthanisation doit s'opérer en conditions anaérobies strictes : la présence d'**oxygène** perturbe le métabolisme des acteurs du processus.

D'autre part, si la concentration en **AGV**, et plus particulièrement en acide propionique (le plus toxique), augmente et dépasse 3 g/L environ, le pH diminue, la toxicité des acides augmente d'autant plus, et les microorganismes méthanogènes sont inhibés. Ce phénomène peut être provoqué par différents facteurs déstabilisants, parmi lesquels une surcharge de matière organique.

Par ailleurs, les microorganismes intervenant au niveau de l'acétogénèse sont inhibés par l'**hydrogène**, comme évoqué au paragraphe I.1.3.2.1. En effet, en tant que produit des réactions d'acétogénèse, l'hydrogène inhibe thermodynamiquement sa propre production. Ainsi, ces réactions sont réalisables si la pression partielle en hydrogène, résultant de l'équilibre entre production et consommation, n'excède pas 10 à 20 Pa (Degrémont, 1989). Globalement, la méthanisation est un procédé relativement lent et sensible à des perturbations variées.

I.1.3.3 Pré-traitements visant à améliorer les performances de la digestion anaérobie

La digestion anaérobie permet de diminuer de 30 à 50% la matière organique des boues. La communauté scientifique s'est récemment attachée à améliorer encore ces performances, au moyen de pré-traitements additionnels. Ces pré-traitements ont pour objectif de libérer la matière intra- et extracellulaire, et de provoquer le transfert de matière particulaire vers la phase soluble. La matière à dégrader s'en retrouve plus accessible pour les microorganismes épurateurs.

Parmi les pré-traitements possibles, ultrasons, ozone et lyse thermique ont été optimisés puis comparés, et même si tous trois permettent à la fois une solubilisation de la matière et une amélioration de la biodégradabilité, le traitement thermique s'avère le plus efficace en terme de solubilisation. En effet, un traitement à 170-190°C pendant 30 à 60 min conduit à un taux de solubilisation de DCO de 50%, et de matière sèche de 45%. De plus, la production de biogaz est fortement accélérée (Bougrier, 2005; Graja *et al.*, 2005).

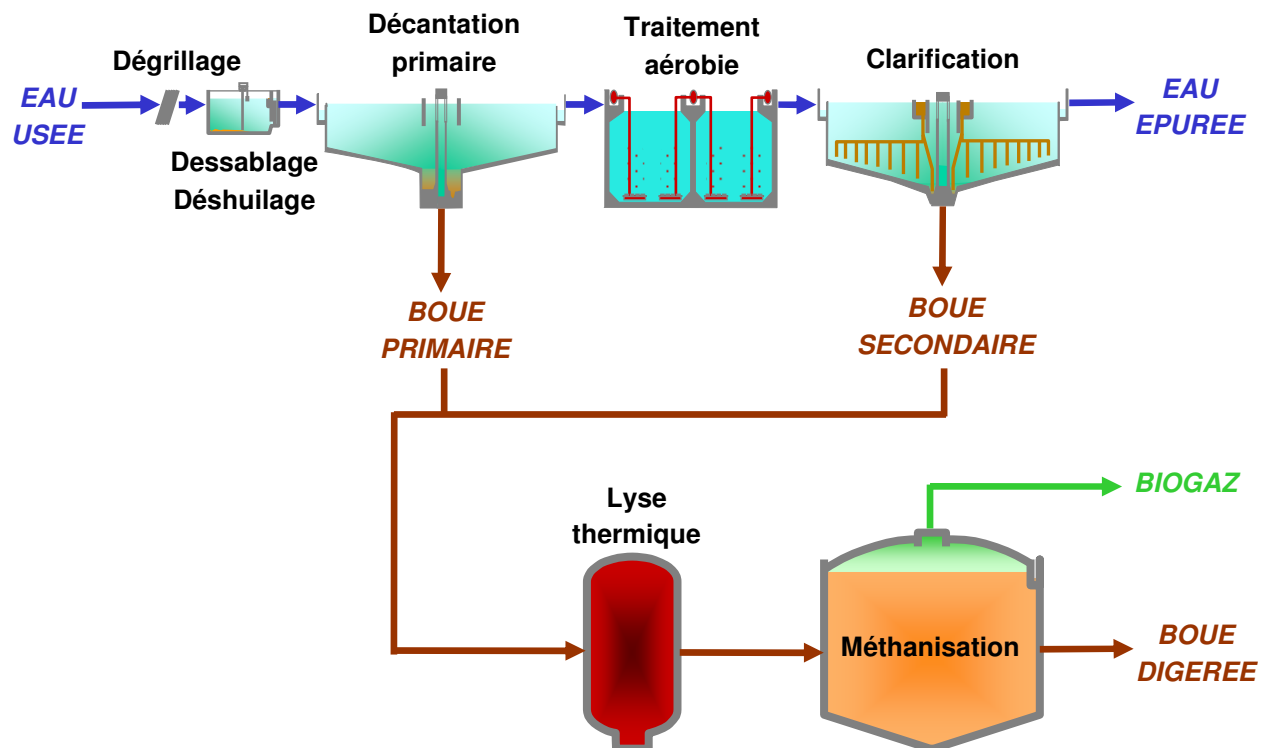


Figure I-6 : Filière d'épuration considérée dans cette étude.

Le contexte « procédé » dans lequel la présente étude s'inscrit inclut le traitement des boues d'épuration par digestion anaérobie, en amont duquel un pré-traitement thermique sera considéré. Ce contexte est présenté en Figure I-6.

Le paragraphe suivant vise à expliquer comment certaines molécules provoquant des effets de perturbation endocrinienne sont introduites dans cette filière, et comment elles s'y comportent.

I.2 Les perturbateurs endocriniens

I.2.1 Le système endocrinien

Au sein des organismes pluricellulaires, la régulation de la fonction de chaque cellule est nécessaire. Deux systèmes remplissent cette fonction : le système nerveux et le système endocrinien. Ce dernier joue un rôle central chez les animaux, puisqu'il contrôle la croissance, la reproduction, l'homéostasie et le métabolisme.

Le système endocrinien est basé sur la sécrétion d'hormones par différentes glandes : hypothalamus, hypophyse (glande pituitaire), thyroïde, glandes parathyroïdes, surrénales, épiphyse (glande pinéale), gonades, thymus et pancréas. Les hormones ainsi sécrétées sont transportées par voie sanguine jusqu'aux organes et cellules cibles. Les cellules cibles sont dotées d'un site d'interaction. Lorsqu'une hormone se lie au récepteur correspondant, la réponse est enclenchée par l'effecteur.

Les sites récepteurs possédant une très grande affinité pour leur hormone, de très petites concentrations en hormones sont suffisantes au déclenchement d'une réponse. Or des composés d'origine exogène peuvent aussi interagir avec ce système endocrinien : on les appelle alors perturbateurs endocriniens (PE).

I.2.2 Définition des perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens sont un sous-groupe au sein des CTOs. Nous retiendrons la définition adoptée par l'*Environmental Protection Agency* des Etats-Unis : "*an exogenous agent that interferes with the synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of natural hormones in the body which are responsible for the maintenance or homeostasis, reproduction, development and or behavior*" (Kavlock *et al.*, 1996). Cette définition illustre la grande diversité des mécanismes impliqués dans la perturbation endocrinienne.

I.2.3 Exemples de mécanismes d'action et effets

Action agoniste/mimétique : par analogie à une hormone naturelle, un PE peut se fixer au niveau d'un récepteur, et déclencher la réponse associée. Ce déclenchement à un moment ou un état physiologique inopportun peut avoir un impact néfaste sur les fonctions biologiques de l'organisme associées à cette hormone. C'est le cas du bisphénol A et du nonylphénol envers le récepteur hormonal GPR30 (Thomas & Dong, 2006).

Action antagoniste : en occupant le site récepteur d'une cellule, un PE empêche la fixation d'une hormone naturelle. Et si ce PE n'est pas suffisamment analogue à l'hormone naturelle pour déclencher le mécanisme de réponse, celui-ci est minimisé. Ainsi, l'herbicide linuron inhibe la production d'une protéine dans les cellules de rein du poisson *Gasterosteus aculeatus* (Jolly *et al.*, 2009). La synthèse de cette protéine qui joue un rôle dans la reproduction est normalement induite par la dihydrotestérone.

Stimulation de la synthèse de récepteurs hormonaux : certains PE peuvent stimuler la production de récepteurs hormonaux, de sorte que le signal hormonal soit amplifié. Par exemple, l'exposition de la moule marine *Mytilus edulis* à du 17- β œstradiol exogène agit sur la transcription des gènes codant pour les récepteurs à œstrogènes et pour la production de vitellogénine, provoquant une augmentation de la concentration intracellulaire en ARNm correspondant (Puinean *et al.*, 2006).

Inhibition de la destruction des hormones naturelles : les PE peuvent interférer avec des enzymes nécessaires au métabolisme de destruction des hormones. Le fait de désactiver ou d'inhiber ce système enzymatique provoquera l'augmentation de la concentration en hormone active et leur persistance dans l'organisme, et la génération de signaux inappropriés. Ainsi, il a été montré que le 4,4'-(OH)(2)-3,3',5,5'- tétrachlorobiphényl, le bisphenol A, le tétrabromobisphenol A, le tétrachlorobisphenol A, le tribromophenol, le trichlorophenol et le pentachlorophenol inhibent la fonction de conjugaison de l'œstradiol dans le rein et le foie de la truite, réaction jouant un rôle important dans la solubilisation, le transport et donc le métabolisme des hormones naturelles (Jurgella *et al.*, 2006).

1.2.4 Les composés perturbateurs endocriniens étudiés

Les composés auxquels un pouvoir de perturbation endocrinienne a été attribué ont été répertoriés par différentes commissions à vocation environnementale, qu'elles soient nationales ou internationales (Tableau I-2).

Durant ce travail, nous nous sommes focalisés sur le nonylphénol comme représentant des alkylphénols, sur 13 représentants de la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), et 7 polychlorobiphényls (PCBs).

1.2.4.1 Le nonylphénol

Le NP (Figure I-7) est l'alkylphénol (AP) le plus répandu, puisqu'il représente 85% du marché total des APs (Corvini *et al.*, 2006). Son pouvoir de perturbation endocrinienne a été révélé dès 1991 (Soto *et al.*, 1991). Un mélange technique de NP, composé de plus de 20 isomères, est utilisé pour la production industrielle des surfactants polyéthoxylés et/ou carboxylés NP_nEO et NP_nEC (Thiele *et al.*, 2004). Au sein de ce mélange, 85% des entités présentes ont un carbone en α quaternaire. Cette structure stable explique que les NP provenant des surfactants soient globalement très persistants, à l'opposé du NP linéaire (Corti *et al.*, 1995; Vallini *et al.*, 1997)

Les NP_nEO et NP_nEC entrent dans la composition de détergents, émulsifiants et pesticides. Ainsi, approximativement 550 000 tonnes de dérivés de NP sont produits chaque année (Guenther *et al.*, 2002; Corvini *et al.*, 2006). Les dérivés de NP acheminés dans les systèmes

d'épuration proviennent donc d'effluents industriels, domestiques et des eaux de ruissellement. Leur biodégradation induit une accumulation de NP et de dérivés faiblement substitués, mais aussi une augmentation d'activité œstrogénique, puisque ces molécules accumulées ont un pouvoir œstrogénique supérieur aux molécules natives (Routledge & Sumpter, 1996; Lu *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2008). L'accumulation du NP et sa forte persistance en font un perturbateur endocrinien prioritaire.

Tableau I-2 : Liste des composés reconnus comme perturbateurs endocriniens par les organismes UKEA (United Kingdom Environment agency), USEPA (United States Environmental Agency), OSPAR (Oslo and Paris Commission), JEA (Japan Environment Agency), and WWF (World Wildlife Fund).

CTO	UKEA	USEPA	OSPAR	JEA	WWF
STEROIDES					
Ethinyl œstradiol	X		X		
17β-œstradiol	X		X		
Œstrone	X		X		
Mestranol			X		
Diethylstilbestrol	X		X	X	X
ALKYLPHENOLS					
Nonylphénol	X	X	X	X	X
Nonylphénol ethoxylate	X				
Octylphenol	X	X	X	X	
Octylphenoethoxylate	X				
COMPOSES POLYAROMATIQUES					
Polychlorobiphenyls	X	X	X	X	X
Produits ignifugeant bromés				X	X
Hydrocarbures aromatiques polycycliques		X	X		
COMPOSES ORGANIQUES OXYGENES					
Phtalate	X	X		X	X
Bisphenol A	X	X		X	X
PESTICIDES					
Atrazine	X	X		X	X
Simazine	X	X		X	X
Dichlorvos	X				
Endosulfane	X	X		X	X
Trifluraline	X	X			X
S-méthyl-demeton	X				
Dimethoate	X				X
Linuron					X
Permethrine	X	X		X	
Lindane	X	X	X		X
Chlordane	X			X	X
Dieldrine	X	X		X	X
Hexachlorobenzène	X			X	X
Pentachlorophénol	X	X		X	X
AUTRES					
Dioxines et furanes	X		X	X	X
Tributyltine	X	X	X	X	

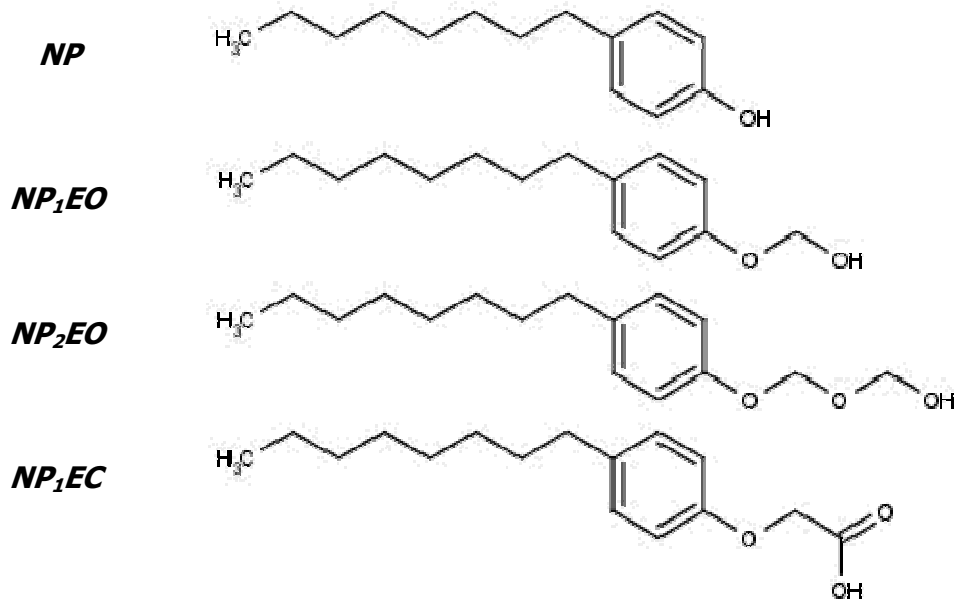


Figure I-7 : Structure de l'isomère du nonylphénol (NP) linéaire, du nonylphénol mono-éthoxylé (NP₁EO) linéaire, du nonylphénol di-éthoxylé (NP₂EO) linéaire et du nonylphénol mono-éthoxylé carboxylé (NP₁EC) linéaire.

I.2.4.2 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Les HAPs sont des molécules organiques composées de noyaux de cinq ou six atomes de carbone, très majoritairement aromatiques, condensés linéairement ou en amas (Figure I-8). Du fait de leur structure, le rapport H/C des HAPs diminue avec le poids moléculaire, alors que le caractère réduit et l'hydrophobicité augmentent avec celui-ci. Parmi les nombreux HAPs possibles avec ou sans substitutions, seulement seize molécules ont été listées comme prioritaires par l'USEPA. En plus de provoquer des perturbations endocriniennes, les HAPs sont aussi mutagènes, tératogènes et cancérigènes.

Les HAPs sont formés lors de la combustion incomplète de matière organique telle que les hydrocarbures aliphatiques. Avant l'utilisation des sources d'énergie fossile que sont le gaz naturel, le pétrole et le charbon, les HAPs étaient essentiellement produits lors de feux de forêt et d'éruptions volcaniques. Désormais, l'origine anthropique pyrolytique est la source majeure en HAPs (de haut poids moléculaire surtout) dans l'environnement, par la combustion de carburant automobile (Yang & Chen, 2004; Rau *et al.*, 2008), la combustion domestique (Kakareka *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006), les centrales électriques fonctionnant au pétrole ou au charbon (Xu *et al.*, 2006) ou encore par les incinérateurs (Mininni *et al.*, 2007). Des HAP ont aussi été décelés dans la fumée de cigarettes (Ding *et al.*, 2007) et dans de nombreux produits alimentaires tels que les poissons et viandes fumés (Duedahl-Olesen *et al.*, 2006; Reinik *et al.*, 2007; Varlet *et al.*, 2007), les huiles de friture (Purcaro *et al.*, 2006), le pain grillé (Rey-Salgueiro *et al.*, 2008)...

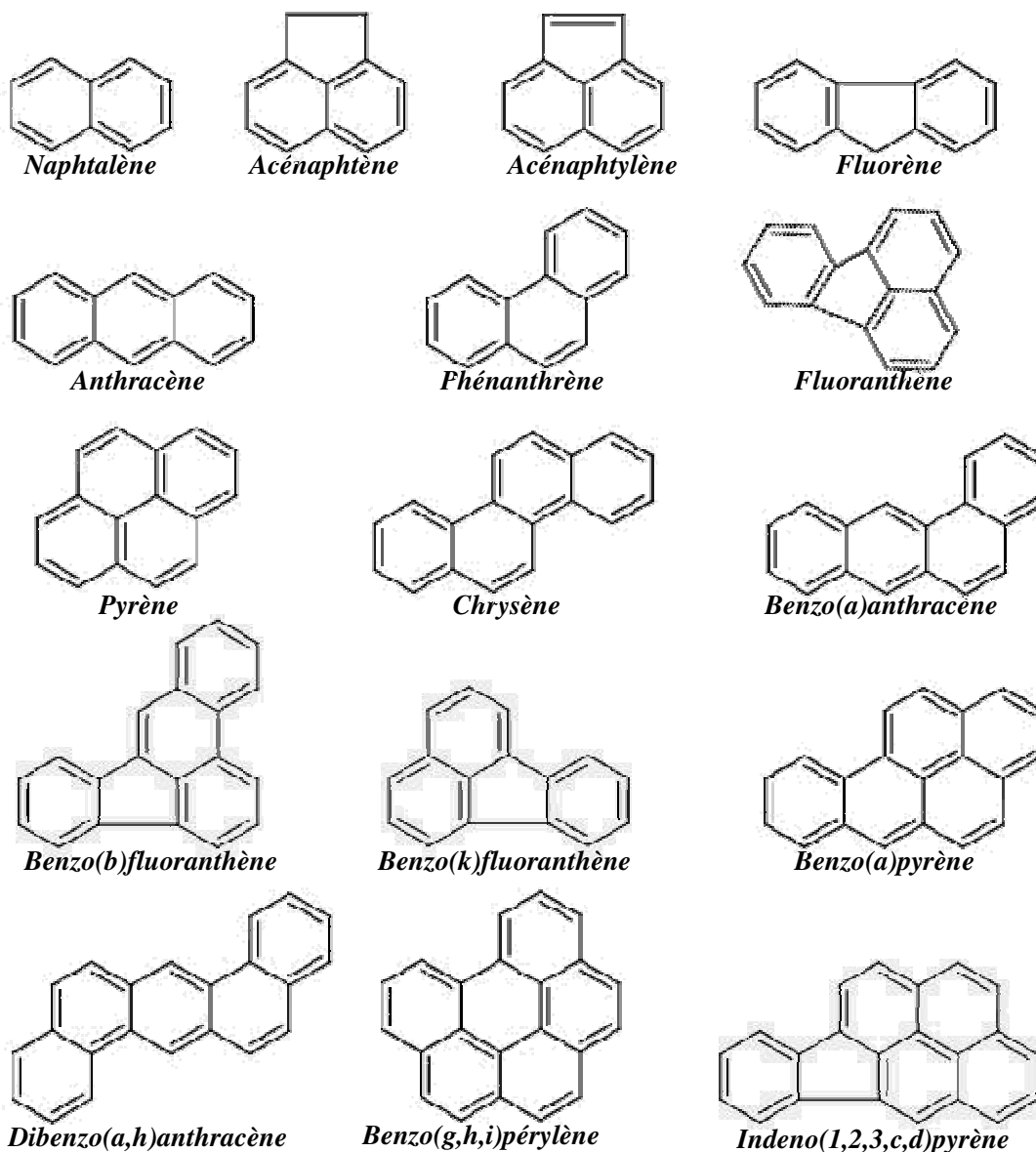


Figure I-8 : Structure des 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques prioritaires selon l'USEPA.

I.2.4.3 Les PolyChloroBiphényles

Les PolyChloroBiphényles (PCBs) sont des composés aromatiques possédant une ossature biphényle, substituée par des atomes de chlore en position et nombre variables (Figure I-9). Parmi la multitude de combinaisons entre nombre et position de chlores possibles, sept PCBs sont visés par la législation française en matière d'épandage (paragraphe I.1.3.1.2) : les n°28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180. Les PCBs sont synthétisés par l'homme, pour leurs propriétés d'isolant thermique, de grande stabilité chimique et d'inflammabilité. Ils ont été massivement produits à partir des années 1930, entrant par exemple dans la composition de transformateurs, condensateurs électriques, lubrifiants, plastifiants, produits de protection du bois, sous les noms commerciaux de Pyralène ou Arochlor.

En France, la mise en évidence de leur forte toxicité a conduit à l'interdiction en 1979 de leur utilisation dans des applications ouvertes (par exemple : encres d'imprimerie), et l'arrêté du 2 Février 1987 interdit ensuite la vente de tout appareil contenant des PCBs. Un plan national de décontamination et d'élimination de ces appareils (décret du 26 Janvier 2003) est en cours. Malgré ces mesures, des PCBs sont toujours détectés dans l'environnement.

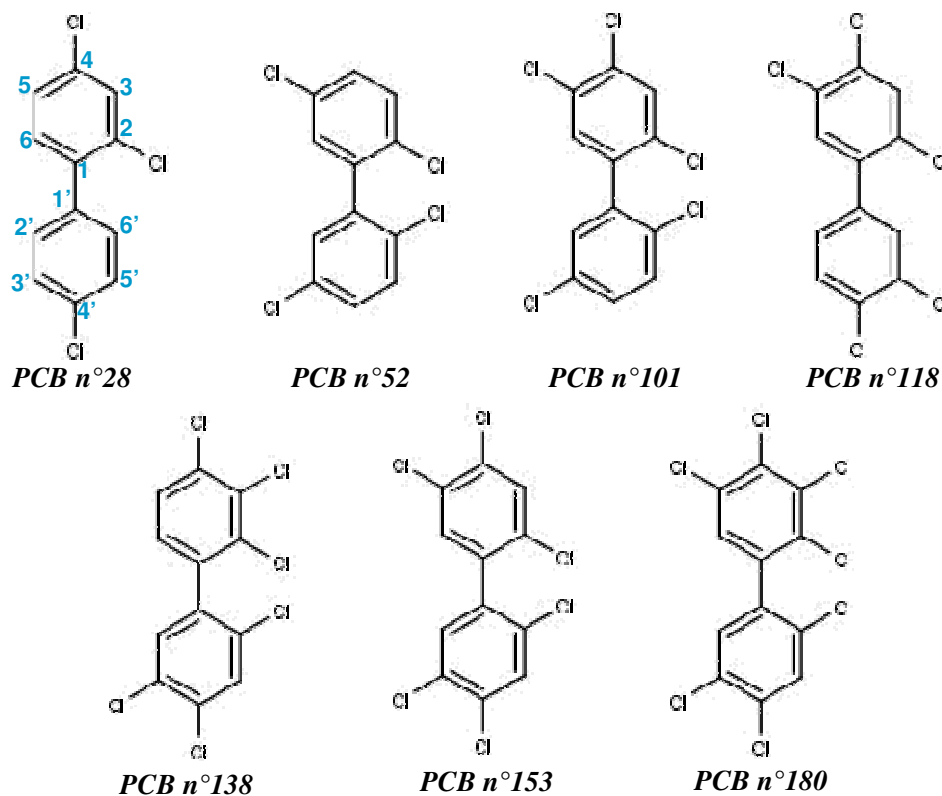


Figure I-9 : Structure des sept polychlorobiphényles visés par la législation française.

La pollution en HAPs, en NP et ses dérivés ainsi qu'en PCBs est acheminée vers les stations d'épuration via les eaux domestiques, industrielles et/ou de ruissellement. Les STEP s constituent donc un point de convergence de ces composés. Leur devenir au cours du traitement appliqué est particulier : il fait l'objet du paragraphe suivant.

1.2.5 Devenir des HAPs/NP/PCBs dans les STEP s et positionnement du couplage pré-traitement thermique/méthanisation

La plupart des études mises en œuvre sur le devenir des HAPs/NP/PCBs dans les STEP s sont focalisées sur la ligne eau : le traitement de l'eau était l'enjeu majeur. En effet, les effets toxiques ont été relatés en premier lieu dans le cas de rejets d'eaux épurées. Les eaux épurées ont donc été la cible privilégiée de la législation. Par ailleurs, les difficultés

techniques engendrées par les analyses de la matrice boue ont probablement contribué à freiner les études sur la ligne boue.

Quand seule la ligne eau est considérée, les HAPs et PCBs présentent des pourcentages d'abattement relativement élevés : par exemple 75% pour les PCBs (Katsoyiannis & Samara, 2004) et respectivement 76 et 98% pour les PCBs et HAPs (Blanchard *et al.*, 2004). En revanche, cet abattement est lié à différents mécanismes : la volatilisation (transfert à l'atmosphère), la sorption (transfert vers la ligne boue) et la biodégradation (Figure I-10).

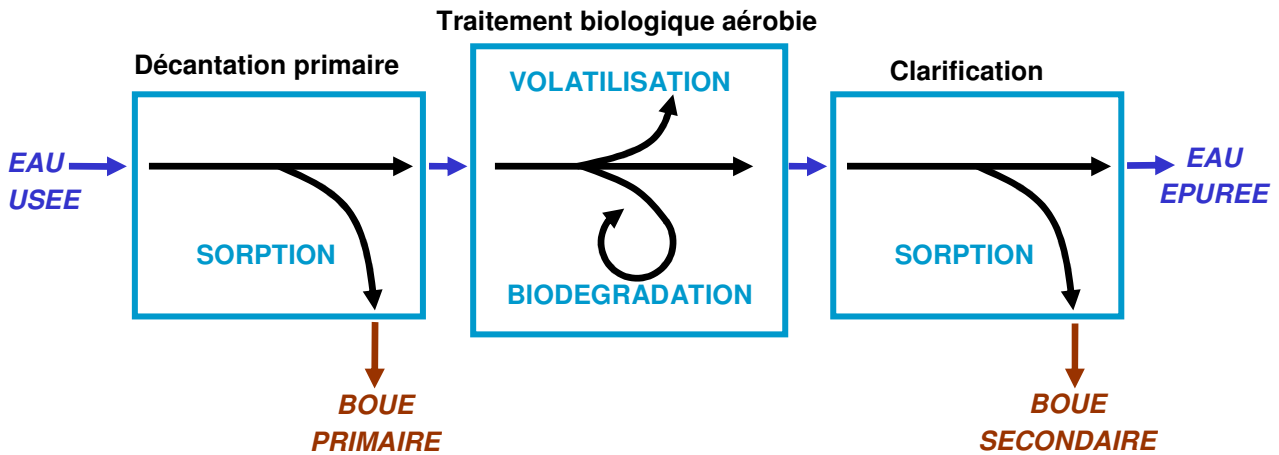


Figure I-10 : Mécanismes s'opérant dans les STEP qui sont responsables de l'abattement des HAPs et PCBs présents dans la ligne eau.

Seule la biodégradation constitue un réel mécanisme d'élimination, alors que les deux autres consistent en un déplacement de la pollution. Cependant, la volatilisation est très difficilement quantifiable en STEP, de sorte que les bilans matière pratiqués l'englobent avec la biodégradation dans l'élimination (référence eau et boue). Ces bilans matière ont révélé **que le mécanisme principal permettant l'abattement des HAPs et PCBs de l'eau était la sorption, et une élimination significative est seulement observée pour les HAPs de faible poids moléculaire (Manoli & Samara, 1999; Blanchard *et al.*, 2004; Katsoyiannis & Samara, 2004).**

En effet, l'opération unitaire de décantation primaire peut permettre à elle seule d'éliminer par sorption autour de 50% des PCBs présents dans l'influent (Blanchard *et al.*, 2004; Katsoyiannis & Samara, 2004) et le traitement biologique aérobie combiné à la clarification d'abattre par élimination/sorption autour de 65% des PCBs (Katsoyiannis & Samara, 2004). Ces observations sont en accord avec des approches de modélisation (Byrns, 2001). Il en résulte que la presque-totalité du flux de HAPs et PCBs entrant se retrouve sorbée et concentrée dans le flux de boues. Ainsi, de l'ordre de 0.001 à 10 mg_{HAP}/kg_{MS} (

Tableau I-4) et de 0.01 à 1 mg_{PCB}/kg_{MS} (Tableau I-3) se retrouvent dans les boues d'épuration, selon les caractéristiques de l'eau usée, son niveau de contamination, et la conception de la STEP.

Tableau I-3 : Concentrations en PCBs dans les boues d'épuration (mg/kg).

	(Katsoyiannis & Samara, 2004)	(Blanchard <i>et al.</i> , 2004)	(Abad <i>et al.</i> , 2005)	(Kohli <i>et al.</i> , 2006)
Nbr de boues / Nbr de prélèvements	1 / 20	1 / 3	22 / 9	35 / 1
PCB 28	nd – 0,10			
PCB 52	0,14 – 0,71			
PCB 101	0,02 – 0,41			
PCB 118	nd – 0,07	Somme	Somme	Somme
PCB 138	nd – 0,06	0,15	nd – 0,60	0,03 – 0,32
PCB 153	nd – 0,05			
PCB 180	0,06 – 0,30			

Nbr : nombre ; *nd* : non détecté par les auteurs ; *nm* : non mesuré.

Tableau I-4 : Concentrations en HAPs dans les boues d'épuration (mg/kg).

	(Bodzek & Janoszka, 1999)	(Bodzek & Janoszka, 1999)	(Blanchard <i>et al.</i> , 2004)	(Abad <i>et al.</i> , 2005)	(Cai <i>et al.</i> , 2007)
Nbr de boues / Nbr de prélèvements	3 / 1	5 / 1	1 / 3	22 / 9	11 / 1
Fluorène	nm	nm	nm		0,08 – 2,7
Phénanthrène	3,5 – 11,0	6,0 – 6,4	nm		0,05 – 6,6
Anthracène	1,4 – 2	0,4 – 1,4	nm		0,07 – 6,1
Fluoranthène	2,0 – 8,0	5,2 – 6,0	1,1		<0,001 – 8,0
Pyrène	2,4 – 6,5	5,0 – 7,1	nm		0,08 – 4,3
Benzo(a)anthracène	2,4 – 3,4	6,8 – 11,1	nm	Somme	<0,001 – 8,3
Chrysène	nm	nm	nm	nd – 5,3	<0,001 – 4,0
Benzo(b)fluoranthène	nm	nm	0,24		<0,001 – 2,9
Benzo(k)fluoranthène	nm	nm	nm		0,007 – 7,0
Benzo(a)pyrène	1,6 – 2,8	8,0 – 10,2	0,37		0,007 – 6,6
Dibenzo(a,h)anthracène	<0,001	2,6 – 2,7	nm		<0,001 – 0,2
Benzo(g,h,i)perylène	<0,001	1,2	nm		<0,001 – 0,6
Indeno(1,2,3,cd)pyrène	<0,001	2,8 – 3,0	nm		<0,001 – 0,5

Nbr : nombre ; *nm* : non mesuré.

Le cas du nonylphénol est particulier dans la mesure où il est produit au sein des traitements biologiques des STEP par la dégradation de ses dérivés éthoxylés ou carboxylés. En effet, les produits majoritaires de dégradation de ces détergents sont les NPnEC de courte chaîne, NPnEO de courte chaîne et NP en présence d'oxygène (Di Corcia, 1998; Corvini *et al.*, 2006), ou les NPnEO de courte chaîne et NP en conditions ferro-réductrices (Lu *et al.*, 2007), nitrate-réductrices (Luppi *et al.*, 2007), sulfato-réductrices et méthanogènes (Corvini *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2008). La production de NP au cours du traitement implique que l'eau épurée contient parfois des concentrations en NP supérieures à l'eau usée : par

exemple 0,8 µg/L contre 0,5 µg/L pour une eau usée domestique (Nakada *et al.*, 2006) et environ 50 µg/L contre 0,1 µg/L pour une eau industrielle riche en alkylphénols (Sheahan *et al.*, 2002). En outre, les phénomènes de sorption jouent un rôle prépondérant dans le devenir du nonylphenol tout comme dans le cas des HAPs/PCBs. En effet, le pourcentage de NP en sortie de bassin d'aération qui se trouve sorbé aux solides, et se retrouve donc dans la ligne boue, atteint 60% (Hung *et al.*, 2004; Koh *et al.*, 2005). Ceci conduit à des concentrations en NP mesurées entre 12 et 144 mg/kg_{MS} (Aparicio *et al.*, 2007), entre 4 et 93 mg/kg_{MS} (Fountoulakis *et al.*, 2005), et entre 16 et 153 mg/kg_{MS} (Ghanem *et al.*, 2007). La concentration moyenne en NP dans les boues d'épuration est donc de l'ordre de 100 mg/kg_{MS}.

Le comportement global de transfert et concentration des HAPs/NP/PCBs dans les boues d'épuration pose le problème du traitement des boues contaminées.

Le procédé de digestion anaérobie (Paragraphe I.1.3.2) a démontré un potentiel de biodégradation des HAPs (Trably *et al.*, 2003; Bernal-Martinez *et al.*, 2005; Dionisi *et al.*, 2006), du NP (Patureau *et al.*, 2008) et des PCBs (Patureau & Trably, 2006; Bertin *et al.*, 2007; El-Hadj *et al.*, 2007) présents dans des boues d'épuration. Ces observations ont été complétées par des études menées sur la digestion anaérobie de boues « dopées », artificiellement contaminées en laboratoire, en batch ou en continu, et qui ont permis d'explorer l'impact de différents paramètres sur les performances du procédé. Il ressort de cet ensemble d'études les conclusions et interrogations suivantes :

L'élimination des CTOs varie énormément d'une étude à l'autre : de 0% en continu avec temps de séjour de 20 jours (Hernandez-Raquet *et al.*, 2007) à 40% en batch de 20 jours et 100% en batch de 80 jours (Chang *et al.*, 2005b) pour le NP, de 12% (Patureau & Trably, 2006) à 98% (El-Hadj *et al.*, 2007) en mode continu pour les PCBs...

Or des pertes abiotiques significatives sont parfois observées lorsque des témoins stériles sont réalisés, liés à de la volatilisation, de la photodégradation, et de la séquestration. Les stratégies de stérilisation sont variables : autoclavage à 121°C durant 20min (Chang *et al.*, 2003), plusieurs cycles d'autoclavage à 121°C durant 1h espacés de 48h (Bertin *et al.*, 2007), ajout de formaldéhyde (Christensen *et al.*, 2004), acidification à pH 2 (Hernandez-Raquet *et al.*, 2007) et enfin ajout d'azide de sodium (Trably *et al.*, 2003). Ces tentatives de blocage de toute activité biologique échouent parfois (Dionisi *et al.*, 2006; Bertin *et al.*, 2007), et lorsque la stérilité est maintenue, les pertes quantifiées varient entre 0% (Chang *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005b) et 25% pour le fluorène (Trably *et al.*, 2003), 10% pour le NP (Patureau *et al.*, 2008) et 20% pour les PCBs (Patureau & Trably, 2006). Cette quantification des pertes abiotiques manque dans beaucoup de cas, où l'abattement calculé ne reflète pas exactement l'activité biologique (Bernal-Martinez *et al.*, 2005; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2006; Dionisi *et al.*, 2006; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2007a; El-Hadj *et al.*, 2007). Ces résultats sont alors difficilement comparables, et les fortes disparités notées peuvent être en partie, mais sans certitude, expliquées par ce phénomène.

L'hypothèse de limitation de la biodégradation des CTOs par leur biodisponibilité est souvent avancée (Chang *et al.*, 2003; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2006; Patureau & Trably, 2006), en reliant cette biodisponibilité aux phénomènes de sorption. Cette hypothèse

est renforcée par le fait que l'ajout de surfactants et donc la solubilisation des CTOs améliore leur biodégradation (Chang *et al.*, 2005b).

Un **pré-traitement** en amont de la digestion anaérobie visant à solubiliser la matière organique des boues (paragraphe I.1.3.3) permet aussi d'améliorer la biodégradation des CTOs qu'elles contiennent (Carballa *et al.*, 2006; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2007b).

L'ajout de **sources additionnelles de carbone** permet d'améliorer la vitesse et le taux de dégradation des HAPs/NP/PCBs (Chang *et al.*, 2005b; Dionisi *et al.*, 2006; Bertin *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont démontré que la digestion anaérobie de boues contaminées était **plus efficace en conditions thermophiles que mésophiles** en terme d'abattement des HAPs (Trably *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2004; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2006; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2007a) et PCBs (El-Hadj *et al.*, 2007). Cependant, une étude s'oppose à ce consensus, dans laquelle le contraire a été observé (Bertin *et al.*, 2007).

La stratégie de **bioaugmentation**, c'est-à-dire l'ajout de microorganismes adaptés, peut permettre d'augmenter la biodégradation des HAPs (Trably *et al.*, 2003; Da Silva & Alvarez, 2004; Jouanneau *et al.*, 2005; Mancera-Lopez *et al.*, 2008).

La confrontation de ces résultats laisse entrevoir la pluralité et la complexité des mécanismes qui conditionnent le devenir des CTOs, et en particulier des HAPs/NP/PCBs, au cours de la digestion anaérobie de boues contaminées. Ils s'opèrent de manière simultanée, et sont donc très difficiles à étudier, de sorte que le procédé est souvent appréhendé comme une « boîte noire », ou bien seul l'un des mécanismes est étudié. Parmi ces mécanismes, il en est d'ordre biologique et d'autres d'ordre physico-chimique. L'état de l'art concernant ces deux types de mécanismes sera présenté dans les deux paragraphes suivants.

I.3 Processus biologiques impliqués dans la biodégradation des HAPs/NP/PCBs au cours de la méthanisation

I.3.1 Déhalogénéation réductrice

I.3.1.1 Mécanisme

La biodégradation des PCBs est initiée par la rupture des liaisons entre atomes de carbone et de chlore. Cette hydrolyse est consommatrice d'électrons. Les PCBs peuvent donc jouer le rôle d'accepteur d'électrons et permettre la conservation d'énergie dans un processus nommé déhalogénéation réductrice ou halorespiration (Figure I-11). Deux types de halorespiration se distinguent : hydrogénéolytique et dihaloélimination (Smidt & de Vos, 2004). Ce dernier est caractérisé par le décrochage simultané de deux halogènes voisins portés par deux atomes de carbone aliphatiques qui deviennent alors liés par une double liaison. Le processus mis en jeu dans les cas des PCBs est donc hydrogénéolytique (aucun carbone aliphatique). Cette réaction est thermodynamiquement favorable, et le potentiel redox varie entre +260 et +480 mV selon le radical R, ce qui fait des molécules chlorées un

meilleur accepteur d'électron que le sulfate ($\text{SO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{S}$: $E_0' = -217$ mV) et proche du nitrate ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$: $E_0' = +433$ mV) (Smidt & de Vos, 2004). Les microorganismes halo-respirants participent donc au métabolisme de l'hydrogène, intermédiaire clé de la digestion anaérobie.

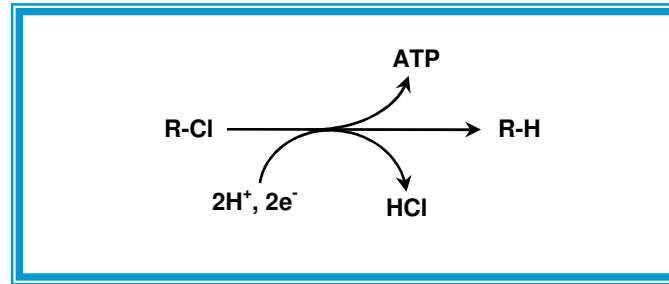


Figure I-11 : Réaction de déhalogénéation réductrice hydrogénolytique d'une molécule chlorée.

Plusieurs consortia ont été enrichis, qui sont capables de déchlorer des PCBs. Chacun de ces consortia présente une **activité très spécifique, en termes de substrat et de mécanisme**. Par exemple, le consortium *ortho* enrichi sur 2,3,5,6-CB déchlorine les deux Cl en position ortho du 2,3,5,6-CB (Cutter *et al.*, 1998) et la culture DF enrichie sur le même PCB les Cl doublement encadrés en meta et para : 2,3,4,5-CB, 2,3,4-CB, 2,3,4,6-CB et 3,4,5-CB (Wu *et al.*, 2000). En effet, huit mécanismes différents de déchloration des PCBs ont pu être répertoriés selon la position des atomes de chlore ainsi que leur voisinage (Bedard, 2008), ce qui témoigne de la pluralité et de la spécificité des enzymes déhalogénases. C'est donc l'action conjointe de plusieurs déhalogénases et probablement de plusieurs microorganismes – un microorganisme pouvant porter plusieurs gènes codant chacun pour une déhalogénase (Holscher *et al.*, 2004) jusqu'au nombre de 32 (Kube *et al.*, 2005) – qui permet la déchloration totale des PCBs en biphényle (Hiraishi, 2008). Les cas d'observation de déchloration totale des PCBs sont rares, mais du biphényle (BP) a tout de même pu être quantifié lors de la dégradation de 2,3,4,5,6-CB par un consortium méthanogène (Natarajan *et al.*, 1996).

I.3.1.2 Acteurs

Les microorganismes pratiquant la déhalogénéation réductrice possèdent au moins un gène codant pour une enzyme déhalogénase. Concernant les déhalogénases, les études les plus nombreuses portent sur la déchloration des solvants perchloroéthène (tétrachloroéthène) et trichloroéthène. Elles ont mis en évidence la classique organisation en opérons, mais dont le nombre de gènes et leur position peut varier d'une espèce à une autre et même au sein d'un même microorganisme. Toutefois, tous les opérons séquencés possèdent en commun deux gènes le plus souvent co-transcrits (Futagami *et al.*, 2008) nommés *rdhA* et *rdhB* pour le terme générique de *reductive dehalogenase*. Les termes plus spécifiques *tceA* et *tceB* sont parfois employés dans la littérature lorsque l'activité spécifique de déhalogénéation du trichloroéthène est considérée, ou encore *pceA* en référence au perchloroéthène. Le gène *rdhA* code pour la sous-unité catalysant la déhalogénéation réductrice. Il s'agit d'une protéine

nécessitant un cofacteur corrinnoïde, et présentant plusieurs unités catalytiques fer-soufre. Le transcrite de *rdhA* possède une séquence consensus TAT « twin arginine translocation » à son extrémité N-terminale (RRXFXK, avec R=arginine, X=acide aminé variable, F=phénylalanine et K=lysine). La translocation de RdhA à travers la membrane est alors couplée au clivage de ce signal peptidique. RdhA se lie ensuite à la protéine membranaire hydrophobe codée par *rdhB*, qui joue donc le rôle d'ancrage. Cette localisation membranaire renforce le rôle de transport d'électrons couplé à la phosphorylation (respiration). De façon étonnante, *rdhB* se trouve en amont ou en aval selon qu'il s'agisse de haloarylréductase (substrat aromatique) ou bien d'haloalkylréductase (substrat aliphatique) (Smidt & de Vos, 2004). L'opéron peut ensuite comprendre des gènes codant pour des protéines chaperonnes liées à la maturation de RdhA (*rdhD*, *rdhE* et *rdhT*), un régulateur transcriptionnel spécifique (*rdhK*) associé à des *haloboxes*, sites d'interaction en amont de *rdhA*, mais aussi un régulateur transcriptionnel de localisation membranaire (*rdhC*) (Futagami *et al.*, 2008).

L'alignement de séquences *rdh* a démontré la présence de zones conservées au sein du cluster, liées aux caractéristiques biochimiques de l'enzyme, comprenant notamment le signal TAT et les séquences codant pour les cystéines impliquées dans les noyaux fer-soufre. Ces alignements ont permis de créer des amorces dégénérées permettant d'amplifier les versions de *rdh* (von Wintzingerode *et al.*, 2001; Sung-Keun Rhee, 2003; Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004; Regard *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008). Ces systèmes excluent très probablement certaines versions de *rdh*, et ils rassemblent des gènes codant pour des Rdh aux substrats très différents, puisque ces enzymes présentent des spectres de substrats très variables (paragraphe I.3.1.1). Ce deuxième biais peut être diminué par la conception d'amorces spécifiques de *rdh* impliquées dans la déhalogénéation d'un substrat donné (Ritalahti *et al.*, 2006).

Par ailleurs, **tous substrats confondus**, les bactéries haloinspirantes identifiées à ce jour se répartissent entre les phyla *Proteobacteria*, *Chloroflexi* et *Firmicutes*, le genre le plus représenté étant *Dehalococcoides*, suivi de *Dehalobacter* et *Desulfitobacterium* (Hiraishi, 2008). Une deuxième stratégie vient donc s'ajouter à la détection des acteurs de la déhalogénéation via la détection du gène *rdh* : la stratégie phylogénétique, où l'indicateur choisi est le gène codant pour l'ARNr 16S. Le genre *Dehalococcoides* peut être ciblé (Smits *et al.*, 2004; Ritalahti *et al.*, 2006; Cupples, 2008) tout comme les genres *Dehalobacter* ou *Desulfitobacterium* (Cupples, 2008). Ce système exclut les bactéries haloinspirantes des autres genres, et inclut tous les individus du genre, dont certains ne possèdent pas la fonction.

Quant aux bactéries **PCB-déhaloinspirantes** identifiées, elles sont très peu nombreuses à ce jour. La capacité à déchlorer certains PCBs de *Dehalococcoides ethenogenes* 195, première bactérie déchlorant totalement le perchloroéthène isolée en 1997 (Maymo-Gatell *et al.*), a été démontrée (Fennell *et al.*, 2004). C'est à ce jour la seule bactérie PCB-déhaloinspirante isolée et séquencée. D'autres bactéries ont toutefois été identifiées sans pouvoir être isolées. La bactérie o-17 est issue de l'enrichissement *ortho* obtenu par Cutter *et al.* (1998). L'analyse de différents profils DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) du gène codant pour l'ARNr 16S pratiquée par les mêmes auteurs, a démontré la corrélation de la croissance d'un seul phylotype avec l'activité mesurée de déhalogénéation du 2,3,5,6-CB (Cutter *et al.*, 2001). La bactérie o-17 ainsi identifiée appartient au phylum des *Chloroflexi*,

mais est profondément branchée par rapport au genre *Dehalococcoides* (moins de 89% d'identité sur 879 paires de base, alors qu'au sein du genre *Dehalococcoides*, la similarité des séquences est supérieure à 98%) (Figure I-12).

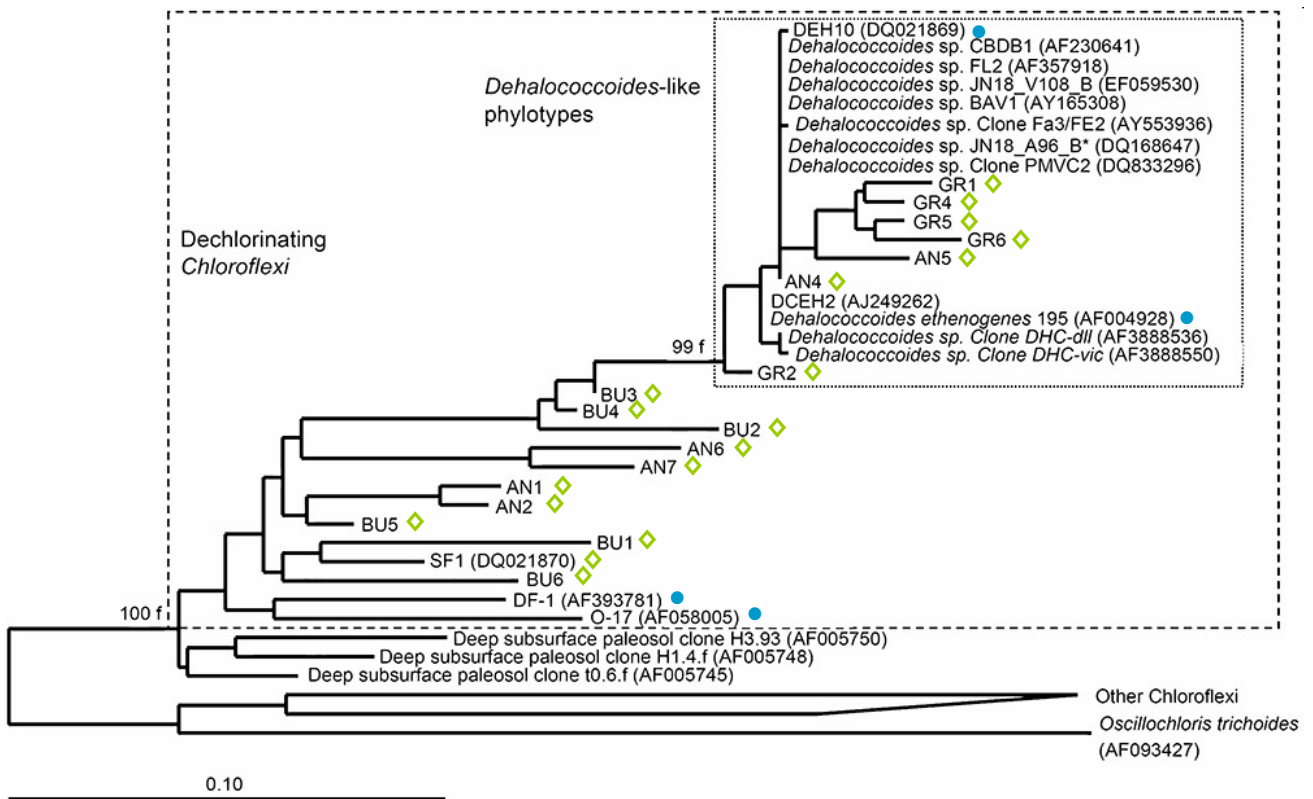


Figure I-12 : Arbre phylogénétique représentant dans l'encadré en pointillés les phylotypes PCB-déhalorespirants avérés (●), les phylotypes PCB-déhalorespirants supposés, identifiés grâce au système développé par Watts *et al.* (2005) (◇) et les phylotypes *Dehalococcoides* déhalorespirants d'autres substrats chlorés (Kjellerup *et al.*, 2008). L'échelle indique 10 substitutions pour 100 nucléotides.

Grâce à une approche expérimentale très similaire sur d'autres enrichissements déchlorant des PCBs, la bactérie DF-1 (phylum *Chloroflexi*, avec 91% d'identité sur 733 pb avec o-17, hors *Dehalococcoides*) a été identifiée (Wu *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002) ainsi que plusieurs autres phylotypes du genre *Dehalococcoides* (Yan *et al.*, 2006; Bedard *et al.*, 2007). Mais les séquences *PCB-rdh* de ces organismes ne sont pas disponibles. C'est pourquoi des stratégies phylogénétiques ont émergé. La stratégie phylogénétique précédemment évoquée qui cible les *Dehalococcoides* (Cupples, 2008) ne permet pas de détecter o-17 et DF-1, ni d'autres bactéries PCB-déhalorespirantes (Watts *et al.*, 2005). Un système de détection complémentaire a donc été développé en 2005 (Watts *et al.*) : l'amorce *Dehal1265* est spécifique du groupement profondément branché formé par o-17 et DF-1 (Figure I-12). Grâce à cette amorce spécifique couplée à une amorce universelle, de nouveaux phylotypes de *Chloroflexi* ont été obtenus dans des enrichissements de sites pollués, hors du genre *Dehalococcoides*, dont certains très proches de o-17 et DF-1. En parallèle, la même équipe de recherche publiait un autre jeu d'amorces, conçu pour amplifier les phylotypes o-17/DF-1-like et *Dehalococcoides spp.* (Fagervold *et al.*, 2005). Ce système associe une amorce

spécifique des *Chloroflexi* (Chl348) à une amorce spécifique des phylotypes PCB-déhalorespirants (Dehal1884). Pour cette dernière, les quatre séquences de phylotype PCB-déhalodégradant connus à cette date ont été alignés : o-17, DF-1, DEH10 (du genre *Dehalococcoides*, identifié au cours de ce même travail), et *Dehalococcoides ethenogenes* 195. Ce système de détection a permis d'identifier dans des sédiments le nouveau phylotype *Chloroflexi* SF1 (Fagervold *et al.*, 2007) puis une autre quinzaine de phylotypes (Kjellerup *et al.*, 2008).

I.3.2 Biodégradation des molécules aromatiques HAPs/NP/BP

I.3.2.1 Mécanismes

Les noyaux benzéniques représentent la deuxième unité de structure chimique la plus abondante dans la nature. Grâce à leur abondance, leur capacité au transfert horizontal de gènes et à leur haut taux de croissance, les microorganismes évoluent rapidement et s'adaptent aux substrats disponibles. Des stratégies ont ainsi été développées par les bactéries afin d'obtenir de l'énergie à partir d'un très large spectre de composés. Cette versatilité englobe l'utilisation de certains CTOs aromatiques (Diaz, 2004).

Les recherches menées sur les voies de dégradation anaérobie des molécules aromatiques portent majoritairement sur les BTEX : benzène, toluène, éthylbenzène et xylène (Gibson & S. Harwood, 2002). En revanche, de très grandes similitudes entre les mécanismes mis en évidence sur le benzène et sur le naphthalène sont apparues. En effet, grâce au marquage de bicarbonate au ^{14}C , l'activation du naphthalène par incorporation de CO_2 a été mise en évidence (Zhang & Young, 1997), de la même façon que le benzène est activé en benzoate (Figure I-13). L'intermédiaire carboxylé naphthoate a aussi été détecté dans une étude toute récente (Musat *et al.*, 2009). Cependant, il n'est pas déterminé si l'incorporation du groupe carboxyl provient d'une réaction de carboxylation, ou d'une autre réaction ou encore d'une série de réactions.

Par ailleurs, une deuxième voie d'activation du naphthalène a été mise en évidence, initiée par une méthylation (Safinowski & Meckenstock, 2006). Les activités enzymatiques d'addition de fumarate (Annweiler *et al.*, 2000), puis de co-enzyme A, et de déshydrogénation (Safinowski & Meckenstock, 2004) ont pu être mesurées, de façon analogue au toluène (Leuthner *et al.*, 1998; Leutwein & Heider, 2001; Leutwein & Heider, 2002). Les réactions de transfert de coenzyme A étant réversibles (enthalpie libre quasi-nulle), le 2-naphthoate et le 2-naphthoyl-CoA sont très probablement en équilibre. De plus, les méthodes d'extraction chimique peuvent conduire à l'hydrolyse de l'ester de coenzyme A. Cette deuxième voie d'activation n'est donc pas forcément différente de la première (Foght, 2008).

L'activation du naphthalène permet l'attaque du noyau aromatique, dont certains intermédiaires ont pu être mis en évidence sous leur forme carboxyl, tels deux tétrahydro-2-naphthoate (Meckenstock *et al.*, 2000), l'octahydro-2-naphthoate, le 2-carboxycyclohexylacétate, et le décahydro-2-naphthoate (Annweiler *et al.*, 2002). Le devenir de ces intermédiaires reste à être élucidé.

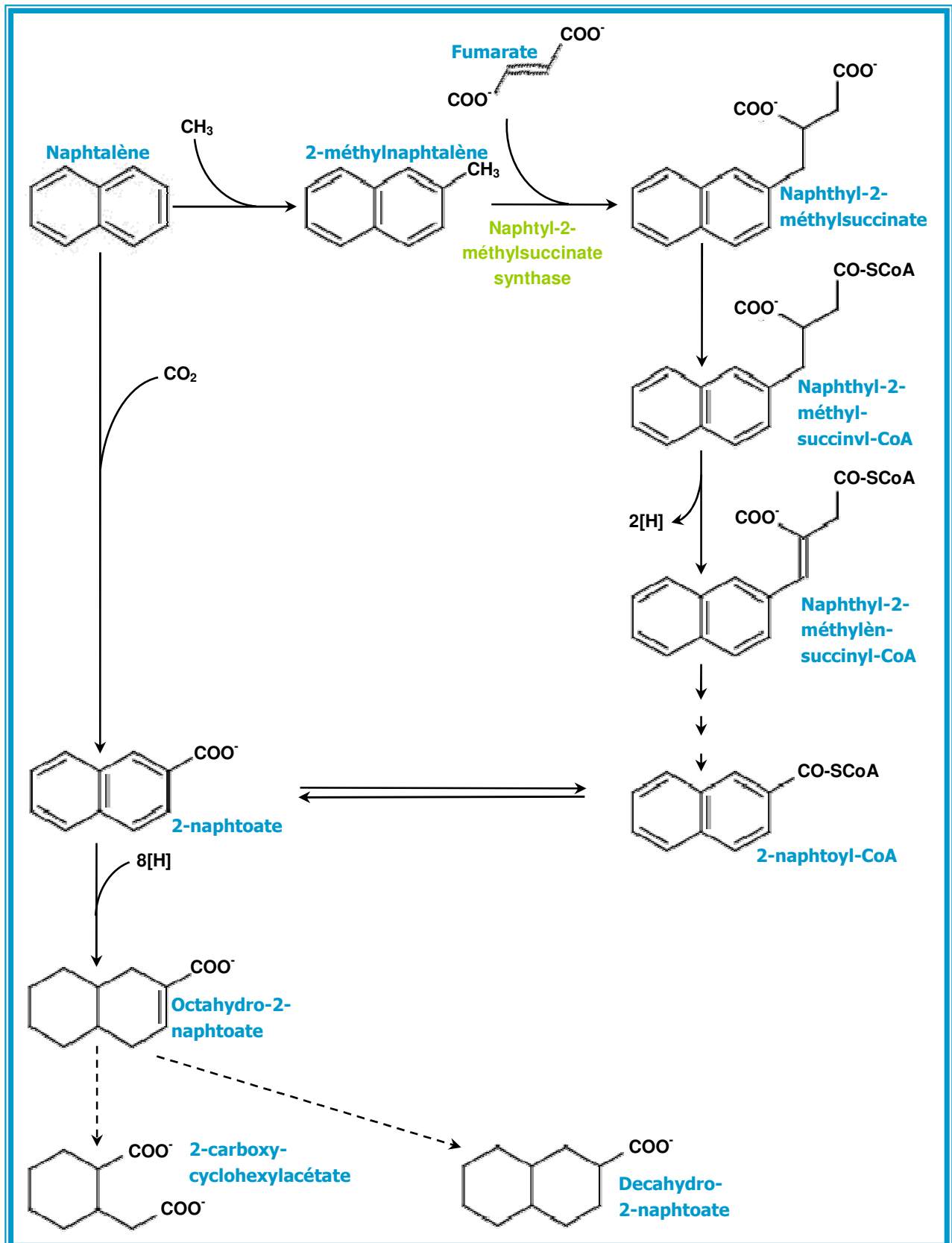


Figure I-13 : Représentation des intermédiaires métaboliques identifiés lors de la dégradation anaérobie du naphthalène, et schémas réactionnels hypothétiques.

Les travaux ayant produit ces résultats ont été menés sur des enrichissements de cultures sulfato-réductrices, et sur un HAP à deux cycles. Cependant, toujours en conditions sulfato-réductrices, la minéralisation du phénanthrène (trois cycles) a aussi été observée (Coates *et al.*, 1997; Zhang & Young, 1997), et l'incorporation de HCO_3^- pour former de l'acide phénanthrène-2-carboxylique mise en évidence (Davidova *et al.*, 2007). Cet intermédiaire métabolique évoque une certaine homologie dans les mécanismes de dégradation du naphthalène et du phénanthrène, et l'absence de discrimination entre carboxylation directe et voie de méthylation persiste dans les deux cas. La dégradation de HAPs jusqu'à 5 cycles a aussi été mesurée en conditions sulfato-réductrices, sans pouvoir affirmer leur minéralisation (Rothermich *et al.*, 2002). Par ailleurs, même si les conditions sulfato-réductrices sont globalement plus favorables à la dégradation des HAPs, Christensen *et al.* (2003) ont démontré par une approche thermodynamique que la dégradation du naphthalène est possible en conditions méthanogènes, et la dégradation de HAPs jusqu'à 6 cycles a pu être mesurée en laboratoire (Chang *et al.*, 2003; Trably *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2004; El-Hadj *et al.*, 2006).

Les voies de dégradation des molécules monoaromatiques substituées telles que l'éthylbenzène, le p-crésol et le toluène possèdent en commun l'intermédiaire benzoyl-CoA (Figure I-14). Le substituant alkyle peut subir une oxydation directe (cas de l'éthylbenzène et du p-crésol) ou bien une oxydation au travers de l'addition de fumarate de façon analogue au 2-méthyl-naphthalène (cas du toluène). Le premier mécanisme s'applique donc sur carbone en α primaire (p-crésol) ou secondaire (éthylbenzène), alors que le second n'a été observé que sur carbone primaire (toluène). Selon les états de valence des intermédiaires produits, les deux mécanismes sembleraient possibles sur un carbone secondaire, mais des phénomènes d'encombrement stérique sont probablement engendrés par le fumarate. Dans le cas du nonylphénol, le premier mécanisme est donc plus probable. En revanche, cette oxydation directe hypothétique du nonylphénol serait uniquement possible pour les isomères possédant un carbone en α primaire ou secondaire, et des contraintes d'encombrement stérique engendrés par le groupement nonyl viennent s'ajouter.

La biodégradation de NP lors de la digestion anaérobie en conditions méthanogènes a été mesurée (Chang *et al.*, 2005b; Trably *et al.*, 2005). Cependant, la connaissance actuelle en matière de dégradation anaérobie se limite à l'enrichissement de consortia et à l'identification de microorganismes impliqués (Trably *et al.*, 2005). Aucun intermédiaire métabolique n'a pu être identifié à ce jour. Mais si le nonylphénol pouvait être converti en hydroxy-benzoyl-CoA, ce qui reste une hypothèse très forte compte tenu de l'absence de connaissances à ce jour, une déhydroxylation réductrice pourrait s'opérer ultérieurement comme dans le cas du p-crésol (Figure I-14) pour donner du benzoyl-CoA. La voie de dégradation du benzoyl-CoA (Figure I-15) comprend l'addition d'atomes d'hydrogène puis de molécules d'eau. Cette oxydation permet l'ouverture du cycle aromatique et son clivage en acétyl-CoA, un intermédiaire du métabolisme central.

Le devenir en conditions anaérobies du biphenyl, molécule aromatique produite par déhalogénéation des PCBs, doit lui aussi être élucidé. Deux intermédiaires métaboliques ont

été identifiés lors de la minéralisation de biphényle. Une première étude menée en conditions sulfato-réductrices a révélé la présence d'acide biphényle-4-carboxylique dans le milieu de culture (Drazenka Selesi, 2009). Cet intermédiaire n'est pas sans rappeler les voies de dégradation des composés monoaromatiques (Figure I-14) et du naphthalène (Figure I-13).

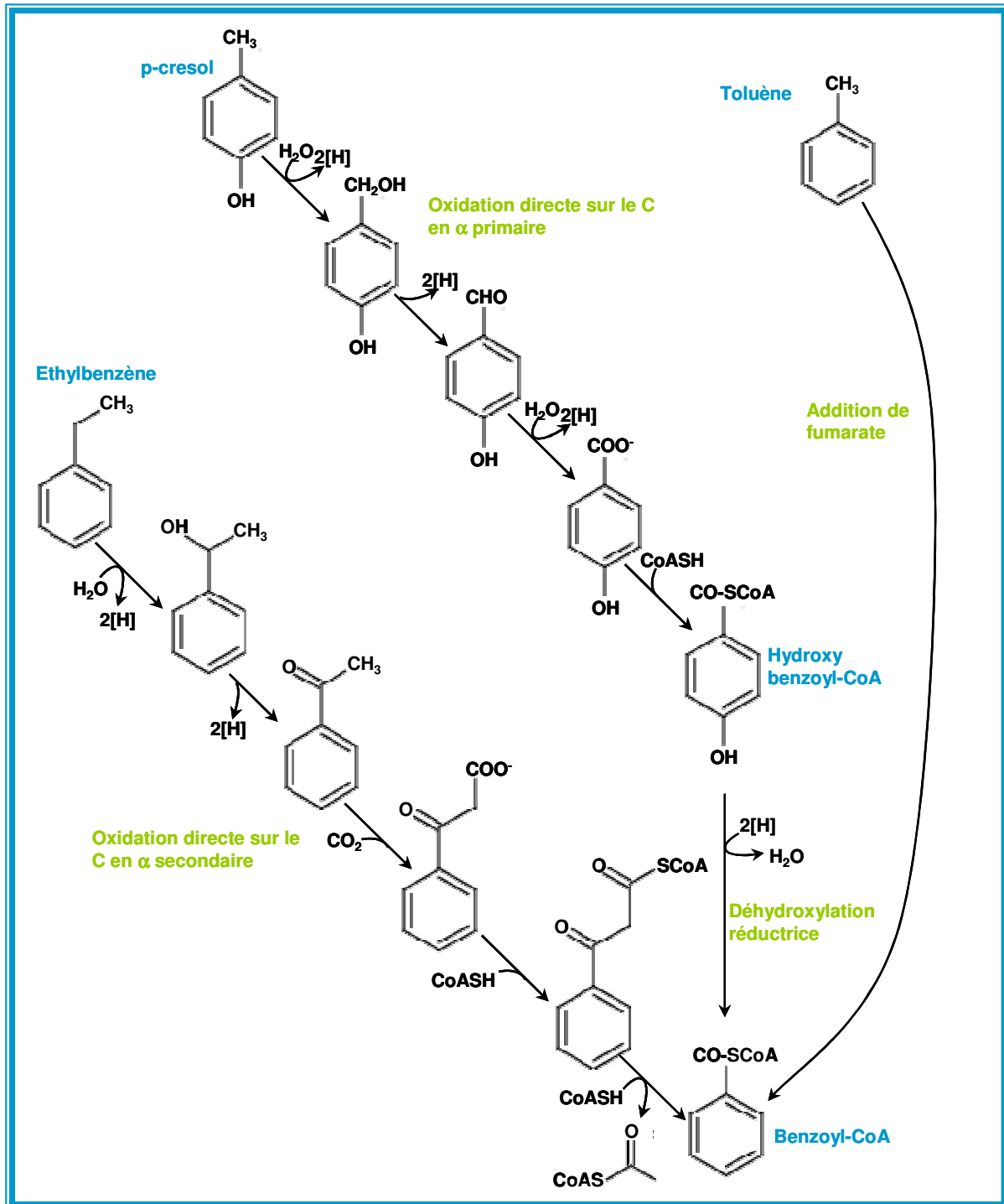


Figure I-14 : Voies de conversion des molécules monoaromatiques éthylbenzène, p-cresol et toluène en benzoyl-CoA (Gibson & S. Harwood, 2002).

Par ailleurs, le p-crésol a été quantifié lors de la dégradation de biphényl en conditions méthanogènes (Natarajan *et al.*, 1999). Cet intermédiaire suggère l'existence d'une deuxième voie de biodégradation. Le p-crésol est ensuite converti en benzoyl-CoA (Figure I-14), lui-même dégradé en acétyl-CoA (Figure I-15) pour alimenter les activités anaboliques et cataboliques, et ainsi permettre croissance des microorganismes et minéralisation sous forme de CO₂ et CH₄.

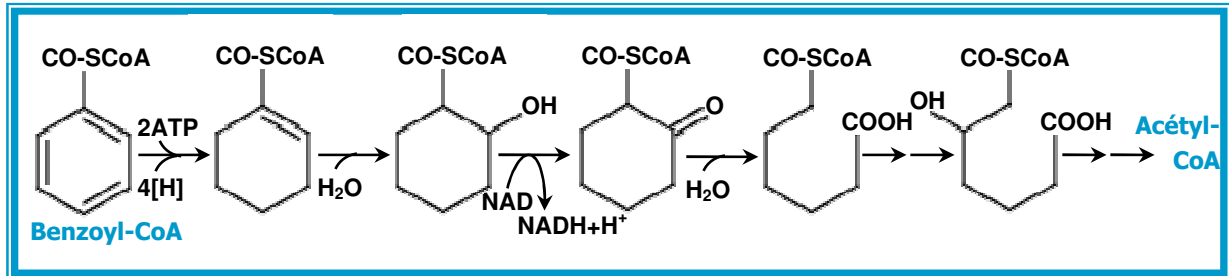


Figure I-15 : Voie de biodégradation anaérobie du benzoyl-CoA (Gibson & S. Harwood, 2002).

I.3.2.2 Acteurs

Parmi les acteurs de la biodégradation anaérobie des molécules aromatiques, ceux possédant le gène *bssA* ont reçu une attention particulière. Le gène *bssA*, impliqué de façon assurée dans la dégradation des molécules monoaromatiques, a été caractérisé pour la première fois chez la bactérie dénitrifiante *Thauera aromatica*. Il fait partie de l'opéron *bss*, codant pour les différentes sous-unités de l'enzyme benzyl-succinate synthase. Cette enzyme catalyse le transfert d'un résidu succinate sur un substituant méthyle porté par un noyau benzénique (voir paragraphe I.3.1.1). Le schéma réactionnel hypothétique serait initié par la formation d'un radical benzyle catalysée par l'enzyme sous sa forme activée, radicalaire, par transfert d'un atome d'hydrogène. Le radical benzyl s'ajouterait alors au niveau de la double liaison du fumarate pour former un radical benzylsuccinyl. Enfin, la régénération de l'enzyme produirait le benzylsuccinate (Heider *et al.*, 1998). Cette enzyme hétéro-hexamérique est constituée d'une sous-unité α et d'une α' codées par le gène *bssA*, de deux sous-unités β codée par *bssB* et de deux sous-unités γ codées par *bssC* (Figure I-16). L'opéron porte un quatrième gène *bssD* en amont, identifié par homologie de séquence comme potentielle enzyme d'activation radicalaire, ainsi qu'un gène *bssE* en aval, de fonction non identifiée.

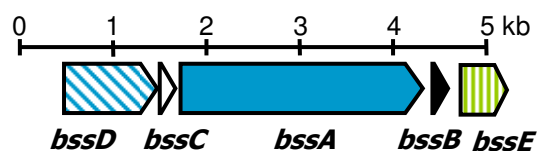


Figure I-16 : Organisation de l'opéron *bss* codant pour la benzyl-succinate synthase (gènes *bssCAB*), pour une protéine activatrice (gène *bssD*) et pour une protéine de fonction inconnue (gène *bssE*) chez *Thauera aromatica* K172 (Leuthner *et al.*, 1998).

L'arrangement *bssCAB* de la souche *Thauera aromatica* K172 est retrouvé chez *Thauera aromatica* T1 dans l'opéron baptisé *tut*, avec l'arrangement *tutFDG* (Coschigano, 2000). De plus, *tutE* coderait pour une enzyme activatrice de la même façon que *bssD*, mais l'organisation globale des opérons *bss* et *tut*, ainsi que les mécanismes transcriptionnels sont différents dans les deux souches. En revanche, les séquences d'acides aminés prédites pour les benzylsuccinate synthases chez *Thauera aromatica* K172 et *Thauera aromatica* T1 sont quasi identiques. De plus, l'arrangement *bssCAB* a été retrouvé chez *Azoarcus* sp. T, avec 90% d'identité des produits avec les sous-unités BssC, BssA et BssB de *Thauera aromatica* K172 et 60 à 80% avec TutF, TutD et TutG de *Thauera aromatica* T1 (Achong *et al.*, 2001). De même, l'arrangement *bssCAB* a été mis en évidence dans différentes souches dénitrifiantes telles que *Azoarcus*-like EbN1 (Kube *et al.*, 2004), *Magnetospirillum* TS-6 (Shinoda *et al.*, 2005), une souche ferro-réductrice : *Geobacter metallireducens* (Kane *et al.*, 2002) et dans un consortium méthanogène (Washer & Edwards, 2007), avec d'importants pourcentages d'identité.

Ainsi, le gène *bssA* est présent chez des bactéries phylogénétiquement très éloignées, appartenant aux phyla des *proteobacteria* (classes β - et δ -*proteobacteria* représentées) et des *Firmicutes* (Winderl *et al.*, 2007). De plus, les distances génétiques entre *bssA* sont très différentes des distances entre ADNr 16S si l'on compare les microorganismes porteurs (Winderl *et al.*, 2007), et les taux de G+C de *bssA* sont différents du reste du génome au sein d'un même microorganisme (Barragan *et al.*, 2004). Ces éléments traduisent un très probable transfert horizontal des gènes, très classique des gènes de voies de biodégradation des xénobiotiques, généralement regroupés en clusters et souvent portés par des éléments génétiques mobiles facilitant leur transfert, tels que les transposons ou plasmides (van der Meer *et al.*, 1992).

La création d'une banque de données de séquences *bss* a permis, par alignement de séquences, de définir des zones conservées. Ce caractère conservé entre espèces fait de *bss* un bon candidat en matière d'indicateur moléculaire fonctionnel. De l'identification de zones conservées a découlé la conception d'amorces dégénérées permettant l'amplification des versions séquencées de ce gène. La première application majeure conséquente à la conception d'amorces est l'amplification et l'identification de nouvelles séquences *bss* ainsi ciblées (Washer & Edwards, 2007; Winderl *et al.*, 2007), afin de, par itérations, alimenter la banque de données qui reste à ce jour limitée et ajuster le système d'amplification. La deuxième application majeure concerne la quantification du nombre de copies de gènes codant pour la BssA, réalisée pour la première fois par Beller *et al.* (2002), renouvelée par la suite (Da Silva & Alvarez, 2004), après alimentation des banques de données et évolution des amorces (Beller *et al.*, 2008; Winderl *et al.*, 2008). Cette application a permis de confronter l'abondance des microorganismes dégradants avec la présence de fortes activités de dépollution de toluène (Da Silva & Alvarez, 2004; Winderl *et al.*, 2008). Ces confrontations confortent l'aspect quantitatif de l'indicateur *bssA*. Enfin, la troisième grande application est l'analyse de la diversité (incluant les notions de présence et abondance) des dégradants au travers d'outils d'empreintes moléculaires. Seuls Winderl *et al.* (2008) citent très brièvement des conclusions issues d'empreintes T-RFLP (*Terminal Restriction Length Polymorphism*) pratiquées sur des amplicons *bssA*-ciblés, sans montrer de résultats. Aucune étude n'expose de résultats complets et aboutis à ce jour.

A l'heure actuelle, il n'a pas été démontré qu'une benzyl-succinate synthase catalysait l'activation de composés aromatiques **polycycliques**. En revanche, la forte homologie entre mécanismes de dégradation des hydrocarbures mono et polyaromatiques, ainsi que le relativement large spectre de substrats monoaromatiques utilisables (Beller & Spormann, 1999), tout comme la détection de *bssA* dans des aquifères majoritairement contaminés en HAPs (Winderl *et al.*, 2007; Winderl *et al.*, 2008) laissent supposer que la benzyl-succinate synthase pourrait assurer **l'activité versatile de « molécule aromatoyl-succinate synthase »**.

1.3.3 Syntrophie

La syntrophie désigne une interaction s'opérant entre au minimum deux microorganismes dont les activités métaboliques sont couplées (Figure I-17). Dans notre contexte, le microorganisme 1 catalyse la transformation d'un substrat de la matrice boue, alors que le microorganisme 2 métabolise un CTO.

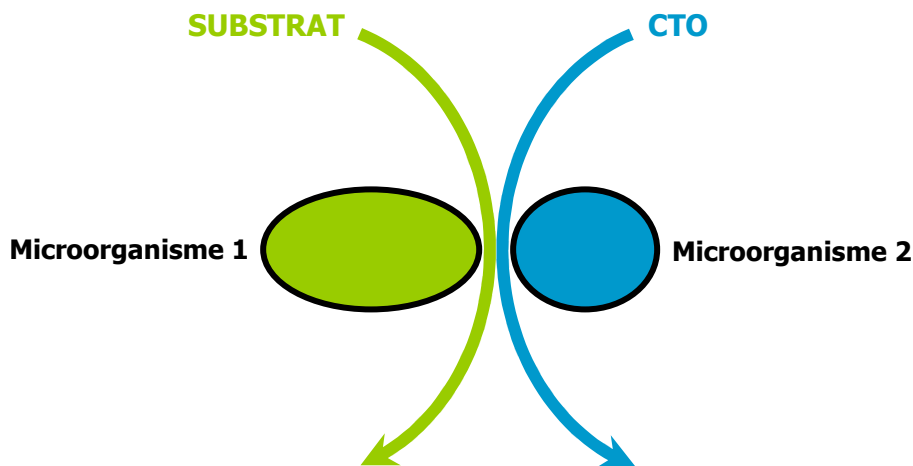


Figure I-17 : Schématisation de la syntrophie

Le couplage peut consister en une consommation par le microorganisme 1 d'un sous-produit de l'activité du microorganisme 2, par exemple de l'hydrogène, de l'acétate ou du fumarate (Gibson & S. Harwood, 2002). Une telle interaction a pu être mise en évidence entre *Syntrophus aciditrophicus* SBT, souche dégradant le benzoate, et des microorganismes utilisant l'hydrogène produit par la dégradation du benzoate (Jackson *et al.*, 1999). Ce type de syntrophie est probable dans le cas de la dégradation des molécules aromatiques auxquelles nous nous intéressons.

Le premier argument en faveur de cette hypothèse est d'ordre thermodynamique. En effet, la dégradation totale de ces molécules par les microorganismes fermentaires produit de l'hydrogène. Et globalement, la quantité d'hydrogène produit par molécule dégradée augmente avec le nombre de cycles, si l'on considère la dégradation totale des HAPs en

acétate et H₂ (Figure I-18). Christensen *et al.* (2004) ont démontré le caractère syntrophique obligatoire de dégradation du naphthalène par calcul de l'énergie libre de la réaction dans des conditions standards méthanogènes. La dégradation des aromatiques serait donc conditionnée par la consommation de l'hydrogène par les microorganismes **méthanogènes hydrogénotrophes ou sulfato-réducteurs**. Le caractère obligatoire est probablement plus marqué pour les HAPs de haut poids moléculaire. Cette approche est criticable, car les conditions standard choisies pour le calcul des énergies libres de réaction ne reflètent pas forcément la réalité intracellulaire, ni ne prennent en compte le fonctionnement physiologique et le métabolisme global des cellules. Mais cette approche théorique doit tout de même être considérée, d'autant plus lorsque les expérimentations ne permettent pas de répondre aux questionnements scientifiques.

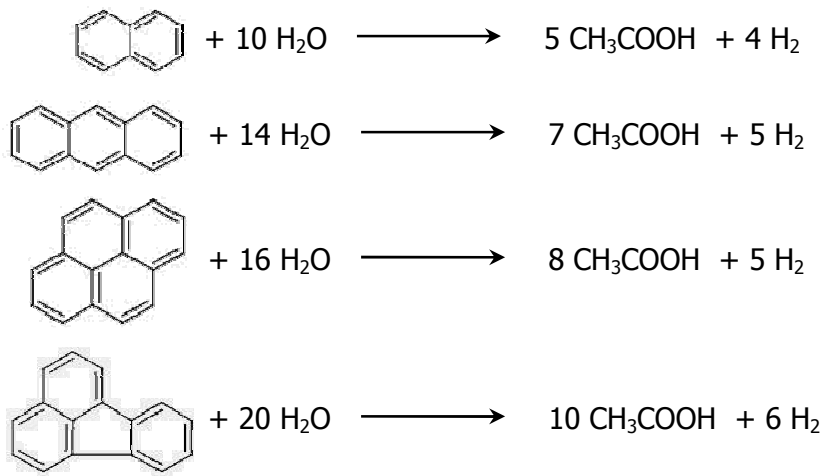


Figure I-18 : Equation bilan de dégradation du naphthalène (Christensen *et al.*, 2004) de l'anthracène, du pyrène et du benzo(k)fluoranthène en acétate et hydrogène.

Le deuxième élément est l'absence d'identification de souches pures capables de dégrader ces CTOs. En effet, à ce jour, seuls des consortia capables d'utiliser certains HAPs (Chang *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2008), le nonylphenol (Trably *et al.*, 2005) et le biphenyl (Natarajan *et al.*, 1999) comme seule source de carbone ont pu être obtenus en conditions méthanogènes, sans jamais pouvoir obtenir de cultures pures.

Le troisième élément concerne l'inhibition des méthanogènes par du bromoéthane sulfonate (BES), qui conduit à une inhibition partielle (Chang *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005b; Dionisi *et al.*, 2006) ou totale (Trably, 2002) de la dégradation des HAPs et NP.

I.3.4 Cométabolisme

Les HAPs possédant moins de quatre cycles ainsi que le nonylphenol peuvent être utilisés comme seule source de carbone. La plupart des consortia présentant cette activité ont été obtenus en conditions sulfato- ou nitrate-réductrices, mais certains enrichissements méthanogènes métabolisent certains HAPs et le nonylphénol (Tableau I-5).

Tableau I-5 : Inventaire des consortia microbiens capable d'utiliser les HAPs, le NP et le biphényl comme seule source de carbone.

Source unique de carbone	Consortium	Conditions d'oxydo-réduction	Référence
Naphtalène	Enrichissement de sédiment	Sulfato-réduction	(Galushko, 1999)
	Enrichissement de sol	Sulfato-réduction	(Meckenstock <i>et al.</i> , 2000)
	Cultures pures	Nitrate-réduction	(Rockne <i>et al.</i> , 2000)
	Enrichissement de sédiment	Méthanogène	(Chang <i>et al.</i> , 2006)
Anthracène	Enrichissement de sol	Sulfato-réduction	(Drazenka Selesi, 2009)
	Enrichissement de sédiment	Sulfato-réduction	(Rockne & Strand, 1998)
	Enrichissement de sédiment	Nitrate-réduction	(Rockne & Strand, 2001)
Phénanthrène	Enrichissement de sédiment	Sulfato-réduction	(Davidova <i>et al.</i> , 2007)
	Sédiment	Méthanogène	(Chang <i>et al.</i> , 2008)
	Enrichissement de sol	Sulfato-réduction	(Drazenka Selesi, 2009)
	Enrichissement de sédiments	Sulfato-réduction	(Rockne & Strand, 1998)
	Enrichissement de sédiments	Nitrate-réduction	(Rockne & Strand, 2001)
	Enrichissement de sédiment	Méthanogène	(Chang <i>et al.</i> , 2006)
Pyrène	Sédiment	Méthanogène	(Chang <i>et al.</i> , 2008)
Nonylphenol	Enrichissement de boue	Méthanogène	(Trably <i>et al.</i> , 2005)
Biphényl	Enrichissement de sol	Sulfato-réduction	(Drazenka Selesi, 2009)
	Enrichissement de sédiment	Sulfato-réduction	(Rockne & Strand, 1998)
	Enrichissement de sédiment	Nitrate-réduction	(Rockne & Strand, 2001)
	Enrichissement de sol	Sulfato-réduction	(Yang <i>et al.</i> , 2008)
	Granules de réacteur UASB	Méthanogène	(Natarajan <i>et al.</i> , 1999)

En revanche, aucune étude n'a pu démontrer la capacité de consortia à utiliser les HAPs à plus de quatre cycles comme seule source de carbone. La dégradation de ces derniers, thermodynamiquement plus défavorable, est donc probablement effectuée par cométabolisme. Par opposition à la syntrophie, le cométabolisme désigne un couplage d'au moins deux réactions opérées par un unique microorganisme (Figure I-19A).

Ainsi, la co-utilisation d'autres substrats génère des flux de carbone et d'énergie au sein des microorganismes, qui peuvent modifier leur pool d'intermédiaires métaboliques et de co-facteurs. Ce nouvel état physiologique peut rendre possible ou plus favorable l'utilisation des HAPs et du nonylphénol comme source de carbone. C'est ainsi que l'ajout de substrats facilement assimilables tels que de l'extrait de levure ou de la cellulose accélère la biodégradation du phénanthrène et du pyrène (Chang *et al.*, 2008) et du nonylphénol (Chang *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005b). Ce cométabolisme peut être qualifié de **carboné**.

En ce qui concerne le cas particulier des PCBs, le cométabolisme pourrait être de deux natures (Figure I-19B), mettant peut-être en jeu des populations différentes. Au cours de la première phase de déhalogénéation, le métabolisme d'un premier type de co-substrat produit des électrons qui sont consommés par le processus de déhalogénéation réductrice (voir paragraphe I.3.1.1). Ce **cométabolisme de type respiratoire** se traduit par une déchloration plus importante des PCBs lorsqu'une source de carbone telle que de l'extrait de levure (Dionisi *et al.*, 2006) ou de la mélasse (Bertin *et al.*, 2007) est ajoutée. Les PCBs

totallement déchlorés donnent du biphényl. Le biphényl pouvant être utilisé comme source de carbone (Tableau I-5), on peut supposer que la deuxième phase de biodégradation des PCBs consistant en la biodégradation de biphényl met en jeu un cométabolisme non obligatoire de type carboné.

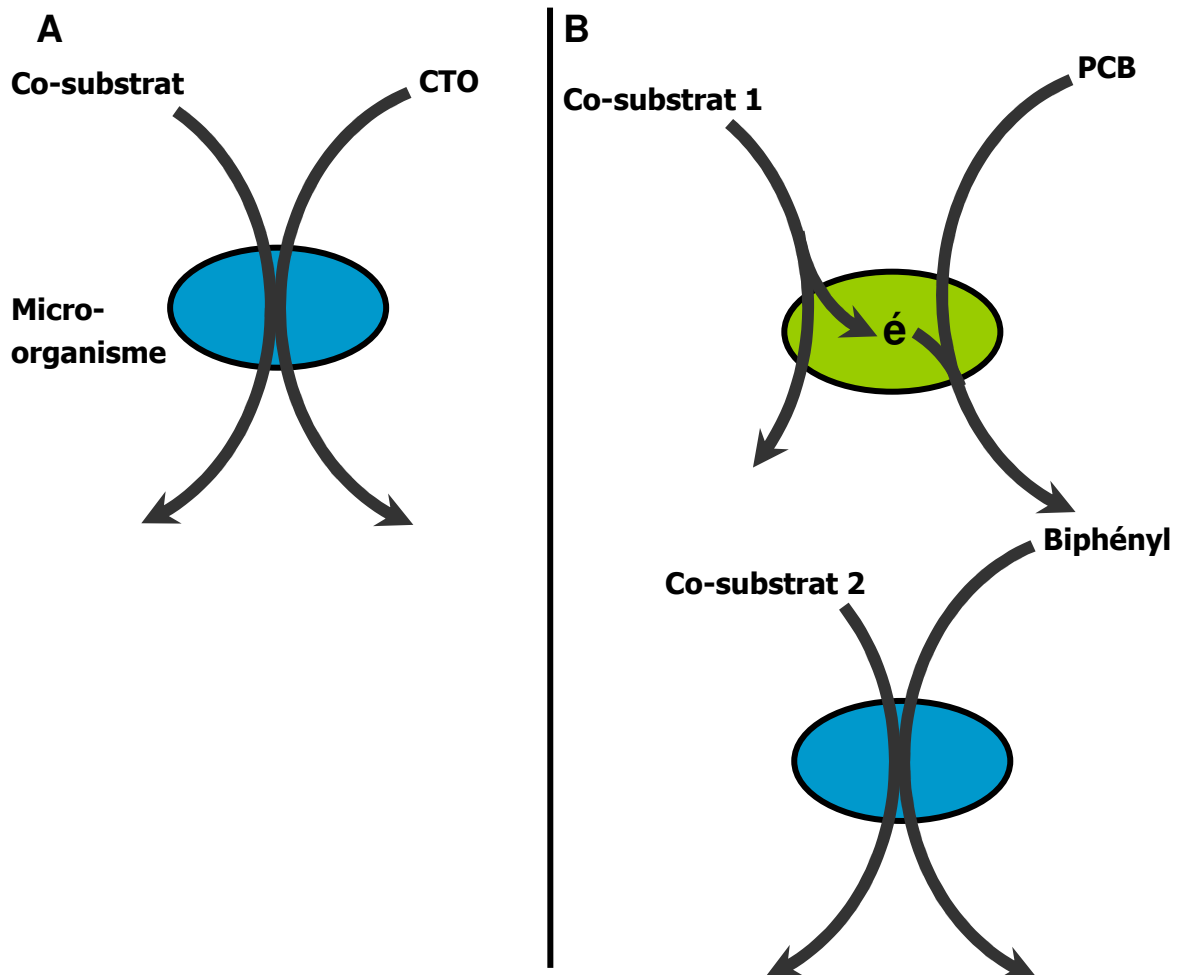


Figure I-19 : Schématisation du cométabolisme dans le cas général des CTOs utilisables comme source de carbone qualifiable de cométabolisme carboné (A) et dans le cas particulier des PCBs où se succèdent probablement un cométabolisme respiratoire puis carboné (B).

1.3.5 Accepteur final d'électrons

Les consortia de digestion anaérobie ne contiennent pas seulement des microorganismes strictement anaérobies, mais aussi des microorganismes anaérobies facultatifs, capables d'utiliser une certaine gamme d'accepteurs d'électrons. En conditions strictement méthanogènes, seul le CO_2 est disponible pour accepter les électrons. D'autres accepteurs d'électrons, tels que des nitrates, sulfates, ont un potentiel redox plus élevé (Tableau I-6). S'ils sont présents lors de la digestion anaérobie de boues d'épuration, leur utilisation est thermodynamiquement plus favorisée, car le transfert d'électron est d'autant plus énergétique que le potentiel redox de l'accepteur est haut. Des calculs thermodynamiques prédisent donc que dans le cas des molécules aromatiques, la dénitrification et la ferro-

réduction permettent un rendement énergétique proche de l'aérobiose, alors que la sulfato-réduction présente un rendement légèrement supérieur aux conditions méthanogènes (Diaz, 2004). Ainsi, lorsque du sulfate est ajouté à raison de 20 mM, la cinétique de biodégradation des HAPs est accélérée de 10 à 270 % selon les molécules (Chang *et al.*, 2003) et celle du NP de 50 % (Chang *et al.*, 2005b). Mais les mêmes auteurs ont observé une inhibition presque totale de la dégradation des HAPs/NP en présence de nitrate à 20 mM, alors que ce dernier est consommé. En effet, la thermodynamique ne prend pas en compte le fait qu'un microorganisme donné puisse ou pas utiliser un accepteur d'électron donné. Ces résultats suggèrent que les microorganismes nitrate-réducteurs ne soient pas impliqués dans la biodégradation des HAPs/NP, contrairement à certains microorganismes sulfato-réducteurs. Cette conclusion est corroborée par le rôle syntrophique attribué aux microorganismes sulfato-réducteurs (consommation d' H_2), et mis en évidence par l'inhibition de la dégradation des HAPs/NP lorsque ces microorganismes sont inhibés par du molybdate (Chang *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005b; Dionisi *et al.*, 2006).

Tableau I-6 : Valeur de potentiel redox pour les principaux accepteurs d'électrons (Diaz, 2004; Smidt & de Vos, 2004).

Couple redox	Potentiel redox hydrogène (V)	Métabolisme respiratoire
O_2 / H_2O	0.80	Aérobie
NO_3^- / NO_2^-	0.43	Anaérobie / nitrate-réduction
R-Cl / HCl	0.26-0.48	Anaérobie / déhalorespiration
SO_4^{2-} / H_2S	-0.27	Anaérobie / sulfato-réduction
CO_2 / CH_4	-0.40	Anaérobie / méthanogénèse

Cependant, l'azote contenu dans les boues est essentiellement sous forme ammoniacale et organique. Les nitrates sont issus de la nitrification, processus mettant en jeu des microorganismes très spécifiques, et qui est mis en oeuvre pour traiter des effluents à forte teneur en ammoniac. Il est dans ces cas-là couplé à la dénitrification afin de convertir l'élément azote en N_2 . Les nitrates sont donc quasiment inexistantes dans les boues d'épuration.

Quant aux sulfates, ils sont indésirables pendant la digestion anaérobie, car (1) ils favorisent les microorganismes sulfato-réducteurs par rapport aux méthanogènes dans leur compétition pour l' H_2 , et diminuent donc le rendement en méthane, et (2) ils produisent de l' H_2S inhibiteur de la méthanogénèse (Moletta, 2008). La méthanisation ne peut donc pas s'opérer en forte présence de sulfates. Mais les faibles concentrations présentes peuvent jouer un rôle non négligeable dans la biodégradation des HAPs/NP/BP, présents à l'état de trace.

Concernant la conversion des PCBs en biphényle, l'absence de nitrates la rend thermodynamiquement très favorable dans le contexte de la digestion anaérobie de boues d'épuration. En effet, les PCBs ont un potentiel redox plus élevé que le CO_2 et le SO_4^{2-} (Tableau I-6). Si tant est que les bactéries déhalogénantes puissent aussi utiliser ces derniers comme accepteur d'électrons, les PCBs sont favorisés dans cette compétition.

Au cours de la digestion anaérobie des boues d'épuration contaminées, les processus biologiques précédemment exposés s'opèrent dans un milieu très complexe : la matrice boue. Le processus physico-chimique de sorption des HAPs/NP/PCBs à cette matrice joue en effet un rôle majeur. Celui-ci sera donc détaillé dans le paragraphe suivant. Il sera conclu par l'exploration des notions de biodisponibilité et de bioaccessibilité, qui établissent le lien entre sorption et biodégradation.

I.4 Processus physico-chimiques : sorption des HAPs/NP/PCBs dans les boues

I.4.1 Phénomènes de sorption

A ce jour, les compartiments environnementaux sol et sédiment ont été beaucoup étudiés du point de vue des interactions de sorption contrairement aux boues d'épuration, pour lesquelles les connaissances acquises sont bien moindres. Cette partie de synthèse bibliographique s'appuie donc fortement sur l'état de l'art dans les systèmes sol et sédiment.

I.4.1.1 Considérations thermodynamiques générales

De façon très générale, les phénomènes de sorption et de désorption correspondent respectivement aux équations bilan suivantes :



Avec CTO_l : CTO en phase liquide.

CTO_s : CTO sorbé à la phase solide.

Comme toute réaction thermodynamiquement possible, elles sont associées à une variation d'enthalpie libre négative, telle que :

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \text{ (Loi de Gibbs)}$$

Avec ΔG^0 : variation d'enthalpie libre.

ΔH^0 : variation d'enthalpie.

T : température.

ΔS^0 : variation d'entropie.

Ainsi, le phénomène de sorption est généré par deux types de forces : des forces liées à l'enthalpie, et d'autres à l'entropie du système. Les forces liées à l'enthalpie peuvent être les forces de London-Van der Waals (interaction dipôle induit – dipôle induit), les liaisons hydrogène ou les interactions dipôle – dipôle. Par ailleurs, la force entropique majeure provient de l'augmentation du désordre créé dans la phase aqueuse lorsque les molécules d'eaux organisées et structurées autour du composé dissout sont libérées.

Dans le cas particulier de composés organiques hydrophobes sans groupe polaire et de sédiments, la force motrice à l'origine de la sorption est une combinaison de forces de London-Van der Waals entre composé et matrice et de la grande variation d'entropie générée en phase aqueuse (Hamaker & Thompson, 1972).

Par ailleurs, l'enthalpie liée à la sorption de HAPs sur de la matière organique dissoute est très faible : la variation d'entropie est la composante principale de la réaction de sorption sur matière dans ce cas (Raber & Kogel-Knabner, 1997). Par conséquent, les interactions mises en jeu lors de cette sorption sont physiques et faibles, du type attraction hydrophobe.

L'adsorption est un processus surfacique, alors que l'absorption est un processus volumique. L'interaction des CTOs avec des matrices environnementales telles que les boues est difficile à classer dans l'un des deux types de processus. Si les floccs, par exemple, sont considérés comme un milieu continu dans lequel les CTOs viennent s'incorporer, alors le terme absorption est plus approprié. En revanche, dans la description poreuse des floccs, avec des pores remplis du milieu continu eau, l'interaction CTO – flocc s'apparente à de l'adsorption aux surfaces que constituent les parois de ses pores. L'échelle d'observation est primordiale dans la distinction entre adsorption et absorption, mais cette distinction reste discutable. Bien que le terme adsorption soit communément employé pour désigner les interactions CTO – matrices environnementales, le terme sorption regroupant adsorption et absorption sera préféré ici.

I.4.1.2 Sorption aux particules

I.4.1.2.1 Cinétique de sorption aux particules

Le suivi de la cinétique de sorption du NP sur des sols agricoles particulières sous agitation a révélé l'existence de deux composantes : durant la première heure, la sorption s'effectue de manière rapide, certainement en surface des particules, alors que durant une deuxième phase d'une vingtaine d'heures, elle s'effectue très lentement et met probablement en jeu des mécanismes de diffusion au sein de la matrice organique (During *et al.*, 2002). La deuxième composante débute au moment où les sites d'interaction superficiels atteignent la saturation, et où le processus de diffusion devient limitant. Ce double processus avait auparavant été démontré dans le cas de la sorption de fluoranthène, naphthalène, et autres CTOs sur sols variés (Karickhoff *et al.*, 1979; Ten Hulscher & Cornelissen, 1996).

La sorption rapide peut être modélisée par une cinétique d'ordre 1 (Ten Hulscher & Cornelissen, 1996) :

$$-\frac{dC_{\text{aqu}}}{dt} = k \times C_{\text{aqu}}$$

Avec C_{aqu} : concentration du composé dans la phase aqueuse.

k : constante de vitesse.

La sorption lente peut quant à elle être modélisée par la loi de Fick :

$$-\frac{dC_{\text{aqu}}}{dt} = \iiint \vec{J} = -D \iiint \overrightarrow{\text{grad}} C_{\text{part}}$$

Avec \vec{J} : densité de flux du CTO.

D : coefficient de diffusion du CTO à travers les particules.

C_{part} : concentration du CTO sorbé aux particules.

Sans apport d'énergie, sous forme mécanique par exemple, la sorption se fait beaucoup plus lentement (During *et al.*, 2002).

Cette double cinétique de sorption a aussi été observée dans le cas d'œstrogènes sur un sol d'estuaire, en conditions agitées (Lai *et al.*, 2000) et dans le cas de pesticides sur sédiments (Gao *et al.*, 1998a).

Cependant, ces deux phases n'ont pu être distinguées dans le cas de **boues d'épuration**, où l'équilibre de sorption du naphthalène, du pyrène et du nonylphénol est atteint avant une heure (Dionisi *et al.*, 2006) et l'équilibre du phénanthrène sur une autre boue avant 2h (Kordel *et al.*, 1997). Le phénomène est alors modélisé par une cinétique d'ordre 1 avec des constantes de temps de 3,34, 19,25 et 6,65 h⁻¹ pour le naphthalène, le pyrène et le nonylphénol respectivement. Si l'on admet que les constantes de temps de sorption et de désorption sont du même ordre de grandeur, ces phénomènes peuvent être considérés comme instantanés dans le contexte de la digestion anaérobie dont l'échelle de temps, *i.e.* le temps de séjour hydraulique, est de l'ordre de 20 jours. De plus, dans l'hypothèse d'une cinétique de biodégradation des CTOs d'ordre 1, les constantes de temps de biodégradation anaérobie du fluorène, du phénanthrène, de l'antracène, du pyrène et du nonylphenol, calculées à partir des données cinétiques de Chang *et al.* (2003; 2005b) sont de l'ordre de 0.03 à 0.4 j⁻¹ et sont donc largement inférieures aux cinétiques de sorption. **Il est donc fort peu probable que les cinétiques de sorption limitent la cinétique de biodégradation de ces CTOs.**

1.4.1.2.2 Isothermes de sorption

Différents modèles décrivant la distribution d'un composé entre ses états libre et sorbé aux particules à l'équilibre existent. Dans le cas de boues d'épuration, le modèle généralement adopté est celui de Freundlich.

L'équation de Freundlich s'écrit : $C_{part} = K_{part} \times (C_{aqu})^{\frac{1}{n}}$

Avec C_{aqu} : concentration du composé dans la phase aqueuse (µg/L).

C_{part} : concentration du composé sorbé à la phase particulaire (µg/kg_{part}).

K_{part} : constante de Freundlich (L/kg_{part}), aussi nommée K_d ou K_f .

$\frac{1}{n}$: coefficient de Freundlich. Lorsqu'il vaut 1, la relation devient linéaire, et

l'équation caractérise alors un modèle de partage (partition).

Dans ce cas, ce modèle d'origine empirique ne présente pas de sens physique, puisqu'il ne rend pas compte de valeur limite de saturation aux très fortes concentrations. Toutefois, il est très largement préféré au modèle de Langmuir, pour ne citer que lui, dans le cas des CTOs, puisque ces derniers sont caractérisés par de très faibles concentrations. En effet, la sorption de CTOs sur des supports de type sol suit une isotherme linéaire jusqu'à 60 à 80%

de la solubilité du composé (Hassett & Banwart, 1987). De même, la sorption et la désorption de NP sur des sols de natures variées (principalement sols agricoles de pH 5,2 à 7,8) adopte dans la plupart des cas une relation linéaire (During *et al.*, 2002).

Cette linéarité est généralisable à la matrice boue. La sorption du BPA sur une boue anaérobiquement stabilisée peut être modélisée par un isotherme de Freundlich de constante 0,96, pour des concentrations allant de 0,5 à 500 mg/L (Ivashechkin *et al.*, 2004). De même, les NP, NP₁EO, NP₂EO, NP₁EC et NP₂EC se sorbent sur des boues activées selon une isotherme de Freundlich quasi-linéaire (Hung *et al.*, 2004). **Globalement, dans le cas de la sorption de CTOs hydrophobes sur des boues, dans des concentrations proches des conditions réelles (paragraphe I.2.5), l'isotherme linéaire convient pour modéliser l'état d'équilibre.**

I.4.1.2.3 Phénomène d'hystérésis

Certains isothermes de sorption et de désorption ne sont pas superposables : il n'y a pas réversibilité, un phénomène d'hystérésis se produit. En effet, l'équilibre obtenu par désorption (mise en contact entre une phase solide de concentration excédentaire et une phase liquide de concentration déficitaire par rapport à l'état d'équilibre) est différent de celui obtenu par sorption (mise en contact d'une phase solide déficitaire avec une phase liquide excédentaire). L'explication avancée est qu'il se crée des interactions entre CTO sorbé et sol plus fortes que celles à l'origine de la sorption (During *et al.*, 2002). La dimension temps est à prendre en compte : plus le CTO reste longtemps sorbé, et plus le phénomène d'hystérésis est accentué (Gao *et al.*, 1998a).

Selon les cas observés dans la littérature, le phénomène est formalisé différemment (Figure I-20).

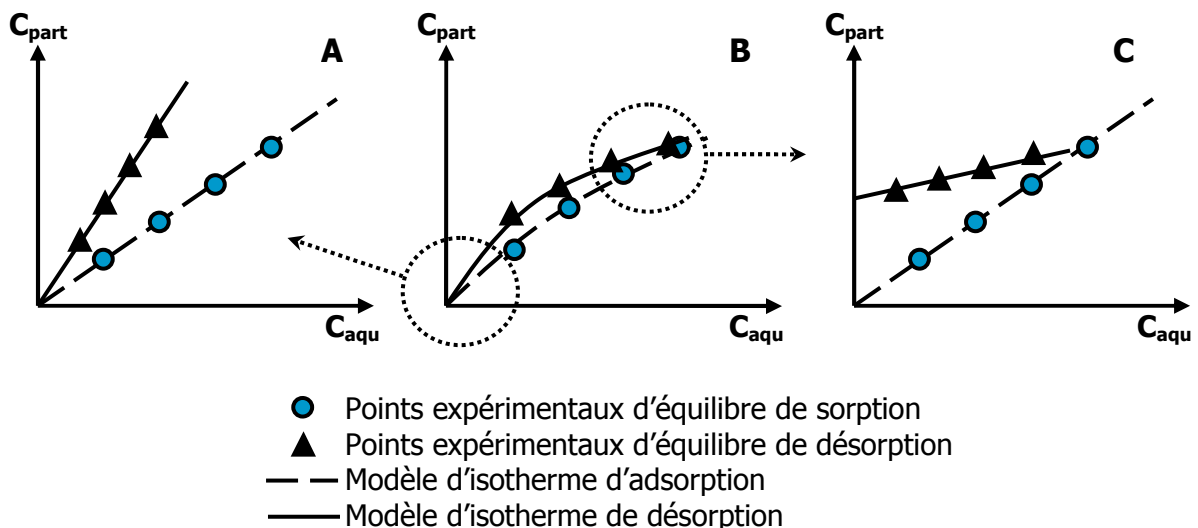


Figure I-20 : Représentation des modèles mathématiques utilisés pour la sorption du nonylphénol dans des sols en A (During *et al.*, 2002), pour des pesticides dans des sédiments en B (Gao *et al.*, 1998b) et pour des herbicides dans un sol en C (Benoit *et al.*, 2008).

Dans le cas A (Figure I-20), les isothermes de sorption et de désorption sont toutes deux linéaires. Le phénomène d'hystérésis est alors quantifié par le coefficient H_{During} , tel que :

$$H_{\text{During}} = \frac{K_{\text{part}}^{\text{des}} - K_{\text{part}}^{\text{ads}}}{K_{\text{part}}^{\text{des}}}$$

Avec H_{During} : coefficient d'hystérésis selon During (sans dimension).

$K_{\text{part}}^{\text{des}}$: la constante de Freundlich calculée par désorption (L/kg_{part}).

$K_{\text{part}}^{\text{ads}}$: la constante de Freundlich calculée par sorption (L/kg_{part}).

Le coefficient d'hystérésis calculé pour 50 sols varie entre 0,01 et 0,83, pour une moyenne de $0,42 \pm 0,16$ (During *et al.*, 2002).

Dans le cas B (Figure I-20), les isothermes ne sont pas linéaires, et isothermes de sorption et de désorption se différencient par leur coefficient de Freundlich. Le phénomène est alors caractérisé par le coefficient H_{Gao} , tel que :

$$H_{\text{Gao}} = \frac{n_{\text{des}}}{n_{\text{ads}}}$$

Avec H_{Gao} : coefficient d'hystérésis selon Gao (sans dimension).

n_{ads} : le coefficient de Freundlich calculé par sorption (sans dimension).

n_{des} : le coefficient de Freundlich calculé par désorption (sans dimension).

Selon les pesticides étudiés sur un même sédiment, les valeurs de H_{Gao} obtenus sont comprises entre 11 et 56% (Gao *et al.*, 1998b).

Le cas C est fondamentalement différent des deux précédents, dans la mesure où il met en jeu la **notion de fraction irréversiblement sorbée**, associée au concept de séquestration, de formation de résidus liés, et de « ageing » (voir paragraphe I.4.2). En effet, le paramètre Q_{irr} , défini comme la concentration en phase solide lorsque la concentration en phase liquide tend vers zéro, vérifie l'équation de Freundlich modifiée suivante :

$$C_{\text{part}} = Q_{\text{irr}} + K_{\text{part}} \times (C_{\text{aqu}})^{\frac{1}{n}}$$

Avec C_{part} : concentration du CTO dans la phase particulaire (µg/kg_{part}).

Q_{irr} : concentration du CTO irréversiblement sorbé aux particules (µg/kg_{part}).

C_{aqu} : concentration du CTO à l'état libre (µg/L).

K_{part} : constante de désorption de Freundlich (L/kg_{part}).

$\frac{1}{n}$: coefficient de désorption de Freundlich (sans dimension)

Pour l'herbicide isopropylaniline, selon les fractions de sol étudiées, Q_{irr} varie entre 86 et 96% de la quantité sorbée (Benoit *et al.*, 2008).

Malgré cette notion d'irréversibilité, il est légitime de s'interroger sur ce qui différencie les trois cas : existe-t-il des différences selon les couples CTO/matrice ? Ou bien, au contraire, A et C ne seraient-ils pas des sous-cas de B, avec A pour les très faibles concentrations, et B celles plus proches de la saturation, comme explicité en Figure I-20 ? Il est très difficile de se situer dans l'isotherme de Freundlich et de répondre à cette question, puisque les molécules étudiées dans les trois cas sont différentes, tout comme les matrices. En revanche, la gamme de concentrations étudiées constitue un élément de réponse : le cas B couvre trois échelles décimales, alors que les cas A et C en couvrent une seulement (Gao *et al.*, 1998a; During *et al.*, 2002).

Le phénomène d'hystérésis a été **peu étudié dans les boues** en comparaison aux sols, mais il a tout de même été mis en évidence dans le cas du pentachlorophénol (Ye & Li, 2007), d'un alkylbenzenesulfonate linéaire (Conrad *et al.*, 2006) et de l'éthinylœstradiol (Yi & Harper, 2007b).

I.4.1.3 Sorption à la matière dissoute et colloïdale

Les CTOs interagissent aussi avec la matière dissoute et colloïdale (DCM) de type humique ou fulvique (Chiou *et al.*, 1986; Perminova *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2003) mais aussi issue de boue (Holbrook *et al.*, 2004), selon un modèle de partage entre la phase libre et la phase sorbée. L'équilibre établi peut être décrit comme suit :

$$K_{\text{DCM}} = \frac{C_{\text{DCM}}}{C_{\text{libre}}}$$

Avec K_{DCM} : coefficient de partage entre phase sorbée à la matière dissoute et colloïdale et phase libre (L/kg_{DCM}).

C_{DCM} : concentration du CTO sorbé à la matière dissoute et colloïdale (µg/kg_{DCM}).

C_{libre} : concentration du CTO libre, strictement dissout (µg/L).

L'interaction avec le compartiment de DCM a été mise en évidence dans les boues de façon indirecte : la sorption de HAPs et de pesticides à la matière particulaire diminue lorsque la concentration en DCM augmente, de façon plus accentuée pour les composés non polaires (Katsoyiannis & Samara, 2005; Katsoyiannis & Samara, 2007).

Contrairement aux interactions avec la matière particulaire, les interactions avec la DCM sont instantanées et réversibles (Vinken *et al.*, 2004).

La quantité de CTO sorbée à la DCM a d'autant plus d'importance dans cette étude que le procédé étudié contient une étape de lyse thermique, opération unitaire qui permet de transférer une partie importante de la matière organique vers les compartiments de matière colloïdale et dissoute (Bougrier, 2005).

Bien que l'interaction des CTOs avec la DCM des boues soit avérée, **le système boue est généralement décrit en différenciant les CTOs sorbés aux particules et les CTOs se trouvant dans la phase aqueuse, sans distinguer ceux qui se trouvent à l'état libre de ceux qui interagissent avec la matière dissoute et colloïdale** (Byrns, 2001;

Artola-Garicano *et al.*, 2003; Ternes *et al.*, 2004; Langford *et al.*, 2005a; Dionisi *et al.*, 2006; Carballa *et al.*, 2008).

I.4.1.4 Méthodologies de mesure des phénomènes de sorption

En ce qui concerne l'étude de transferts ou équilibres entre une phase particulière et une phase aqueuse, les méthodologies majoritairement mises en œuvre adoptent une première étape de séparation des deux phases, qui sont ensuite analysées séparément (extraction puis dosage). Cette séparation peut être réalisée par centrifugation (Lee & Farmer, 1989; Lai *et al.*, 2000; During *et al.*, 2002; Krauss & Wilcke, 2005; Langford *et al.*, 2005a). Par ailleurs, la séparation des phases peut être effective tout au long de l'expérimentation grâce à un système membranaire (Ivashechkin *et al.*, 2004) qui donne un accès continu à la phase aqueuse, et facilite les études cinétiques. Ainsi, le **partage entre phase aqueuse et phase sorbée aux particules** est mesurée.

Au sein d'une phase aqueuse donnée, les deux phases libre et sorbée à la matière dissoute/colloïdale sont plus difficiles à séparer d'un point de vue technique. Par exemple, la séparation de la DCM par centrifugation à 20 000 *g* (Servos & Muir, 1989) est discutable. Il se peut que les colloïdes environnementaux de grande taille (acides humiques) se retrouvent dans le culot lorsque cette importante force centrifuge est appliquée, mais cela est peu probable dans le cas de DCM de plus petite taille, comme celle rencontrée dans les boues. Plusieurs méthodes non-séparatives remédient à ce problème.

Une première méthode s'appuie sur le partage des CTOs entre état dissout (libre) et état gazeux : les CTOs dans l'« espace de tête » sont mesurés de façon à estimer leur concentration dissoute selon leur constante de Henry (Servos & Muir, 1989). L'approximation est faite que l'équilibre de partage entre état dissout et gazeux n'est pas influencé par la présence de DCM. Cette méthodologie est de plus limitée aux molécules relativement volatiles. Une deuxième méthode consiste à quantifier l'augmentation de la **solubilité apparente** d'un CTO en fonction de la concentration en matière dissoute et colloïdale (Chiou *et al.*, 1986). Ensuite, la méthode par **quenching** (extinction) de la fluorescence d'un CTO est basée sur la diminution voire même l'extinction totale de la fluorescence du composé lorsqu'il est associé à la matière. Cette méthode requiert d'une part que le CTO soit fluorescent, et d'autre part que son interaction avec la matière dissoute induise une modification mesurable par fluorescence de l'environnement électronique de la molécule ; par exemple, ce n'est pas le cas du nonylphénol avec l'acide alginique (Yamamoto *et al.*, 2003). Enfin, la **ndSPME** (*negligible depletion Solid Phase MicroExtraction*) consiste à introduire une troisième phase dans le système, un sorbant solide, pour laquelle l'équilibre sorbant/phase aqueuse est au préalable caractérisé. Dans le cas où la quantité de sorbant introduite est suffisamment faible pour garantir une capacité de sorption négligeable devant la quantité de CTOs en phase aqueuse, l'équilibre entre phase libre et sorbée de l'échantillon est alors modifié dans une mesure négligeable (Vaes *et al.*, 1996). Cette méthode permet donc une mesure *in situ* de la concentration en phase libre. Il est cependant nécessaire de s'assurer que la matière colloïdale ou dissoute n'interagit pas avec le sorbant. Cette troisième phase sorbante peut aussi être utilisée de manière plus exhaustive. Dans ce cas, une

hypothèse forte est posée : lors du passage rapide de l'échantillon au contact du sorbant, seuls les CTOs libres vont pouvoir se sorber, alors que ceux qui sont associés ne le pourront pas (Raber & Kogel-Knabner, 1997).

Mais ces techniques « aqueuses » semblent difficilement applicables en présence de particules : des phénomènes d'absorption de fluorescence peuvent interférer dans le premier cas, alors que dans les autres cas, les particules peuvent interagir avec le sorbant.

Finalement, les méthodologies disponibles sont difficilement extrapolables à l'étude des phénomènes de **sorption aux particules et à la DCM** dans les **boues**.

I.4.1.5 Influence des caractéristiques des boues et des CTOs sur les phénomènes de sorption

Les valeurs de K_{DCM} mesurées dans 3 études différentes sont présentées dans le Tableau I-7. Ces résultats démontrent (1) que des variations importantes de constante d'équilibre sont observées pour un même CTO avec différentes DCM, qu'elles soient relativement proches (comparaison au sein des boues activées) ou d'origines très différentes (comparaison entre boues et composts) et que (2) pour un échantillon de DCM donné, la constante d'équilibre varie selon les CTOs. Il en va de même pour le K_{part} . Il apparaît donc nécessaire de considérer l'influence que peuvent avoir les caractéristiques de chacun des deux acteurs (matière dissoute et colloïdale / CTO ou bien particules / CTO) sur l'équilibre de leur interaction.

Tableau I-7 : Comparaison des valeurs de $\log K_{DCM}$ obtenues pour différentes matrices et différents HAPs, et mise en évidence de l'influence des caractéristiques de chacun des deux acteurs.

CTO	Origine de la matière dissoute et colloïdale	$\log K_{DCM}$ (avec K_{DCM} en L/kg _{DCM})	Référence
Pyrène	Boues activées	2,4 – 4,3	(Holbrook <i>et al.</i> , 2004)
Phénanthrène	Composts	4,5 – 4,6	(Plaza <i>et al.</i>)
Pyrène		4,7 – 5,1	
Phénanthrène	Sol	4,0	(Plaza <i>et al.</i>)
Pyrène		4,6	
Benzo(a)Anthracène	Sols	1,8 – 2,5	(Arias-Estevez <i>et al.</i> , 2007)
Benzo(b)Fluoranthène		2,5 – 3,2	
Benzo(k)Fluoranthène		2,0 – 2,8	
Benzo(a)pyrène		2,4 – 3,3	
Dibenzo(a,h)Anthracène		2,8 – 3,7	
Benzo(g,h,i)Perylène		3,4 – 4,5	
Indeno(1,2,3,cd)Pyrène		4,3 – 4,8	

I.4.1.5.1 Caractéristiques des boues

Caractéristiques macroscopiques : Au niveau **cinétique**, un sol composé de grosses particules implique une prévalence des phénomènes de diffusion lente au sein des agrégats (Beulke *et al.*, 2001), et donc un temps plus long nécessaire à atteindre l'équilibre.

En ce qui concerne l'**équilibre**, la sorption de bisphénol A sur une boue digérée en conditions anaérobies ayant subi une étape de lyophilisation, trituration, tamisage, dialyse par de l'eau (seuil de coupure de 1 kDa) est plus élevée que sur la boue non traitée (Ivashechkin *et al.*, 2004). Parmi les explications fournies, les auteurs privilégient la taille des particules : une diminution de celle-ci, et par conséquent une augmentation de la surface d'échange serait à l'origine de cette augmentation de sorption. Dans une autre étude, une concentration plus élevée de pesticides dans les petites particules d'un sol a aussi été observée, attribuée à une **surface spécifique** supérieure (Gao *et al.*, 1998a).

Caractéristiques chimiques : Si la concentration en **carbone organique** augmente dans la phase particulaire, en conservant les mêmes concentrations en matière sèche et en œstrogènes, la sorption de ces derniers augmente aussi, selon une corrélation linéaire (Lai *et al.*, 2000). Egalement, une corrélation linéaire a été obtenue entre la sorption de pesticides et la teneur en carbone organique total d'un sédiment (Gao *et al.*, 1998a).

Lors d'une analyse statistique visant à modéliser la sorption de NP sur des sols variés (196 échantillons), parmi les quatre paramètres liés au sol pris en compte, la teneur en carbone organique du sol s'est révélé être le paramètre de plus grande influence (Krahe *et al.*, 2006). De fait, très souvent, la concentration en matière organique est posée comme paramètre essentiel, dans les sols comme dans les boues, de sorte que la sorption des CTOs est caractérisée par la relation (Poerschmann & Kopinke, 2001; During *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003; Ivashechkin *et al.*, 2004; Krahe *et al.*, 2006) :

$$K_{oc} = \frac{C_{part}}{C_{aqu}} \times \frac{100}{COT}$$

Avec K_{oc} : Coefficient de partage entre carbone organique et eau.

C_{part} : concentration du composé sorbé aux particules.

C_{aqu} : concentration du composé en phase aqueuse.

COT : Pourcentage massique de carbone organique dans la matière sèche.

Cette relation revient à un modèle d'isotherme de Freundlich linéaire, qui suppose que la sorption est proportionnelle à la teneur en carbone organique.

S'il y a corrélation entre concentration en matière organique, qu'elle soit soluble, colloïdale ou particulaire, et sorption des CTOs, la matière organique n'est pas pour autant nécessaire : l'oxyde de fer peut porter 40% des œstrogènes sorbés par un sédiment à 1,1% de carbone organique (Lai *et al.*, 2000), et la sorption de CTOs sur matière minérale autre a été observée auparavant (Karickhoff *et al.*, 1979). Le phénomène d'hystéresis sorption/désorption est accentué lorsque le contenu en carbone organique augmente, mais il existe aussi lorsque le sédiment est dépourvu de matière organique (Gao *et al.*, 1998a). Les forces liées à la sorption même de CTOs sur des sédiments, sols ou boues d'épuration puis à sa stabilisation peuvent donc mettre en jeu des interactions à la fois avec la matière organique, mais aussi avec la matière minérale.

De telles observations d'influence des caractéristiques macroscopiques et chimiques sur les propriétés sorbantes n'ont pu être menées dans les boues. Cependant, **l'âge des boues** par exemple a un impact sur la structure physique des floccs, mais aussi sur leur composition. En effet, les floccs de boues jeunes présentent une forme irrégulière, contrairement aux floccs de boues âgées qui sont beaucoup plus sphériques (Liss *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2006) : la surface d'échange est donc plus importante dans les boues jeunes. De plus, la surface des floccs de boues âgées présente une haute densité en exopolymères, elle est donc plus hydrophobe et de charge négative moindre (Liao *et al.*, 2001). Par ailleurs, les floccs de boues âgées ont une structure plus compacte, susceptible de gêner la diffusion, sont moins hydratées, et présentent une teneur en lipide plus élevée (Liss *et al.*, 2002). Ces variations dans les caractéristiques physico-chimiques des boues sont susceptibles d'influencer les cinétiques et équilibres de sorption des CTOs.

Caractéristiques fonctionnelles : La sorption des œstrogènes sur différentes DCM (acides humique, fulvique, alginique, tannique, et dextrane) montre une forte corrélation positive avec l'absorbance de la matière organique à la longueur d'onde de 272 nm, qui est une mesure de la **teneur en cycles aromatiques** (Yamamoto *et al.*, 2003). L'abondance de cycles aromatiques dans la matière organique dissoute est donc d'une grande importance dans les mécanismes de sorption des œstrogènes, molécules possédant un cycle aromatique et quatre cycles non aromatiques. Les auteurs émettent donc l'hypothèse d'interaction entre les électrons π des œstrogènes et de la matière organique dissoute (Yamamoto *et al.*, 2003). Le même phénomène de sorption croissante lorsque la teneur en cycles aromatiques dans des substances humiques augmente a aussi été observé dans le cas des HAPs pyrène, fluoranthène, et anthracène (Perminova *et al.*, 2001). Cependant, la corrélation n'est pas vérifiée dans le cas d'autres CTOs moins hydrophobes, monocycliques et comportant des chaînes aliphatiques tels que le NP, par exemple.

L'influence de la teneur en cycles aromatiques de la matière organique ne semble donc avoir d'effet que sur la sorption de CTOs polycycliques, ce qui concerne au sein de cette étude la famille des PCBs et des HAPs.

Par ailleurs, la sorption des œstrogènes corrèle fortement et celle des NP modérément avec la **teneur en phénol** de matières organiques dissoutes (Yamamoto *et al.*, 2003). Ceci confirme l'importance des interactions entre électrons π et des ponts hydrogène dans la sorption des estrogènes. De plus, la faible corrélation observée pour les NP peut s'expliquer par l'intervention d'autres phénomènes : les forces de Van der Waals liées au groupe nonyl apolaire (Yamamoto *et al.*, 2003).

En phase aqueuse, les groupements fonctionnels peuvent être quantifiés par spectrophotométrie UV. Quantifier ces mêmes groupements fonctionnels dans une phase solide relève de moyens techniques beaucoup plus sophistiqués. La résonance magnétique nucléaire du carbone 13 est une possibilité, puisque le déplacement chimique des atomes de carbone est caractéristique de leur environnement : 0-50 p.p.m. pour les atomes de carbone des chaînes alkyles, 50-110 p.p.m. pour ceux des chaînes alkyles liés à un atome d'oxygène, 110-140 p.p.m. pour les aromatiques, 140-158 pour les phénoliques et 158-190 pour les amides et esters.

I.4.1.5.2 Caractéristiques des CTOs

Hydrophobicité : Lorsque sept pesticides sont mis en compétition quant à leur sorption sur des sédiments, les plus hydrophobes ($\log K_{ow}$ élevé) sont les plus sorbés (Gao *et al.*, 1998a; Gao *et al.*, 1998b). Dans ces cas, l'hydrophobicité influence non seulement l'état d'équilibre, mais aussi les cinétiques de sorption et accentue le phénomène d'hystérésis (Gao *et al.*, 1998a; Lai *et al.*, 2000).

Ainsi, la corrélation de Karickhoff, qui prend en compte des représentants de familles de CTOs et des sols différents, permet d'obtenir un ordre de grandeur du K_{oc} (Karickhoff *et al.*, 1979) :

$$\log K_{oc} = \log K_{ow} - 0,21$$

Cependant, les comparaisons de molécules inter-familles montrent que le seul paramètre K_{ow} n'est pas un critère suffisant pour prévoir et comparer la sorption des composés (Poerschmann & Kopinke, 2001; Yamamoto *et al.*, 2003). Ainsi, des mécanismes différents des interactions hydrophobes non spécifiques doivent jouer un rôle important dans la sorption de ces perturbateurs endocriniens, comme par exemple les interactions entre électrons π .

Solubilité : De façon similaire à la corrélation établie entre K_{oc} et K_{ow} , une corrélation a été mise en évidence entre le K_{oc} et la solubilité dans l'eau S (Karickhoff *et al.*, 1979) :

$$\log K_{oc} = -0,54 \log S + 0,44 \quad (r^2=0,94)$$

Gao *et al.* (1998a) se sont attachés à établir les isothermes de Freundlich de sept pesticides différents. Ils ont ainsi pu observer une relation similaire entre solubilité du CTO et constante de Freundlich K_d .

Isomérisation : Parmi les isomères contenus dans le mélange technique de NP, les plus branchés sont moins sorbés sur des sols en conditions compétitives (During *et al.*, 2002). Ainsi, les $\log K_{oc}$ obtenus respectivement pour un mélange de NP et pour le n-NP seul sont de 4,0 et 4,9. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la diffusion des isomères branchés au sein de la matière organique est gênée, et que leur structure limite la mise en place d'interactions spécifiques avec la matrice sol (During *et al.*, 2002).

I.4.1.6 **Influence de la compétition inter-CTOs sur les phénomènes de sorption**

En présence de valérate d'œstradiol, composé très hydrophobe ($\log K_{ow} = 6,41$), la quantité d'œstradiol, œstrone, œstriol et ethynylœstradiol sorbés sur des sédiments (15 g/L de matière sèche) diminue au détriment du valérate sorbé (Lai *et al.*, 2000). De plus, cette diminution est plus importante pour les œstrogènes moins hydrophobes. Ceci suggère que le valérate d'œstradiol est un compétiteur efficace envers les sites de sorption des sédiments, et qu'il a une meilleure affinité pour ces sites que les estrogènes moins hydrophobes (Lai *et al.*, 2000). Le phénomène de compétition, lié à la saturation des sites d'interaction, dépend très probablement des niveaux de concentration des CTOs, de leur affinité pour les sites de sorption et de la capacité de sorption des particules. Ils sont donc CTO-dépendants et

matrice-dépendants. Toutefois, ce possible phénomène de compétition devrait être pris en compte dans les expérimentations impliquant la sorption de plusieurs composés de façon concomitante.

I.4.1.7 Influence des conditions opératoires sur les phénomènes de sorption

I.4.1.7.1 Activation par la température

Dans les modèles de cinétique de sorption exposés au paragraphe I.4.1.2.1, l'activation par la température peut être modélisée par la loi d'Arrhénius :

$$k = k_0 e^{-\frac{E_a^r}{RT}} \text{ et } D = D_0 e^{-\frac{E_a^l}{RT}}$$

Avec k_0 : constante.

E_a^r : énergie d'activation associée à la sorption rapide.

D_0 : constante.

E_a^l : énergie d'activation associée à la sorption lente.

L'énergie d'activation de la sorption rapide de CTOs sur des sédiments a été mesurée de 10 à 50 kJ/mol (Ten Hulscher & Cornelissen, 1996). Pour étudier la sorption lente, la diffusion de ces composés en matrice polymérique a été mesurée, et l'énergie d'activation obtenue est de 60 kJ/mol (Ten Hulscher & Cornelissen, 1996). Les mêmes auteurs ont démontré un déplacement de l'équilibre vers la phase aqueuse lorsque la température augmente.

I.4.1.7.2 pH

Des expériences menées sur boue digérée en anaérobiose ont montré une influence notable du pH sur la sorption du bisphénol A (BPA). Bien qu'entre 3,5 et 9 la distribution du BPA entre phase aqueuse et sorbée ne varie pas, à partir de 9, sa désorption commence, atteint 50% entre 10 et 11, et est totale à 12 (Ivashechkin *et al.*, 2004). La demi-désorption correspond au pKa du BPA. Par ailleurs, la désorption totale peut s'expliquer par la répulsion électrostatique engendrée par la déprotonation du BPA. Le pH agit donc sur l'état d'ionisation du BPA, et par conséquent sur sa sorption (Ivashechkin *et al.*, 2004). Le même comportement est à prévoir pour les CTOs possédant un pKa similaire (NP). Pour des CTOs présentant un pKa proche de 2 (pesticides tels que triazine), le phénomène est transposable, puisque la sorption est maximale à pH acide, et diminue lorsque le pH augmente (Gao *et al.*, 1998a). On peut en conclure que ces CTOs interagissent avec la matrice en partie de façon électrostatique.

En revanche, les CTOs non ioniques (ex : pesticide bifenox) montrent une tendance identique de désorption lorsque le pH augmente. Ici, l'intervention de forces électrostatiques liées à l'état d'ionisation est à exclure. La désorption des CTOs non ioniques est à relier à la dissolution d'une partie de la matière organique lors de l'augmentation de pH, qui s'ajoute à une augmentation de l'affinité des CTOs pour la matière organique, et en particulier pour l'acide humique. Ceci a été démontré pour le pesticide napropamide (Lee & Farmer, 1989).

Le pH a donc un effet incontestable sur la sorption de nombreux CTOs, mais les mécanismes mis en jeu diffèrent selon la nature et les caractéristiques du CTO. Cependant, le fait que les boues d'épuration soient des milieux proches de la neutralité et tamponnés exclut un potentiel effet du pH dans notre contexte.

I.4.2 Impact des phénomènes de sorption sur le devenir des CTOs : biodisponibilité, bioaccessibilité et séquestration

I.4.2.1 Définitions

Les travaux réalisés sur les phénomènes de sorption ont démontré qu'une très grande partie des CTOs hydrophobes auxquels nous nous intéressons sont sorbés à la phase particulaire. Ces interactions peuvent en partie expliquer les faibles abattements biologiques observés, via les notions de bioaccessibilité et de biodisponibilité.

Au cours du temps, selon les auteurs et leur discipline de travail (pharmacologie ou toxicologie par exemple), les définitions de ces deux notions varient (Tableau I-8). Semple *et al.* (2004) se sont efforcés d'inventorier et de synthétiser un grand nombre de définitions. Selon eux, et telle est la définition que nous avons adoptée, un CTO est **biodisponible s'il peut traverser la membrane cellulaire d'un organisme à un instant t. Il est bioaccessible s'il est disponible pour traverser la membrane cellulaire d'un organisme depuis son environnement, lorsque l'organisme accède à cet environnement.**

Tableau I-8 : Exemples de définitions de la biodisponibilité.

Définition de la biodisponibilité	Référence
Rapport entre la capacité de l'environnement d'un organisme ou d'une population à fournir un composé et la capacité de cet organisme ou population à transformer ce composé	(Bosma <i>et al.</i> , 1997)
Proportion de CTOs qui est disponible pour un transfert rapide vers la phase aqueuse	(Cornelissen <i>et al.</i> , 1998)
Résultante de la quantité accessible (défini par extraction non exhaustive) et de l'activité chimique du CTO (définie par les processus physico-chimiques de diffusion, sorption et partition)	(Reichenberg & Mayer, 2006)

Un CTO bioaccessible peut donc être physiquement séparé de l'organisme puis devenir biodisponible après une période de temps donnée. **L'échelle de temps** est donc prépondérante dans la définition et la distinction des notions de biodisponibilité et de bioaccessibilité, comme souligné par les mêmes auteurs.

Par ailleurs, la bioaccessibilité fait appel aux trois **processus physiques** que sont l'interaction avec la matrice, le transport dans le milieu et la traversée de la membrane, alors que la biodisponibilité fait seulement appel au dernier (Semple *et al.*, 2007).

L'échelle de temps des procédés d'épuration est beaucoup plus courte que celle du devenir des CTOs présents dans des sols contaminés. Dans le **référentiel des procédés**

d'épuration, sont généralement considérées comme biodisponibles les fractions de CTO dissoute et DCM-associée, et comme bioaccessible une partie de la fraction associée à la matière particulaire, désorbable au cours du procédé (Byrns, 2001; Artola-Garicano *et al.*, 2003; Langford *et al.*, 2005a; Urase & Kikuta, 2005; Dionisi *et al.*, 2006). Mais dans certains cas beaucoup plus rares, une partie de la fraction associée à la matière particulaire est aussi considérée comme biodisponible (Fountoulakis *et al.*, 2006). Dans le cas général, la biodisponibilité est alors mesurée par dosage des CTOs en phase aqueuse, alors que la bioaccessibilité fait appel à des méthodes d'extraction non-exhaustive. La plupart de ces méthodes ont été mises au point dans le référentiel des sols, et certaines n'ont pas encore été appliquées à des systèmes « boue ».

Tout comme la biodisponibilité et la bioaccessibilité, la notion de **séquestration** fait l'objet de confusions sémantiques et conceptuelles. Par exemple, les concepts rapportés par Semple *et al.* (2003) pour décrire le phénomène de séquestration étaient d'une part la diffusion au sein de la matière organique, et d'autre part la diffusion dans les pores retardée par la sorption/désorption aux parois de ces pores. Selon cette vision du phénomène, la séquestration est réversible mais sur une échelle de temps très longue, ce qui correspondrait à un **cas extrême de fraction bioaccessible**. La même correspondance existe avec la fraction séquestrée identifiée par Kraaij *et al.* (2002) comme la fraction lentement désorbable en présence de billes de Tenax. Dans le contexte des procédés, où la fraction bioaccessible a été définie comme la fraction étant biodisponible à t_0 ou le devenant au cours de la durée du procédé, la fraction séquestrée pourrait être décrite comme la fraction ne devenant pas biodisponible durant le procédé, mais pouvant potentiellement le devenir sur une échelle de temps beaucoup plus longue. Dans ce contexte, la séquestration ne désigne pas un processus absolument irréversible et l'échelle de temps est tout aussi primordiale.

De plus, le terme de « **résidus liés** », parfois nommés « résidus non-extractibles » (en référence aux méthodes de dosage) est aussi employé dans la littérature pour désigner des phénomènes très proches de la séquestration. Les définitions proposées par Weller *et al.* (1998) et reprises par la suite (Northcott & Jones, 2000) englobent les CTOs ou leurs principaux métabolites (1) liés de façon covalente à la matrice et (2) emprisonnés, retenus dans la matrice par des effets stériques. Les résidus liés sont créés au cours du vieillissement de matrices en contact avec des CTOs, l'« ageing » (Northcott & Jones, 2001), par formation de liaisons covalentes et/ou par modification de la matrice de façon à fermer des inclusions. Pour citer un exemple illustrant la première définition, les HAPs partiellement dégradés sont incorporés à des macromolécules du sol au cours du processus d'humification (Bogan *et al.*, 1999; Ressler *et al.*, 1999). En 120 jours, la fraction de phénanthrène et de pyrène incorporée dans les sols peut varier entre 0 et 25% (Bogan *et al.*, 1999), et entre 10 et 30% pour l'anthracène (Richnow *et al.*, 1999). La formation de liaisons esters entre radicaux carboxyles portés par des métabolites de HAPs et radicaux hydroxyles de macromolécules matricielles a pu être mise en évidence. Ces liaisons peuvent être hydrolysées en milieu alcalin (Richnow *et al.*, 1998). D'autres types de résidus liés sont très probablement formés. Ils sont considérés comme pratiquement inquantifiables contrairement aux esters (Northcott & Jones, 2000). Leur formation est **dépendante de l'activité métabolique dans le sol**

(Richnow *et al.*, 1999), **du temps de contact entre CTO et matrice et des caractéristiques de chacun des deux acteurs** (Bogan *et al.*, 1999). Mais une première question peut être soulevée : ces résidus liés doivent-ils être considérés comme des CTOs séquestrés (qui peuvent redevenir biodisponibles après un temps très long) ou bien éliminés (absolument irréversiblement) ? Cette question renvoie à une seconde : les résidus liés le sont-ils irréversiblement ? En effet, on peut imaginer que la rupture des liaisons covalentes libère les CTOs, et que la matrice soit modifiée de sorte qu'un CTO emprisonné soit libéré. Des expériences menées dans des sols tendent à montrer que ces résidus liés sont très stables : autour de 10% de minéralisation en 200 jours (Eschenbach *et al.*, 1998) et que le carbone issu de HAPs incorporés par humification peut être en partie minéralisé sans aucune libération des résidus liés (Eschenbach *et al.*, 1998). Mais ce résultat à lui seul ne permet pas de réfuter le scénario de libération. Les CTOs liés par liaison covalente ou bien emprisonnés sous leur forme native devraient donc, par précaution, être considérés comme réversiblement séquestrés. A noter que si la réversion libère des **métabolites**, alors le contexte nuance la distinction entre séquestration et élimination. Si les CTOs sont considérés comme une source de carbone (contexte de biodégradation, minéralisation), alors le terme de séquestration est probablement plus approprié puisque cette source de carbone est piégée mais est libérable. En revanche, si le caractère de perturbation endocrinienne des CTOs est posé comme primordial (contexte de toxicologie), les résidus liés impliquant une libération potentielle de métabolites non-perturbateurs peuvent être considérés comme éliminés, et ceux libérant des métabolites perturbateurs constituent une séquestration de l'activité endocrinienne.

Finalement, dans le contexte de la biodégradation des HAPs/NP/PCBs au cours de la digestion anaérobie, les concepts très complexes de bioaccessibilité et séquestration peuvent être définis en référence à la biodisponibilité, et différenciés suivant le temps ou le niveau d'activité nécessaires à atteindre la biodisponibilité même (Figure I-21).

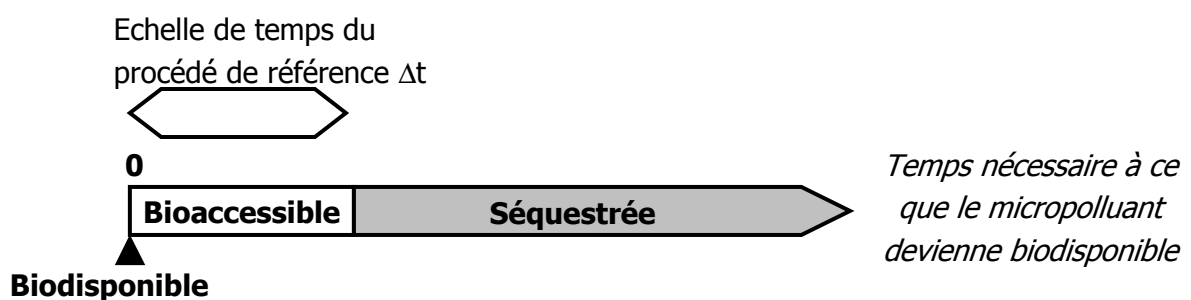


Figure I-21 : Différenciation des fractions biodisponible, bioaccessible et séquestrée en référence au procédé/processus étudié.

Deux cas particuliers méritent d'être cités et intégrés dans ces définitions.

Les HAPs peuvent se biosorber aux membranes des microorganismes, en surface ou bien incorporés au sein des structures lipidiques (Yamamoto *et al.*, 2003), en observant le même coefficient de partage dans le cas de microorganismes dégradants, non-dégradants et de

boue activée (Stringfellow & Alvarez-Cohen, 1999). Dans ce cas-là, si cette fraction sorbée n'est pas biodisponible aux microorganismes dégradants, y compris celui-là, elle sera là encore bioaccessible ou séquestrée selon le temps et la force nécessaire à son passage dans la fraction biodisponible. La fraction ayant pénétré à l'intérieur du cytoplasme est probablement séquestrée car sa libération nécessite sa diffusion au travers de la membrane ou bien une lyse cellulaire.

Le deuxième cas particulier concerne des hypothétiques exoenzymes responsables de la dégradation des CTOs. Dans ce cas, la définition de biodisponibilité peut être modulée en « fraction pouvant atteindre le site actif à un instant t ». Mais aucun élément ne permet de dire si les fractions de CTOs biodisponible, bioaccessible et séquestré envers les microorganismes correspondent aux fractions biodisponible, bioaccessible et séquestré envers les exoenzymes.

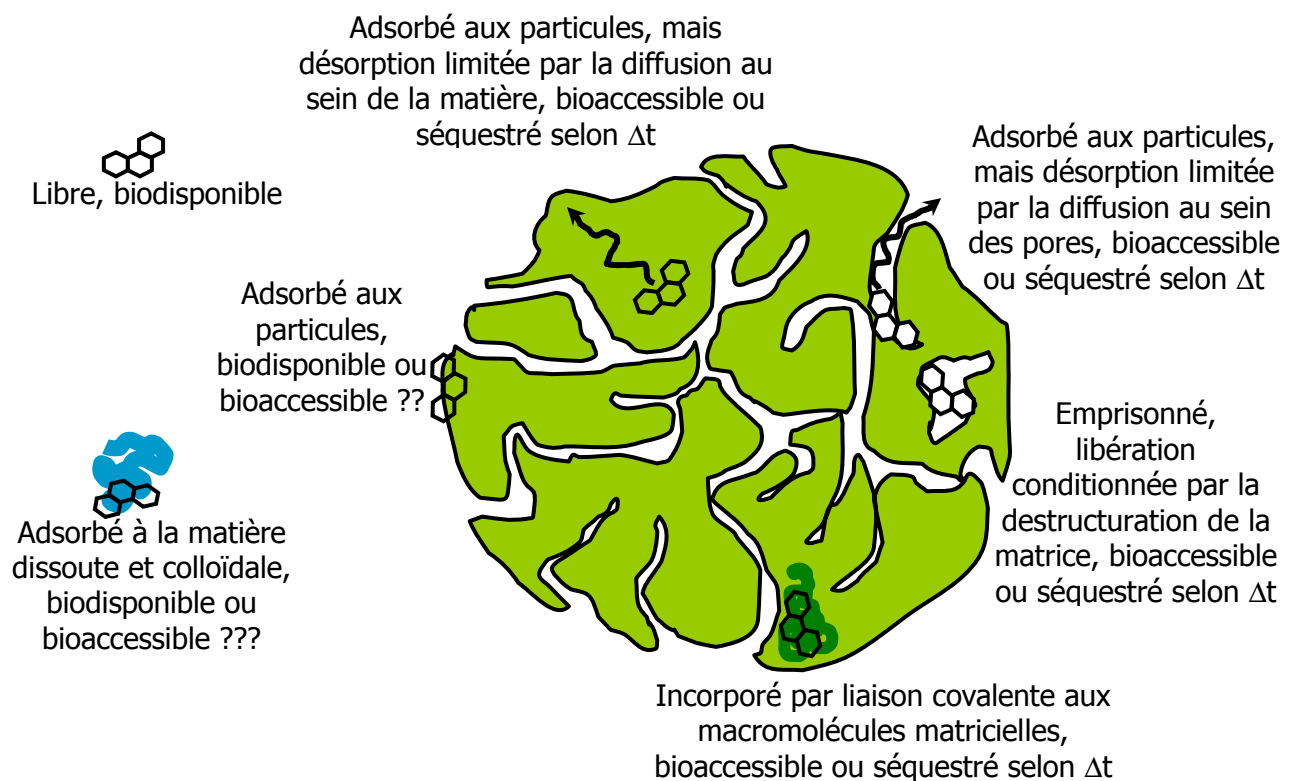


Figure I-22 : Synthèse des états physiques possibles pour le phénanthrène dans les boues, et correspondance avec les compartiments biologiques biodisponible, bioaccessible et séquestré, inspiré d'une illustration de Semple *et al.* (2004).

En conclusion, l'ensemble des états physiques des CTOs mis en évidence dans les sols et transposés aux boues sont résumés et illustrés en Figure I-22. L'activité métabolique dans les systèmes de traitement étant supérieure aux sols, et bien que la formation et la libération de la fraction séquestrée soit un processus très lent dans les sols, on peut supposer que malgré l'échelle de temps beaucoup plus courte, elle ait aussi lieu dans les boues. La correspondance de toutes les fractions physiques identifiées avec les fractions biodisponible, bioaccessible et/ou séquestrée est explicitée. Pour ce qui est des états libre,

sorbé à la matière dissoute et colloïdale, et sorbé aux particules, l'interrogation subsiste : l'état des connaissances sur les mécanismes mis en jeu ne permet pas de déterminer exactement s'ils sont biodisponibles ou seulement bioaccessibles. Pour ce qui est des états plus intimement liés à la matrice, le raisonnement employé jusque là conduit à trancher entre bioaccessible et séquestré en fonction du temps nécessaire à les libérer, **en référence à l'échelle de temps du processus étudié.**

Dans la perspective d'élucider les **mécanismes** qui influencent la biodégradation des HAPs/NP/PCBs **à tout instant t** de la digestion anaérobie de boues contaminées, leur fraction biodisponible est celle d'intérêt. En revanche, l'efficacité du **procédé dans sa globalité** dépend de leur **bioaccessibilité**, intégration de la biodisponibilité en fonction du temps. En effet, la bioaccessibilité représente la quantité maximale biodégradable au cours du procédé, en absence de limitation autre que la biodisponibilité. La biodisponibilité et la bioaccessibilité peuvent donc être qualifiées de potentiels physiques de biodégradation, l'une représentant un potentiel instantané, l'autre un potentiel intégré.

Il a été antérieurement mentionné que les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité provenaient de domaines d'étude autres que les procédés de dépollution. En effet, ces notions sont beaucoup plus utilisées en **écotoxicologie**. Dans cette discipline, les recherches visent à quantifier l'impact de l'exposition de certains organismes aux CTOs présents dans leur environnement (sol, sédiment). Le terme *exposition* fait dans ce cas référence à la quantité totale de CTOs bioaccumulables, c'est-à-dire à leur **bioaccessibilité**, plutôt qu'aux cinétiques et mécanismes de transfert des CTOs vers ces organismes. Certaines des méthodes développées en écotoxicologie pour évaluer la quantité de CTOs bioaccessible sont développées dans le paragraphe suivant.

I.4.2.2 Méthodes de quantification de la bioaccessibilité

Il convient de préciser que certaines des méthodes ultérieurement exposées ont été conçues par leurs auteurs pour quantifier la biodisponibilité selon eux. La confusion sémantique entre biodisponibilité et bioaccessibilité a été soulignée au paragraphe I.4.2. Nous avons donc ici pris la liberté d'adapter la sémantique des auteurs aux définitions qui nous ont semblé les plus justes et qui sont précisées dans le paragraphe précédent.

Certains outils chimiques d'évaluation de la bioaccessibilité ont été adaptés à partir d'outils de quantification des CTOs libres et/ou sorbés à la DCM (paragraphe I.4.1.4) : ils reposent sur l'utilisation d'extractants. Leur utilisation est ici basée sur l'analogie entre transfert des CTOs vers les organismes et vers un extractant (Figure I-23). Cet extractant chimique se décline sous différentes formes.

Le principe de la **Solid Phase Extraction (SPE)** est d'introduire dans le système un compartiment supplémentaire : un sorbant solide, sous forme de particules ou bien de fibre, pour lequel les CTOs ont une forte affinité. Or si ces techniques sont applicables dans les solutions de sol ou de sédiments (Cornelissen *et al.*, 1998; Cuypers *et al.*, 2002), aucune étude à ce jour ne relate son utilisation dans de la boue. En effet, la matière organique des

boues est susceptible d'interagir avec le support sorbant (effet compétitif), et de gêner le transfert des CTOs (effet colmatage).

La méthode d'extraction à l'**hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD)** utilise les propriétés structurales de ce polymère pour transférer les CTOs hydrophobes vers la phase liquide (Reid *et al.*, 2000). En effet, il est très soluble en raison des groupements hydroxyles présents à sa surface, et possède une cavité hydrophobe au coeur de sa structure dans laquelle les CTOs peuvent se nicher. Le diamètre de cette cavité étant de 0,65 nm, il forme des complexes 1:1 avec les plus petits HAPs, et 2:1 avec les plus volumineux. Il a été montré que l'HP β CD était aussi capable d'interagir avec le nonylphenol (Kawasaki *et al.*, 2001), et les PCBs (Dean & Scott, 2004).

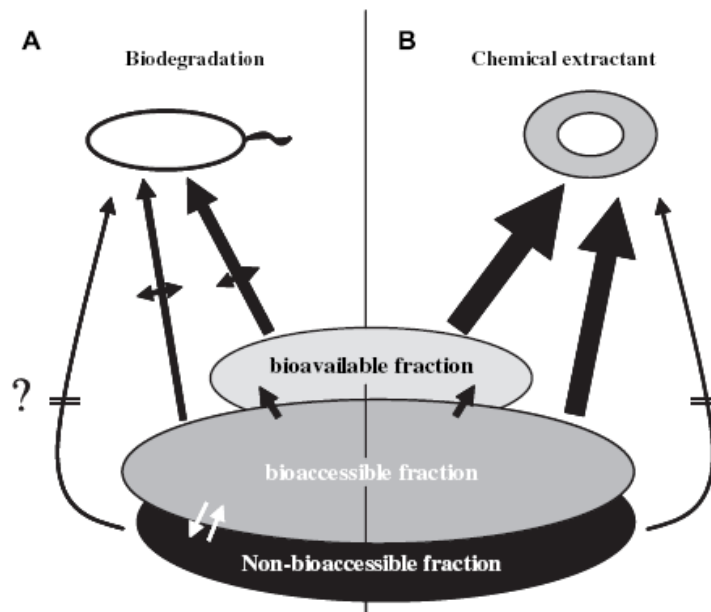


Figure I-23 : Notion de bioaccessibilité et biodisponibilité, et flux de CTOs en présence de biodégradation (A) ou d'un extractant (B) (Semple *et al.*, 2007). La taille des flèches précise l'importance relative des différents flux.

Une autre approche de quantification de la bioaccessibilité des CTOs consiste à mettre en contact un solide contaminé mais non marqué avec une phase liquide contaminée par des **molécules marquées**. La bioaccessibilité est alors reliée à la fraction échangeable.

Contrairement à la SPE, à l'HP β CD et au marquage des molécules en phase aqueuse, il existe des méthodes ne faisant pas appel à un transfert aqueux. Parmi elles, des techniques d'extraction par **solvants organiques** ont été pratiquées, comme le dichlorométhane (Reid *et al.*, 2000), le butanol (Swindell & Reid, 2006), ou encore un mélange éthanol/eau (Chung & Alexander, 1998).

Les techniques d'extraction par **fluide super-critique** en jouant sur la température et par solvants variables ont de même été développées, toujours sur des sols ou autres géosorbants (Ehlers & Loibner, 2006; Bogolte *et al.*, 2007).

La bioaccessibilité dans les sols peut aussi être mesurée de façon **biologique**, en introduisant un organisme qui accumule les CTOs bioaccessibles comme *Lumbricus rubellus*, ou un organisme qui les minéralise comme *Pseudomonas sp.* en aérobiose (Hickman & Reid, 2005). Cette approche est surtout utilisée dans un contexte d'écotoxicologie.

Cependant, toutes ces méthodes donnent des résultats différents pour un CTO, une matrice et une méthode d'évaluation de bioaccessibilité donnés, et selon les cas, l'une ou l'autre des méthodes est le meilleur indicateur (Figure I-24). Par exemple, Cornelissen *et al.* (1998) ont observé une corrélation entre fraction de HAPs rapidement désorbable en présence de billes de Tenax et dégradation en bioréacteur, et Reid *et al.* (2000) entre fraction extractible à l'HP β CD et minéralisation microbienne. Il n'existe donc pas de mesure absolue de la bioaccessibilité.

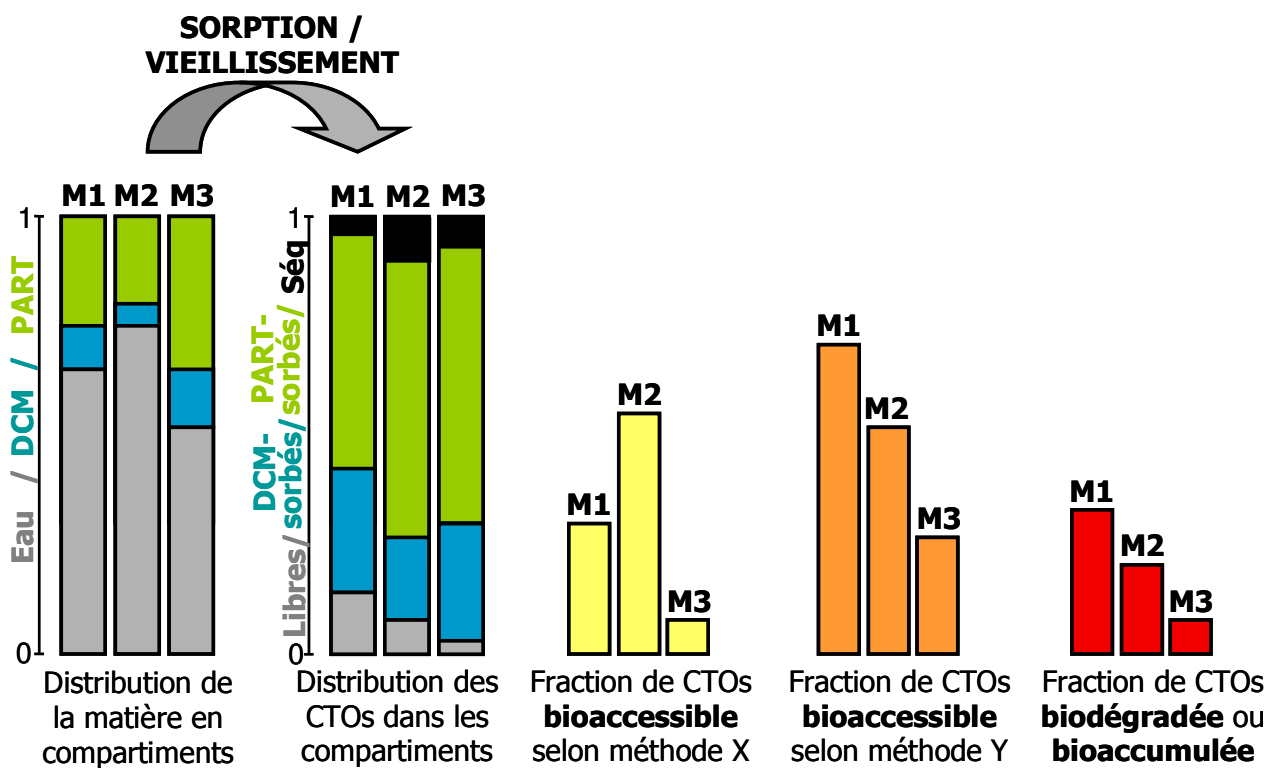


Figure I-24 : Représentation schématique des fractions physiques de trois matrices M1, M2 et M3, des fractions physiques des CTOs dans cette matrice, de la fraction bioaccessible estimée par une méthode X et par une méthode Y, et de la fraction réellement dégradée (dans ce cas, la méthode d'évaluation Y est adaptée car une corrélation apparaît entre bioaccessibilité selon Y et biodégradation/ bioaccumulation).

PART : particulaire ; *DCM* : matière dissoute et colloïdale ; *Séq* : séquestrés

La transposition de ces outils à notre contexte d'étude n'est pas immédiate. Non seulement certaines difficultés techniques évoquées précédemment mettent en doute l'utilisation de ces outils de quantification de la bioaccessibilité dans les boues, mais de plus, les matrices sols et sédiments peuvent être considérées comme figées, alors que les matrices boues sont

radicalement modifiées au cours des procédés de traitement. Or, s'il est possible de relier la mesure de bioaccessibilité d'un CTO dans un sol à un instant donné avec la fraction qui sera accumulé par un organisme après un certain temps d'exposition dans ce sol, on peut néanmoins se demander si la bioaccessibilité des CTOs dans une boue mesurée au temps initial peut représenter la réelle bioaccessibilité (et donc la biodégradation) durant le procédé, caractérisé par d'importantes modifications de matrice. **Pour les procédés d'épuration**, une application différente de ces méthodologies pourrait être plus judicieuse : elles pourraient être plutôt utilisées pour relier la différence de bioaccessibilité des CTOs entre entrée et sortie de réacteurs avec leur biodégradation, comme effectué par Cornelissen *et al.* (1998).

Une autre option consiste à plutôt considérer la biodisponibilité. **En effet, ce critère instantané permet de prendre en compte les modifications de la matrice au cours du temps, et ainsi d'appréhender les mécanismes cinétiques** - à noter que dans les procédés en **mode continu**, les réacteurs se trouvent à un état d'équilibre, ce qui implique **l'égalité de la biodisponibilité et de la bioaccessibilité**. Cette deuxième option est largement préférée dans la littérature (Byrns, 2001; Artola-Garicano *et al.*, 2003; Langford *et al.*, 2005a; Urase & Kikuta, 2005; Dionisi *et al.*, 2006). En revanche, cette approche va de pair avec l'évaluation de la biodisponibilité selon de fortes hypothèses (paragraphe I.4.2.1). Ces hypothèses établissent une **correspondance directe entre compartiments physiques des boues et compartiment biodisponible**.

Les outils développés pour les sols et sédiments n'ont donc pas à ce jour été utilisés dans le contexte du traitement des boues d'épuration. Si l'absence de lien direct entre compartiments physiques et biodisponibilité était démontrée, ces outils offriraient toutefois une alternative.

I.5 Conclusions

Cette étude bibliographique démontre que dans le **contexte de procédé** défini au fil du paragraphe I.1, le comportement des HAPs/NP/PCBs est conditionné par un réseau très complexe d'interactions et rétroactions (Figure I-25). Dans la littérature, seule une maille de ce réseau est étudiée à la fois, ou bien le réseau est considéré comme une boîte noire, de sorte que le ou les mécanismes limitants ne sont pas clairement identifiés. A noter que ce réseau est généralisable à de très nombreux systèmes, pourvu que soient présents les trois acteurs suivants : une matrice, un ensemble de microorganismes et un CTO.

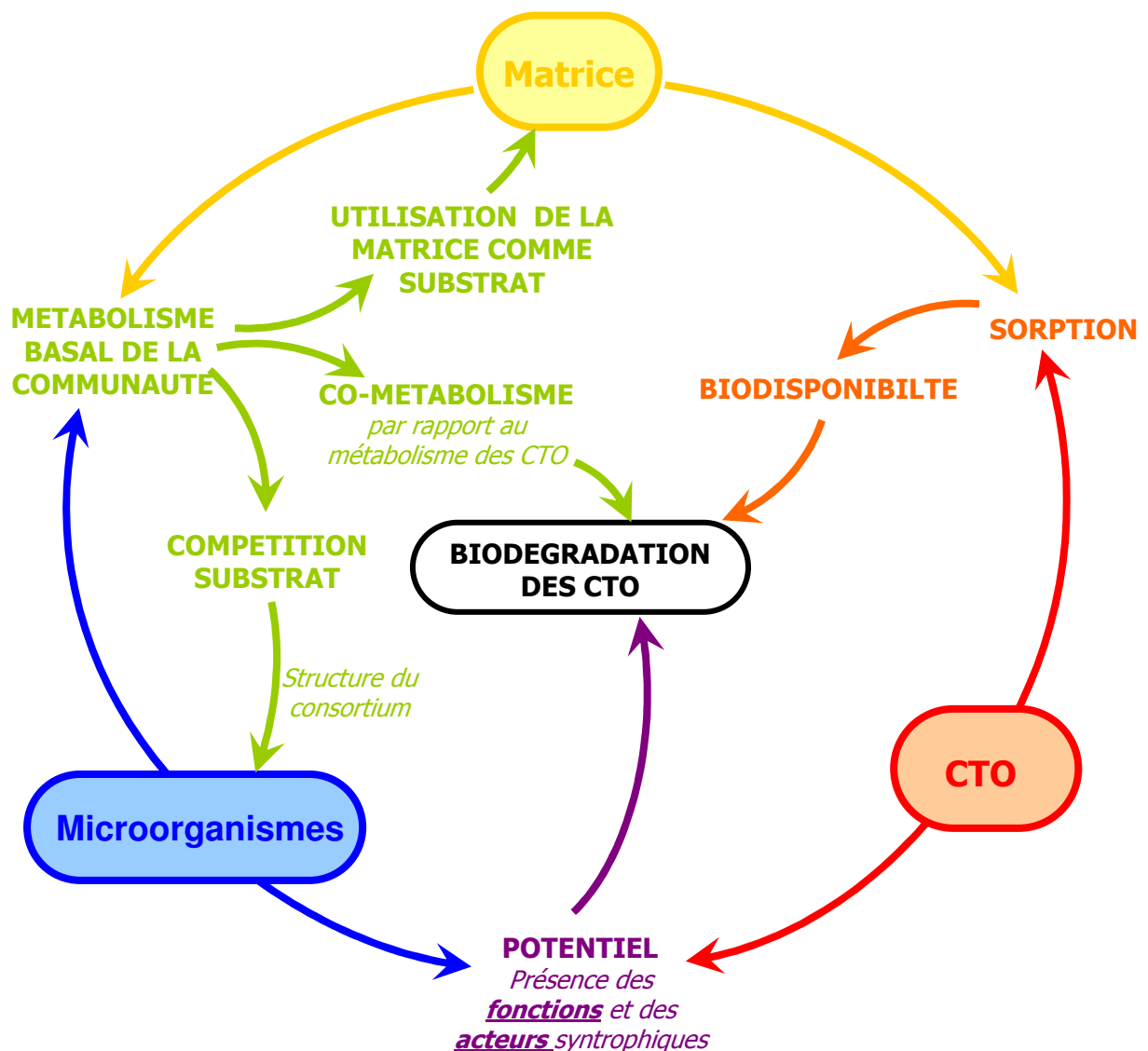


Figure I-25 : Représentation des interactions et rétroactions s'opérant entre les trois acteurs du système constitué par les CTOs dans le procédé de digestion anaérobie, et influence de ces mécanismes sur la biodégradation.

D'une part, les CTOs interagissent physiquement avec la matrice sous forme de sorption. Cette interaction semble dépendre à la fois des caractéristiques physico-chimiques des CTOs mais aussi des caractéristiques physiques, chimiques et fonctionnelles de la matrice. Cette dépendance a été peu étudiée dans les boues, et les caractéristiques d'un seul des deux acteurs ont été considérées à la fois. Il apparaît donc intéressant de quantifier l'importance relative de ces caractéristiques.

Par ailleurs, bien que des interactions entre CTO et matière dissoute et colloïdale aient été mesurées, les phénomènes de sorption dans les boues sont appréhendés selon une approche bi-compartiments, différenciant les CTOs sorbés aux particules et les CTOs se trouvant dans la phase aqueuse, sans distinguer ceux qui se trouvent à l'état libre de ceux qui interagissent avec la matière dissoute et colloïdale. Or, les boues contiennent une part significative de matière dissoute et colloïdale. Elle est occultée dans la littérature, pour des raisons pratiques peut-être, mais son rôle n'est probablement pas négligeable. Nous proposons donc de **décrire la boue comme un système tri-compartiment**, dans lequel les CTOs vont coexister sous trois états : libre, associé à la matière particulaire et associé à la matière colloïdale et dissoute. Des systèmes aquatiques environnementaux ont été auparavant décrits de la sorte (Schrap & Opperhuizen, 1992; Mitra & Dickhut, 1999; Luo *et al.*, 2009), mais à notre connaissance, les boues ne l'ont jamais été.

De plus, ces interactions CTO – matrice sont considérées comme limitantes envers la biodégradation des CTOs, via la notion de biodisponibilité. Là encore, l'approche bi-compartiment est communément employée, et les CTOs sorbés aux particules sont considérés comme non biodisponibles, et ceux se trouvant dans la phase aqueuse comme biodisponibles, qu'ils soient libres ou sorbés à la matière dissoute et colloïdale. Or il a été démontré dans des systèmes simplifiés (absence de particules) que les interactions CTO-matière colloïdale et dissoute pouvaient aussi diminuer leur biodégradation. L'approche tri-compartiments que nous souhaitons développer pourrait permettre de distinguer ces deux entités aqueuses, et donc de **déterminer lequel ou lesquels parmi les trois compartiments physiques identifiés font réellement partie du compartiment biologique dit biodisponible**. En référence à la biodégradation des CTOs, cette biodisponibilité peut être appréhendée comme un **potentiel d'ordre physique**.

Par ailleurs, le couple matrice – microorganismes détermine le métabolisme basal de la communauté, en terme de voies métaboliques empruntées, d'accepteur final d'électron utilisé, et de flux de carbone et d'énergie. Le métabolisme est ici défini comme basal par opposition au métabolisme minoritaire des CTOs, puisque ceux-ci constituent un substrat en quantités traces. Ce métabolisme basal définit les performances macroscopiques du procédé « boîte noire » : abattement de la matière et production de biogaz. A l'échelle du réseau d'interactions, il est impliqué dans différentes mailles. Tout d'abord, il « rétroagit » sur la matrice, puisque son utilisation comme substrat engendre des modifications de celle-ci : consommation de certains constituants et génération de produits (ce qui peut modifier les équilibres de sorption). Par ailleurs, il « rétroagit » aussi sur la structure de l'écosystème en présence, au travers de phénomènes de compétition pour le substrat disponible ou de sélection par les conditions environnementales que sont le pH, la température, la présence

d'inhibiteurs, d'accepteurs d'électrons... Cette compétition favorise la présence de certains organismes, et détermine leur abondance relative. Enfin, un lien direct existe entre le métabolisme basal de la communauté et la biodégradation des CTOs : le cométabolisme permet de coupler le métabolisme thermodynamiquement peu favorable des CTOs au métabolisme basal, pour le rendre favorable (paragraphe I.3.4). C'est ce dernier lien que nous souhaitons explorer, afin de **mieux définir et caractériser le cométabolisme**.

Enfin, le couple CTO – microorganismes définit un **potentiel d'ordre microbiologique**, via la présence des acteurs directement impliqués mais aussi via la présence d'acteurs syntrophiques. En effet, la biodégradation des HAPs/NP/PCBs semble être le fruit d'une collaboration entre plusieurs acteurs. Or, les acteurs syntrophiques sont peu spécifiques de la biodégradation des CTOs contrairement aux acteurs directs : il semble donc plus pertinent de se focaliser sur ces derniers. Cependant, les voies de biodégradation des HAPs/NP/PCBs ne sont pour le moment que partiellement connues, mais deux activités enzymatiques pourraient se révéler clés : l'activité déhalogénase (avérée dans le cas de PCBs) et l'activité arylsuccinate-synthase qui permet d'activer les molécules aromatiques avant ouverture du cycle (hypothétique dans le cas des polyaromatiques). Deux **indicateurs** microbiologiques pourraient donc être développés afin de quantifier les acteurs directement impliqués dans ces activités. L'état des connaissances en la matière nous oriente vers deux stratégies différentes : la stratégie fonctionnelle de détection du gène *bssA* pour l'activité arylsuccinate synthase, et la stratégie phylogénétique de détection de gènes ARNr 16S caractéristiques de bactéries PCB-déhalorespirantes.

Le premier objectif de cette thèse sera donc de développer une démarche qui permette d'étudier les trois potentiels identifiés : physique, cométabolique et microbiologique. Un volet entier de cette thèse aura pour but d'étudier les phénomènes de sorption, afin de fournir les connaissances nécessaires à la caractérisation du potentiel physique (chapitre III). Dans le second chapitre de résultats, les potentiels physique, cométabolique et microbiologique seront confrontés à des mesures de biodégradation. L'un de ces potentiels est probablement limitant : il détermine la biodégradation des HAPs/NP/PCBs au cours de la méthanisation des boues d'épuration contaminées. Le deuxième objectif est donc de déterminer lequel de ces potentiels est limitant.

II MATERIEL & METHODES

Dans ce chapitre, l'ensemble du matériel et des méthodes utilisés lors de ce travail seront présentés.

Dans un premier temps, les échantillons de boue sur lesquels les expériences se sont basées seront décrits.

Ensuite, les dispositifs expérimentaux permettant l'étude des phénomènes de sorption des HAPs/NP/PCBs dans les boues ainsi que la mise en œuvre de la digestion anaérobie de boues contaminées seront exposés.

Puis les méthodes analytiques couplées à ces dispositifs expérimentaux seront décrites.

Enfin, les outils utilisés pour l'analyse des données générées par les expérimentations menées seront détaillés.

II.1 Echantillons de boues d'épuration

Deux prélèvements sont réalisés pour les besoins de l'étude. Une boue primaire (**PS**) est échantillonnée dans la STEP de Muret (Haute-Garonne). Une boue secondaire (**SS**) est obtenue de la STEP de Cergy-Pontoise (Val-d'Oise). Cette boue secondaire provient d'un procédé de boues activées à très forte charge : l'âge des boues y est de 0,36 jours.

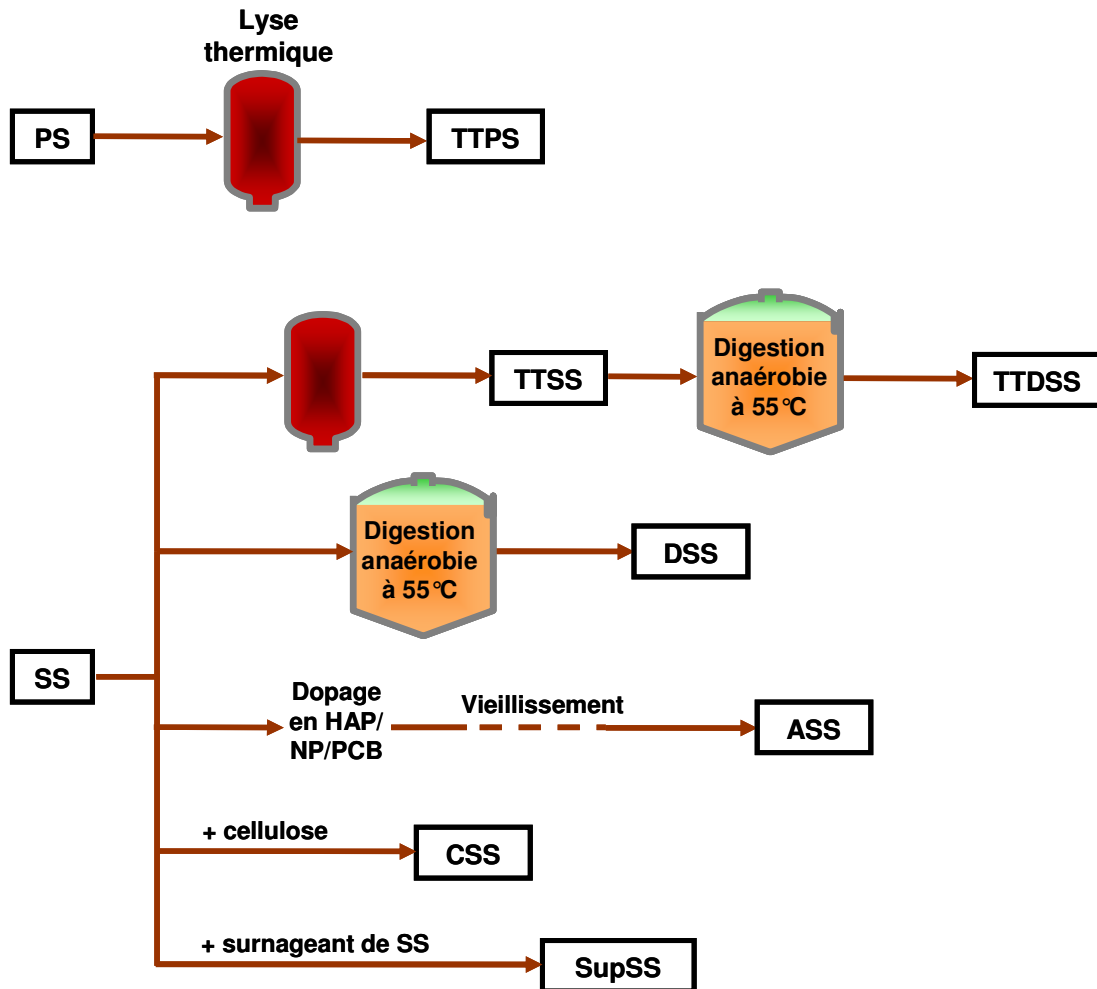


Figure II-1 : Obtention des échantillons de boues utilisés lors des expérimentations.

La boue PS est traitée thermiquement (paragraphe II.2.2) pour obtenir **TTPS** (Figure II-1). A partir de la boue secondaire SS, six nouvelles boues sont générées en laboratoire (Figure II-1). **TTSS** est obtenue par traitement thermique de SS, **DSS** par digestion anaérobie continue de SS au laboratoire (55°C, temps de séjour de 15 jours) et enfin **TTDSS** obtenue par traitement thermique puis digestion anaérobie thermophile de SS.

Un échantillon de boue SS est aussi dopé à raison de $5 \mu\text{g}_{\text{HAP}}/\text{g}_{\text{MS}}$. Durant deux mois, il est agité à température ambiante pendant 1h, deux fois par semaine. Entre ces phases d'agitation et durant 15 mois supplémentaires, l'échantillon est conservé à +4°C. Ainsi est obtenu un échantillon de boue contaminée et artificiellement vieillie (**ASS**).

Par ailleurs, la boue SS est aussi mélangée à des particules de cellulose (Sigma), en proportions DCO/DCO de 50/50, afin de créer la boue secondaire supplémentée en cellulose **CSS**. Enfin, la boue SS est diluée avec sa propre phase aqueuse préalablement séparée (3:1 v:v), de façon à augmenter le ratio matière dissoute et colloïdale / matière particulaire dans la boue nommée **SupSS**.

II.2 Dispositifs expérimentaux

II.2.1 Standardisation des boues par dopage en CTOs

L'un des objectifs des travaux menés dans le cadre de cette thèse est d'explorer l'influence des caractéristiques des boues et des CTOs sur le devenir de ces derniers lors de la digestion anaérobie de boues contaminées. Dans ce contexte, il est primordial de pouvoir étudier les CTOs ensemble dans une boue donnée, mais aussi dans plusieurs boues. Or, si une même boue contenant tous les HAPs/NP/PCBs dans des concentrations quantifiables était déjà difficile à trouver, trouver plusieurs boues remplissant ces conditions relèverait de l'impossible. C'est pourquoi la stratégie de dopage de boues initialement non-contaminées a été sélectionnée pour la mise en œuvre de la digestion anaérobie.

Par ailleurs, l'étude des cinétiques et équilibres de sorption/désorption et particulièrement l'étude de l'effet du vieillissement des boues et CTOs en contact nécessitent la maîtrise des concentrations en CTOs dans les systèmes et de leur temps de contact avec les boues. Là encore, la stratégie de dopage est préférable.

Afin de réaliser ce dopage, une solution concentrée en HAPs/NP/PCBs est préparée. L'injection d'un petite volume (de l'ordre de 1/1 000) de celle-ci permet d'atteindre les concentrations désirées en CTOs sans modifier les propriétés de la boue.

Les 13 HAPs et 7 PCBs étudiés sont commercialisés sous forme de poudre à une pureté de 99% (CIL Cluzeau). Ces poudres sont individuellement dissoutes à 1 g/L dans du dichlorométhane. Le mélange commercial des isomères du nonylphénol se présente sous forme de liquide visqueux, à partir duquel une solution à 20 g/L dans de l'hexane est préparée. Ensuite, un volume donné de solution de dopage est obtenu par ajout de 1/10 de ce volume en chacune des solutions individuelles, excepté pour l'indeno(1,2,3,c,d)pyrène dont 1/40 de volume est ajouté. Après évaporation à sec sous flux d'azote, le mélange est repris dans le volume désiré d'acétonitrile. Les concentrations obtenues dans la solution de dopage sont donc de 2 g/L de nonylphénol, 100 mg/L des PCBs et HAPs sauf l'indeno(1,2,3,c,d)pyrène présent à 25 mg/L. Ce dernier est présent en concentration moindre car il est très peu soluble dans l'eau et est donc susceptible de se retrouver en conditions de saturation lors des opérations de dopage. Il est de plus très coûteux.

La concentration de dopage de référence pour les expérimentations est de 5 $\mu\text{g}_{\text{HAP}}/\text{g}_{\text{MS}}$, 1,25 $\mu\text{g}_{\text{indeno(1,2,3,c,d)pyrene}}/\text{g}_{\text{MS}}$, 5 $\mu\text{g}_{\text{PCB}}/\text{g}_{\text{MS}}$ et 100 $\mu\text{g}_{\text{NP}}/\text{g}_{\text{MS}}$. Cette concentration peut être modulée en fonction des besoins spécifiques d'une expérience.

II.2.2 Traitement thermique des boues

L'appareil utilisé pour le traitement thermique des boues est un autoclave Zipperclave série 02-0378-1 (Autoclave France). 900 mL d'échantillon à traiter sont introduits dans la cuve en

acier inoxydable et maintenus sous agitation à 450 rpm (Figure II-2). Le four en céramique permet une montée en température de l'échantillon régulée par un PID : 165°C sont atteints en 30 min. L'autoclave étant hermétiquement clos, la pression dans la cuve atteint alors 3 bar. Au bout de 30 min à la température de 165°C, le four est retiré du pourtour de la cuve, et le refroidissement s'opère grâce à un groupe froid relié au serpentin de refroidissement.

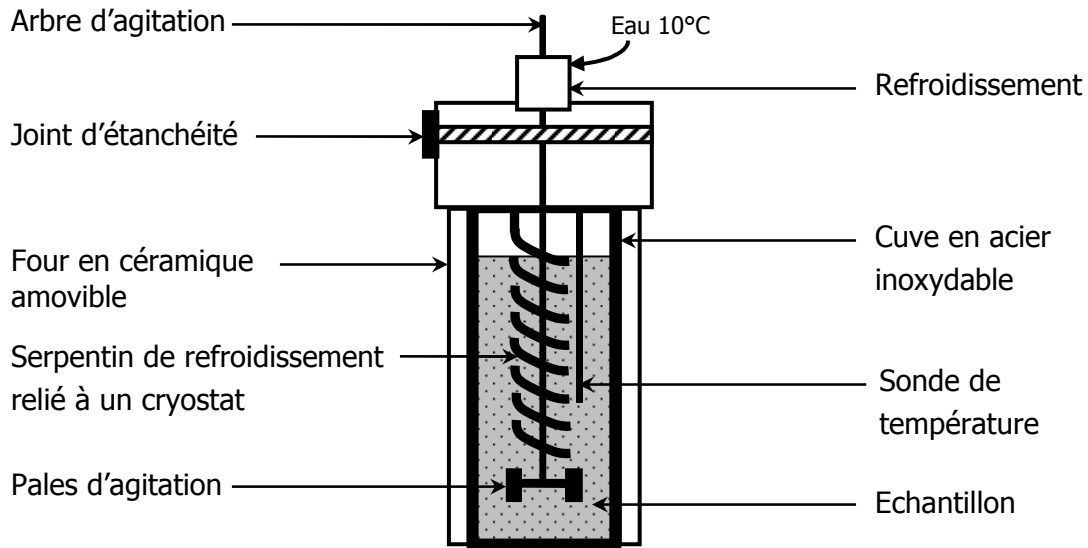


Figure II-2 : Autoclave de traitement thermique des boues.

II.2.3 Etude des phénomènes de sorption dans les boues

Cette partie expérimentale vise à étudier les phénomènes de sorption des HAPs/NP/PCBs dans les boues d'épuration. La boue est ici considérée comme un système tri-compartiments.

II.2.3.1 Cinétique

La cinétique de sorption des CTOs à la matière dissoute et colloïdale étant instantanée, la cinétique de partage des CTOs entre particules et phase aqueuse est gouvernée par leur cinétique de sorption aux particules. De plus, le partage étant techniquement beaucoup plus aisé à mesurer, celui-ci sera étudié dans le cadre des travaux menés en cinétique.

Pour étudier la cinétique de partage des HAPs dans la boue SS, celle-ci est préalablement diluée à 4 g_{MS}/L, puis 350 mL en sont introduits dans 8 pots à centrifuger de 400 mL. Ces pots sont tout d'abord équilibrés à la température de 35°C grâce à une table agitante opérant à 100 rpm durant 20 min dans une pièce thermostatée. Ensuite, à un instant marquant le t=0 de la cinétique, chaque pot est dopé à hauteur de 5 µg_{HAP}/g_{MS}. Le dopage est réalisé de manière très précise : le flacon de solution de dopage est pesé avant et après chaque prélèvement. Les pots sont ensuite replacés dans les mêmes conditions de température et d'agitation. Après 1, 3, 4, 6, 8, 10, 14 et 24h, les particules et la phase aqueuse sont séparées. Les HAPs sont quantifiés en duplicats dans la phase aqueuse, et la concentration aqueuse obtenue est exprimée en pourcentage de la concentration initialement introduite.

La mise en œuvre de cette méthodologie est détaillée dans le paragraphe III.1 de résultats.

II.2.3.2 Equations d'équilibre et de partage dans le système tri-compartiment

L'équilibre du système tri-compartimenté formé par un CTO dans une boue est gouverné par deux équations d'équilibre supposées (dans un premier temps) linéaires :

$$K_{\text{part}} = \frac{C_{\text{part}}}{C_{\text{free}}} \quad \text{et} \quad K_{\text{DCM}} = \frac{C_{\text{DCM}}}{C_{\text{free}}},$$

avec K_{part} la constante d'équilibre de sorption aux particules (mL/g_{part}) et K_{DCM} de sorption à la DCM (mL/g_{DCM}). C_{free} est la concentration en CTOs libres (µg/mL), C_{part} est la concentration en CTOs sorbés aux particules (µg/g_{part}), et C_{DCM} la concentration en CTOs sorbés à la DCM (µg/g_{DCM}).

Le système peut aussi être caractérisé par le coefficient de partage K_{global} (aussi nommé $K_{\text{partition}}$; mL/g_{PART}) :

$$K_{\text{global}} = \frac{C_{\text{part}}}{C_{\text{aqu}}} = \frac{K_{\text{part}} C_{\text{free}}}{K_{\text{DCM}} C_{\text{free}} [\text{DCM}] + C_{\text{free}}} = \frac{K_{\text{part}}}{K_{\text{DCM}} [\text{DCM}] + 1}$$

où C_{aqu} représente la concentration en CTOs en phase aqueuse (somme des entités libres et sorbées à la DCM, µg/mL), et $[\text{DCM}]$ la concentration en DCM (g_{MS}/mL).

II.2.3.3 Linéarité des équations d'équilibre

La linéarité des deux équilibres de sorption implique un coefficient de partage constant lorsque la concentration en DCM est fixe. Le partage des HAPs est donc étudié à concentration en DCM fixe afin de vérifier les hypothèses de linéarité.

Pour cela, cinq échantillons de boue SS diluée à 21,8 g_{MS}/L (dont 8 % de DCM) sont équilibrés à 35°C durant 20 min. Chaque pot est ensuite dopé à 1, 3, 5, 7 ou 9 µg_{HAP}/g_{MS}. Après 4h, les phases aqueuse et particulaire sont séparées par centrifugation à 15 000 g durant 20 min à 35°C. A partir des analyses pratiquées sur les deux phases, le coefficient de partage K_{global} est calculé dans chaque pot.

Les résultats présentés dans le paragraphe III.2 font appel à cette méthodologie.

II.2.3.4 Effets de compétition inter-CTO sur l'équilibre

Six échantillons de boue SS sont préparés, trois d'entre eux dopés avec les 21 CTOs étudiés, et trois autres avec le fluoranthène seul, à la concentration standard de 5 µg_{HAP}/g_{MS}. Après 4h de mise à l'équilibre à 35°C sous une agitation de 100 rpm, les phases aqueuse et particulaire sont séparées, afin de déterminer les concentrations en fluoranthène dans les deux phases, et de calculer les coefficients de partage K_{global} en présence et en absence de compétiteurs pour le fluoranthène.

Les résultats découlant de cette approche sont exposés lors de la discussion III.1.2

II.2.3.5 Hystérésis : comparaison des équilibres de sorption et de désorption, et effet du temps de contact

Pour mettre en évidence un potentiel phénomène d'hystérésis, un échantillon de boue ASS est dilué d'un facteur 3 pour déclencher la désorption des HAPs, et réparti dans 6 pots à centrifuger A1, A2, A3, F1, F2 et F3. Dans les pots F, l'équivalent de 5 µg_{HAP}/g_{MS} sont ajoutés. Afin de s'affranchir d'un biais potentiel dû au solvant ajouté lors du « néo-dopage »

des pots F, le même volume d'acétonitrile (450 µL) est introduit dans les pots A. Au bout de 4h de mise à l'équilibre à 35°C, les phases aqueuse et particulaire sont séparées avant quantification des HAPs dans chacune d'elles, pour pouvoir estimer les coefficients de partage dans les pots A et F. Le coefficient de partage obtenu dans les pots A caractérisera le partage des HAPs « vieillis », alors que celui obtenu dans les pots F est une combinaison du partage des HAPs « vieillis » et « néo-dopés ».

Cette approche a été employée dans le cadre des travaux exposés au paragraphe III.1.

II.2.3.6 Détermination de K_{part} et K_{DCM}

A partir d'un même échantillon de boue, plusieurs composites sont préparés en mélangeant en proportions variables un volume de boue, un volume de phase aqueuse de cette boue préalablement séparée, et un volume d'eau distillée. Cette méthodologie permet de faire varier la concentration en DCM. Toutefois, une expérience préliminaire est menée afin de détecter des biais éventuellement engendrés par ces dilutions. Pour cela, 11 échantillons obtenus à partir de SS sont mis sous agitation à 35°C : un échantillon de la boue initiale, et 10 échantillons de boue dilués d'un facteur 1,2 à 200. Après 4h, les phases aqueuses sont séparées des particules. Dans un premier temps, le pH des phases aqueuses est mesuré, puis leur demande chimique en oxygène (méthode précise, rapide et nécessitant de petits volumes). Le ratio R_i entre la DCO mesurée dans chaque phase aqueuse de facteur de dilution F_i (DCO_{Fi}) et la DCO prédite à partir de la DCO mesurée dans la phase aqueuse issue de la boue initiale (DCO_0) est calculé comme suit :

$$R_i = \frac{DCO_{Fi}}{DCO_0} \cdot F_i$$

On vérifiera que ce ratio reste proche de 1, c'est-à-dire que la matière particulaire n'est pas en partie solubilisée, et que les propriétés chimiques de la phase aqueuse ne sont pas modifiées de façon importante (indicateur pH). Suite à cette vérification, la méthodologie de préparation des composites est appliquée à 5 boues différentes : PS, SS, TTSS, DSS et enfin TTDSS (Tableau II-1).

Les gammes de concentration en DCM et particules dans les composites résultent de trois contraintes pratiques :

- La concentration maximale en DCM est imposée par la concentration en DCM dans la boue initiale.
- La concentration minimale en DCM est obtenue en diluant au maximum la boue initiale avec de l'eau. La dilution est cependant limitée par la quantité de particules présentes dans les pots : 0,5 g_{part} sont nécessaires pour l'analyse des CTOs qui y sont sorbés.
- La concentration en particules ne doit pas être trop élevée afin de garantir de bonnes conditions de mélange.

Lors de la préparation des composites, les volumes exacts de boue, de phase aqueuse et d'eau sont déterminés par pesée, et permettent de calculer précisément les concentrations en DCM et particules. Tous ces composites sont dopés à 5 µg_{HAP}/g_{MS} (par pesée), puis agités durant 4h à 35°C. Après séparation, les concentrations dans les phases aqueuse et particulaire sont mesurées, et le coefficient de partage calculé. Ainsi, pour chaque CTO dans chaque boue, 6 à 9 couples de valeurs ([DCM] ; K_{global}) sont obtenus.

Tableau II-1 : Composition initiale des 5 boues étudiées, puis volumes de boue, de phase aqueuse et d'eau à mélanger afin d'obtenir les composites. Les concentrations exactes en DCM et particules sont ensuite calculées.

Boue	Composition initiale de la boue	Composite	V _{boue} initiale (mL)	V _{φ aqu} (mL)	V _{eau} (mL)	[DCM] (g _{DCM} /L)	[part] (g _{part} /L)
PS	25,2 g _{part} /L	PS1	50	0	300	0,26	3,26
		PS2	75	0	275	0,43	5,42
		PS3	100	0	250	0,57	7,17
	2,02 g _{DCM} /L	PS4	125	0	225	0,73	9,17
		PS5	150	0	200	0,89	11,2
		PS6	200	0	150	1,16	14,4
		PS7	250	0	100	1,73	18,1
		PS8	250	50	50	2,02	18,1
		PS9	350	0	0	2,77	25,2
SS	60,9 g _{part} /L	SS1	40	0	360	0,65	8,81
		SS2	60	20	320	0,71	6,47
		SS3	100	0	300	1,16	15,7
	4,51 g _{DCM} /L	SS4	133	0	267	1,50	20,3
		SS5	150	50	200	2,08	22,5
		SS6	133	266	0	4,50	20,6
DSS	9,60 g _{part} /L	DSS1	50	0	300	0,14	1,34
		DSS2	75	0	275	0,21	2,04
		DSS3	100	0	250	0,29	2,75
	1,01 g _{DCM} /L	DSS4	125	0	225	0,36	3,41
		DSS5	150	0	200	0,43	4,16
		DSS6	150	50	150	0,58	4,21
		DSS7	150	100	100	0,72	4,12
		DSS8	150	150	50	0,86	4,20
		DSS9	150	200	0	1,01	4,06
TTSS	23,8 g _{part} /L	TTSS1	75	0	275	1,36	2,78
		TTSS2	100	0	250	1,97	4,04
		TTSS3	125	0	225	2,66	5,45
	11,6 g _{DCM} /L	TTSS4	150	0	200	3,32	6,80
		TTSS5	150	50	150	4,19	6,91
		TTSS6	150	100	100	5,00	6,91
		TTSS7	150	150	50	5,83	6,96
		TTSS8	150	175	25	6,65	6,98
		TTSS9	150	200	0	8,24	6,93
TTDSS	6,01 g _{part} /L	TTDSS1	100	0	250	0,27	1,70
		TTDSS2	125	0	225	0,33	2,09
		TTDSS3	150	0	200	0,41	2,55
	0,96 g _{DCM} /L	TTDSS4	150	50	150	0,55	2,57
		TTDSS5	150	75	125	0,62	2,58
		TTDSS6	150	100	100	0,68	2,55
		TTDSS7	150	150	50	0,83	2,60
		TTDSS8	150	175	25	0,89	2,60
		TTDSS9	150	200	0	0,96	2,64

Cette méthode a été employée pour les travaux détaillés dans les paragraphes de résultats III.2 et III.3.

II.2.4 Digestion anaérobie des boues contaminées

II.2.4.1 Mode batch

En mode batch, les expériences de digestion anaérobie sont menées en fioles de 500 mL équipées d'un septum. Le volume réactionnel de 400 mL est composé d'un inoculum (prélèvement de sortie d'un digesteur industriel mésophile traitant des boues contaminées en HAPs) et d'un substrat à raison de 1 g_{DCCO} par gramme de matière volatile particulaire d'inoculum, dilués de façon à atteindre une concentration en matières sèches de 20 g/L. Les CTOs y sont ensuite ajoutés à la concentration standard. Après dégazage de la phase liquide et mise sous atmosphère CO₂/N₂ (30/70), les fioles sont disposées sur une table agitante (100 rpm), dans une enceinte régulée à 35°C. Tous les 1 à 3 jours, le volume de gaz produit est déterminé grâce à une aiguille piquée dans le septum et reliée à un système d'éprouvette renversée, par mesure du volume d'eau déplacé. Cette mesure de volume est couplée à une mesure de composition : 1 mL d'échantillon gazeux est prélevé.

Une fiole nommée « témoin froid » ne contenant pas de substrat est analysée de la même manière, afin de quantifier la respiration endogène de l'inoculum, et de corriger les fioles comprenant du substrat.

La mesure de concentration en CTOs nécessite de sacrifier une fiole entière. De ce fait, les CTOs sont analysés dans le mélange à t₀, et à la fin de l'expérience (20 jours).

Les expériences préliminaires de quantification des pertes abiotiques présentées au paragraphe IV.2 s'appuient sur ce dispositif.

II.2.4.2 Mode semi-continu

Les bioréacteurs de digestion anaérobie mis en œuvre au cours de l'étude sont proches d'un réacteur infiniment mélangé en mode de fonctionnement continu et avec cellules libres, similairement aux procédés industriels. Ces bioréacteurs possèdent un volume utile de 5L dont le mélange est assuré par un agitateur magnétique (Figure II-3). Leur double enveloppe permet la régulation de température. Cette double enveloppe est de plus recouverte d'un matériau isolant, qui bloque les rayonnements lumineux. Mettler Toledo reliée à un microordinateur permet l'acquisition en ligne du pH. Les pompes d'alimentation et de soutirage sont programmées de façon à opérer 6 cycles de soutirage-alimentation par jour. Le volume pompé par cycle est calculé par pesée hebdomadaire des réservoirs d'alimentation et de soutirage. Le temps de marche des pompes est ensuite ajusté de façon à appliquer un temps de séjour hydraulique (TSH) de 15 à 20 jours selon les conditions. Environ 100 cycles se succèdent au cours d'un TSH : ce mode semi-continu est donc assimilable à un mode continu.

Les boues d'alimentation sont continuellement agitées dans un souci d'homogénéité et de stabilité de l'alimentation. De même que les boues digérées (soutirage), elles sont maintenues dans une enceinte réfrigérée afin de limiter leur évolution entre le renouvellement de l'alimentation et le prélèvement du soutirage effectués à fréquence hebdomadaire.

L'effluent gazeux est réfrigéré de manière à limiter les pertes des composés évaporés ou volatilisés depuis le mélange réactionnel. Un septum disposé en aval du réfrigérant permet le prélèvement pour analyse hors ligne de la composition du biogaz. Le biogaz produit traverse

ensuite une cartouche ORBO en polyuréthane (Supelco) dont le garnissage adsorbe les CTOs volatilisés. Le biogaz atteint ensuite le compteur volumique qui permet de suivre en ligne le volume de biogaz produit. A chaque volume V_{imp} le traversant, ce compteur génère une impulsion électrique acquise par le microordinateur. V_{imp} est mesuré au cours de l'étalonnage préalable du compteur.

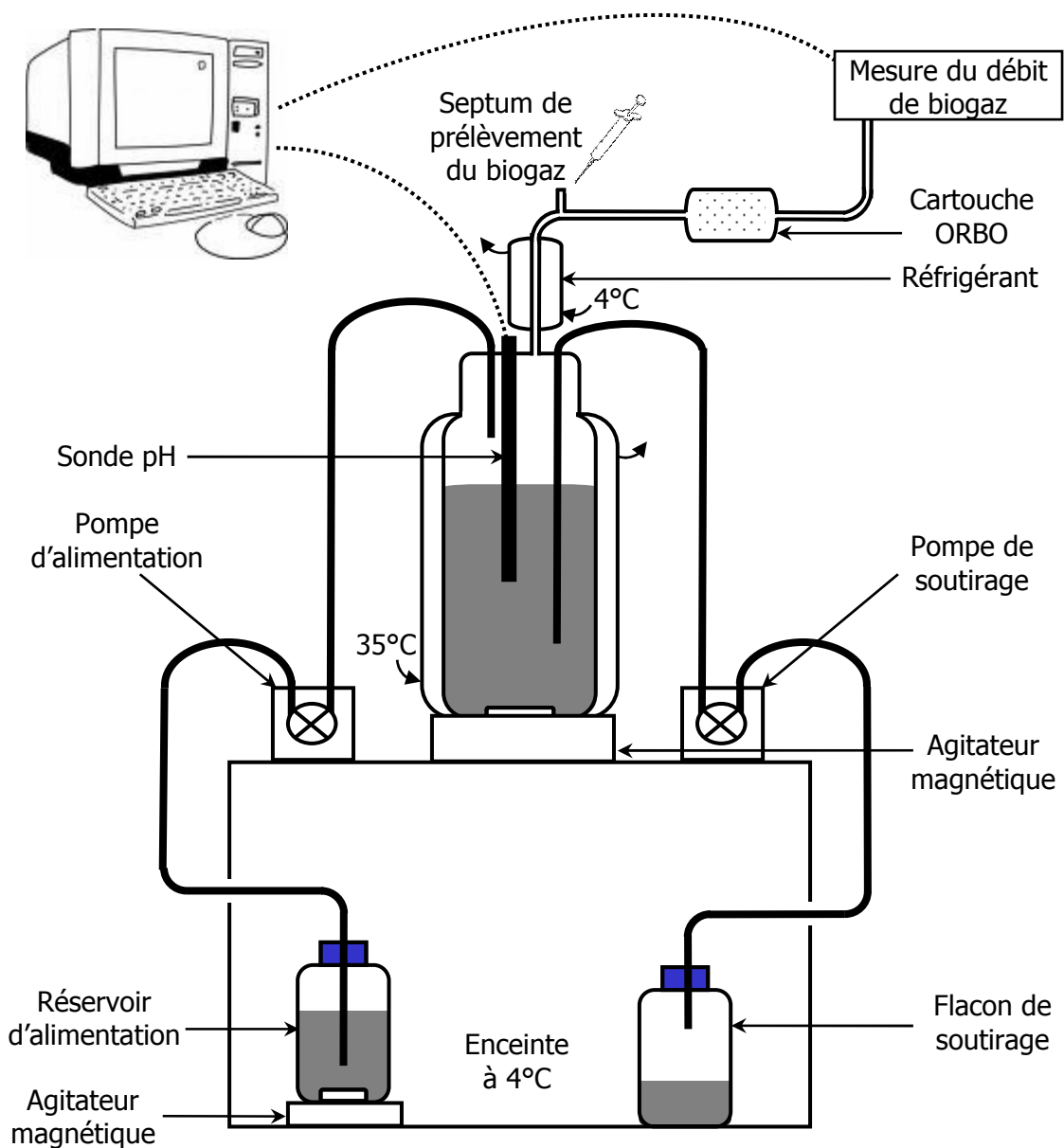


Figure II-3 : Représentation du dispositif de digestion anaérobie.

Ce dispositif a permis l'étude de la digestion anaérobie des boues PS, SS, TTPS, TTSS, CSS et SupSS dopées à $5 \mu\text{g}_{\text{HAP}}/\text{g}_{\text{MS}}$ durant 4 TSH chacune, en conditions mésophiles (35°C , TSH : 20 jours) et pour une charge de 1g de demande chimique en oxygène par litre de réacteur et par jour. Le même inoculum que pour les essais en batch a été utilisé pour démarrer ces réacteurs. *Les résultats obtenus lors de la mise en œuvre de tels réacteurs font l'objet des paragraphes de résultats IV.3 et IV.4.*

Des réacteurs thermophiles (55°C, TSH : 15 jours) alimentés en boues SS et TTSS non dopées ont permis de générer les boues DSS et TTDSS, mais le suivi et les performances de ces réacteurs ne seront pas abordés. Ces réacteurs ont été mis en œuvre dans le but de générer de nouveaux échantillons pour réaliser les isothermes de sorption (Figure II-1).

II.3 Méthodes analytiques

II.3.1 Préparation des échantillons

II.3.1.1 Séparation particules / phase aqueuse

La séparation des phases particulaire et aqueuse (contenant la matière dissoute et colloïdale) est réalisée par centrifugation à 15 000 *g* durant 20 min. Ensuite, certains culots de centrifugation étant très peu cohésifs, une étape de filtration à 1,2 μm est pratiquée afin de séparer les résidus de culot resuspendus. Cette filtration postérieure à la centrifugation retient des quantités négligeables de matière dissoute et colloïdale.

En vue de la quantification des CTOs en phase aqueuse, 0,37% (en volume) de formaldéhyde sont immédiatement ajoutés au filtrat.

II.3.1.2 Lyophilisation

300 mL de boues totales ou bien de leur phase particulaire sont tout d'abord congelées à -20°C. Grâce au module HetoPowerDry PL 3000 (ThermoElectron Corporation), ces échantillons sont lyophilisés. Les parois du piège à glace sont maintenues à -55°C, le vide est poussé à 1 mbar, et les étagères portant les plateaux sont équipées de résistances chauffantes, de manière à accélérer la sublimation de la glace. Le chauffage est programmé selon des paliers de 2h à -20°C, -5°C, 5°C, 15°C puis les échantillons sont maintenus à 25°C jusqu'à arrêt de l'appareil. La lyophilisation dure environ 20h.

II.3.1.3 Broyage

Un broyage est appliqué aux échantillons lyophilisés afin de les réduire en une poudre fine et de garantir une homogénéité satisfaisante. Pour cela, un microbroyeur (Culatti) équipé d'un tamis de 1 mm est utilisé. La vitesse de rotation de la tête de broyage est fixée à 3 000 rpm.

II.3.2 Analyse des boues

II.3.2.1 Caractérisation chimique

II.3.2.1.1 Quantification des matières sèches et matières volatiles

Dans un creuset en céramique taré (masse T), environ 60 mL d'échantillon (boue totale ou phase particulaire ou phase aqueuse) sont introduits. Le creuset est ensuite pesé (m_0), puis placé à l'étuve à 105°C durant 24h afin d'évaporer l'eau et pesé à nouveau (m_{105}). Enfin, l'échantillon est disposé dans un four à 550°C pendant 2h, et pesé à nouveau (m_{550}).

Finalement, les concentrations en matières sèches (MS) et matières volatiles (MV) sont obtenues par les calculs suivants :

$$MS(g/kg) = \frac{m_{105}(g) - T(g)}{m_0(g) - T(g)} * 1000 \quad \text{et} \quad MV(g/kg) = \frac{m_{105}(g) - m_{550}(g)}{m_0(g) - T(g)} * 1000$$

L'erreur commise est de 2% pour des échantillons liquides, et de 5% pour des boues totales.

II.3.2.1.2 Demande chimique en oxygène

La demande chimique en oxygène (DCO) des boues totales ou de leur phase aqueuse est mesurée à l'aide de kits Spectroquant (Merck), en accord avec la norme ISO 15 705. Les tubes commercialisés dans lesquels 2 mL d'échantillon sont introduits contiennent un excès de bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) qui permet l'oxydation totale de la matière après 2h en conditions acides et à 150°C. La détection par spectrophotométrie s'applique dans la gamme 150 – 1 500 mg_{O_2}/L . L'erreur commise sur des échantillons liquides est de 5%, et elle atteint 10% en présence de particules, du fait de l'hétérogénéité de la matrice et du faible volume prélevé.

II.3.2.1.3 Dosage des protéines

Les protéines contenues dans les boues totales ou leur phase aqueuse sont dosées par la méthode spectrophotométrique de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) basée sur la détection des liaisons peptidiques. La solution de réactifs est un mélange de solution basique (4 g_{NaOH}/L) de Na_2CO_3 (20 g/L), de solution de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ à 10 g/L, et de solution de tartrate double de potassium et de sodium à 20 g/L, en proportions volumiques 100/1/1.

Des solutions de sérum d'albumine bovine (SAB) à 20, 40, 60, 80 et 100 mg/L sont préparées afin de réaliser une courbe d'étalonnage.

Dans des tubes à essai, 1 mL d'échantillon ou de standard, 3 mL de solution de réactifs et 0,3 mL de réactif de Folin sont introduits puis placés à l'obscurité durant 2h. Dans ce milieu alcalin, les ions Cu^{2+} réagissent avec les atomes d'azote des liaisons peptidiques et sont réduits en Cu^+ . Les ions Cu^+ réduisent ensuite le complexe acide phosphotungstique/acide phosphomolybdique contenu dans le réactif de Folin, ce qui confère une coloration bleutée aux mélanges réactionnels. L'adsorbance à 750 nm est finalement mesurée pour obtenir la concentration des échantillons en équivalents g_{SAB}/L . La présence de particules augmente l'erreur de mesure de 5 à 15%.

II.3.2.1.4 Dosage des glucides

Le dosage des glucides dans les boues totales ou leur phase aqueuse est basé sur leur réaction avec l'antrone (Dreywood, 1946). La solution de réactif est préparée par dilution d'antrone dans de l'acide sulfurique à 98% à raison de 2 g/L.

L'étalonnage est réalisée grâce à des solutions de glucose à 20, 40, 60, 80 et 100 mg/L.

1 mL d'échantillon ou de standard ainsi que 1 mL de solution de réactifs sont disposés dans des tubes à essais, puis plongés dans un bain-marie à 98°C durant 10 min. A cette température et en milieu acide, les glucides réducteurs sont déshydratés pour donner des dérivés furfuraliques. Ceux-ci se condensent avec l'antrone, générant une couleur verte pour les hexoses. Après refroidissement dans de la glace, l'absorbance à 625 nm permet

d'obtenir la concentration en glucides en équivalents g_{glucose}/L . L'erreur commise est inférieure à 10%.

II.3.2.1.5 Dosage des lipides

Le dosage des lipides dans les échantillons lyophilisés et broyés est mené grâce à l'appareil ASE 200 (Dionex), qui permet de réaliser l'extraction par l'éther de pétrole à hautes température et pression. Les cellules contenant 1 g d'échantillon sont chauffées à 105°C et portées à la pression de 67 bars, maintenues dans ces conditions pendant 10 min, puis purgées de la totalité du solvant. Chaque cellule subit trois cycles de ce type. Les extraits sont récupérés dans des vials préalablement tarés. L'éther de pétrole est évaporé à l'aide d'un Multivapor (Büchi) dans lequel les échantillons sont agités, chauffés à 45°C, mis sous vide (500 mbar), et l'éther de pétrole est condensée à 4°C. Les traces de solvant restantes sont ensuite éliminées à l'étuve à 105°C avant pesée du vial. La différence par rapport à la tare permet de mesurer la masse de matière extractible à l'éther de pétrole par unité de masse de l'échantillon, à 5% prêt.

II.3.2.1.6 Dosage des acides gras volatils

Les acides gras volatils (AGV) sont dosés par chromatographie en phase gazeuse. 1 μL d'un mélange volumique 50/50 de phase aqueuse de boue et d'étalon interne à 1 g/L (acide éthyl-2-butyrique) sont injectés dans la colonne capillaire (Econocap FFAP Altech ; longueur / diamètre / épaisseur : 15 m / 0,53 mm / 1,2 μm). Le gaz vecteur est composé d'azote (25 bar) d'hydrogène (50 bar) et d'air (100 bar). L'injecteur est maintenu à 250°C, le détecteur à ionisation de flamme à 275°C, alors que le four à colonne adopte un gradient de 80°C à 120°C en 3 min. Des étalons externes à 1 g/L permettent de quantifier les acides acétique (temps de rétention t_R : 3,8 min), propionique (4,8 min), iso-butyrique (5,2 min), butyrique (6,3 min), iso-valérique (7,3 min) et valérique (9,2 min). La limite de quantification est de 0,1 g/L, et l'erreur de mesure est de 2 %.

II.3.2.1.7 Acquisition de spectres de fluorescence 3D

Les spectres de fluorescence en trois dimensions (x : longueur d'onde d'excitation, y : longueur d'onde d'émission, z : intensité de fluorescence) de phases aqueuses des boues PS, SS, TTSS et DSS sont obtenus à l'aide d'un spectromètre LS 55 (Perkin Elmer). Les longueurs d'onde balayées sont comprises entre 200 et 400 nm pour la détection, et 280 à 550 nm pour l'émission, avec un pas de 5 nm.

Pour s'affranchir de problèmes d'extinction de fluorescence et de filtre interne mais aussi pour tendre vers une analyse quantitative, les spectres sont acquis dans la zone de linéarité du signal de fluorescence en fonction de la concentration en DCM. Pour localiser cette zone de linéarité, des mesures de fluorescence sont au préalable pratiquées au couple de longueur d'onde excitation-émission caractérisé par la plus grande intensité dans l'échantillon, et ce à différentes dilutions.

Les spectres acquis, leur traitement ainsi que leur exploitation sont précisément exposés dans le paragraphe III.3.2.

II.3.2.2 Caractérisation physique

II.3.2.2.1 Granulométrie

La taille des **particules** de boue est analysée à l'aide d'un granulomètre laser Coulter LS230 (Beckman). Les particules sont assimilées à des sphères, et la répartition du volume de matière en fonction du diamètre de ces pseudo-sphères entre 0,4 et 2 000 μm est obtenue. Ainsi, le paramètre quantitatif d_{50} (μm) est estimé. Il représente le diamètre qui partage les particules en deux populations de volume égal : la population des particules de taille inférieure, et celle de taille supérieure.

II.3.2.2.2 Fractionnement de la matière dissoute et colloïdale

Le critère physique choisi pour la caractérisation de la matière dissoute et colloïdale est sa répartition en classes de taille. Quatre fractions sont définies : F1 concerne les molécules comprises entre 0,1 et 1,2 μm , F2 entre 10 kDa et 0,1 μm , F3 entre 1 et 10 kDa et F4 en dessous de 1 kDa. La DCO est choisie comme référence pour cette répartition en raison du faible volume que cette analyse nécessite.

La matière dissoute et colloïdale a subi une étape de filtration lors de sa séparation des particules (voir paragraphe II.3.1.1). La DCO initiale de l'échantillon ($\text{DCO}_{<1,2\mu\text{m}}$) est mesurée. L'échantillon subit alors une étape de filtration sous vide sur une membrane en PVDF de 0,1 μm de seuil de coupure (Millipore), et la DCO du filtrat ($\text{DCO}_{<0,1\mu\text{m}}$) est mesurée. Le filtrat subit ensuite une ultra-filtration sous 3 bars dans une cellule Amicon (Millipore) munie d'une membrane en cellulose régénérée de 10 kDa de taille de pores (Millipore). Cet ultra-filtrat ($\text{DCO}_{<10\text{kDa}}$) est de nouveau ultra-filtré à 1 kDa de taille de pores pour donner la fraction représentée par $\text{DCO}_{<1\text{kDa}}$. F1, F2, F3 et F4 sont calculées comme suit :

$$F1 = \frac{\text{DCO}_{<1,2\mu\text{m}} - \text{DCO}_{<0,1\mu\text{m}}}{\text{DCO}_{<1,2\mu\text{m}}} * 100 \quad , \quad F2 = \frac{\text{DCO}_{<0,1\mu\text{m}} - \text{DCO}_{<10\text{kDa}}}{\text{DCO}_{<1,2\mu\text{m}}} * 100 \quad ,$$

$$F3 = \frac{\text{DCO}_{<10\text{kDa}} - \text{DCO}_{<1\text{kDa}}}{\text{DCO}_{<1,2\mu\text{m}}} * 100 \quad \text{et} \quad F4 = \frac{\text{DCO}_{<1\text{kDa}}}{\text{DCO}_{<1,2\mu\text{m}}} * 100$$

II.3.2.2.3 Densité

La densité de la matière totale ou de la matière minérale des boues est mesurée sur échantillons secs et broyés. Dans un appareil Ultra Pycnometer 1000, une masse précise d'échantillon est introduite. De l'azote est introduit dans la chambre de l'échantillon dont le volume est connu, jusqu'à atteindre la pression de 17 psi. La vanne reliant la chambre de l'échantillon à la chambre d'expansion (de volume connu aussi) est alors ouverte. La différence de pression alors mesurée est directement reliée au volume occupé par l'échantillon. Le ratio entre la masse d'un échantillon (en g) et le volume qu'il occupe (en mL) donne sa densité.

La densité de la matière organique est déduite des densités de la matière totale et de la matière minérale.

II.3.3 Analyse des HAPs/NP/PCBs

II.3.3.1 Extraction des HAPs/NP/PCBs en phase solide

L'extraction concomitante des HAPs/NP/PCBs contenus dans des échantillons de boue totale ou de culots de centrifugation est conduite après lyophilisation et broyage, par extraction accélérée par solvant avec l'ASE 200 (Dionex) selon la méthode optimisée par Trably *et al.* (2004).

Dans les cellules comportant un filtre en fibre de verre (Whatman), surmonté de 1 g d'alumine (rétention des composés polaires, Sigma Aldrich) et de 1 g d'hydromatrix (dispersant et asséchant, Varian), 0,5 g d'échantillon sont introduits puis mélangés à l'hydromatrix présent. Enfin, le volume restant est comblé d'hydromatrix.

Le solvant utilisé pour l'extraction est un mélange volumique d'hexane et d'acétone à 50/50. Une extraction consiste à chauffer la cellule remplie de ce mélange jusqu'à atteindre la température de 120°C (au bout de 6 min), à maintenir cette température et une pression de 100 bars pendant 5 min, puis à purger 60 % du volume de solvant pour le remplacer par du solvant neuf. L'opération est répétée une seconde fois. Deux extractions ainsi définies sont opérées par cellule, récupérées dans deux vials séparés. L'évaporation du solvant est réalisée à l'aide du Multivapor (voir paragraphe II.3.2.1.5) et le séchage complet des extraits est obtenu sous flux d'azote. 2 mL d'acétonitrile sont introduits dans chaque vial de récupération. Après agitation et repos, les deux volumes de 2 mL et 1 mL additionnel d'acétonitrile utilisé pour le rinçage sont rassemblés dans un vial de reprise préalablement taré. Par pesée, le volume exact de reprise est déterminé.

Les extraits sont conservés à -20°C.

II.3.3.2 Extraction de HAPs/NP/PCBs en phase liquide

L'extraction des HAPs/NP/PCBs présents en phase liquide est réalisée par *Solid Phase Extraction* (SPE). Une colonne d'affinité garnie de 1 g de silice greffée C18 (Chromabond) est tout d'abord rincée par deux passages de 5 mL de méthanol/toluène/acétonitrile (33/33/33 v/v/v), et conditionnée par deux passages de 5 mL de méthanol puis d'eau ultrapure. Ensuite, l'échantillon de 100 mL est passé à raison de 1 mL/min au travers de la colonne. Le garnissage est asséché sous vide (30 min) avant élution des HAPs/NP/PCBs retenus par 2 * 2 mL de méthanol / toluène (50/50 v/v) puis 2*2 mL de méthanol/dichlorométhane (50/50 v/v). L'extrait est alors évaporé à sec sous courant d'azote, repris dans 1 mL d'acétonitrile et transféré dans un vial de reprise avant conservation à -20°C.

II.3.3.3 Extraction de HAPs/NP/PCBs fixés sur cartouche ORBO

La cartouche ORBO (Supelco) traversée par l'effluent gazeux d'un réacteur durant une période donnée est retirée du dispositif et placée dans un montage Soxhlet. 200 mL de mélange hexane/acétone (50/50) sont disposés dans le ballon, qui est chauffé à 60°C durant 16h. L'extrait obtenu est réduit à quelques millilitres à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi), puis séché sous courant d'azote, et enfin repris dans 1 mL d'acétonitrile.

II.3.3.4 Quantification des HAPs/NP/PCBs dans les extraits

II.3.3.4.1 Dosage des HAPs

La chaîne d'analyse des HAPs en chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est composée d'un passeur d'échantillons (Waters 717 plus Autosampler), d'un système de pompes péristaltiques (Waters 600 Controller) et d'un détecteur fluorimétrique (Waters 2475). La colonne greffée en C18 (Bakerbond™ PAH 16-Plus) est maintenue à 25°C à l'aide d'un four à effet Pelletier (CIL Cluzeau). Après injection de 20 µL d'échantillon, le système de pompes permet de générer une première phase isocratique à 0,25 mL/min de mélange acétonitrile/eau (60/40 v/v) pendant 30 min, puis un gradient jusqu'à atteindre une élution d'acétonitrile à 100 % au bout de 35 min, maintenue pendant 10 min et le débit est finalement augmenté à 0,5 mL/min pour la phase de rinçage sous acétonitrile/eau (60/40 v/v). Le système de détection optimisé par Trably *et al.* (2004) est programmé de façon à quantifier chaque HAP à son couple longueur d'excitation (λ_{ex}) / longueur d'onde d'émission (λ_{em}) optimal (Tableau II-2).

L'étalonnage est réalisé suivant six niveaux de standard (10 à 1 000 µg/L) obtenus par dilution d'une solution mère PAH Mix 3 (CIL Cluzeau) à 10 mg/L. Ensuite, après chaque série de 10 échantillons, un standard est injecté de façon à vérifier la stabilité du signal au fil des injections.

Tableau II-2 : Temps de rétention (min) des HAPs et couples de longueurs d'onde d'excitation / émission (nm) utilisés pour leur détection par fluorimétrie.

HAP	Flu	Phe	Ant	Fluora	Pyr	BaA	Chr	BbF	BkF	BaP	DBA	BghiP	Ind
t_R	22	26	31	36	39	49	51	57	60	63	67	69	71
λ_{ex}	266	250	250	280	260	280	268	234	270	270	300	300	300
λ_{em}	312	370	400	430	410	430	384	420	400	400	407	407	500

II.3.3.4.2 Dosage du NP

Le NP est analysé selon la méthode mise au point par Ahel *et al.* (2000). Le dispositif de dosage du NP par HPLC est composé d'un passeur d'échantillon ASI 100 (Dionex), d'un système de pompe P580 (Dionex) et d'un détecteur fluorimétrique RF2000 (Dionex).

La colonne LiChroCART® Purospher® STAR NH2 est maintenue à 30°C à l'aide d'un four (CIL Cluzeau). L'éluant utilisé est un mélange hexane / isopropanol (98,5/1,5 v/v), ce qui nécessite un transfert des extraits (obtenus dans de l'acétonitrile) dans de l'hexane, par une étape d'évaporation de 100 µL d'extrait et reprise dans un volume adéquat d'hexane. L'élution s'effectue en mode isocratique à 2 mL/min, et le nonylphénol (t_R : 13 min) est détecté au couple $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 228/305 nm.

A partir d'une solution standard commerciale à 10 mg/L (CIL Cluzeau), quatre niveaux de concentrations sont préparés (0,5, 1, 2 et 4 mg/L). Le volume injecté est de 20 µL. Une série d'injection de ces quatre niveaux est intercalée entre chaque série de 10 échantillons.

II.3.3.4.3 Dosage des PCBs

Pour le dosage des PCBs, 150 µL des extraits sont transférés dans de nouveaux vials, évaporés à sec, puis repris dans une solution de tétrachloronaphtalène (TCN) à 1 mg/L dans

du dichlorométhane. Le TCN joue le rôle de standard interne lors de la quantification des PCBs par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

La séparation s'effectue par GC grâce à un auto system XL (PerkinElmer). L'injection de 1 µL est réalisée en mode *splitless* (débit de purge d'injecteur nul pendant l'injection) pulsé (débit de gaz vecteur augmenté de 13 à 20 psi durant l'injection). La température de l'injecteur s'élève à 250°C. La colonne capillaire Elite PE 5MS (longueur : 30 m, diamètre : 2,25 mm, épaisseur du film : 0,25 µm ; PerkinElmer) est maintenue à 55°C durant 2 min, puis la température est élevée selon un premier gradient de 25°C/min jusqu'à 160°C et une seconde rampe de 5°C/min jusqu'à 300°C, et enfin maintenue à 300°C pendant 10 min. Un spectromètre de masse Turbo Mass Gold (PerkinElmer) en mode d'impact électronique (70 eV) permet l'ionisation des PCBs et la détection des ions formés. La source est maintenue à 280°C. L'acquisition des données est réalisée en sélectionnant deux ions, l'un permettant l'identification et la quantification, le second étant un ion de confirmation (Tableau II-3). Ces deux ions sont les ions majoritaires des spectres de fragmentation expérimentalement obtenus. Il peut s'agir d'ions moléculaires ou d'ions fragments. Les fragments majoritairement observés sont issus de la rupture d'une ou plusieurs liaisons entre atomes de carbone et de chlore.

Tableau II-3 : Temps de rétention (min) et ions d'identification/ quantification et de confirmation (m/z) pour la détection des PCBs par spectrométrie de masse.

CTO	PCB 28	PCB 52	TCN	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
t_R	14,8	15,8	16,2	18,9	21,2	21,9	22,9	25,3
Ion de quantification	256	220	264	254	254	290	290	324
Ion de confirmation	258	292	266	326	326	360	360	394

Les aires des PCBs (A_{PCBi}) et du TCN (A_{TCN}) sont quantifiées dans les chromatogrammes. Elles dépendent de leur facteur de réponse spécifique (f), de leur concentration (C), et du volume injecté (V_{inj}) :

$$A_{PCBi} = f_{PCBi} * C_{PCBi} * V_{inj} \quad \text{et} \quad A_{TCN} = f_{TCN} * C_{TCN} * V_{inj}$$

Le volume d'injection peut être exprimé en fonction de l'aire, du facteur de réponse et de la concentration du TCN, et remplacé dans l'expression de A_{PCBi} , pour donner :

$$A_{PCBi} = f_{PCBi} * C_{PCBi} * \frac{A_{TCN}}{f_{TCN} * C_{TCN}},$$

$$\text{soit} \quad C_{PCBi} = \frac{f_{TCN} * A_{PCBi} * C_{TCN}}{f_{PCBi} * A_{TCN}} = F_{PCBi} * \frac{A_{PCBi} * C_{TCN}}{A_{TCN}}$$

Les facteurs globaux F_{PCBi} sont déterminés par étalonnage externe. Pour cela, la linéarité de la réponse détectée en spectrométrie de masse en fonction de la concentration en PCBs a été étudiée en préliminaire, ainsi que sa gamme de validité. En routine, un seul niveau de standard est ensuite utilisé pour l'étalonnage. Les séquences d'analyses se décomposent en cycles de 5 injections : un blanc (dichlorométhane), un standard à concentration proche des

échantillons, et trois échantillons (dilués ou concentrés pour se ramener dans la gamme 0,1 – 2 mg/L). L'injection très régulière de standards permet de prendre en compte l'évolution du signal au cours de l'encrassement de la source.

II.3.4 Analyse du biogaz

La composition du biogaz produit par les réacteurs de digestion anaérobie est déterminée par chromatographie en phase gazeuse. 1 mL d'échantillon gazeux est injecté. Deux colonnes en série permettent la séparation des différents gaz. La première colonne Hayesep Q (Altech CTRI), garnie de silica gel, permet la séparation du CO₂. Les autres gaz sont séparés grâce à la seconde colonne, qui est un tamis moléculaire à 5 Å (Altech CTRI).

Le gaz vecteur est de l'argon à 2,8 bars. La détection est réalisée à l'aide d'un catharomètre dont le courant est fixé à 80 mA. Le four à colonne est réglé à 30°C, alors que l'injecteur et le détecteur opèrent à 100°C. La composition de l'échantillon est déterminée par étalonnage externe. Pour cela, un gaz étalon composé de 25% volumique de CO₂, 2% de O₂, 5% de H₂, 10% de N₂ et 58% de CH₄ est employé.

II.3.5 Détection du gène *bssA* dans les boues

II.3.5.1 Echantillonnage

Les prélèvements de sorties de réacteurs sont réalisés au moment où la pompe de soutirage fonctionne. L'effluent est directement prélevé au bout de tuyau. La phase de stockage à +4°C dans le flacon de soutirage est ainsi évitée, de façon à garantir l'intégrité des ADNs. Pour chaque prélèvement hebdomadaire, quatre aliquots de 0,5 mL sont préparés dans des tubes de 2 mL et conservés à -20°C. Cette procédure a été appliquée au cours des différentes phases de conduite de 7 réacteurs.

II.3.5.2 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait grâce au kit FastDNA® SPIN conçu pour les échantillons de sol. 950 µL de tampon de phosphate de sodium et 120 µL de tampon MT sont ajoutés aux tubes de 2 mL contenant les échantillons, immédiatement après leur sortie du congélateur. Lorsque la boue est décongelée, le mélange est homogénéisé, et transféré dans un tube Multmix 2 Tissue Matrix. Ce tube contient un mélange de particules de céramique et de silica gel. Les cellules sont ensuite lysées par agitation violente durant 10 min. Après centrifugation durant 10 min à 10 000 *g*, le surnageant est transféré dans un tube contenant 250 µL de solution PPS qui entraîne la précipitation des protéines. Les tubes sont manuellement inversés à dix reprises, puis centrifugés durant 3 min.

750 µL de surnageant sont ensuite transférés dans un tube contenant 750 µL de Binding Matrix, pour laquelle l'ADN a une forte affinité. L'homogénéisation réalisée par inversions manuelles pendant 2 min est suivie de 5 min d'incubation. Après un *spin* à 6 000 *g*, 800 µL de surnageant sont éliminés. Le restant est re-suspendu et transféré dans un SpinFilter. Après 1 min de centrifugation à 10 000 *g*, l'éluat est éliminé. Pour laver les impuretés, la Binding Matrix est re-suspendue deux fois dans 500 µL de SEWS-M (solution de sel et éthanol) et le SpinFilter est centrifugé. Une nouvelle centrifugation permet de sécher en

partie la Binding Matrix, et le SpinFilter est disposé dans un nouveau tube maintenu ouvert pour permettre l'évaporation de l'éthanol résiduel. Ensuite, la Binding Matrix est suspendue dans 200 µL de DES (solution d'éluion de l'ADN). Suite à 5 min d'incubation, l'extrait d'ADN purifié est récupéré par centrifugation de 3 min à 10 000 *g*.

Avant congélation et conservation de l'extrait à -20°C, sa concentration en ADN double brin ainsi que sa pureté sont analysées par spectrophotométrie à l'aide d'un appareil Nanoquant infinete 200 (Tecan). La mesure de l'absorbance à 260 nm permet d'estimer la concentration en ADN obtenue, et le ratio entre absorbances à 260 et 280 nm renseigne sur la présence de substances humiques dans l'extrait.

II.3.5.3 Amplification de l'ADNr 16S

La région V3 de l'ADNr 16s est amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction). 1 µL d'extrait sont introduits dans un volume réactionnel de 50 µL contenant les quatre nucléotides activés (dNTP) à 50 µM, les amorces universelles bactériennes w49 et w104 à 0,2 µM et l'enzyme Pfu Turbo à 0,05 U/µL, dans le tampon commercialisé avec l'enzyme.

Le programme de température appliqué est de 94°C durant 2 min (dénaturation initiale), 25 cycles de 30s à 94°C (dénaturation), 30s à 55°C (hybridation) et 30s à 72°C (élongation), suivis de 10 min d'élongation. La taille et la pureté du produit de PCR sont analysées par électrophorèse sur gel à 2% d'agarose et révélation au BET (Bromure d'éthydiuim).

II.3.5.4 Conception du système d'amorces pour la détection du gène *bssA*

Deux zones conservées dans le gène *bssA* ont été identifiées, vers lesquelles plusieurs travaux très récents ont convergé (Washer & Edwards, 2007; Winderl *et al.*, 2007; Duran, Communication personnelle). Ces deux zones se situent en positions 1 984 et 2 254 par rapport au fragment de gène *bssA* séquencé chez *Thauera aromatica* K172. En revanche, les amorces utilisées par les auteurs pour cibler ces zones sont dégénérées car les zones ne sont pas conservées à 100%. Or de telles dégénérescences, couplées à des hybridations en *mismatch* (appariement erroné sur une ou plusieurs bases) durant les cycles d'amplification du gène, peuvent engendrer plusieurs amplicons pour une unique séquence initiale. Supprimer les dégénérescences permettrait de s'affranchir de ces erreurs. Afin de vérifier si elles peuvent être supprimées, les séquences *bssA* connues ont été récupérées depuis la banque de données NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/), puis alignées à l'aide du logiciel Bioedit. Le résultat obtenu est présenté en Figure II-4.

Ainsi, les dégénérescences en position 1 992, 2 259 et 2 268 n'ont pas été considérées car elles ne concernent qu'une seule séquence sur les 7 considérées. Les dégénérescences aux positions 1 986 et 1 995 sont plus partagées et ne peuvent pas être négligées. Quant aux positions 2 256 et 2 265, leurs dégénérescences sont liées (A/A ou G/G) sauf dans un cas. Or un *mismatch* entre amorce et ADN est beaucoup plus probable entre G et T qu'entre A et C. Le couple d'amorces choisi est donc :

bssA-F (sens) : AAR TGG GGC AAY GAC GAC GA

bssA-R (anti-sens) : TTC TGG TTT TTC TGC ACT TT (inverse/complément de AAA GTG CAG AAG AAC CAG AA).

	1985	1995	2005	2015
Azoarcus sp. EbN1	CCGAAGTGGG	GCAACGACGA	CGACGCCGCG	GACACGCTTA
Geobacter metallireducens	CCCAAATGGG	GCAATGACGA	CGAATATGCC	GATACCATCA
Azoarcus sp. T AY032676	CCAAAGTGGG	GCAACGACGA	CGAATACGCC	GACAGCATCG
Thauera aromatica K172	CCGAAGTGGG	GCAATGACGA	CGACGACGCA	GACGTGCTGA
Geobacter sp. TMJ1	CCCAAATGGG	GCAATGACGA	CGACTATGCC	GATGGCATCA
Magnetospirillum sp. TS-6	CCCAAGTGGG	GTAACGACGA	CGCCTATTGC	GACGAGATCA
Desulfobacula toluolica	CCTAAGTGGG	GCAACGACAA	TGAATATGCC	GACGCAACAA
Consensus	CCVAARTGGG	GYAAYGACGA	CGMMKMYKSV	GAYRNSMTBR
	2245	2255	2265	2275
Azoarcus sp. EbN1	GCGCTCGGTG	TCGAAAGTGC	AGAAAAATCA	GAAGGCCAAT
Geobacter metallireducens	GAAGTCCGTT	TCCAAAGTGC	AGAAAAACCA	GAAAGCCAAT
Azoarcus sp. T AY032676	GCGCTCGGTG	TCCAAGGTGC	AGAAGAACCA	GAAGGCCAAT
Thauera aromatica K172	GCGCTCGGTG	TCCAAGGTGC	AGAAGAACCA	GAAGGCCAAT
Geobacter sp. TMJ1	AAAATCCGTT	TCCAAGGTGC	AGAAAAACCA	GAAA-----
Magnetospirillum sp. TS-6	GCGGTCCGTT	TCCAAGGTTT	AGAAGAACCA	GAAGGCCAAT
Consensus	RMRVTCSTGK	TCSAARGTKC	AGAARAAYCA	GAARGCCAAT

Figure II-4 : Zones consensus dans la séquence du gène *bssA*

R=A ou G ; **Y**=C ou T ; **K**=T ou G ; **M**=A ou C ; **S**=G ou C ; **V**=G ou A ou C ; **B**=G ou T ou C ; **N**=A ou T ou C ou G

II.3.5.5 Amplification du gène *bssA*

Pour amplifier les versions du gène *bssA* contenues dans les extraits d'ADN, les amorces spécifiques *bssA-F* et *bssA-R* remplacent les amorces universelles *w49* et *w104* dans le milieu réactionnel décrit au paragraphe II.3.5.3. La température optimale d'hybridation de ce jeu d'amorces est identifiée grâce à un extrait d'ADN témoin issu d'*Azoarcus sp. CIB* (Diaz, Communication personnelle). Le programme de température de PCR universelle est modifié pour inclure cette température optimale. Le produit de PCR est aussi analysé par électrophorèse sur gel d'agarose et révélation au BET.

II.4 Outils d'analyse des données

II.4.1 Calcul d'abattements en réacteurs

II.4.1.1 Méthode 1

La comparaison des paramètres d'entrée et de sortie des réacteurs permet de déterminer le taux d'abattement, que ce soit pour les paramètres macroscopiques des réacteurs (matières sèches, matières volatiles, DCO...) ou pour les CTOs.

Le taux d'abattement est calculé après avoir atteint l'état stationnaire, soit après 3 à 4 TSH, dans notre cas, entre 60 et 80 jours de digestion.

Le calcul des taux d'abattement sur les données macroscopiques est basé sur un calcul de taux d'abattement pour chacune des 5 dernières semaines de chaque phase d'étude, c'est-à-dire entre 40 et 60 jours après le démarrage des réacteurs.

$$\text{Abatement} = \frac{C_{\text{entrée}}^{\text{moyenne}} - C_{\text{sortie}}^{\text{moyenne}}}{C_{\text{entrée}}^{\text{moyenne}}} \times 100$$

Avec $C_{\text{entrée}}^{\text{moyenne}}$, la moyenne des concentrations en entrée sur les 5 dernières semaines et $C_{\text{sortie}}^{\text{moyenne}}$ la moyenne des concentrations en sortie sur les 5 dernières semaines.

Ainsi, le taux d'abattement moyen et l'écart-type correspondant sont obtenus.

II.4.1.2 Méthode 2

Lorsque les paramètres de l'alimentation varient, ou que l'état stationnaire n'est pas atteint, une 2^{ème} méthode de calcul est appliquée. La concentration de sortie théorique qui correspondrait à un réacteur infiniment mélangé parfaitement stérile est comparée aux concentrations mesurées. Cette concentration théorique est calculée en assimilant la concentration entrante à une succession de créniaux qui durent entre deux mesures (Figure II-5).

Un bilan matière est appliqué à chaque période :

$$\frac{d(V_{\text{réacteur}} \times C_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t))}{dt} = Q_{\text{entrée}} * C_{\text{entrée}}^{\text{mesuré}}(t_0) - Q_{\text{sortie}} * C_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t)$$

avec $V_{\text{réacteur}}$ le volume du réacteur qui est constant, $C_{\text{entrée}}^{\text{mesuré}}(t_0)$ la concentration entrante supposée constante sur la période étudiée et mesurée à t_0 , début de la période, $C_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t)$ la concentration en sortie au bout du temps $t-t_0$ de cette période, et les débits entrant et sortant $Q_{\text{entrée}} = Q_{\text{sortie}} = \frac{V_{\text{réacteur}}}{\tau}$ où le temps de séjour τ vaut 20 jours.

Ainsi on obtient :

$$\frac{dC_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t)}{dt} = \frac{C_{\text{entrée}}^{\text{mesuré}}(t_0) - C_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t)}{\tau}$$

$$\frac{dC_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t)}{C_{\text{entrée}}^{\text{mesuré}}(t_0) - C_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t)} = \frac{dt}{\tau}$$

Par intégration entre le début t_0 et la fin t_f de la période, on peut estimer la concentration théorique à la fin de cette période :

$$\ln\left(\frac{C_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t_f) - C_{\text{entrée}}^{\text{mesuré}}(t_0)}{C_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t_0) - C_{\text{entrée}}^{\text{mesuré}}(t_0)}\right) = -\frac{t_f - t_0}{\tau}$$

On obtient : $C_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t_f) = C_{\text{entrée}}^{\text{mesuré}}(t_0) + (C_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t_0) - C_{\text{entrée}}^{\text{mesuré}}(t_0)) * e^{-\frac{t_f - t_0}{\tau}}$

L'abattement sur la période considérée vaut :

$$\text{Abatement} = \frac{C_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t_f) - C_{\text{sortie}}^{\text{mesuré}}(t_f)}{C_{\text{sortie}}^{\text{théorique}}(t_f)} * 100$$

Pour obtenir un abattement moyen, les abattements calculés pour les périodes se succédant sont moyennés.

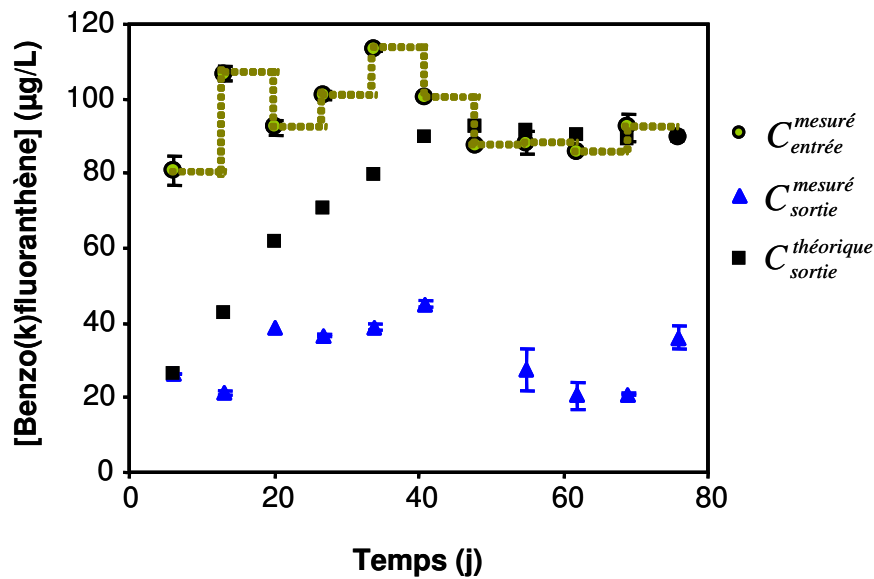


Figure II-5 : Illustration de la méthode de calcul des abattements du B(k)F au cours du démarrage d'un réacteur.

II.4.2 ANOVA

Une analyse de variance (**AN**alysis **Of** **VA**riance, ANOVA) à un facteur est pratiquée pour déterminer s'il existe une différence statistique entre deux ou plusieurs échantillons de données. Les échantillons de données dont nous disposons sont de petite taille (souvent trois individus). Nous ne pouvons donc pas vérifier qu'ils suivent une **loi normale** ni qu'ils présentent une **variance identique**. Ces deux hypothèses sont donc posées.

Les ANOVA sont mises en œuvre grâce à l'utilitaire d'analyses du logiciel Excel (Microsoft). L'hypothèse à vérifier (H_0) est que tous les échantillons ont la même moyenne. L'hypothèse alternative est qu'au moins un échantillon possède une moyenne différente des autres. Le principe du test est de décomposer la variance intra-classe et inter-classe puis de calculer un coefficient F de Fisher. Si $F_{\text{observé}}$ est supérieur au F_{critique} , alors l'hypothèse H_0 est rejetée.

Une deuxième information est fournie par le logiciel : la *p-value* ou probabilité critique. Si la *p-value* est inférieure à 0,05, alors H_0 est rejetée avec 5% de risque. Si elle est supérieure à 0,05, le risque est trop grand pour rejeter H_0 , l'hypothèse nulle est donc validée.

II.4.3 Régression linéaire multivariée par PLS

La régression linéaire des moindres carrés partiels (Partial Least Squares, PLS) est appliquée lorsque une variable (bloc de Y) est à expliquer/prédire en fonction de plusieurs variables explicatives/prédictives (bloc des X). L'hypothèse de l'existence d'une relation linéaire entre Y et chaque prédicteur est posée.

Cette technique de régression est basée sur la construction de facteurs (également nommés composantes principales) en minimisant la covariance entre le bloc de Y et le bloc des X. Le premier facteur contient le pourcentage le plus élevé de variance, et les facteurs suivants des pourcentages décroissants. Le nombre de facteurs à inclure (dimension) est déterminé en minimisant la moyenne des carrés des erreurs de prédiction (PRESS) par une procédure

de validation croisée. Une régression multivariée du bloc de Y en fonction des facteurs (et donc du bloc des X) est ensuite réalisée. Cette technique présente l'avantage de pouvoir considérer des variables explicatives liées.

Les régressions PLS sont mises en œuvre grâce à la version 1.2.2 du logiciel libre R, et en employant des fonctions préalablement développées (Durand).

Le modèle obtenu peut être utilisé en tant que prédiction. Pour réaliser des prédictions de Y à partir d'un bloc de X contenant des variables explicatives indéterminées, une version de démonstration du logiciel The Unscrambler 9.6 est utilisée. Grâce à ce logiciel, les variables manquantes sont estimées à partir de leurs coordonnées, déterminées lors de la construction des facteurs. Le bloc de X ainsi « complété » permet d'appliquer le modèle pour prédire les Y correspondant.

II.4.4 Régression non linéaire

Pour réaliser la régression d'une variable Y en fonction d'une variable X, alors que la fonction f reliant Y et X ($Y=f(X)$) n'est pas linéaire, un algorithme de type Levenberg-Marquardt (Marquardt, 1963) est utilisé à l'aide du logiciel Matlab 6.5. Grâce aux itérations codées par l'algorithme, la somme des erreurs au carré entre les points expérimentaux et leur estimation par la fonction f est minimisée. Les paramètres optimaux de la fonction f sont ainsi déterminés. Leurs valeurs initiales peuvent être estimées grâce aux données de la littérature.

III MODELE de SORPTION des HAPs/NP/PCBs dans les BOUES

Les résultats obtenus tout au long des travaux de recherche réalisés seront divisés en deux grandes sections. Ce premier volet de résultats sera focalisé sur les phénomènes de sorption des HAPs/NP/PCBs dans les boues. Il comprendra une étude sur la cinétique de ces phénomènes et sur leur caractère réversible. Ensuite, une méthodologie sera développée afin d'étudier l'état d'équilibre, en considérant la boue comme un système à trois compartiments. Cette méthodologie étant validée pour les HAPs et dans une boue, elle sera par la suite appliquée aux 21 molécules de HAPs/NP/PCBs et dans 5 échantillons de boue. A l'issue de ce travail, deux modèles prédictifs seront élaborés.

III.1 Identification des paramètres de sorption à intégrer au modèle

III.1.1 Avant-propos

Pour tendre vers la modélisation des phénomènes de sorption des CTOs au sein des systèmes de digestion anaérobie, il convient en premier lieu d'identifier les paramètres nécessaires et suffisants à inclure dans le futur modèle. D'après la revue bibliographique, les phénomènes de sorption se hiérarchisent en trois niveaux, correspondant à des échelles de temps croissantes :

- cinétique de sorption/désorption,
- équilibre de sorption/désorption,
- modification de l'équilibre de sorption/désorption par le vieillissement de la matrice en contact avec les CTOs.

A chacun de ces mécanismes sont associés un ou plusieurs formalismes et leurs paramètres : cinétique d'ordre 1 (constante de temps) et loi de Fick (coefficient de diffusion) pour la cinétique, isothermes (constante de Freundlich) pour l'équilibre, et formalismes de Doring, Gao ou Benoit pour l'hystérésis associée au vieillissement (Voir paragraphe I.4.1.2). La prise en compte des trois mécanismes entraîne donc une description très complexe du système. Faisant appel à des échelles de temps très différentes, certains de ces paramètres sont très probablement facultatifs dans la fenêtre de temps considérée dans ce projet de thèse : celle des systèmes de traitement, et plus particulièrement de la digestion anaérobie.

L'objectif de ce premier paragraphe est tout d'abord de vérifier que les constantes de temps des cinétiques de sorption et de désorption des CTOs sont très faibles devant les constantes de temps de leur biodégradation répertoriées dans la littérature. Dans les boues, les cinétiques de sorption de certains CTOs de petite taille tels que nonylphenol, naphthalène, phénanthrène et pyrène ont été auparavant démontrées comme étant très rapides, sans phase de diffusion lente (Kordel *et al.*, 1997; Dionisi *et al.*, 2006) contrairement aux systèmes sols et sédiments (Ten Hulscher & Cornelissen, 1996; Doring *et al.*, 2002). Or, les molécules de plus haut poids moléculaire et d'encombrement stérique accru sont plus susceptibles de subir des phénomènes de limitation diffusionnelle. Il nous est donc apparu nécessaire de vérifier si les cinétiques de sorption de CTOs de plus haut poids moléculaires (« gros » HAPs) sont aussi très rapides. Puis, dans la mesure où sorption et désorption s'opèrent alternativement dans les systèmes d'épuration, au fil de la transformation du sorbant que constitue la boue, le caractère rapide de leur désorption a par la suite été vérifié.

Ensuite, le caractère réversible des transferts entre compartiment de CTOs sorbés aux particules et compartiment libre se devait d'être étudié, pour la raison évoquée précédemment d'alternance des deux sens de transfert dans les systèmes de dépollution. En effet, même si le transfert de désorption s'avérait aussi rapide que le transfert de sorption, la

littérature décrivant un phénomène marqué d'hystérésis laisse supposer que les équilibres atteints à l'issue de l'un ou de l'autre peuvent être différents.

La description bi-compartimentée du système boue pouvant entraîner l'observation d'un faux phénomène d'hystérésis (Schrap & Opperhuizen, 1992; Sander & Pignatello, 2007), nous nous sommes affranchis de ce biais en comparant les équilibres de sorption et de désorption dans une boue à même concentration en matière dissoute et colloïdale DCM. Ils ont de plus été comparés dans la même boue, puisque sa composition est susceptible de modifier les équilibres (paragraphe I.4.1.5.1).

Un quatrième compartiment a été intégré au système boue précédemment décrit (paragraphe I.5) : le compartiment de CTOs séquestrés (non extractibles). Les CTOs séquestrés se différencient nettement des CTOs « juste » sorbés : ils ne sont plus concernés par l'équilibre de sorption. Ce compartiment séquestré n'est pas quantifiable, il a donc été intégré dans le sens où il a été pris en compte dans le calcul du coefficient de partage. Ce dernier a été identifié comme le ratio entre concentration en CTOs sorbés aux particules, mesurée par extraction, et concentration en CTOs en phase aqueuse. Cette méthode d'estimation du coefficient de partage est différente de la méthode appliquée dans les études relatant un phénomène d'hystérésis. Dans la plupart de ces études, le coefficient de partage est obtenu par le ratio entre concentration en CTOs dans les particules - *calculée par différence entre CTOs initialement introduits et CTOs quantifiés dans la phase aqueuse, englobant donc les CTOs sorbés et séquestrés* - et concentration en CTOs dans la phase aqueuse (Gao *et al.*, 1998a; During *et al.*, 2002; Conrad *et al.*, 2006; Yi & Harper, 2007b; Benoit *et al.*, 2008). Ainsi, nous souhaitons déterminer si l'irréversibilité mentionnée par ces auteurs était seulement due à la séquestration des CTOs au cours du vieillissement des matrices contaminées, ou si, indépendamment de cette séquestration, l'affinité des CTOs pour la boue évoluait avec le temps de contact.

Des expériences ont été conçues de façon à étudier ces deux aspects : cinétiques et réversibilité des phénomènes de sorption. Elles font l'objet de l'article suivant.

KINETICS AND REVERSIBILITY OF MICROPOLLUTANTS SORPTION IN SLUDGE

Maialen Barret, Hélène Carrère, Matthieu Patau and Dominique Patureau
D'après l'article soumis au journal Process Biochemistry

Abstract: The fate of micropollutants throughout wastewater treatment systems strongly depends on their sorption interaction with sludge matter. In this study, both sorption and desorption kinetics of PAHs in activated sludge were shown to be very fast in comparison to biodegradation kinetics. It was concluded that PAHs transfer does not limit their biodegradation, and that their fate is governed by sorption/desorption equilibrium state. The effect of contact time between sludge and PAHs was also investigated. It was shown that aging did not influence the sorption/desorption equilibrium although PAHs losses during aging suggested that sequestration phenomena had occurred. This implies that there is no need to include a contact time dimension for the PAHs sorption assessment within treatment processes. As a consequence, this work demonstrated that the literature studies which mostly deal with micropollutants sorption in sewage sludge with short contact time can be extrapolated to real systems in which sorption, desorption and aging occur.

III.1.1.1 Introduction

Sorption phenomena play an important role in organic micropollutants fate not only in the environment but also in wastewater treatment systems, especially for hydrophobic micropollutants. Indeed, their sorption interactions with sludge matter influence (i) the distribution of micropollutants fluxes between water and sludge throughout physical separation steps, and (ii) their bioavailability and biodegradation within biological treatment units. As a consequence, qualifying these interactions is crucial to accurately assess micropollutants fate in wastewater treatment plants.

Only few studies about the kinetics of hydrophobic micropollutants sorption in sludge have been published. Nonetheless, the sorption equilibrium for nonylphenol, naphthalene, phenanthrene and pyrene was demonstrated to be achieved within one or two hours (Kordel *et al.*, 1997; Dionisi *et al.*, 2006). These kinetics completely differ from other environmental systems such as soils and sediments, where diffusion limits micropollutants transfer to interaction sites, resulting in equilibrium time of about 24h (Ten Hulscher & Cornelissen, 1996; During *et al.*, 2002). In addition, the first order time constant for phenanthrene biodegradation ranges from 10^{-4} to 10^{-1} h⁻¹ (Thiele-Bruhn & Brummer, 2004; Xu *et al.*, 2004; Kim & Weber, 2005; Chen *et al.*, 2008) and for pyrene, around 10^{-4} h⁻¹ (Cottin & Merlin, 2007), which is much lower than time constants for their sorption, equal or superior to 1 h⁻¹ (Kordel *et al.*, 1997; Dionisi *et al.*, 2006). Therefore, for low

molecular weight PAHs, sorption in sludge can be considered as instantaneous, in comparison to degradation kinetics.

In sludge treatment systems, both sorption and desorption are likely to occur, since the sludge matrix evolves in term of quality and quantity: a part of sludge matter is consumed by microorganisms for growth support and a fraction of this consumption is excreted as exopolymeric substances. The desorption kinetics are a key parameter to be measured in order to conclude that biodegradation is not limited by sorption/desorption transfers, which would corroborate the results obtained by the modelling approach developed by Artola-Garicano *et al.* (2003).

Otherwise, if sorption/desorption kinetics do not limit biodegradation, the sorption/desorption equilibrium can be limitant. Indeed, the common hypothesis in sludge processes is that only the aqueous fraction of micropollutants can be metabolized by microorganisms (Artola-Garicano *et al.*, 2003; Langford *et al.*, 2005a; Urase & Kikuta, 2005; Dionisi *et al.*, 2006).

Two sorption/desorption equilibria are concomitantly established in sludge: sorption to particles and sorption to dissolved/colloidal matter (DCM) (Barret *et al.*). Both are assumed to fit linear isotherms at low micropollutants concentrations (Holbrook *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2004; Ivashechkin *et al.*, 2004; Arias-Estevéz *et al.*, 2007). So far, these two equilibria of sorption have not been considered in sludge studies. Only the sorbed-to-particles and aqueous phase (sum of free and sorbed-to-DCM fractions) have been distinguished and a partition coefficient between these two phases was measured using the initial total concentration and the aqueous one determined when equilibrium state was achieved. This inaccurate description of the sludge system can lead to important mistakes, among which the observation of a false hysteresis effect on sorption/desorption equilibria, called the "third phase effect" (Schrap & Opperhuizen, 1992). An other type of hysteresis effect is also stated when a fraction of micropollutants is found to be irreversibly sorbed (Benoit *et al.*, 2008). However, this type of irreversibility refers to another mechanism different from sorption/desorption : the sequestration. During the aging of contaminated matrices, a fraction of sorbed micropollutants slowly becomes sequestered (Semple *et al.*, 2003), due to physical and/or chemical phenomena (Northcott & Jones, 2001). The sequestered micropollutants might be mobilised back after a long time, but in the time scale of sorption experiments, they can be assumed to be irreversibly sequestered. These residues, also called non-extractable residues or bound residues, are not concerned anymore by the equilibrium between sorbed-to-particles and free micropollutants. Excluding the sequestered fraction from the calculation of equilibrium constants might allow to determine whether the strict sorption/desorption reaction is reversible or if it is influenced by micropollutants/sludge contact time.

The objectives of this study were (i) to experimentally verify that the sorption and desorption kinetics of hydrophobic micropollutants are so fast in sludge that they can be assumed to be instantaneous in comparison to biodegradation kinetics and (ii) to demonstrate that sorption is reversible if the third phase effect and the non-extractable residues formation are considered. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) were chosen as model compounds for these experiments, including high molecular weight compounds.

III.1.1.2 Material and Method

Sludge source. All experiments were performed using activated sludge from an urban wastewater treatment plant. The influent was entirely domestic. The plant consisted in preliminary treatments, primary settling, aerated tank, secondary settling and thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge. Retention time in the aerated tank was 0.36 day. Sludge was frozen at -20°C for storage. After defrosting, the activated sludge contained 37.2 ± 1.5 g/L of dry matter, constituted of 20 ± 1 % of DCM and 80 ± 2 % of particles.

Chemicals. All solvents were purchased from J.T.Baker. Phenanthrene (Phe), anthracene (Ant), fluoranthene (Fluor), benzo(a)anthracene (B(a)A), benzo(b)fluoranthene (B(b)F), benzo(k)fluoranthene (B(k)F), benzo(a)pyrene (B(a)P), dibenzo(a,h)anthracene (DBA), benzo(g,h,i)perylene (B(ghi)P) and indeno(1,2,3,c,d)pyrene (Ind) were obtained from Dr Ehrenstorfer GmbH. The spiking mix at 100 mg/L for each PAH was prepared in acetonitrile. The 10 mg/L HPLC standard solution of PAHs in acetonitrile was provided by Dr Ehrenstorfer GmbH and dilutions (from 10 to 1 000 fold factor) were stored at - 20 °C.

PAHs quantification in sludge compartments. Extraction from aqueous phase was performed in duplicates using SPE cartridges with 1 g C18 sorbent from Macherey-Nagel. Cartridges were conditioned with 2x5mL of methanol:toluene:acetonitrile (33:33:33 v:v:v), 2x5 mL of methanol and 2x5 mL of ultra pure water. 100 mL of sample were percolated through the extraction columns at a flow rate of 2 mL/min. The sorbent was then dried in a stream of atmospheric air during 30 min. Adsorbates were eluted with 2x5 mL of methanol:toluene (50:50 v:v). Extracts were dried under nitrogen flow and dissolved in 1 mL of acetonitrile.

Extraction of sorbed-to-particles PAHs as well as PAHs quantification in extracts from both aqueous and solid phases were carried out according to Trably *et al.* (2004).

Sorption kinetics experiments. Eight sludge samples of 350 mL diluted at 3.9 g of dry matter per liter ($0.6 \text{ g}_{\text{DCM}}/\text{L}$ and $3.3 \text{ g}_{\text{part}}/\text{L}$) were agitated at 100 rpm during 20 min at 35°C in centrifugation flasks in order to stabilize the matrix. Then, each sample was spiked at $5 \mu\text{g}_{\text{PAH}}$ per gram of dry matter to start with the sorption kinetics. After 1, 3, 4, 6, 8, 10, 14 and 24h of incubation (100 rpm, 35°C), the flasks were centrifuged during 20 min at 12 000 g, 35 °C. The supernatant was filtered at 1.2 μm with glass microfiber filters (GF/C Whatman) to obtain the aqueous phase, to which 0.4 % of formaldehyde was added for storage prior to PAHs quantification.

Sorption/desorption equilibrium. A methodology was designed to investigate the sorption/desorption of fresh/aged PAHs in exactly the same matrix. Indeed, the partitioning was demonstrated to depend on matter qualitative characteristics (Raber & Kogel-Knabner, 1997; Holbrook *et al.*, 2004) and on its concentration (Barret *et al.*). For this, a sludge sample was defrosted, diluted at approximately 12.2 g of dry matter per liter ($2.4 \text{ g}_{\text{DCM}}/\text{L}$ and $9.8 \text{ g}_{\text{part}}/\text{L}$) and spiked at $5 \mu\text{g}_{\text{PAH}}/\text{g}$ of dry matter. Every four days and during two months,

this sample was mixed 1h at room temperature in an open flask. Between these mixing stages and during 15 additional months, it was stored at 4°C in a closed container. For sorption/desorption experiment, this aged sample was diluted of a three fold factor with distilled water in order to start with desorption, and 350 mL were transferred into six centrifugation flasks (A1, A2, A3, F1, F2, F3). In flasks F1, F2 and F3, fresh micropollutants were additionally introduced at 5 µg_{PAH}/g of dry matter. The volume of acetonitrile used for fresh spiking (450 µL) was also added in control flasks A1, A2 and A3, to consider the impact of the solvent on sorption/desorption equilibrium. After 4h of mixing (100 rpm) at 35°C, the flasks were centrifuged during 20 min at 12 000 g and at 35 °C. The supernatant was filtered at 1.2 µm with glass microfiber filters (GF/C Whatman) to obtain the aqueous phase, to which 0.4 % of formaldehyde were added. The particulate phase (pellet) was frozen at -20 °C and freeze-dried. PAHs were extracted from both fractions, in order to assess the partition coefficient $K_{\text{partition}}$ (mL/g_{part}), defined as:

$$K_{\text{partition}} = \frac{C_{\text{part}}}{C_{\text{aqu}}},$$

where C_{part} (µg_{PAH}/g_{part}) represents the sorbed/extractable PAH concentration in sludge particles and C_{aqu} (µg_{PAH}/mL) the aqueous PAH concentration.

III.1.1.3 Results and discussion

Sorption kinetics. The partitioning kinetics of PAHs between aqueous and sorbed-to-particles phases is shown in Figure III-1 for phenanthrene (the lowest molecular weight PAH), benzo(a)anthracene (intermediary) and indeno(1,2,3,c,d)pyrene (the highest). The partition equilibrium was achieved before 1h. This observation was consistent for all PAHs (data not shown). The PAHs partitioning results from two equilibria: sorption to particles and sorption to DCM (Figure III-1).

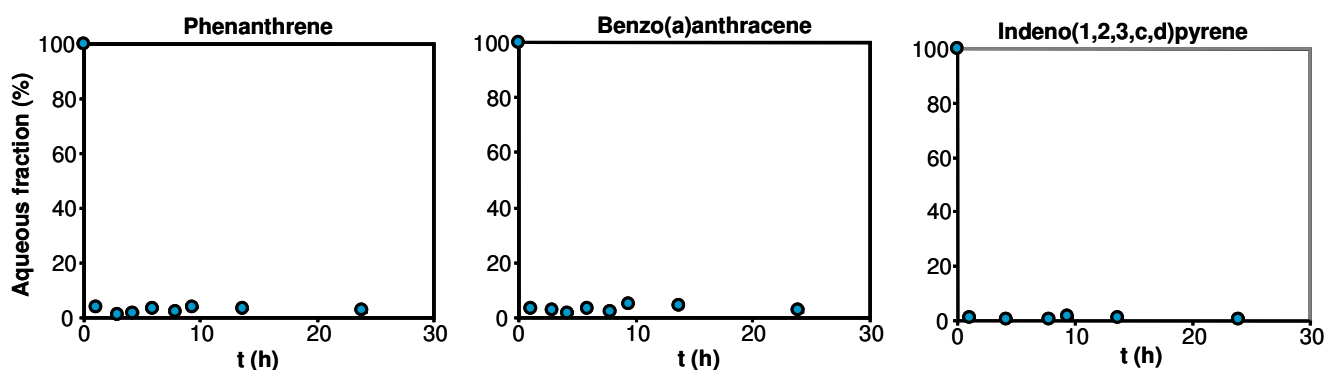


Figure III-1: PAHs remaining in aqueous phase (percentage of initial concentration) during the sorption kinetics experiment.

As the equilibrium of sorption to DCM is instantaneous (Vinken *et al.*, 2004), the results showed that the equilibrium of sorption to particles was achieved within one hour. Such

rapid kinetics were previously reported (Kordel *et al.*, 1997; Dionisi *et al.*, 2006), but only for naphthalene, phenanthrene, pyrene and nonylphenol, which are smaller and less hydrophobic compounds. The constants of sorption kinetics for these micropollutants ranged from 3 to 20 h⁻¹ (Kordel *et al.*, 1997; Dionisi *et al.*, 2006). This is much higher than the time constants of biodegradation kinetics for these compounds, inferior to 10⁻¹ h⁻¹ under aerobic condition (Cottin & Merlin, 2007; Chen *et al.*, 2008) as well as under anaerobic conditions (Chang *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005a). As a result, sorption can be considered as instantaneous for those compounds. The results obtained here demonstrate that even for hexacyclic PAHs which are likely to undergo slower diffusion through the particles, sorption in sludge occurs very quickly, and can be assumed to be instantaneous.

Sorption reversibility. The $K_{\text{partition}}$ coefficient determined in flasks A represents the desorption equilibrium of aged PAHs, whereas $K_{\text{partition}}$ measured in freshly spiked flasks F represents the combination of aged PAHs desorption and fresh PAHs sorption equilibria. Here, the so-called "third phase effect" did not occur: sorption and desorption were studied at the same DCM concentration. Moreover, only the sorbed/unsequestered fraction was concerned by the extraction method. Therefore, the sequestered fraction of PAHs was not considered. In conclusion, the methodology employed here aims at assessing the effect of the two following parameters on the specific equilibrium between sorbed-to-particles and free micropollutants (Figure III-2) : (i) a long contact time between sludge and micropollutants, and (ii) micropollutants mass transfer either towards sorbed-to-particles fraction or towards aqueous fraction to achieve the equilibrium. According to the hysteresis effect described in literature (Northcott & Jones, 2001; Yi & Harper, 2007a), both parameters are expected to displace the equilibrium towards the sorbed fraction, resulting in an increased $K_{\text{partition}}$.

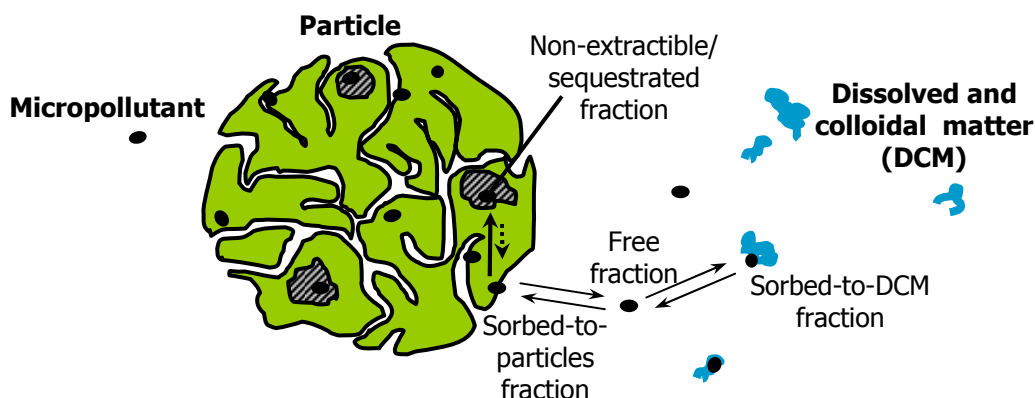


Figure III-2 : Representation of the free, sorbed-to-DCM, sorbed-to-particles and sequestered fractions of a micropollutant in sludge.

The results presented in Figure III-3 show that the equilibrium achieved in flasks A did not statistically differ from flasks F. The sorption equilibrium was previously shown to be achieved before 4 hours. A significant difference would have been observed between the sorption and desorption equilibria if desorption equilibrium had not been achieved within 4 hours. Therefore, it was established that desorption was a rapid phenomenon, even after a

long period of contact time between micropollutants and sludge. As a result, the PAHs desorption was shown to be almost instantaneous regarding the biodegradation kinetics.

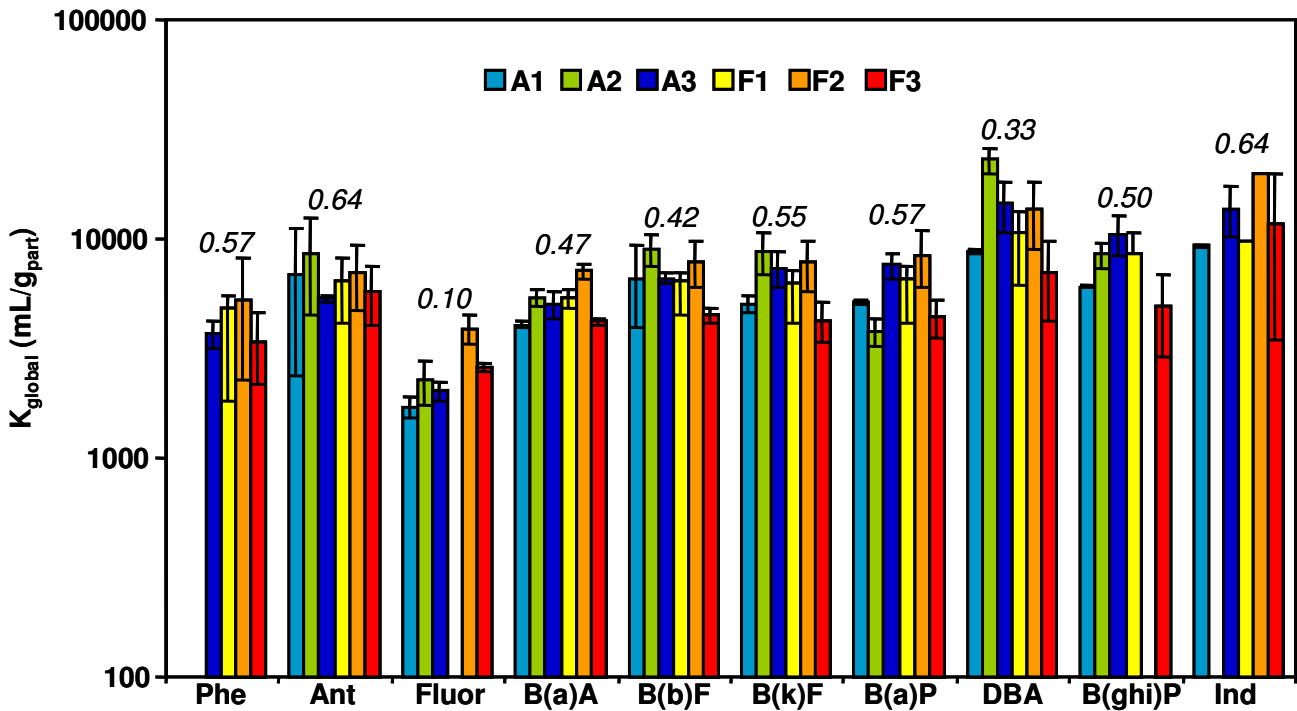


Figure III-3 : $K_{partition}$ values (mL/g_{part}) obtained in flasks A1, A2, A3, F1, F2, F3 for PAHs. The standard deviation corresponds to duplicate analyses of aqueous phase. The p-values obtained from the analysis of variance (ANOVA) between the A group and the F group of $K_{partition}$ are indicated in italic for each PAH. (p-value above 0.05 indicates that the two groups are not statistically different).

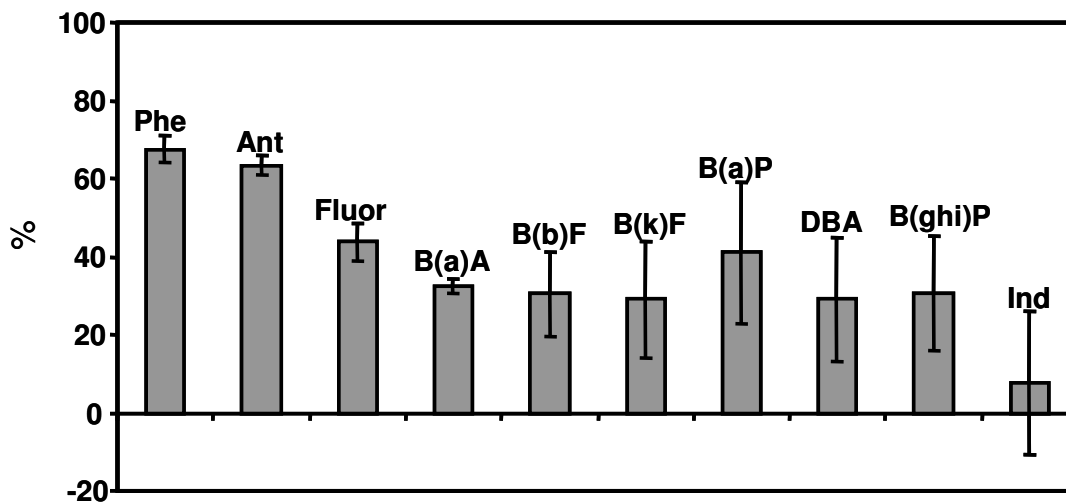


Figure III-4 : PAH losses during sludge aging as a percentage of initial concentration (60 µg/L).

In addition, the absence of significant difference between flasks A and F suggested that aging did not affect the sorption/desorption equilibrium. As sequestered PAHs are not measurable unless using labelled molecules, the sequestration yield could not be quantified in this experiment. Nevertheless, the comparison between initial PAHs concentration and PAHs concentration after aging exhibited up to 60% losses of low molecular weight PAHs, and lower losses for high molecular weight ones (Figure III-4). A strong relationship between PAHs properties and their fate during the aging period was thus observed. Although this apparent removal may also include biodegradation (22% of dry matter losses demonstrated a significant biological activity) and volatilisation (for low molecular weight PAHs only), sequestration is likely to account for a fraction of PAHs losses.

III.1.1.4 Conclusion

The results presented in this paper demonstrated that sorption and desorption kinetics of PAHs are very quick, even for high molecular weight congeners. This indicates that desorption kinetics can not limit PAHs biodegradation in biological treatment systems: describing equilibrium state is sufficient to represent sorption phenomena.

In addition, it was shown that aging did not affect the equilibrium between free and sorbed-to-particles (extractable) micropollutants. In that sense, sorption to particles is strictly reversible. This suggests that the well-known hysteresis phenomena described in literature could be only due to the transfer of micropollutants from sorbed fraction to sequestered fraction, and not to a time-dependant increasing sorption affinity of micropollutants for the matrix. This means that no micropollutant/sludge contact time dimension has to be included in sorption/desorption assessment. Most published studies about micropollutants and sludge interactions are focused on sorption. Our results show that these available data can be transposed to real systems, in which not only sorption but also desorption and aging occur.

III.1.2 Discussion

L'article présenté ci-dessus démontre que les cinétiques de sorption et de désorption sont beaucoup plus rapides que les cinétiques de biodégradation. **La modélisation des cinétiques de sorption/désorption ne sera donc pas nécessaire** dans le contexte de digestion anaérobie.

Par ailleurs, les résultats obtenus ont prouvé que même après une longue période de vieillissement commun, l'équilibre de désorption était identique à l'équilibre de sorption. Même s'il y paraît, ceci ne remet aucunement en cause le phénomène d'hystérésis largement décrit dans la littérature (pourvu que le « third phase effect » soit pris en compte) : les observations font appel à des définitions et objectifs différents. Prenons l'exemple des travaux menés par Benoit *et al.* (2008) et Gao *et al.* (1998a). Même si les données concernant la concentration en DCM dans les phases aqueuses en équilibre avec les particules au fil des dilutions effectuées manquent, nous posons comme hypothèse que le

« third phase effect » n'explique pas la totalité des différences observées par les auteurs entre sorption et désorption. Dans ces deux études, les ratios entre concentration en CTOs dans la phase particulaire (calculée par différence entre concentration initiale et concentration mesurée en phase aqueuse) et concentration en phase aqueuse sont calculés. Ces ratios sont dénommés de façon imprécise « constante de Freundlich » (Gao *et al.*, 1998a) ou plus prudemment « paramètre lié à la capacité de désorption » (Benoit *et al.*, 2008). Quoiqu'il en soit, ce ratio est supérieur après désorption, d'où l'effet d'hystérésis invoqué. De telles approches permettent de quantifier la part des CTOs apportés dans un sol ou des sédiments (respectivement par pratique agricole ou par pollution d'une rivière) qui peuvent être disséminés, c'est-à-dire mobilisés et transférés par l'écoulement d'une phase aqueuse vers d'autres systèmes. Ainsi, la phase aqueuse est en quelque sorte mise au centre de ces études, alors que la phase particulaire, qu'il s'agisse de CTOs sorbés ou séquestrés, peut agir comme « piège » à CTOs. En revanche, de telles approches ne permettent pas d'estimer la répartition des CTOs non séquestrés entre les compartiments libre, sorbé aux particules, et sorbés à la DCM. Or, notre objectif est exactement celui-là : étudier la distribution des CTOs non séquestrés (potentiellement biodisponible ou bioaccessibles) entre les 3 compartiments. Les questions de recherche et par conséquent les phénomènes à quantifier se différencient donc radicalement entre notre étude et les travaux précités.

La portée des résultats obtenus aurait été grandie par la comparaison entre sorption de CTOs frais et désorption de CTOs vieillis dans des conditions de vieillissement plus poussé. Ici, le temps de vieillissement a été de 17 mois, mais ce vieillissement s'est majoritairement opéré à 4°C. L'activité doit être considérée plus que le temps. Cette activité chimique et/ou biologique est bien sûr supérieure à plus haute température. On peut supposer que l'activité de séquestration subie au cours de 20 jours de digestion anaérobie soit supérieure à l'activité relevée durant notre stratégie de vieillissement. En effet, une plus forte activité de minéralisation de la matière est observée (environ 50% en digestion anaérobie contre 22% lors de notre vieillissement), qui laisse présager des mécanismes de modification de la matrice, et notamment de réorganisation de floccs et de séquestration, de plus grande ampleur. Cependant, les contraintes de charge des digesteurs opérés au laboratoire et les abattements obtenus génèrent des effluents très dilués (de l'ordre de 7 g_{MS}/L). L'étude de désorption sur ces effluents fortement vieillis nécessitant une étape de dilution, la mesure des CTOs sorbés aux particules est rendue très difficile par la faible quantité de matière disponible dans le volume de travail. C'est pourquoi l'expérience n'a pu être menée sur les effluents de réacteurs anaérobie suivis au laboratoire, bien qu'ils soient de très bons candidats vieillis. Toutefois, l'activité de minéralisation observée au cours de notre stratégie de vieillissement reste significative, proche de la moitié de celle observée en réacteur. Si aucune différence n'est observée entre désorption des CTOs vieillis dans ces conditions et CTOs fraîchement ajoutés, nous supposons que si une différence apparaît après vieillissement par digestion anaérobie, elle restera négligeable. **En conclusion, il ne sera pas nécessaire d'intégrer la dimension temps de contact CTO-matrice dans notre modèle de sorption.**

Enfin, après avoir démontré qu'il n'était pas pertinent dans notre contexte d'inclure des paramètres cinétiques ni des paramètres liés au vieillissement, nous nous sommes intéressés aux phénomènes de compétition pouvant s'opérer dans les systèmes pluri-contaminés (13 HAPs + NP + 7 PCBs) que nous étudions. Cette étude a été motivée par l'observation de phénomènes de compétition entre composés œstrogéniques (Lai *et al.*, 2000). Le fluoranthène a ici été choisi car c'est un composé faiblement hydrophobe, il est donc un compétiteur faible, susceptible de subir un fort effet de compétition. Le fluorène, le phénanthrène et l'antracène sont d'encore plus faibles compétiteurs, mais ils sont aussi plus volatils. Les analyses sont légèrement moins précises pour ces composés car les étapes d'évaporation à sec des extraits peuvent entraîner des pertes par volatilisation. Le fluoranthène représente donc un compromis satisfaisant. Les résultats obtenus sont présentés en Figure III-5.

L'analyse de variance (ANOVA) pratiquée entre les trois valeurs de $K_{\text{partition}}$ en absence de compétiteurs et les trois valeurs de $K_{\text{partition}}$ en présence de compétiteurs a démontré que la faible différence observée n'était pas significative (p-value : 0,134). Ceci suggère qu'il ne s'opère pas de compétition entre les CTOs pour les sites de sorption. Ceci est très probablement lié aux faibles concentrations en CTOs employées. Le futur modèle de sorption ne comprendra donc pas de terme de compétition.

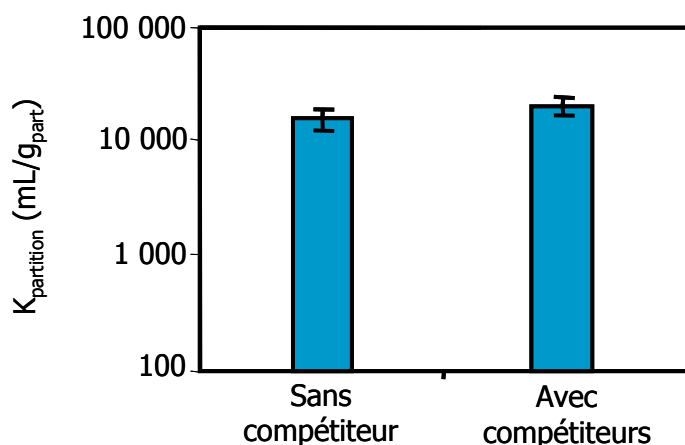


Figure III-5 : Coefficients de partage du fluoranthène en absence et en présence de compétiteurs (12 HAPs, NP, 7 PCBs).

Finalement, les seuls paramètres nécessaires à la description du comportement de sorption/désorption des CTOs au cours de la digestion anaérobie sont les constantes d'équilibre, qui peuvent être mesurées indifféremment par sorption ou désorption et avec ou sans vieillissement. Pour des raisons pratiques évidentes, elles seront déterminées par sorption de CTOs fraîchement introduits. Le paragraphe à venir expose la méthodologie mise au point dans ce but.

III.2 Mise au point et validation d'un protocole de détermination des constantes d'équilibre K_{part} et K_{DCM}

III.2.1 Avant-propos

Ayant démontré dans le paragraphe précédent que la description des équilibres suffisait à prendre en compte les phénomènes de sorption dans les procédés de traitement, le travail suivant a consisté en la mise au point d'un protocole d'obtention des constantes d'équilibre K_{part} (sorption aux particules) et K_{DCM} (sorption à la matière dissoute et colloïdale). Le « third phase effect » décrit dans la littérature (Schrap & Opperhuizen, 1992; Lee & Kuo, 1999), témoigne de l'importance de décrire les systèmes environnementaux selon une approche tri-compartiments. En revanche, les auteurs l'ayant décrit ont exploité des constantes d'équilibre préalablement déterminées, dans des études différentes, afin de démontrer que le compartiment de DCM devait être pris en compte. Malgré cette mise en garde, les systèmes environnementaux ont continué à être abordés selon une approche biphasique, et lorsque ce travail a débuté, aucune méthodologie n'était disponible dans la littérature pour la détermination de K_{part} et K_{DCM} de façon fiable dans les boues.

Les équations d'équilibre relatives au système tri-compartiments, détaillées dans l'article suivant, ont dans un premier temps été posées. Afin d'établir le lien entre approches bi- et tri-compartiments, les constantes d'équilibre K_{part} et K_{DCM} ont été introduites dans l'expression du **coefficient de partage nommé $K_{partition}$ dans le paragraphe précédent, et désormais rebaptisé K_{global} afin d'exclure toute confusion avec K_{part} .** Cette manipulation a conduit à une expression mathématique reliant K_{global} et le couple (K_{part} ; K_{DCM}) :

$$K_{global} = \frac{K_{part}}{K_{DCM}[DCM] + 1}$$

Cette relation illustre le caractère système-dépendant du coefficient de partage K_{global} , et quantifie l'influence de la concentration en DCM sur sa valeur. Nous nous sommes alors attachés à exploiter cette relation pour en déterminer les paramètres : les constantes K_{part} et K_{DCM} . Pour cela, différents couples (K_{global} ; [DCM]) devaient être obtenus. Mais comment faire varier le seul paramètre [DCM] entre différents échantillons de boue ? La méthode imaginée a consisté à mélanger dans des proportions variables 3 volumes : un volume de boue (fixe dans la mesure du possible, afin de maintenir la concentration en particules constante), un volume de son surnageant préalablement séparé, et un volume d'eau (Figure III-6).

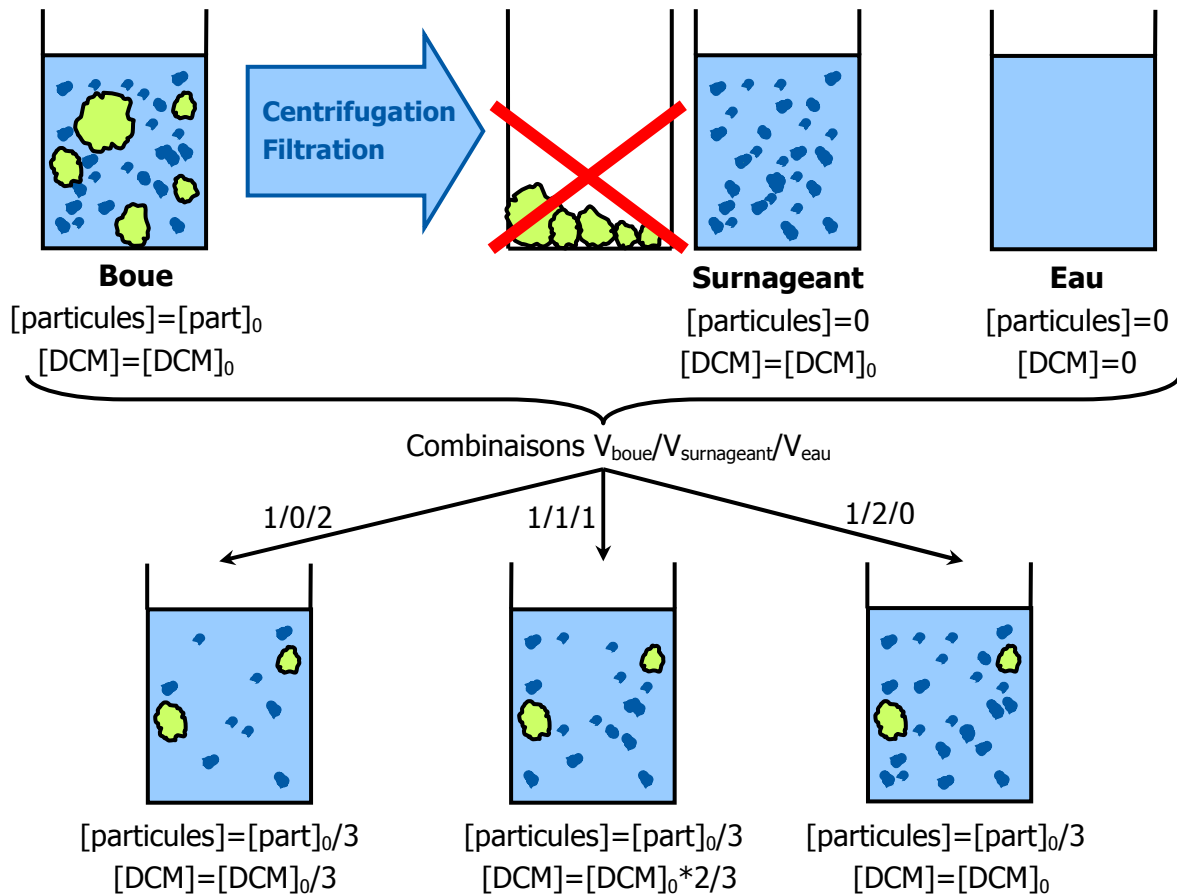


Figure III-6 : Méthodologie imaginée pour faire varier uniquement la concentration en DCM.

L'article suivant vise à proposer une méthodologie de détermination de K_{part} et K_{DCM} basée sur l'observation de la variation de partage des CTOs entre phase particulaire et phase aqueuse en fonction de la concentration en DCM maîtrisée comme explicité en Figure III-6. Les hypothèses sur lesquelles cette méthodologie est fondée y sont validées, et les biais engendrés par la stratégie de dilution discutés. La confrontation à la littérature des résultats obtenus par la mise en œuvre de cette méthodologie pour les HAPs dans une boue a permis de valider cette méthodologie. Cette méthodologie offre d'importantes perspectives sur lesquelles l'accent est mis en fin d'article.

**A THREE-COMPARTMENT MODEL FOR MICROPOLLUTANTS SORPTION IN
SLUDGE: METHODOLOGICAL APPROACH AND INSIGHTS**

Maialen Barret, Dominique Patureau, Eric Latrille and Hélène Carrère

D'après l'article sous presse, pour publication dans le journal Water Research

Abstract: In sludge resulting from wastewater treatment, organic micropollutants sorb to particles and to dissolved/colloidal matter (DCM). Both interactions may influence their physical and biological fate throughout the wastewater treatment processes. To our knowledge, sludge has never been considered as a three-compartment matrix, in which micropollutants coexist in three states: freely dissolved, sorbed-to-particles and sorbed-to-DCM. A methodology is proposed to concomitantly determine equilibrium constants of sorption to particles (K_{part}) and to DCM (K_{DCM}). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) were chosen as model compounds for the experiments. The logarithm of estimated equilibrium constants ranged from 3.1 to 4.3 and their usual correlation to PAH hydrophobicity was verified. Moreover, PAH affinities for particles and for DCM could be compared. Affinity for particles was found to be stronger, probably due to their physical and chemical characteristics. This work provided a useful tool to assess the freely dissolved, sorbed-to-particles and sorbed-to-DCM concentrations of contaminants, which are necessary to accurately predict their fate. Besides, guidelines to investigate the link between sorption and the fundamental concept of bioavailability were proposed.

III.2.1.1 Introduction

Organic micropollutants such as Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) present very low water solubility and are highly hydrophobic. Due to these properties, they tend to sorb to organic matter. In the context of wastewater treatment, sorption phenomena firstly impact on physical fate of these compounds, determining the fluxes distribution throughout the physical separation steps (eg. settling, centrifugation). But these physical mechanisms only determine micropollutants dispersion, whereas biological mechanisms are mainly responsible for their removal. Biological mechanisms may also be influenced by sorption, throughout bioavailability limitation towards biodegradation. Bioavailability might be the main limiting factor of PAHs biodegradation in sludge.

Micropollutants bioavailability has been widely investigated in soils and many tools were subsequently designed to quantify it (Reid *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2002; van Straalen *et al.*, 2005; Oleszczuk, 2007; Hickman *et al.*, ; Oleszczuk, 2008). However, these studies referred to different definitions of bioavailability. Moreover, bioavailability and bioaccessibility were sometimes confused. Semple *et al.* (2004; 2007) gathered most of the encountered concepts into two definitions: a bioavailable compound is "freely available to cross an organism's

cellular membrane from the medium the organism inhabits at a given time"; a bioaccessible compound is "available to cross an organism's cellular membrane from the environment, if the organism has access to the chemical". These definitions imply that a bioaccessible compound can become bioavailable after some time.

On the contrary, micropollutants bioavailability in sludge has been little studied. Related concepts and mechanisms are less precisely described than in soil. Some of them may be similar between soil and sludge, although matrix characteristics and micropollutants/matrix contact time completely differ. From a general point of view, micropollutants are usually assumed to be bioavailable when they are located in the aqueous phase and bioaccessible when they are initially sorbed to particles and can be transferred to the aqueous phase during the process (Byrns, 2001; Artola-Garicano *et al.*, 2003; Langford *et al.*, 2005a; Urase & Kikuta, 2005; Dionisi *et al.*, 2006). Otherwise, the assumption that a fraction of sorbed-to-particles compounds would be directly bioavailable can also be encountered (Fountoulakis *et al.*, 2006). Anyway, even if the nature of the link between sorption phenomena and bioavailability was never demonstrated and is still subject to controversy when studying sludge, the existence of a link is generally admitted. Thus, to study sorption phenomena appears to be the first step towards bioavailability investigation

In published studies dealing with micropollutants sorption in sludge, sludge have been considered as a two-compartment system, corresponding to two states for micropollutants: sorbed-to-particles and aqueous (Byrns, 2001; Artola-Garicano *et al.*, 2003; Ternes *et al.*, 2004; Dionisi *et al.*, 2006; Carballa *et al.*, 2008). However, sorption phenomena also occur inside aqueous phase. Indeed, micropollutants have been shown to interact with dissolved and/or colloidal matter (DCM) of various origins (Chiou *et al.*, 1986; Perminova *et al.*, 2001) including sludge from wastewater treatment plant (Holbrook *et al.*, 2004). The sorption to DCM is likely to influence micropollutants bioavailability in sludge as well as sorption to particles (Mackay & Fraser, 2000; Vinken *et al.*, 2004). Thus, the freely dissolved and sorbed-to-DCM micropollutants states should be differentiated. Sludge should then be considered as a three-compartment matrix, with three states of micropollutants: freely dissolved, sorbed-to-DCM and sorbed-to-particles. To our knowledge, such a model has been used to study sorption phenomena in aquatic environmental systems such as sediments (Schrap & Opperhuizen, 1992; Lee & Kuo, 1999) but it has never been applied to sludge.

Micropollutants sorption equilibria in environmental samples including sludge are often modelled by Freundlich isotherms with a Freundlich coefficient close to 1, which is equivalent to a linear isotherm (Hung *et al.*, 2004; Ivashechkin *et al.*, 2004; Arias-Estevéz *et al.*, 2007). As a consequence, the equilibrium of sorption to particles is usually assumed to fit linear equations (Ternes *et al.*, 2004; Carballa *et al.*, 2006; Dionisi *et al.*, 2006; Katsoyiannis *et al.*, 2006) as well as the equilibrium of sorption to DCM (Yamamoto *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2007).

The objective of this study was to propose and to validate a methodological approach to study micropollutants sorption equilibria in sludge, considering sludge as a three-compartment matrix. Even though this investigation focused on PAHs, the methodology and its implications may be transposed to a wider range of micropollutants.

III.2.1.2 Materials and Methods

Sludge Source. All experiments were performed using activated sludge from a urban wastewater treatment plant. The influent was entirely domestic. The plant consisted in preliminary treatments, primary settling, aerated tank, secondary settling and thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge. Hydraulic retention time in the aerated tank was 0.36 day. The activated sludge contained 65.4 ± 1.2 g/L of total solids (TS), constituted of 7 ± 1 % of DCM and 93 ± 2 % of particles. DCM represented the dissolved and colloidal matters which were not differentiated, defined as the centrifugation supernatant ($12\ 000 \times g$, 20 min, 35°C). Some particles were unwillingly suspended back after centrifugation because of little pellet cohesiveness. To remove them, the supernatant was filtered at $1.2\ \mu\text{m}$ (Whatman GF/C glass microfiber filter). The DCM fraction retained by the filter was negligible.

Chemicals. All solvents were purchased from J.T.Baker. Mixtures are indicated in volume percentage. Fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene and indeno(1,2,3,c,d)pyrene powders were obtained from Dr Ehrenstorfer GmbH. Each PAH was dissolved in dichloromethane at 1 g/L. The spiking mix was prepared from these individual concentrated solutions, adding 5 mL of each, evaporating solvent under gentle nitrogen flow and dissolving in 50 mL of acetonitrile. Final concentrations were 100 mg/L for each PAH. This mixture was used in equilibrium experiments, as competitive phenomena are often assumed not to occur at low concentration (Krauss & Wilcke, 2005; Dionisi *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007).

The 10 mg/L standard solution of PAHs in acetonitrile was provided by Dr Ehrenstorfer GmbH. Dilution factors from 10 to 1 000 were applied to obtain 6 calibration levels. Standards were stored at $-20\ ^\circ\text{C}$.

PAHs Quantification in Sludge. 400 mL of sludge were centrifuged during 20 min at $12\ 000 \times g$, at $35\ ^\circ\text{C}$. The supernatant was filtered at $1.2\ \mu\text{m}$ with glass microfiber filters (GF/C Whatman) to obtain the aqueous phase, to which 1 % of formaldehyde at 37 % was added for conservation. The particulate phase (pellet) was frozen at $-20\ ^\circ\text{C}$ and freeze-dried. Extraction from aqueous phase was performed using SPE cartridges with 1 g C18 sorbent from Macherey-Nagel. Cartridges were washed and conditioned with 2×5 mL of methanol:toluene:acetonitrile (33:33:33), 2×5 mL of methanol and 2×5 mL of ultra pure water. 100 mL of sample were percolated through the extraction columns at a flow rate of 2 mL/min. After the sample percolated, the sorbent was dried in a stream of atmospheric air during 30 min. Adsorbates were eluted with 2×5 mL of methanol:toluene (50:50). Extracts were dried under nitrogen flow and dissolved into 1 mL of acetonitrile. Each sample was extracted in duplicate and corrected by the recovery performance determined on the same aqueous sample (same DCM concentration) spiked at approximately the same PAHs concentration.

Extraction from solid phase was carried out as described by Trably *et al.* (2004).

PAHs quantification in extracts from aqueous and solid phases was performed according to the method optimised by the same authors (Trably *et al.*, 2004). The sum of PAHs concentration in aqueous and in solid phase was compared to the spiking concentration to ensure that no significant losses occurred during the experiment.

The three-Compartment Model. A micropollutant present in sludge can be located in one among three physical compartments (Figure III-7): the freely dissolved one (concentration C_{free} , $\mu\text{g/mL}$), the sorbed-to-DCM one (concentration C_{DCM} , $\mu\text{g/g}_{DCM}$) and the sorbed-to-particles one (concentration C_{part} , $\mu\text{g/g}_{PART}$).

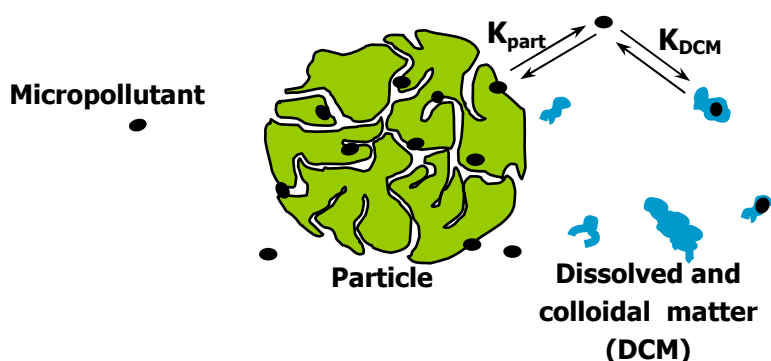


Figure III-7 : Representation of the three-compartment model of a micropollutant in sludge.

At equilibrium, the three-compartment system can be described by the two following equations:

$$K_{part} = \frac{C_{part}}{C_{free}} \quad (1) \quad \text{and} \quad K_{DCM} = \frac{C_{DCM}}{C_{free}} \quad (2),$$

where K_{part} is the equilibrium constant of micropollutant sorption to particles (mL/g_{PART}) and K_{DCM} is the equilibrium constant of sorption to DCM (mL/g_{DCM}). C_{free} is very difficult to obtain experimentally whereas C_{aqu} (concentration of apparently dissolved micropollutant, sum of the freely dissolved and sorbed-to-DCM states, $\mu\text{g/mL}$) and C_{part} are easily measurable. From C_{aqu} and C_{part} measurement, K_{global} (mL/g_{PART}) can be estimated:

$$K_{global} = \frac{C_{part}}{C_{aqu}} = \frac{K_{part} C_{free}}{K_{DCM} C_{free} [DCM] + C_{free}} = \frac{K_{part}}{K_{DCM} [DCM] + 1} \quad (3)$$

where $[DCM]$ represents the DCM concentration (g/mL). K_{global} is not a thermodynamical equilibrium constant but a partition coefficient, which is system-dependant.

Equilibration time. The kinetics of PAHs sorption was monitored in order to determine the equilibration time. For this, eight sludge samples were firstly mixed at 100 rpm at 35°C in centrifugation flasks in order to stabilize the matrix. Then, each sample was spiked at 5 $\mu\text{g}_{PAH}/\text{g}_{DM}$ to start with the sorption kinetics. The aqueous PAHs concentration was measured after 1, 3, 4, 6, 8, 10, 14 and 24h of incubation (extractions were carried out in duplicate).

Linearity Verification. At constant DCM concentration, K_{global} is constant. As a consequence, the linearity of $C_{\text{part}}=f(C_{\text{aqu}})$ is a linearity indicator of equilibria (1) and (2). Five samples at 0.7 g_{DCM}/L and 4.9 g_{PART}/L were therefore directly put in centrifugation flasks and equilibrated at 35°C on a mixing table (100 rpm). After 30 min of equilibration, they were spiked with the spiking mix at different concentrations ranging from 1 to 5 µg_{HAP}/g_{DM} and incubated again at 35°C for 4 hours. The samples were then centrifuged at 35°C and both C_{part} and C_{aqu} were measured according to quantification section.

Determination of sorption equilibrium constants. K_{part} and K_{DCM} can be extracted from equation (3) by assessing K_{global} with various DCM concentrations for each PAH. Variations of DCM concentrations from 0.6 to 4.5 g_{DCM}/L were obtained by diluting sludge with its own supernatant previously separated and with water in different proportions. To ensure that this dilution method did not modify pH and that no particulate matter was released into DCM, the pH and the chemical oxygen demand (COD) were measured in 10 samples diluted by 1.2 (3.7 g_{DCM}/L) to 200 (0.02 g_{DCM}/L) fold factor. The COD was chosen here because it is a fast and little volume consuming method.

The same procedure previously detailed was applied to equilibrate, spike, incubate and quantify C_{part} and C_{aqu} in the samples from 0.6 to 4.5 g_{DCM}/L. Hence, K_{global} dependence to DCM concentration was measured. A non linear regression algorithm of Levenberg-Marquardt type (Marquardt, 1963) was used to minimize the sum of square errors and to estimate the two parameters of the K_{global} model: K_{part} and K_{DCM} . In some cases, the algorithm did not converge, due to the measurement noise and to high $K_{\text{DCM}}[\text{DCM}]$ values compared to 1. Indeed, when the "+1" term becomes negligible in the denominator of equation (3), this leads to equation (4):

$$K_{\text{global}} \approx \frac{K_{\text{part}}}{K_{\text{DCM}}[\text{DCM}]} = \frac{\alpha}{[\text{DCM}]} \quad (4)$$

An infinity of couples ($K_{\text{part}}, K_{\text{DCM}}$) can be solution of this equation, defined by the ratio

$\alpha = \frac{K_{\text{part}}}{K_{\text{DCM}}}$. α could be precisely determined by the algorithm. Afterwards, introduction of α

into equation (3) allowed us to estimate K_{part} for each K_{global} measurement and its corresponding [DCM]:

$$K_{\text{part}} = \frac{K_{\text{global}}}{1 - K_{\text{global}} \frac{[\text{DCM}]}{\alpha}} \quad (5)$$

The average of calculated K_{part} values and the corresponding K_{DCM} were used with the Levenberg-Marquardt algorithm in order to evaluate standard deviations and correlation coefficient. This procedure was applied to dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene and indeno(1,2,3,c,d)pyrene.

III.2.1.3 Results and discussion

Hypotheses verification. From the initial DCM concentration in sludge (12 700 mg_{O2}/L), the DCM concentration in diluted samples (from 1.2 to 200 fold factor) could be predicted, assuming that no matter was transferred from particles into aqueous phase. These predicted concentrations were compared to measured values. The ratio between them was very close to 1 (Figure III-8). Only for dilution factors higher than 20, a little fraction of particulate matter (15%) was found to be released, since the ratio reached 1.15. The highest dilution factor applied in sorption experiments was 7.5, which ensures that no particulate matter release occurred during these experiments. As a consequence, the DCM concentrations estimated thanks to the dilution factor were reliable. Moreover the pH was not modified by the dilution (Figure III-8), implying that the physicochemical properties of DCM can be assumed to be unchanged.

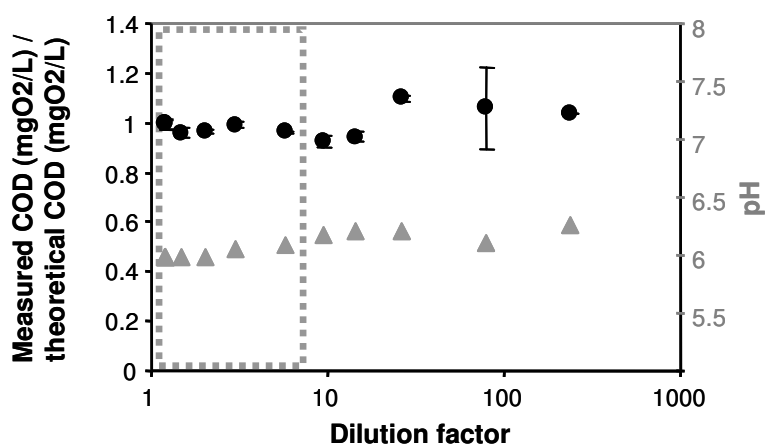


Figure III-8 : Ratio between measured and theoretical aqueous COD (mg/L) (black circles) and pH (grey triangle) as a function of sludge dilution factor. The dotted frame indicates the range of dilution factors used for sorption experiments.

Besides, the absence of particulate matter release in diluted samples indicates that sludge DCM does not behave like sorbable/desorbable matter. Indeed, matter is likely to be either dissolved/colloidal or particulate according to intrinsic parameters. This implies that PAHs sorption to particles via the sorption of DCM on which PAHs are sorbed does not occur, which validates the “three-compartment model / two equilibria” description (Figure III-7).

The kinetics of fluorene and benzo(a)pyrene sorption in sludge are presented in Figure III-9. The sorption equilibrium state for these two PAHs was achieved within one hour shaking, and it was the same for all other PAHs (data not shown). This value of one hour for equilibrium achievement is consistent with literature (Dionisi *et al.*, 2006) and suggests that during wastewater treatment processes, bioavailability is not limited by dynamic phenomena, as contact between xenobiotics and sludge lasts for several hours or days. Furthermore, a four hour incubation time was selected for equilibrium experiments.

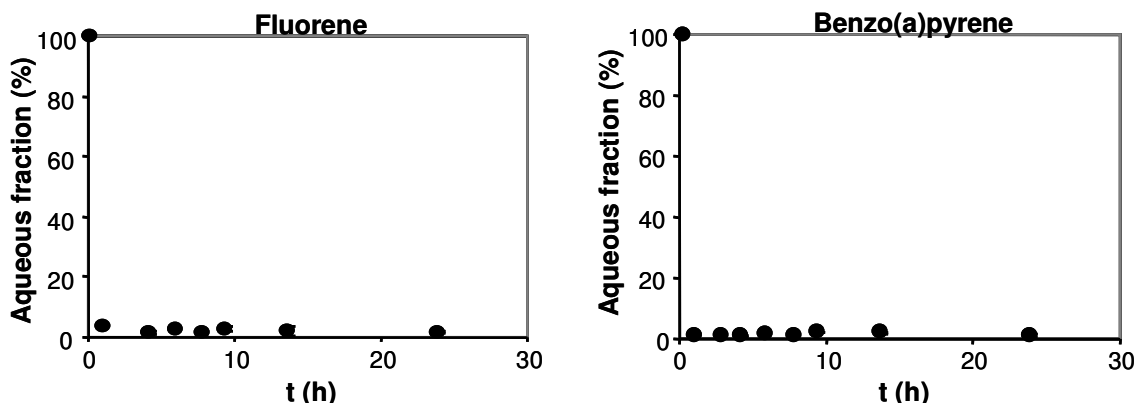


Figure III-9 : Percentage of initially spiked PAHs that remain in aqueous phase as a function of equilibration time. Since PAHs are spiked in liquid form, at time 0, the aqueous fraction is assumed to be 100 %.

The linear regressions performed to extract K_{global} from $C_{part}=f(C_{aqu})$ produced regression coefficients R^2 ranging from 0.85 to 0.95 (Tableau III-1). This is consistent with the hypothesis of linearity assumed in the model. Moreover, K_{global} was plotted as a function of DCM concentration (Figure III-10) for each PAH. The obtained models fitted very well the experimental data with R^2 ranging from 0.68 to 0.95, which again reinforced the model.

K_{global} dependence to DCM concentration. According to the considered PAH, the measured partition coefficients varied of a ten fold factor in the set of tested conditions (Figure III-10). Indeed, a little shift of DCM concentration was shown to imply an important variation of K_{global} , above all at low concentrations. Moreover, when sludge is not considered as a three-compartment system and measured K_{global} is assimilated to an equilibrium constant, this so-called constant can be largely underestimated. For example, measured K_{global} for benzo(b)fluoranthene at 0.6 g_{DCM}/L was about 2 000 mL/g_{PART} whereas the real equilibrium constant K_{part} was estimated at 6 920 mL/g_{PART} (Figure III-10). In this case, assimilating K_{global} to the equilibrium constant would lead to an underestimation of 71 %.

Overall, this underestimation varied from 57 to 94 % within the PAHs family and the more hydrophobic the PAH, the higher the error. Such an underestimation prevents from accurately predicting micropollutants sorption in sludge. All these results highlighted the necessity to consider the third phase to precisely assess the micropollutants fate.

The obtained partition coefficients could not be strictly compared to literature data. Indeed, the studies published until now about PAHs sorption in sludge are very few, and authors neither take into account the three compartments nor measure DCM concentration. Moreover, our results underlined the strong K_{global} dependence to this concentration, which obliges to compare K_{global} values at equivalent DCM concentrations.

Comparison between K_{part} and K_{DCM} . The logarithm of thermodynamical equilibrium constants K_{part} and K_{DCM} extracted from K_{global} dependence to DCM concentration are presented in Tableau III-1. Standard deviation was higher for highly hydrophobic compounds

than for weakly hydrophobic ones, due to mathematical difficulties previously mentioned. The first way to reduce standard deviations would be to multiply measurements in order to decrease experimental uncertainty due to (i) sludge heterogeneity and (ii) quantification procedure. The second way would be to optimize measurements distribution on the DCM concentration scale. However, this option is limited for practical reasons. Indeed, the upper DCM concentration limit comes from the DCM concentration in raw sludge that cannot be passed over. Besides, to minimize DCM concentration, no supernatant volume should be added and a small sludge volume should be diluted with water. Nevertheless, particles concentration would concomitantly decrease and particles quantity needed for PAH quantification would constitute the lower DCM concentration limit. Nonetheless, standard deviation values for most PAHs were acceptable in comparison with the literature data on adsorption topic, since standard deviations, although very seldom estimated, are in this range (Kordel *et al.*, 1997; Dionisi *et al.*, 2006; Carballa *et al.*, 2008).

Tableau III-1 : log K_{ow} , partition coefficient K_{global} and coefficient R^2 obtained from linear regression of $C_{part}=f(C_{aqu})$ at 0.7 g_{DCM}/L, and equilibrium constants extracted from K_{global} dependence to DCM concentration in the range 0.6 to 4.5 g_{DCM}/L.

Compound	log K_{ow}	Partition coefficient Equilibrium constants			
		K_{global} (mL/ g _{part})	R^2	log K_{part}	log K_{DCM}
Fluorene	4.18	638	0.89	3.21 ± 0.23	3.24 ± 0.37
Phenanthrene	4.46	2 142	0.92	3.56 ± 0.24	3.35 ± 0.36
Anthracene	4.5	1 493	0.92	3.45 ± 0.17	3.11 ± 0.29
Fluoranthene	4.9	2 357	0.85	4.01 ± 0.44	3.46 ± 0.61
Pyrene	4.88	3 196	0.95	3.71 ± 0.37	3.20 ± 0.62
Benzo(a)anthracene	5.63	2 712	0.92	3.78 ± 0.21	3.33 ± 0.32
Chrysene	5.63	1 833	0.92	3.86 ± 0.40	3.47 ± 0.56
Benzo(b)fluoranthene	6.04	2 381	0.89	3.84 ± 0.38	3.49 ± 0.52
Benzo(k)fluoranthene	6.21	1 857	0.90	4.27 ± 0.76	4.02 ± 0.85
Benzo(a)pyrene	6.06	566	0.89	4.01 ± 0.55	3.83 ± 0.65
Dibenzo(a,h)anthracene	6.86	1 701	0.90	4.34 ± 1.57	4.12 ± 1.71
Benzo(g,h,i)perylene	6.78	1 542	0.89	4.11 ± 1.10	4.00 ± 1.20
Indeno(1,2,3,c,d)pyrene	6.58	1 035	0.87	4.03 ± 0.83	3.81 ± 0.97

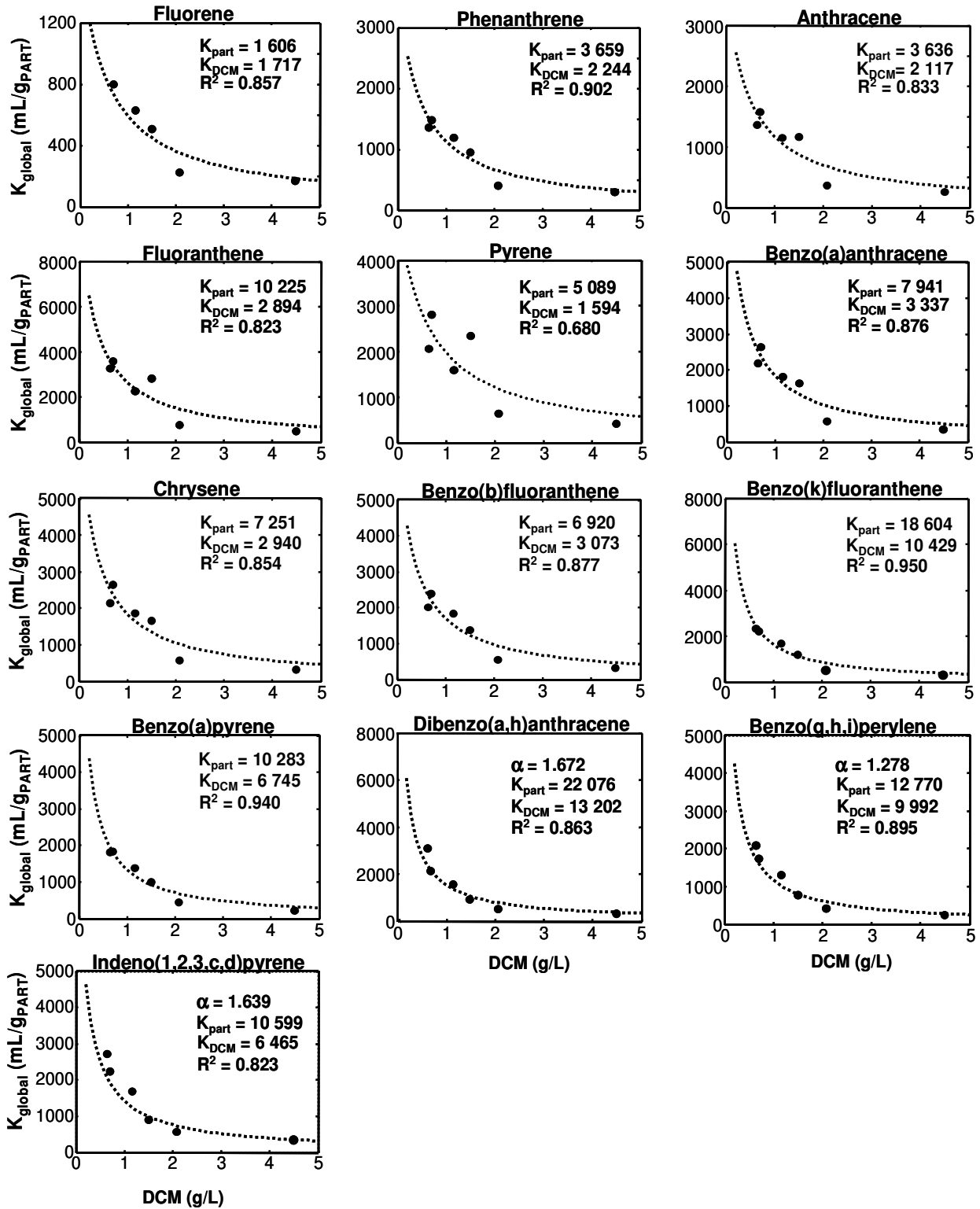


Figure III-10 : Measured (mark) and modelled (line) K_{global} (mL/g_{PART}) as a function of DCM concentration (g/L). The α coefficient (for dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene and indeno(1,2,3,c,d)pyrene), K_{part} , K_{DCM} and regression coefficients estimated thanks to the algorithm are presented on each graph. The corresponding logarithmic values and standard deviation for K_{part} and K_{DCM} are presented in Tableau III-1.

Again, K_{part} comparison with previously published data was hardly feasible. However, at low particulate matter concentration (1g/L), which indicates a probable very low DCM concentration, Dionisi *et al.* (2006) measured a K_{global} of $9\,700 \pm 5\,000$ mL/g_{PART} for pyrene in an activated sludge. This value might be compared to our K_{part} , as K_{part} corresponds to K_{global} limit when DCM concentration tends to zero. We calculated a K_{part} in the range 2 200 – 12 000 mL/g_{PART} for pyrene (Tableau III-1), which is in good agreement with Dionisi *et al.*'s values (2006).

K_{DCM} is easier to compare with literature data than K_{part} , since several studies were performed in absence of particles. As an illustration, Holbrook *et al.* (2004) studied pyrene adsorption onto sludge DCM. Depending on sample origin and size fractionation, the authors measured some K_{DCM} values ranging from below 1 000 to 80 000 mL/g_{OC} (g of organic carbon). Since organic carbon usually represents approximately 25% of the total matter in sludge (Dignac *et al.*, 2000), these values are widespread from below 250 to 20 000 mL/g_{DCM}. This range is in accordance with our estimation of 380 – 6 607mL/g_{DCM} (Tableau III-1).

The common and general correlation between the logarithm of equilibrium constants and hydrophobicity of PAHs (Karickhoff *et al.*, 1979; Poerschmann & Kopinke, 2001) was observed for both K_{part} and K_{DCM} (Figure III-11). This demonstrates that PAHs sorption to particles and to DCM may be driven by hydrophobic interactions. Moreover, the linear regressions revealed very similar slopes (0.31 and 0.35) but different origins (2.13 and 1.61), resulting in different values (Figure III-11).

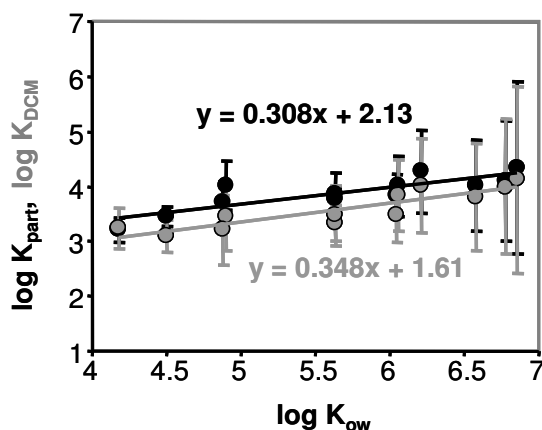


Figure III-11 : log K_{part} (black rounds) and log K_{DCM} (grey rounds) as a function of PAHs log K_{ow} .

Indeed, the PAHs affinity for particles was found to be stronger than for DCM. This finding can be related to the compartments characteristics since equilibrium constants reflect the affinity of PAHs for the corresponding compartment. In this work, the compartments were differentiated according to their physical criteria, as defined in the 2.1. section: the density criteria imposed by centrifugation, followed by the size criteria of filtration. Other physical properties such as hydrophobicity, surface charge and specific surface area differentiate particles and DCM. In addition of physical properties, Bougrier *et al.* (2008) demonstrated that biochemical composition (chemical oxygen demand, carbohydrates and proteins

content) is different in particles and DCM. These properties are influenced by sludge history in terms of substrate (wastewater), involved microbiological population, and process operating parameters. For example, high sludge retention time in activated sludge process reduces particles specific surface area (Liss *et al.*, 2002) and leads to more hydrophobic particles (Liao *et al.*, 2001) with higher lipid content (Liss *et al.*, 2002). Quantifying the influence of physical and biochemical sludge characteristics on the sorption equilibrium constants of PAHs would be very interesting.

Assessment of PAHs compartment distribution. K_{part} and K_{DCM} determination and dependence to hydrophobicity provided the parameters needed to simulate PAHs distribution between the three sludge compartments. Aqueous and freely dissolved percentages were simulated in two theoretical and extreme cases: for a weakly hydrophobic PAH and for a strongly hydrophobic one (Figure III-12).

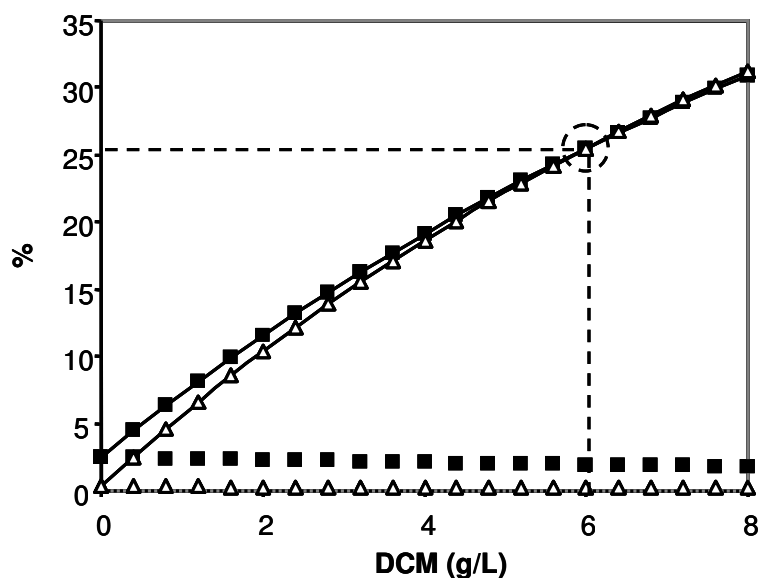


Figure III-12: Percentage of free (plots) and aqueous (linked plots) concentrations modelled for a theoretical weakly hydrophobic PAH ($\log K_{ow}=4.2$, square) and for a theoretical very hydrophobic PAH ($\log K_{ow}=6.8$, triangle) as a function of dissolved and colloidal matter concentration, particulate concentration being fixed at 10 g/L. For this simulation, K_{part} and K_{DCM} of both PAHs were estimated thanks to the relationship presented in Figure III-11. The reversion point is located at 6.01 g_{DCM}/L , which corresponds to 25.5 % of aqueous PAHs. Over this value, aqueous fraction is slightly higher for the very hydrophobic PAH than for the weakly hydrophobic one.

The simulation demonstrated that freely dissolved fraction does not exceed 0.4 % of the total concentration for a very hydrophobic compound and 2.5 % for a weakly hydrophobic one. This fraction is slightly influenced by DCM concentration in both cases.

On the contrary, aqueous fraction of both PAHs appeared to strongly depend on DCM concentration. This result is of great concern since aqueous fraction is usually assimilated to

bioavailable fraction, as previously mentioned. It means that low DCM concentrations favour higher percentage in aqueous phase for weakly hydrophobic PAHs than for very hydrophobic ones, whereas reasonable high concentrations discriminate less PAHs. The extrapolation of the model to extremely concentrated conditions ($[DCM] > 6 \text{ g/L}$) shows that the aqueous concentration of a very hydrophobic PAH could equal and even exceed a weakly hydrophobic one (Figure III-12). In the usual bioavailability hypothesis "aqueous is bioavailable", this would mean that a very hydrophobic PAH could be more bioavailable than a weakly hydrophobic one. This case is really atypical, since micropollutants are usually assumed to be less bioavailable when they are more hydrophobic (Mackay & Fraser, 2000). It is an important insight derived from the three-compartment approach. The reversion point would be located at $[DCM] = 6.0 \text{ g/L}$ for the studied activated sludge, as particulate matter concentration was fixed at 10 g/L for the simulation. However, it has to be reminded that the model was established for DCM concentrations up to 4.5 g/L . Moreover, DCM at the reversion point would represent 37.5% of the total matter, which is much higher than common values (Bougrier *et al.*, 2008). As a conclusion, the latter case is little probable in real systems, but it could be interesting to create it in laboratory investigations.

Apart from the descriptive issue previously discussed, such simulations constitute a new tool for micropollutants physical fate assessment. They will allow to predict the fate of PAHs throughout the separation steps encountered in wastewater treatment plants. In the example of a settler, the flux of sorbed-to-particles PAHs in solid effluent (for agricultural disposal) can be quantified as well as the flux of sorbed-to-DCM and dissolved PAHs carried by clarified water (discharged into surface water). Indeed, Katsoyannis and Samara (2007) observed an influence of DCM concentration on micropollutants fate, without quantifying this effect. The three-compartment approach could provide the missing data to quantitatively take this interaction between micropollutants and DCM into account. As a result, the methodology presented here constitutes a real improvement in the assessment of micropollutants fate throughout treatment plants and of their environmental discharges.

Towards Bioavailability. Quantifying PAHs distribution in sludge samples has an important outcome concerning its consequences on bioavailability topic. Indeed, it may be useful to verify the usual hypothesis of identity between aqueous and bioavailable fractions (Artola-Garicano *et al.*, 2003; Dionisi *et al.*, 2006). This assumption may be verified by measuring biodegradation at different aqueous concentrations. Initial biodegradation rate in batch experiments could be an appropriate indicator for biodegradation. The assumption would be confirmed if biodegradation rate correlates with aqueous concentration. Guidelines for such an experiment are provided by the present work: it suggests that different aqueous concentrations of one PAH might be achieved thanks to different DCM concentrations. On the other hand, investigation on the link between freely dissolved and bioavailable fractions of one PAH appears more difficult, as freely dissolved concentration varied little in the presented conditions. It means that this link might be investigated through either the comparison between different compounds in one matrix or the comparison of one compound in various matrixes for which this compound has different affinities.

These guidelines are of great importance for the modeling of micropollutants biological fate in sludge, since until now, models have been built on hypotheses which have never been clearly demonstrated.

III.2.1.4 Conclusions

The three-compartment methodology proposed to investigate micropollutants sorption in sludge was validated. The results underlined the fact that a reliable tool for micropollutants behaviour prediction in sludge should integrate a three-compartment model since DCM concentration influences micropollutants distribution in a significant way. Indeed, the usual biphasic approach was shown to lead to an important underestimation of equilibrium constants. Despite the lack of published data about PAH sorption in sludge, the results could be confronted to a few studies. The confrontation showed the consistency of equilibrium constant values and of dependency to PAH hydrophobicity.

Besides, PAH affinities for particles and for DCM could be compared. Affinity for particles was found to be stronger, probably due to their physical and chemical characteristics. Further investigation is necessary to include the influence of both sludge and micropollutant characteristics in the three-compartment model. This research, being presently undergone by the authors, will enable to predict PAHs behaviour in any sludge, as a function of its characteristics. The future predictive model would allow to estimate the PAH distribution in any sludge in order (i) to determine fluxes throughout physical separation steps and (ii) to confront PAHs distribution between compartments to their biodegradation, which might help to elucidate bioavailability issue.

III.2.2 Discussion

Le modèle proposé repose sur l'hypothèse de **linéarité** des équilibres entre CTOs libres et sorbés aux particules et entre CTOs libres et sorbés à la DCM. Cette hypothèse est confortée par la constance du coefficient de partage K_{global} en fonction de la concentration en CTOs, à concentration en DCM constante.

De plus, la déstructuration/désintégration des particules par la dilution, conduisant à la libération de DCM, a été démontrée comme négligeable dans la gamme de dilution employée. Ceci suggère que la matière est sous forme soit dissoute/colloïdale soit particulaire selon des propriétés intrinsèques, et que la DCM ne peut être décrite comme en équilibre entre son état libre et son état sorbé aux particules (Figure III-13). De ce fait, un équilibre entre CTOs sorbés à la DCM et CTOs « sorbés à la DCM sorbée aux particules » est exclu, et le modèle de sorption tri-compartmenté est validé. Il est aussi validé par la description fidèle de K_{global} en fonction de la concentration en DCM par l'équation (3), et par la concordance des constantes d'équilibre obtenues K_{part} et K_{DCM} avec la littérature existante. La très forte dépendance du coefficient de partage K_{global} à la concentration en DCM a aussi été mise en exergue, démontrant que ce troisième compartiment devait impérativement être pris en compte. A notre connaissance, ceci est la première étude quantifiant le « third phase effect » dans les boues d'épuration.

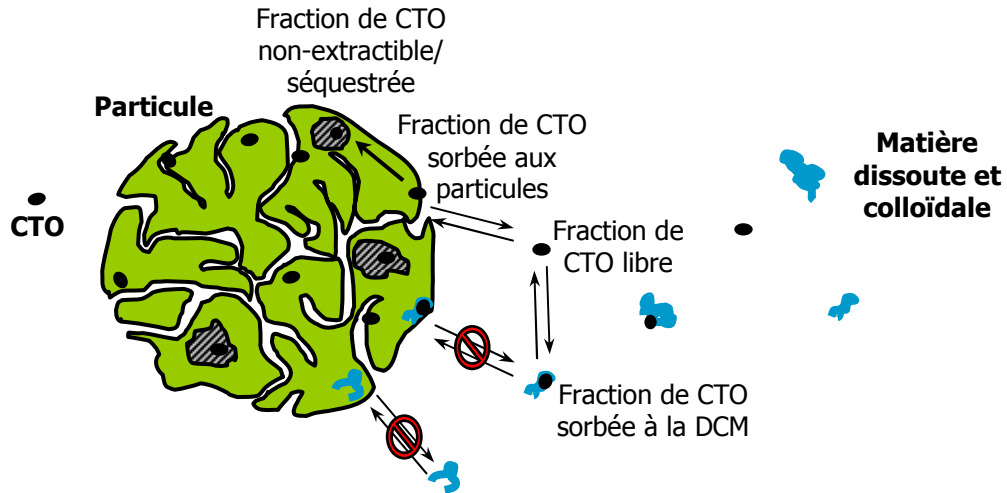


Figure III-13 : Synthèse des équilibres et transferts identifiés dans le système CTO-boue.

Les constantes d'équilibre K_{part} et K_{DCM} extraites grâce à la méthodologie développée permettent d'estimer la répartition des HAPs entre les trois compartiments de la boue SS. Pour cela, il suffit de mesurer la concentration en particules ($[part]$, g_{part}/L) et la concentration en DCM ($[DCM]$, g_{DCM}/L). La concentration totale en CTOs C_{total} (ou bien C_{aquif} toutes deux en $\mu g_{CTO}/L$) permet d'estimer les concentrations absolues. En effet, C_{total} peut être décomposé :

$$C_{total} = C_{free} + C_{DCM}[DCM] + C_{part}[part]$$

En combinant cette expression aux équations d'équilibre, on obtient :

$$C_{free} = \frac{C_{total}}{1 + K_{DCM}[DCM] + K_{part}[part]} \quad \text{et} \quad \%_{free} = \frac{100}{1 + K_{DCM}[DCM] + K_{part}[part]}$$

$$C_{DCM} = \frac{K_{DCM}[DCM]C_{total}}{1 + K_{DCM}[DCM] + K_{part}[part]} \quad \text{et} \quad \%_{DCM} = \frac{100K_{DCM}[DCM]}{1 + K_{DCM}[DCM] + K_{part}[part]}$$

$$C_{part} = \frac{K_{part}[part]C_{total}}{1 + K_{DCM}[DCM] + K_{part}[part]} \quad \text{et} \quad \%_{part} = \frac{100K_{part}[part]}{1 + K_{DCM}[DCM] + K_{part}[part]}$$

Ainsi, dans une boue secondaire à $10 g_{part}/L$ et $1 g_{DCM}/L$, la fraction aqueuse d'un HAP faiblement hydrophobe représente approximativement 7,5 % de la concentration totale, contre 5,5 % pour un HAP fortement hydrophobe. Dans cette fraction aqueuse, seuls 31 % des HAPs faiblement hydrophobes et 8 % des fortement hydrophobes sont sous forme réellement libre. Là encore, l'estimation précise des CTOs strictement libres dans les boues d'épuration, non réalisée par ailleurs à ce jour, est rendue possible.

Finalement, le modèle de sorption tri-compartimenté présenté ici apparaît comme un outil puissant en vue de l'exploration de la question fondamentale de la biodisponibilité : la

confrontation de données de répartition des CTOs entre les trois compartiments avec des données de biodégradation est envisageable. La mise en évidence éventuelle de corrélations pourrait permettre de démontrer à la fois la limitation de la biodégradation des CTOs par leur biodisponibilité, mais aussi de préciser la définition-même de la biodisponibilité. Mais pour l'instant, ces perspectives restent cantonnées aux HAPs et à la seule boue secondaire étudiée (SS).

III.3 Modèle de sorption en fonction des caractéristiques des CTOs et des boues : vers la prédiction

III.3.1 Avant-propos

De la méthodologie mise au point dans le paragraphe précédent ont découlé des résultats de sorption des HAPs dans la boue secondaire SS très encourageants. Ceci nous a mené à appliquer cette méthodologie à une plus large gamme de CTOs et de boues. La gamme de CTOs a été enrichie des PCBs et du NP. Quant au panel de boues, il a été choisi de façon à représenter au mieux la variabilité rencontrée au travers des systèmes d'épuration. Ainsi, la boue primaire PS, la boue secondaire SS après traitement thermique (TTSS), digestion anaérobie (DSS) et après les deux traitements (TTDSS) ont été incluses dans cette étude. La démarche développée est exposée en Figure III-14.

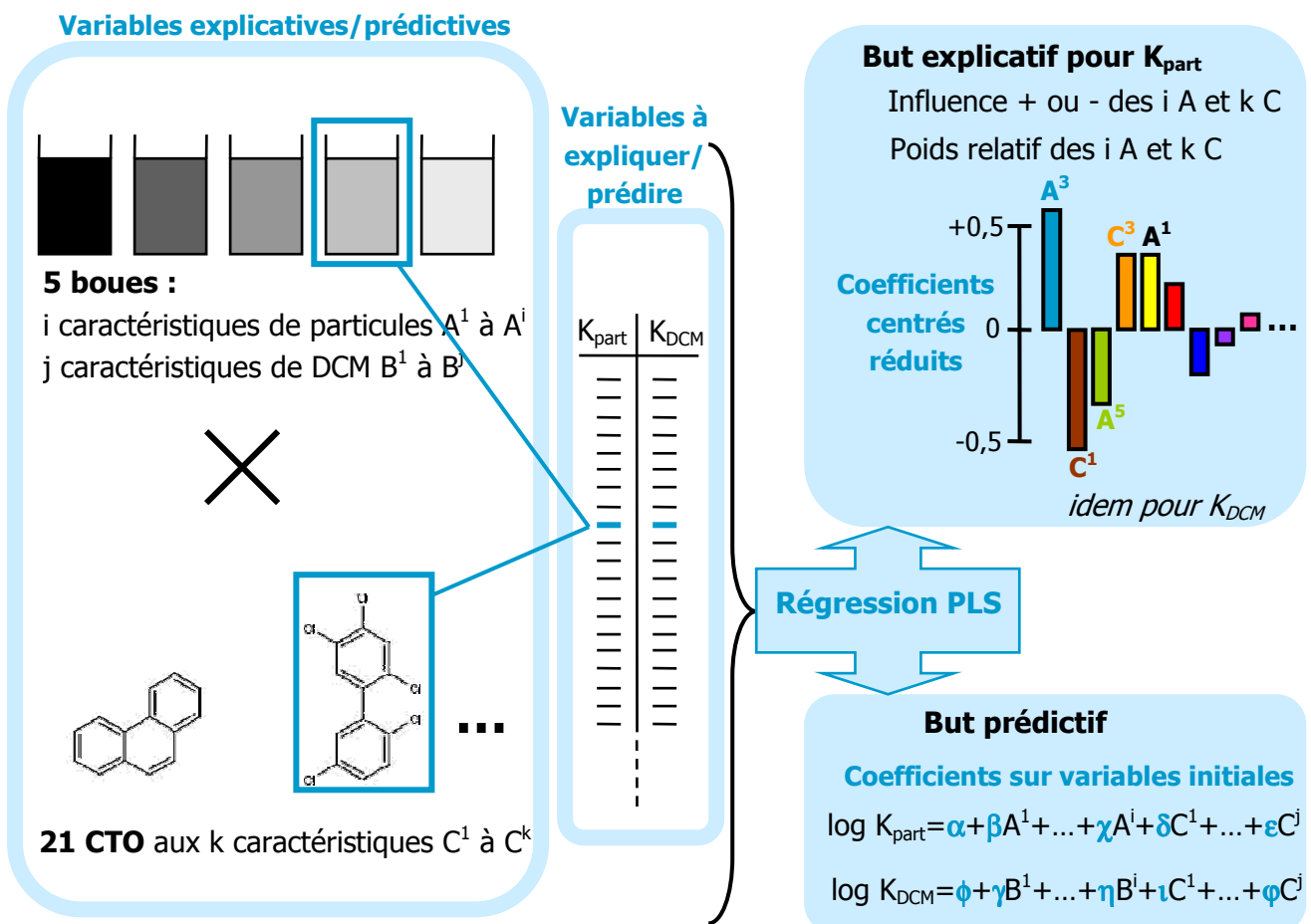


Figure III-14 : Démarche expérimentale d'étude de l'influence des caractéristiques des CTOs et des boues sur les équilibres de sorption.

Les constantes d'équilibre de sorption sont mesurées pour chaque couple CTO-boue. Ensuite, l'ensemble des valeurs de K_{part} obtenues est traité par régression PLS en fonction des caractéristiques des CTOs et des boues (variables prédictives). Le même traitement est appliqué aux valeurs de K_{DCM} . Deux utilisations sont visées pour les coefficients de régression obtenus. Les coefficients de régression sur variable centrées réduites permettent dans un premier temps de déterminer pour chacun des paramètres s'il favorise ou défavorise l'interaction de sorption. Certains mécanismes impliqués dans les phénomènes de sorption peuvent donc être discutés. D'autre part, le poids relatif de ces caractéristiques permet d'identifier lesquelles jouent un rôle majeur dans la gamme de caractéristiques testée. Les coefficients de régression sur variables initiales permettent quant à eux d'estimer les constantes K_{part} et K_{DCM} à partir des caractéristiques d'un couple CTO-boue donné. Cette démarche fait l'objet de l'article suivant.

SLUDGE AND MICROPOLLUTANTS CHARACTERIZATION TO MODEL THE SORPTION EQUILIBRIA

Maialen Barret, Hélène Carrère, Eric Latrille, Christelle Wisniewski & Dominique Patureau
D'après l'article sous presse, accept e pour publication dans le journal Environmental Science & Technology

Abstract: The sorption of hydrophobic micropollutants in sludge is one of the major mechanisms which drive their fate within wastewater treatment systems. The objective of this study was to investigate the influence of both sludge and micropollutant characteristics on the equilibria of sorption to particles and to dissolved and colloidal matter (DCM). For this purpose, the equilibrium constants were measured for 13 polycyclic aromatic hydrocarbons, 5 polychlorobiphenyls and the nonylphenol, and five different sludge types encountered in treatment systems: a primary sludge, a secondary sludge, the same secondary sludge after thermal treatment, after anaerobic digestion, and after both treatments. After thermal treatment, no more sorption to DCM was observed. Anaerobic biological treatment was shown to enhance micropollutants sorption to particles and to DCM of one logarithmic unit, due to matter transformation. Partial least squares linear regressions of sorption data as a function of micropollutant and sludge properties revealed that sludge physical and chemical characteristics were more influential than micropollutant characteristics. Two models were provided to predict the sorption of such micropollutants in any sludge. To our knowledge, this is the first time that a three-compartment approach is used to accurately model micropollutant sorption in sludge and to understand the driving mechanisms.

III.3.1.1 Introduction

Organic micropollutants such as Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), PolyChloroBiphenyls (PCBs) and NonylPhenol (NP) present very low water solubility and are highly hydrophobic. These properties favour their sorption to organic matter. In WasteWater Treatment Plants (WWTP), the micropollutants are in contact with a large amount of available sorbent: the organic matter in the sludge. Hence, sorption is one of the main mechanisms that determine the fate of micropollutants in WWTP. First of all, it influences their bioavailability for microorganisms and, as a consequence, their removal by biological processes. Furthermore, sorption redistributes micropollutant fluxes throughout the physical separation units and, as a result, their concentrations in the final solid and liquid effluents.

Micropollutant sorption in sludge has been generally studied according to a two-compartment approach where sorbed-to-particles and aqueous compounds are distinguished (Ivashechkin *et al.*, 2004; Langford *et al.*, 2005a; Dionisi *et al.*, 2006). However, this approach is open to inaccuracy since sorption occurs not only to sludge particles but also to dissolved and colloidal matter (DCM) (Holbrook *et al.*, 2004; Ilani *et al.*, 2005). This latter type of interaction has been little quantified in sludge, even though its impact on micropollutant fate was suggested in Katsoyiannis and Samara's study (2007) of a WWTP.

In a previous paper, we proposed a new model which takes into account sorption to particles as well as to DCM, with an appropriate methodology for studying this three-compartment matrix (Barret *et al.*, 2009a). This work provided a useful tool for the accurate investigation of the two sorption equilibria in sludge and for determining the equilibrium constants K_{part} (sorption to particles) and K_{DCM} (sorption to DCM). At the same time, it was applied to study the sorption of thirteen PAHs in an activated sludge sample. The linear correlation between sorption equilibrium constants (K_{part} as well as K_{DCM}) and the $\log K_{\text{ow}}$ of PAHs was verified, as usually observed in sorption studies (Karickhoff *et al.*, 1979), indicating that sorption originates from hydrophobic interaction. Nevertheless, when a wider range of micropollutants are studied, a general correlation is difficult to obtain (Yamamoto *et al.*, 2003; Langford *et al.*, 2005a). Although hydrophobicity has been identified as an influential characteristic of micropollutants, it appears to be insufficient to explain and predict sorption equilibria. This fact indicates that certain other characteristics of micropollutant must influence their sorption.

Besides, the equilibrium constant of PAH sorption to DCM was shown to vary by a 4-fold factor among three samples of digested sludge, thus highlighting the influence of sludge characteristics (Raber & Kogel-Knabner, 1997). Several studies have attempted to explain such differences in sorption equilibria by sludge characteristics. PAH affinity for DCM has been shown to increase with DCM molecular weight (Raber & Kogel-Knabner, 1997; Holbrook *et al.*, 2004) and DCM hydrophobicity to enhance PAH sorption (Maxin & Kogel-Knabner, 1995; Ilani *et al.*, 2005). In addition to physical properties, some DCM chemical characteristics, such as aromaticity and phenolic compounds content, have been shown to correlate with sorption equilibrium constants of various micropollutants (Yamamoto *et al.*, 2003). Sludge particle characteristics and their impact have been less well investigated than

those of DCM, probably due to experimental difficulties. Nevertheless, similar phenomena are likely to occur in sludge particles, in the same way as physical (density, hydrophobicity) and chemical (organic carbon content) characteristics affect the sorption of micropollutants to soil and sediment particles (Gao *et al.*, 1998a; During *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2006; Benoit *et al.*, 2008). Very little published data has aimed at identifying the key parameters in the specific characterization of both sludge particles and DCM in regard to their sorption ability. The key parameters in soil are probably unsuitable for sludge, since these two matrixes are very different. For example, organic carbon can represent around 1% of dry matter in soil (During *et al.*, 2002) whereas it forms 25-50% of sludge (Dignac *et al.*, 2000). Furthermore, the organic matter in soil is made up of highly condensed and stabilised compounds such as humic acids, whereas sludge contains much fresher biological products. The biochemical classification of carbohydrates / proteins / lipids (Dignac *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007) may thus be more suited to sludge characterization than reference to organic carbon content.

The objective of this study was to investigate the influence of both micropollutant and sludge characteristics on their sorption interaction. To this end, the sorption equilibrium constants of 19 micropollutants were determined in 5 sludge samples. To our knowledge, this is the first use of a three-compartment approach with a wide range of micropollutants and sludge samples. Based on the thorough characterization of 4 sludge samples and of the 19 compounds, two models were designed. They were validated with the fifth sludge.

III.3.1.2 Experimental section

Sludge samples. The experiments were carried out using five different sludge samples. They were chosen to maximize the representativity of sludge diversity actually encountered in treatment systems. The primary sludge sample (PS) was collected from a domestic wastewater treatment plant treating 33 000 PE (Population Equivalent), at the primary settling tank outlet. The secondary sludge sample (SS) came from the biological aerobic unit of a domestic plant treating 250 000 PE with a very low sludge retention time (0.4 day). One part of this SS was hydrolysed at 165°C for 30 min in a Ziperclave reactor to obtain the thermally-treated secondary sludge sample (TTSS). Such pretreatment is used in order to enhance sludge biodegradability (Li & Noike, 1992; Graja *et al.*, 2005; Bougrier *et al.*, 2008). The fourth sample was the digested secondary sludge sample (DSS). To produce this sludge, a 5 L continuous anaerobic reactor fed with SS was ran at 55°C, with a 15-day retention time and an organic load of 1 g_{COD} (Chemical Oxygen Demand) per day and per liter.

The fifth sludge sample was used for model validation: the thermally-treated and digested secondary sludge (TTDSS) was obtained by thermal treatment of the SS followed by its anaerobic digestion in the same operating conditions as previously described.

Micropollutant sorption experiments. Sorption experiments were carried out with the five sludge samples PS, SS, DSS, TTSS and TTDSS. To ensure feed stability throughout the duration of anaerobic digestion operation, SS was frozen to obtain DSS. As a consequence, sorption experiments were also performed with frozen/defrosted SS, in order to study the

specific effect of biological and/or thermal treatments (See Figure III-18, Supporting Information). To be consistent, PS was also frozen/defrosted. Since the freezing step is likely to modify sludge characteristics, the transferability of our experimental data to other sludge samples will depend on the characterization of such samples.

The methodology developed by Barret et al. (Barret *et al.*, 2009a) was applied to determine the K_{part} and K_{DCM} of 13 PAHs, 5 PCBs and NP (listed in Tableau III-3, Supporting Information) with PS, SS, DSS, TTSS and TTDSS. The DCM concentrations ranged from 0.26 to 2.02 g_{DM}/L for PS, 0.65 to 4.50 g_{DM}/L for SS, 0.14 to 1.00 g_{DM}/L for DSS, 0.31 to 2.84 g_{DM}/L for TTSS and 0.27 to 0.96 g_{DM}/L for TTDSS. These sorption experiments were performed using a mixture of all compounds (see Chemicals, Supporting Information) since competitive phenomena can be assumed not to occur at low concentration (Krauss & Wilcke, 2005; Dionisi *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007).

After equilibration and phase separation, PAHs, PCBs and NP were extracted from freeze-dried particles (2004) and from the aqueous phase (Barret *et al.*, 2009a). The materials and method for PAH quantification in the extracts has been previously described (Trably *et al.*, 2004), and for NP analysis (Ahel *et al.*, 2000; Hernandez-Raquet *et al.*, 2007). For PCB quantification, 150 μL of acetonitrile extracts were evaporated and dissolved in a dichloromethane solution of tetrachloronaphtalene (TCN, injection standard) at 1 mg/L. PCBs were separated on a gas chromatography auto system XL (PerkinElmer) with an Elite 5MS column (PerkinElmer). 1 μL of samples were injected in splitless mode with a carrier pulse (20 psi), at 250°C and with helium as the carrier gas (13 psi). The temperature program was 55°C for 2 min, a first ramp at 25°C/min to 160°C, a second ramp at 5°C/min to 300°C, and then a hold at 300°C for 10 min. A Turbo Mass Gold (PerkinElmer) mass spectrometer with electron-impact mode (70 eV) was used to detect PCBs and TCN. The source temperature was set at 280°C. Data acquisition was carried out in selected-ion recording mode. Two ions were used for identification and quantification (Tableau III-4, Supporting Information). An external calibration was used for quantification.

The quantification of micropollutants was monitored on the basis of a certified matrix (VKI) for solid samples and in accordance with Barret et al. (Barret *et al.*, 2009a) for liquid samples.

After micropollutant quantification in both particulate and aqueous phases, the K_{global} could be calculated and K_{part} and K_{DCM} estimated from K_{global} dependency on the DCM concentration in each sludge sample (Barret *et al.*, 2009a).

Sample preparation prior to sludge characterization. Depending on the characterization analyses involved, different preparation steps were carried out (Figure III-18, Supporting Information). The method for separation of particles from the aqueous phase (the latter containing the DCM) was the same as that used for micropollutant analysis (Barret *et al.*, 2009a). Dry matter (DM), organic/volatile matter (OM), carbohydrates, proteins and chemical oxygen demand (COD) were analysed in total sludge and in the DCM fraction, which made it possible to calculate particle characteristics.

For lipids and organic carbon (OC) quantification, a sludge fraction was freeze-dried and ground to 1mm. For density analysis of the total and mineral sludge fractions, drying was necessary at, respectively, 105°C and 550°C.

Sludge chemical characterization. All analyses were performed in triplicate. The DM was measured by weighing the sample after heating at 105°C for 24 h and the OM after heating at 550°C for 2h. The carbohydrates and proteins were respectively analysed in accordance with Lowry (Lowry *et al.*, 1951) and anthrone (Dreywood, 1946) methods, using bovine serum albumin (BSA) and glucose (Glu) as standards. The COD was determined with Merck Spectroquant kits, in accordance with the ISO 15 705. The OC in both aqueous and solid samples was performed with a TOC-V_{CSN} analyser (Shimadzu). The lipid content in particles was defined as the matter extractible with petroleum ether (PEEM) at 70 bars and 105°C with an Accelerated Solvent Extractor (Dionex). In DCM, the concentrations of volatile fatty acids (VFAs) acetate, propionate, iso-butyrate, butyrate, iso-valerate and valerate were determined by gas chromatography (Varian GC 3900). According to their size and hydrophilicity, VFAs were assumed not to interact directly with micropollutants. Hence, their contributions to dissolved and colloidal COD and OC were subtracted. As organic carbon is the common reference for micropollutant sorption (Karickhoff *et al.*, 1979; Raber & Kogel-Knabner, 1997; Holbrook *et al.*, 2004; Ivashechkin *et al.*, 2004; Arias-Estevéz *et al.*, 2007), all concentrations were finally expressed per gram of particulate organic carbon (POC) or per gram of dissolved and colloidal organic carbon (DCOC) in the same way as K_{part} and K_{DCM} were expressed as mL/g_{POC} and mL/g_{DCOC} respectively.

Sludge physical characterization. The particle diameter d_{50} was taken as the diameter dividing the particles into two populations (50% in volume of the measured particles have a diameter below d_{50}), each population accounting for the same volume of particles. It was determined by triplicate measurements with a Beckman Coulter LS230 laser granulometer. Density analysis of the total dry matter (ρ_{total}) and of the total mineral dry matter (ρ_{min}) was carried out with an Ultra Pycnometer 1000 apparatus using nitrogen. Organic matter density (ρ_{org}) was deduced from ρ_{total} and ρ_{min} according to a law of mixture (Ruiz *et al.*, 2007). Since ρ_{org} , ρ_{total} and ρ_{min} were determined on total sludge, these parameters were used for both particle and DCM characterization.

DCM was characterized on the basis of size fractionation. The fraction below 0.1 μm was obtained by filtration with a PVDF membrane (Millipore). Ultrafiltration was carried out in an Amicon ultrafiltration cell (Millipore) to yield the fractions below 10 kDa and 1 kDa, using regenerated cellulose membranes. The COD of each filtrate/ultrafiltrate was measured in duplicate. The distribution of COD between fraction F1 (from 0.1 to 1.2 μm), F2 (between 10 kDa and 0.1 μm), F3 (between 1 and 10 kDa) and F4 (below 1 kDa) was calculated by subtraction.

PLS regression. The partial least-squares (PLS) regression is based on constructing PLS factors by minimizing the covariance between the dependant variable (Y block) and the explicative variables (X block). The prediction of Y block is then calculated with a linear regression on the X block using the software R version 1.2.2 and by using PLS functions developed elsewhere (Durand). These functions have been designed to deal with roughly-correlated explicative variables (Wold *et al.*, 1983). The number of PLS factors (dimension, dim) of the models was determined by minimizing the mean squared predictions error

(Predicted REsidual Sum of Squares, PRESS) through a leave-one-out cross-validation procedure.

This PLS regression technique was first used to model K_{part} . In this case, X block was composed of sludge particle characteristics (Tableau III-2) and of micropollutant characteristics (Tableau III-3), and Y block consisted of the K_{part} measured values. Then, the K_{DCM} model was obtained with X block composed of the sludge DCM characteristics (Tableau III-2) and micropollutant characteristics (Figure III-3), and Y block of the K_{DCM} measurements.

For model validation, individuals from the fifth sludge sample (TTDSS), with non-determined predictors, were considered. A free version of Unscrambler 9.6 software was used to deal with the lacking data. Indeed, when the PLS regression was first performed on individuals with no data lacking, PLS factors were determined and expressed as a function of all predictors. Such linear combinations establish relationships between the predictors. They enable estimates to be made of the non-determined predictors from the determined predictors. Hence, by applying the models of K_{part} and K_{DCM} as a function of all variables, the constants could be predicted for the validation individuals and then compared to the measured values.

III.3.1.3 Results & Discussion

Influence of biological treatment on sludge characteristics. The characteristics of PS, SS and DSS (Tableau III-2) make it possible to compare the impact of a physical (PS), an aerobic biological (SS) and an anaerobic biological treatment process (DSS). Since we sampled SS in a WWTP with a very short retention time, this sludge was hardly stabilized and did not differ greatly from PS in terms of its OC, oxidation state (g_{O_2}/g_{OC}) and physical characteristics. However, we found that DSS was chemically very different from PS and SS, especially in terms of the OC content. This is consistent with the literature since anaerobic digestion has been shown to reduce the OC content on account of the mineralization of matter (Schievano *et al.*, 2008). We also recorded a decrease in the overall carbohydrate and lipid content attributable to their use as substrates supporting anaerobic microbial growth. In addition, we have shown that anaerobic treatment increased the particulate protein content. Indeed proteins are substrates for anaerobic microorganisms but also products of biological reaction. They are the major cellular constituent synthesized during cell division and they are present in great proportion in exopolymeric substances.

PS and SS particles are made up of large entities, since their d_{50} value is close to 100 μm . The anaerobic digestion process decreased the particle size, due to the consumption of matter and to mixing during the process, resulting in a d_{50} of 19 μm . Among DCM fractions, entities below 1 kDa predominate in PS and SS whereas they are in the minority in DSS. Indeed, the smaller-sized fraction may be more readily bioaccessible to microorganisms; this would explain their preferential removal during anaerobic digestion.

Taken as a whole, PS and SS characteristics were very similar while, on contrast, DSS exhibited important differences.

Tableau III-2 : Particles and DCM characteristics.

	DM		OC	OM		COD	Carbohydrates		Proteins	Lipids		d ₅₀	ρ _{total}	ρ _{org}	ρ _{min}
	g _{DM} /L	g _{OC} /g _{DM}		g _{OM} /g _{POC}	g _{OC} /g _{POC}		g _{eqGlu} /g _{POC}	g _{eqBSA} /g _{POC}		g _{PEEM} /g _{POC}	μm				
PARTICLES	PS	33.6 ± 0.9	0.472 ± 0.003	1.64 ± 0.01	3.18 ± 0.12	0.43 ± 0.05	0.62 ± 0.04	0.32 ± 0.01	95 ± 3	1.55 ± 0.01	1.30 ± 0.01	2.63 ± 0.01			
	SS	29.9 ± 0.8	0.419 ± 0.008	1.71 ± 0.03	3.29 ± 0.09	0.60 ± 0.06	0.80 ± 0.01	0.31 ± 0.01	117 ± 5	1.51 ± 0.01	1.30 ± 0.01	2.71 ± 0.01			
	DSS	8.2 ± 0.2	0.304 ± 0.006	1.65 ± 0.01	2.95 ± 0.09	0.21 ± 0.01	1.30 ± 0.07	0.23 ± 0.01	19 ± 2	1.81 ± 0.01	1.34 ± 0.01	2.93 ± 0.01			
	TTSS	24.4 ± 0.8	0.427 ± 0.009	1.52 ± 0.03	3.21 ± 0.16	0.55 ± 0.09	0.56 ± 0.04	0.46 ± 0.03	100 ± 3	1.55 ± 0.01	1.32 ± 0.01	3.13 ± 0.01			
	TTDSS	6.0 ± 0.2	0.272 ± 0.008	ND	2.89 ± 0.10	ND	1.14 ± 0.08	ND	ND	ND	ND	3.02 ± 0.01			
DCM	DM*	g _{DM} /L	g _{DOC} /g _{DM}	g _{OM} /g _{DOC} *	g _{OC} /g _{DOC} *	g _{eqGlu} /g _{DOC} *	g _{eqBSA} /g _{DOC} *	g _{VFA} /g _{DOC} *	% _{DOC} *	F1	F2	F3	F4		
	PS	4.4 ± 0.1	0.225 ± 0.009	3.31 ± 0.07	3.30 ± 0.03	0.33 ± 0.02	1.10 ± 0.01	2.37 ± 0.02	0 ± 7	9 ± 7	4 ± 2	88 ± 1			
	SS	7.3 ± 0.1	0.248 ± 0.006	3.22 ± 0.06	3.15 ± 0.05	0.20 ± 0.01	1.22 ± 0.05	1.70 ± 0.01	3 ± 4	3 ± 4	4 ± 1	90 ± 1			
	DSS	1.0 ± 0.1	0.172 ± 0.004	3.35 ± 0.07	3.25 ± 0.09	0.52 ± 0.01	1.15 ± 0.03	nd	26 ± 5	17 ± 6	52 ± 5	5 ± 1			
	TTSS	12.5 ± 0.1	0.283 ± 0.030	3.08 ± 0.11	3.49 ± 0.03	0.27 ± 0.01	1.89 ± 0.02	0.90 ± 0.07	2 ± 4	20 ± 4	30 ± 2	48 ± 1			
TTDSS	1.0 ± 0.1	0.155 ± 0.009	ND	3.06 ± 0.04	ND	ND	nd	nd	ND	ND	ND	86 ± 1			

The characteristics used as predictors are indicated in bold. Since ρ_{total}, ρ_{org} and ρ_{min} were measured on total sludge, these predictors gather the characteristics of particles and DCM; Mean 3 or 4 values ± standard deviation; * : the OC and COD content of VFAs was subtracted from COD in fraction 4 and from the overall OC and COD of DCM, since micropollutants sorption to VFAs is assumed not to occur; nd : not detectable; ND : not determined; F1: percentage of COD between 0.1 and 1.2 μm; F2: between 10 kDa and 0.1 μm; F3: between 1 and 10 kDa and F4: below 1 kDa.

Influence of biological treatment on micropollutant sorption to sludge. The tendency observed for the characteristics of PS / SS / DSS was also revealed by their sorption ability. Indeed, the logarithms of K_{part} and K_{DCM} for PAHs, NP and PCBs (Figure III-15) are quite similar for PS and SS, except for very hydrophobic PCBs. Moreover, we found that the equilibrium constants of sorption to DSS are higher than for PS and SS, with one logarithmic unit difference. This higher sorption ability is the consequence of matrix transformation during anaerobic digestion, in particles as well as in DCM. However, such an effect had not previously been observed for more hydrophilic micropollutants such as carbamazepine, ibuprofen, naproxen and iopromide (Carballa *et al.*, 2008). Our results thus suggest that anaerobic treatment enhances the proportion of hydrophobic material responsible for the sorption of hydrophobic micropollutants.

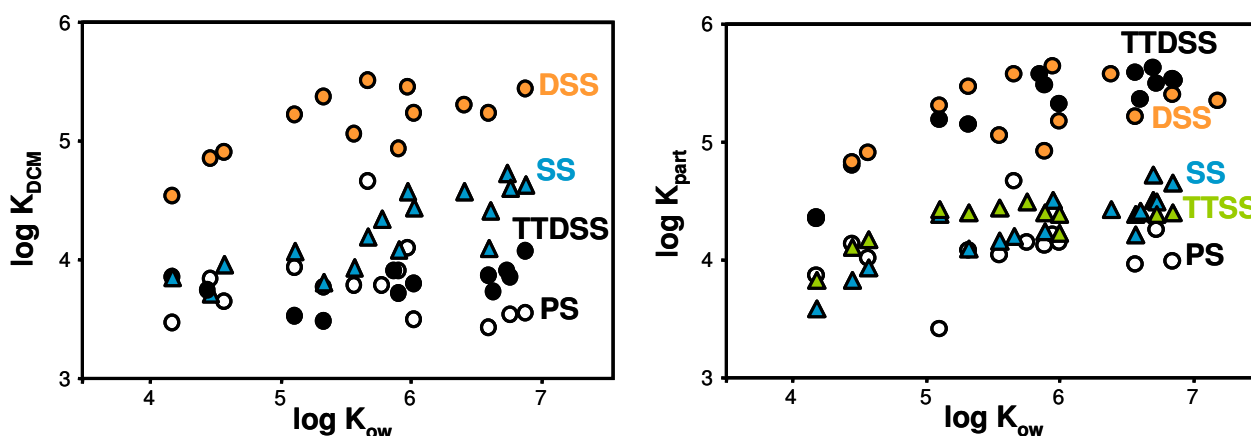


Figure III-15 : $\log K_{\text{DCM}}$ and $\log K_{\text{part}}$ as a function of micropollutants hydrophobicity for PS (white dots), SS (blue triangles), DSS (orange dots), TTSS (green triangles) and TTDSS (black dots). The raw data are presented in Tableau III-5 (Supporting Information).

Influence of thermal treatment on sludge characteristics. The thermal treatment caused the partial desintegration of sludge particles : d_{50} value decreased from 117 μm in SS to 100 μm in TTSS (Tableau III-2). In addition, by far the largest part of DCM in SS (90%) was below 1 kDa, while a greater release of exopolymers with high molecular weight increased the proportion of higher molecular weight DCM (mainly F2 and F3) in TTSS. This desintegration was concomitant to the solubilization of COD, proteins and carbohydrates, the most highly solubilized component being proteins. As a consequence, we observed a decrease of the protein and carbohydrate content in particles whereas the lipid concentration increased. These observations are consistent with the literature (Eskicioglu *et al.*, 2006; Aquino *et al.*, 2008; Bougrier *et al.*, 2008), which ensures the transferability of our results.

Influence of thermal treatment on micropollutant sorption to sludge. Surprisingly, the DCM concentration no longer influenced the partitioning of indeno(1,2,3,c,d)pyrene between the particles and the aqueous phase after thermal treatment (Figure III-16), and this was the case for all micropollutants (data not shown). Indeed, the experimental K_{global} variations observed in TTSS were randomly distributed around the average, contrary to SS,

where the experimental points followed a strong decreasing tendency (Figure III-16). Moreover, the relative standard deviation among the experimental values of K_{global} was about 10% for TTSS in contrast to 60% for SS, suggesting that experimental errors might account for the differences observed in TTSS. We concluded that K_{DCM} was below our detection limit. To our knowledge, this is the first evidence of such a strong impact of thermal treatment on micropollutant sorption.

Since K_{DCM} was undetectable, K_{DCM} values for TTSS have not been plotted on Figure III-15 nor could they be included in further data exploitation. Also, K_{part} was identified as the average of the eight K_{global} values. We found that these K_{part} values were slightly higher than in SS, resulting from the matrix differences previously discussed.

Although no interaction of sorption between DCM and micropollutants could be detected after sludge thermal treatment, the sorption ability of DCM was retrieved after subsequent anaerobic digestion (Figure III-15, TTDSS). Making this result as a basis, the denaturing effect of thermal treatment is not irreversible. Nonetheless, the affinity of micropollutants for DCM in TTDSS was lower than in DSS, and was similar to SS and PS, which does suggest that denaturing would not be totally reversible.

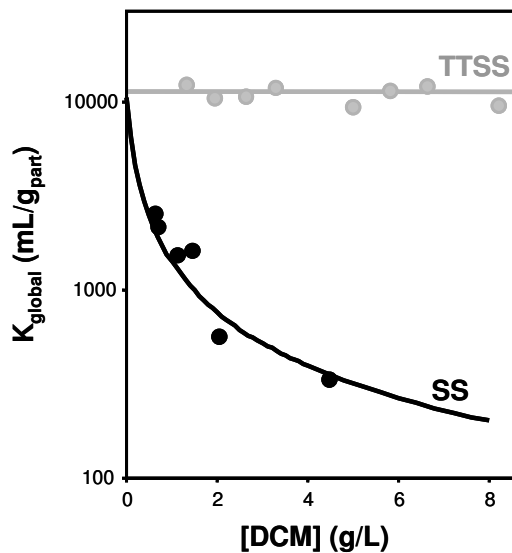


Figure III-16 : Experimental (dots) and modeled (curve) K_{global} as a function of DCM concentration in SS (black) and TTSS (grey) for indeno(1,2,3,c,d)pyrene.

K_{part} and K_{DCM} models. The PLS regression permitted the estimating of the coefficients necessary to express the log K_{part} and log K_{DCM} as a function of sludge and micropollutant characteristics:

$$\begin{aligned} \log K_{part} = & -9.67 + 0.124 \log K_{ow} + 0.00085M + 0.0091 \log s - 0.125n5C - 0.0077n6C \\ & + 0.046nCl + 0.18nOH + 0.705OM - 0.165COD + 0.136Carbohydrates + 0.486Proteins \\ & - 0.334Lipids - 0.0013d_{50} + 0.533\rho_{total} + 7.27\rho_{org} + 0.696\rho_{min} \end{aligned}$$

(PRESS=0.19, dim=4)

$$\log K_{DCM} = 2.88 + 0.0633 \log K_{ow} + 0.00118M - 0.0190 \log s - 0.0323n5C - 0.0068n6C \\ + 0.0264nCl - 0.0254nOH + 0.0083OM - 1.027COD + 0.290Carbohydrates + 1.606Proteins \\ - 0.105\Sigma.10 + 0.0079F1 + 0.0064F2 + 0.0036F3 - 0.0020F4 + 0.814\rho_{min}$$

(PRESS=0.22, dim=2)

To perform these regressions, 59 and 46 individuals were taken into account for, respectively, $\log K_{part}$ and $\log K_{DCM}$ (Tableau III-5, Supporting Information). The regression coefficients R^2 reached 0.81 and 0.82, respectively. To assess the significance of the PLS coefficients, we estimated them with 6 independent sets of individuals. The 6 sets were randomly selected among the data. Each set represented 70% of the total number of individuals: 41 and 32 individuals for, respectively, K_{part} and K_{DCM} . From the 6 values obtained for each coefficient, their interval of 95% confidence was determined (Figure III-17). Thus, it was found that only 3 coefficients among 16 (for K_{part}) and 5 among 17 (for K_{DCM}) were not statistically different from zero. For K_{part} , these coefficients were associated with carbohydrate content in sludge particles and, in the micropollutants, to the solubility and number of six-carbon cycles. For K_{DCM} , they were associated to the organic matter in sludge DCM and, in the micropollutants, to the solubility, the number of five- and six-carbon cycles and the number of hydroxyl groups.

The models obtained can be used for prediction. Indeed, they make it possible to predict the sorption equilibrium constants of a given micropollutant within a characterized sludge matrix. The models also give information about the relative weight of each predictor. Their weight can be compared by considering the regression coefficients relative to centered and reduced predictors (Figure III-17). The first observation that can be made is the higher weight of sludge predictors in comparison to micropollutant predictors. A predictive model based on a single characteristic of micropollutants ($\log K_{ow}$) had previously been established in soils (Karickhoff *et al.*, 1979). Our results show that this method is not reliable in sludge. Although the influence of some of the parameters discussed below had already been reported, we classified such parameters, along with new ones, by order of weight for the first time. This new result has enabled us to identify the driving mechanisms at work.

Weight of sludge predictors. The sludge chemical predictors common to particles and DCM had the same strong influence on K_{part} and K_{DCM} . Indeed, we showed that the protein content, which is an indicator of exopolymeric substance content, favours micropollutant sorption to both particles and DCM (Figure III-17). We also found that the degree of oxydation of the matter played an important role: the lower the COD (g_{O_2}/g_{OC}) value, the more oxidized and condensed the matter and the higher the sorption. This might also be linked to the organic matter's higher density. All these parameters concern the transformation of sludge matter during biological treatments: the organic matter is humified and stabilized and its aromaticity increases (Bartoszek *et al.*, 2008), leading to enhanced sorption of organic pollutants (Yamamoto *et al.*, 2003). Therefore, the chemical indicators of biological transformation are relevant indicators of micropollutant sorption.

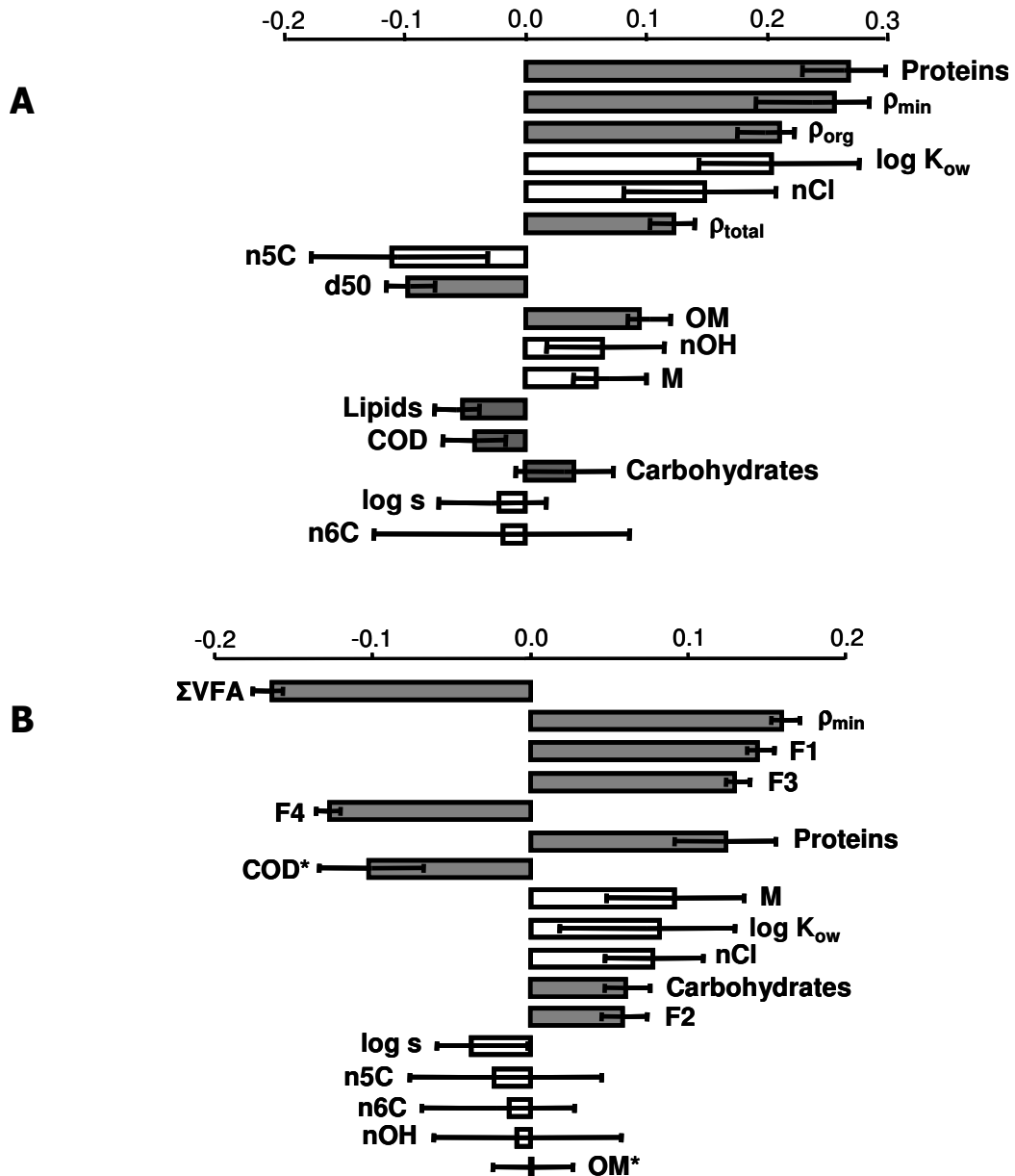


Figure III-17 : Centered and reduced regression coefficients of the predictors for $\log K_{part}$ (A) and for $\log K_{DCM}$ (B). The sludge predictors are indicated in grey, the micropollutants predictors in white. The error bars represent the interval of 95% confidence based on six independent estimates of the coefficients. These estimates were carried out on six sets of randomly selected individuals, each set representing 70% of the total individuals (41 and 32 individuals for, respectively, K_{part} and K_{DCM}).

Among the physical parameters of sludge, we found that the mineral density is the most influential. High ρ_{min} implies high sorption equilibrium constants, for both particles and DCM. ρ_{min} variations are related to different pools of cations. For example, magnesium is denser than calcium, sodium and potassium (Weast & Selby, 1966). In addition, precipitation phenomena during thermal lysis may also account for ρ_{min} variations. Cations play a major role in floc structuration (Park *et al.*, 2006) and in floc surface charge (Keiding & Nielsen,

1997). As anions interact with cations, they indirectly influence floc structuration. As a result, variations in mineral composition can profoundly influence particle properties. Since these properties impact on the sorption ability of particles (Finlayson *et al.*, 1998), the influence of ρ_{\min} on equilibrium constants revealed by our results is not surprising. Nonetheless, the measurement of density is unusual in characterizing sludge. Here, we demonstrate that this original parameter is highly relevant to sludge characterization, especially when studying sorption.

We have shown that particle granulometry moderately influences micropollutant sorption, with a centered and reduced coefficient of about -0.1 for d_{50} . When d_{50} decreases, the particles' specific area of exchange increases, resulting in a higher number of accessible sorption sites. Such an effect has been previously reported (Ivashechkin *et al.*, 2004). Nevertheless, we found the influence of d_{50} was weak in comparison to other predictors. This might be explained by the very low micropollutant concentrations used for the experiments. Such low concentrations would guarantee a large surplus of accessible sorption sites in comparison to the amount of micropollutants.

We found that the high molecular weight fractions of DCM (F1, F2, F3) have a positive effect on K_{DCM} , with a stronger influence for F1 and F3. Indeed, the affinity of micropollutants is known to increase with DCM molecular weight (Raber & Kogel-Knabner, 1997) because the presence of intramolecular hydrophobic environments resulting from three-dimensional foldings is probably favoured in large molecules. Here, the fraction below 1 kDa exhibits a negative effect because it may be poor in hydrophobic sites. However, this does not prove that no interaction occurs at all: some micropollutants have been shown to interact with DCM below 1 kDa (Raber & Kogel-Knabner, 1997). This kind of interaction probably involves amphoteric molecules organized around the micropollutants. The affinity of micropollutants for this DCM fraction might be weaker than for other fractions, which would explain the negative sign for this predictor. Although the VFAs, in which acetate and propionate account for 70% of the COD, also exhibited a strong negative coefficient, interactions of an amphoteric type are doubtful in view of their high hydrophilicity. Other indirect interaction is more likely to explain the influence of VFAs.

Weight of micropollutant predictors. The micropollutant characteristics had a secondary but important influence. We showed that the equilibrium constants rise with increasing $\log K_{\text{ow}}$, which is a widely reported result (Karickhoff *et al.*, 1979; Dionisi *et al.*, 2006; Arias-Estevez *et al.*, 2007). However, when micropollutants from different families are taken into account, their $\log K_{\text{ow}}$ is not sufficient to explain the sorption differences between them (Langford *et al.*, 2005a). Here, other characteristics such as the molar mass and the number of chlorines were found to increase both sorption constants, and the number of five carbon cycles exhibited the opposite effect. The set of characteristics selected in this work thus provides some descriptive information lacking with only $\log K_{\text{ow}}$.

Model validation. A validation step was carried out on TTDSS to test the models obtained. Sludge characterization was minimized. Three predictors were selected according to their weight in the model and to technical factors: COD, proteins and ρ_{\min} for particles, and COD, VFAs and F4 for DCM.

The log K_{part} and log K_{DCM} of PAHs were determined in the TTDSS. The distribution of the errors between the predicted and the measured values is presented in Figure III-19 (Supporting Information). The highest error was about half a log for both K_{part} and K_{DCM} , and 75% of the predicted values exhibited absolute errors below 0.4. K_{part} was slightly underestimated and K_{DCM} overestimated, with mean errors of -0.28 and +0.29, respectively. The overestimation of K_{DCM} might have been due to the persistence of thermal denaturing mentioned in section 3.2. Nevertheless, these errors are similar to the prediction errors of the individuals included in the model (Figure III-19) and they remain within the range of the measurement errors encountered in the study of micropollutant sorption in environmental samples (Gerstl, 1990; Krauss & Wilcke, 2005; Dionisi *et al.*, 2006; Barret *et al.*, 2009a). In conclusion, the predictions were satisfactory in the light of performances and they validate our models. Moreover, we carried out very few number of sludge analyses prior to these predictions. This highlights the robustness and reliability of the K_{part} and K_{DCM} models proposed here, qualities which should enable them to be easily and widely used.

III.3.1.4 Supporting information

Chemicals. All solvents were purchased from J.T.Baker. Powders of the PAHs and PCBs studied (listed in Tableau III-3) were obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH. Each compound was separately dissolved in dichloromethane at 1 g/L. The pure 4-nonylphenol (NP) isomer mixture was purchased from Interchim. It was diluted in hexane to reach 40 g/L. The spiking mix for sorption experiments was prepared from these individual concentrated solutions, to obtain the final concentration of 100 mg/L of each compound except for indeno(1,2,3,c,d)pyrene (20 mg/L) and nonylphenol (2 g/L).

Standard solutions of PAHs, PCBs, tetrachloronaphtalene (TCN) and NP were provided by Dr. Ehrenstorfer GmbH. For quantification, they were diluted as follows to obtain 6 calibration levels: for PAHs, from 10 to 1 000 $\mu\text{g/L}$ in acetonitrile; for PCBs, from 100 to 1 000 $\mu\text{g/L}$ in dichloromethane; and for NP, from 500 to 5 000 $\mu\text{g/L}$ in hexane. All solutions were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tableau III-3 : Physicochemical characteristics of the PAHs, NP and PCBs.

Compound	log K _{ow}	M (g/mol)	log s	n5C	n6C	nCl	nOH
Fluorene	4.18	166	0.301	1	2	0	0
Phenanthrene	4.57	178	0.079	0	3	0	0
Anthracene	4.45	178	0.114	0	3	0	0
Fluoranthene	5.1	202	-0.585	1	3	0	0
Pyrene	5.32	202	-0.886	0	4	0	0
Benzo(a)anthracene	5.85	228	-1.959	0	4	0	0
Chrysene	5.89	228	-2.699	0	4	0	0
Benzo(b)fluoranthene	6.57	252	-1.921	1	4	0	0
Benzo(k)fluoranthene	6.84	252	-3.097	1	4	0	0
Benzo(a)pyrene	6.00	252	-2.523	0	5	0	0
Dibenzo(a,h)anthracene	6.70	278	-3.301	0	5	0	0
Benzo(g,h,i)perylene	6.73	276	-3.523	0	6	0	0
Indeno(1,2,3,c,d)pyrene	6.60	276	-1.208	1	5	0	0
Nonylphenol	5.76	220	0.778	0	1	0	1
PCB 28	5.66	257	-0.64	0	2	3	0
PCB 52	5.95	292	-0.904	0	2	4	0
PCB 101	6.38	327	-1.475	0	2	5	0
PCB 118	6.65	327	-1.575	0	2	5	0
PCB 138	7.19	364	-2.137	0	2	6	0
PCB 153	6.86	364	-1.959	0	2	6	0
PCB 180	7.15	399	-2.167	0	2	7	0

s: solubility in water (mg/L); *n5C*: number of five carbon rings; *n6C*: number of six carbon rings; *nCl*: number of chlorines; *nOH*: number of hydroxyl substitutions

Tableau III-4 : MS program for PCBs quantification after gas chromatography separation.

Compound	Retention time <i>min</i>	Identification and quantification ion <i>m/z</i>	Confirmation ion <i>m/z</i>
PCB 28	14.8	256	258
PCB 52	15.8	220	292
TCN	16.2	264	266
PCB 101	18.9	254	326
PCB 138	21.9	290	360
PCB 153	22.9	290	360

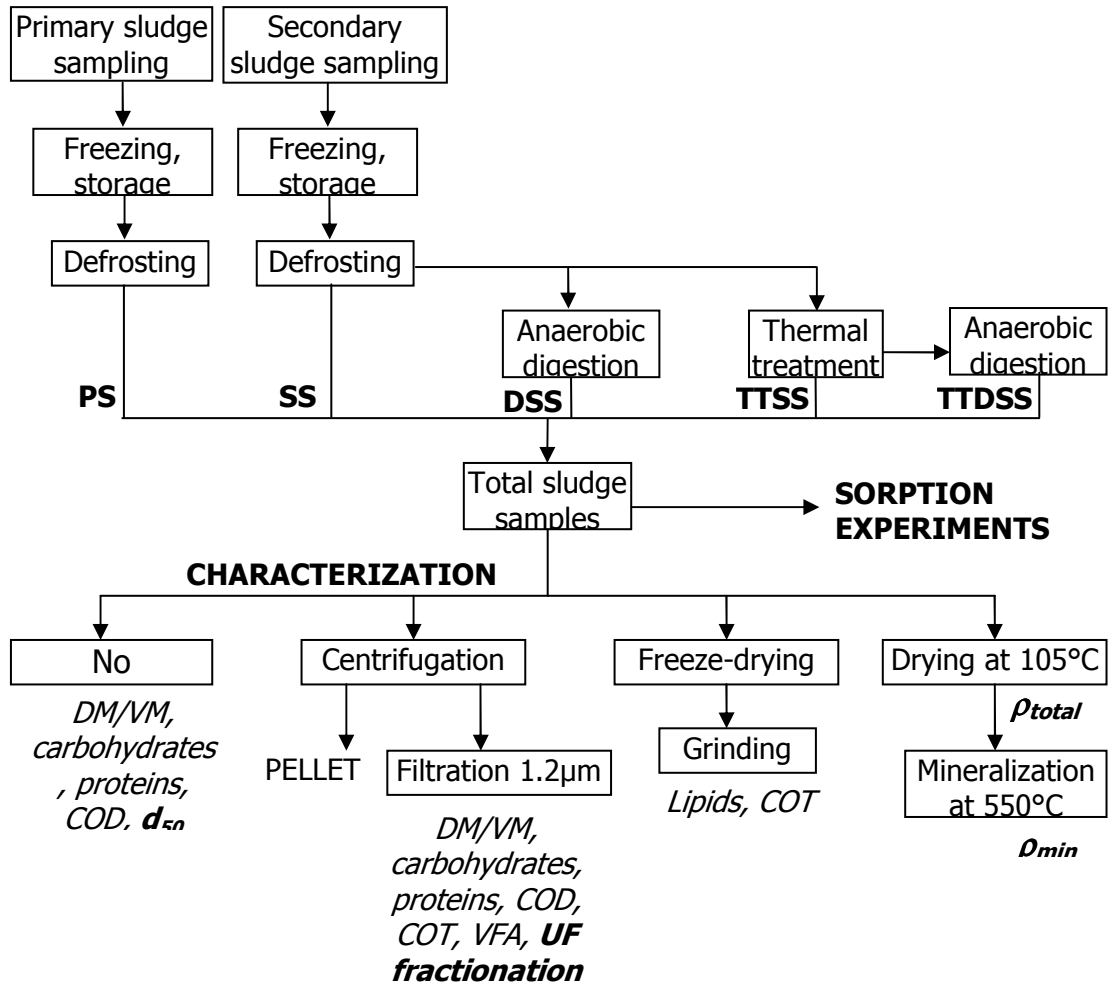


Figure III-18 : Sludge sample preparation steps (in box) prior to sorption experiments and characterization. Chemical analyses are in italic only whereas physical analyses are in bold italic.

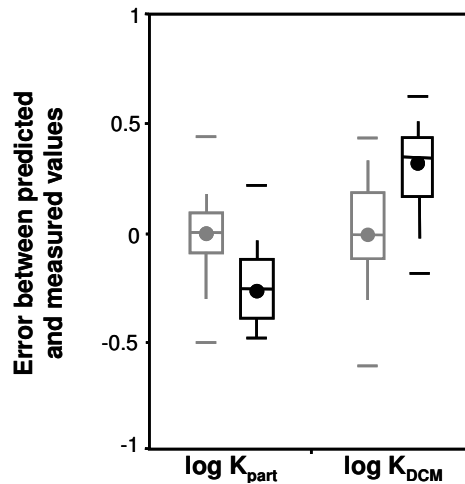


Figure III-19 : Box-whisker plots illustrating the dispersion of errors between predicted and measured values of K_{part} and K_{DCM} for the individuals included in regression (grey) and for those used for validation (black). Symbols represent maximum (upper —), mean (•) and minimum (lower —), box shows 75th percentile (top line), 50th percentile (middle line) and 25th percentile (bottom line), and whiskers show 90th and 10th percentile (upper and bottom whiskers).

Tableau III-5 : log K_{part} and log K_{DCM} values for PAHs, NP and PCBs in the five sludge samples.

	PS		SS		DSS		TTSS		TTDSS	
	log K _{part}	log K _{DCM}	log K _{part}	log K _{DCM}	log K _{part}	log K _{DCM}	log K _{part}	log K _{DCM}	log K _{part}	log K _{DCM}
Fluorene	3.9	3.5	3.6	3.8	4.4	4.5	3.8	ld	4.3	3.8
Phenanthrene	4.0	3.6	3.9	4.0	4.9	4.9	4.2	ld	nm	nm
Anthracene	4.1	3.8	3.8	3.7	4.8	4.8	4.1	ld	4.8	3.7
Fluoranthene	3.4	3.9	4.4	4.1	5.3	5.2	4.4	ld	5.2	3.5
Pyrene	4.1	3.8	4.1	3.8	5.5	5.4	4.4	ld	5.1	3.5
Benzo(a)anthracene	4.0	3.8	4.2	3.9	5.1	5.1	4.4	ld	5.6	3.9
Chrysene	4.1	3.9	4.2	4.1	4.9	4.9	4.4	ld	5.5	3.7
Benzo(b)fluoranthene	4.0	3.4	4.2	4.1	5.2	5.2	4.4	ld	5.6	3.9
Benzo(k)fluoranthene	4.0	3.5	4.6	4.6	5.4	5.4	4.4	ld	5.5	4.1
Benzo(a)pyrene	4.1	3.5	4.4	4.4	5.2	5.2	4.2	ld	5.3	3.8
Dibenzo(a,h)anthracene	nm	nm	4.7	4.7	nm	nm	4.5	ld	5.6	3.9
Benzo(g,h,i)perylene	4.3	3.5	4.5	4.6	nm	nm	4.4	ld	5.5	3.8
Indeno(1,2,3,c,d)pyrene	nm	nm	4.4	4.4	nm	nm	4.4	ld	5.4	3.7
Nonylphenol	4.1	3.8	4.5	4.3	nm	nm	nm	ld	nm	nm
PCB 28	4.7	4.7	4.2	4.2	5.6	5.5	nm	ld	nm	nm
PCB 52	4.2	4.1	4.5	4.6	5.6	5.5	nm	ld	nm	nm
PCB 101	nm	nm	4.4	4.6	5.6	5.3	nm	ld	nm	nm
PCB 138	nm	nm	nm	nm	5.3	4.9	nm	ld	nm	nm
PCB 153	nm	nm	nm	nm	5.5	5.1	nm	ld	nm	nm

nm : not measured ; ld : below detection limit

III.3.2 Discussion

D'importantes différences de répartition entre les compartiments ont été observées inter-HAP lors du travail exposé dans le paragraphe III.2. Ici, les variations inter-boue ont pu être appréciées.

La digestion anaérobie a pour effet d'augmenter l'affinité des CTOs à la fois pour les particules et pour la DCM, du fait des modifications subies par la matière organique. Ce processus biologique engendre aussi une réorganisation de la matière entre compartiments, résultant en une diminution de la DCM : elle est abaissée de 20% de la matière sèche dans SS à 11% dans DSS. De ce fait, la proportion de CTOs libres et de CTOs sorbés à la DCM diminuent toutes deux, entraînant une diminution de la fraction aqueuse de 10,8 à 6,6% pour le pyrène (Figure III-20).

Le traitement thermique entraîne une chute importante du pourcentage de pyrène aqueux (Figure III-20), alors que la concentration en DCM est augmentée de 7,3 à 12,5 g_{MS}/L. Cette forte diminution est principalement due à l'absence de sorption à la DCM, et elle est légèrement accentuée par une faible augmentation de l'affinité du pyrène pour les particules. Cette perte totale de capacité de sorption de la DCM après thermo-traitement, observée pour l'ensemble des CTOs étudiés, est surprenante. A noter que l'expérience a été conduite à trois reprises, en modifiant la gamme de concentrations de DCM : les résultats convergent, aucune influence de la concentration en DCM sur le partage des CTOs entre particules et phase aqueuse n'a pu être notée.

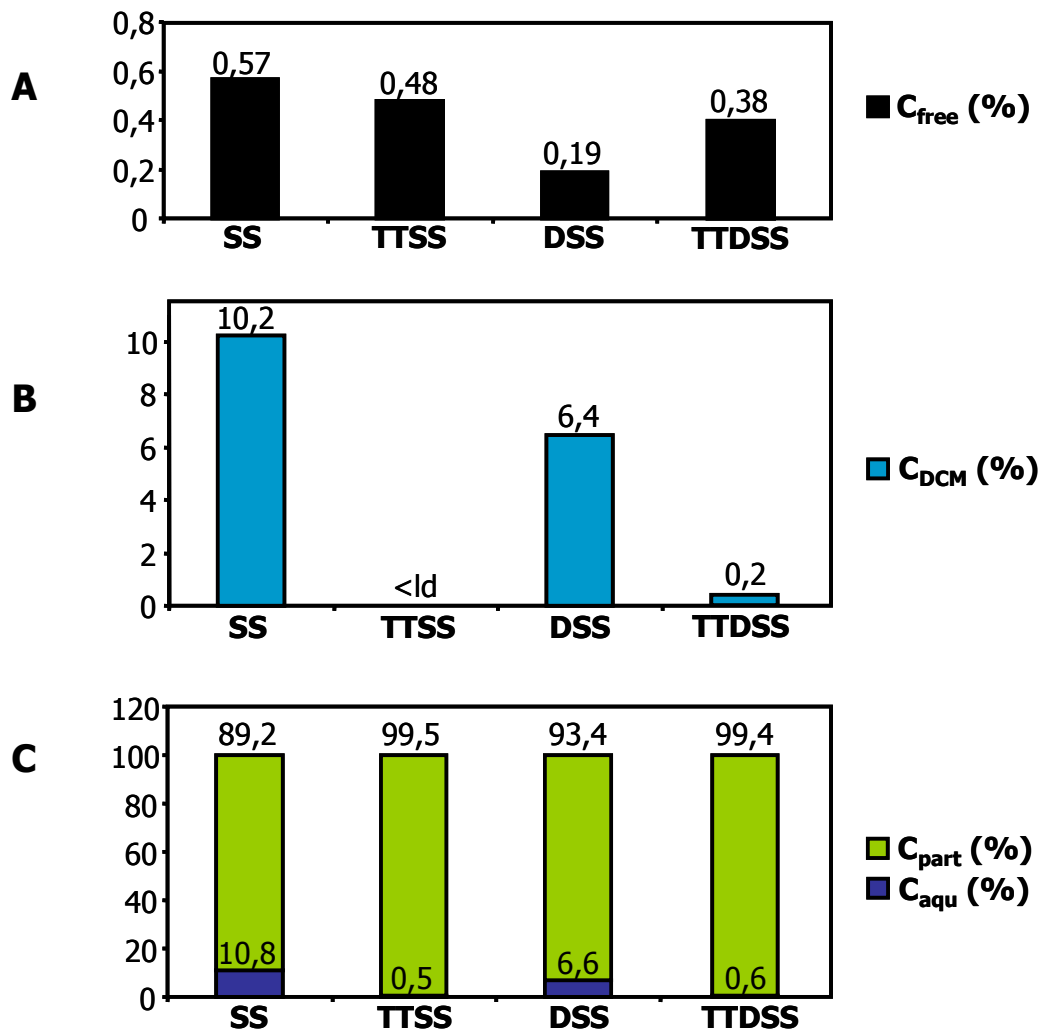


Figure III-20 : Pourcentage de pyrène libre (A) et sorbé à la DCM (B), et répartition du pyrène entre phase aqueuse et particulaire (C) dans les boues SS, TTSS, DSS et TTSS.

ld : limite de détection

L'hypothèse de modification des repliements tridimensionnels avancée pour expliquer ce phénomène est expérimentalement difficile à vérifier compte tenu de la complexité et de la pluralité de la DCM. La mesure de sa distribution de potentiel zeta pourrait apporter des

éléments de réponse. En effet, les interactions d'attraction et de répulsion de charges conditionnent la conformation intra- et inter-moléculaire. Ces interactions modifient aussi la charge surfacique des macromolécules. Un lien existe donc entre potentiel zeta et structure tri-dimensionnelle. Au moyen de cette mesure de potentiel zeta par exemple, la dénaturation de la DCM pourrait être mieux caractérisée en étudiant l'impact de la température et de la durée du traitement.

Toutefois, cette dénaturation par la chaleur n'apparaît pas irréversible, dans le sens où la sorption des CTOs à la DCM a pu être détectée dans la boue traitée thermiquement puis digérée. Durant le processus de digestion anaérobie, 3 phénomènes peuvent expliquer cette récupération de capacité de sorption de la DCM (Figure III-21) :

- (1) La DCM dénaturée a subi une certaine agitation mécanique, à 55°C durant 15 jours. Cette importante agitation peut permettre la mise en place de nouvelles liaisons inter- et intra-molécules, et la réapparition de sites d'interaction.
- (2) La DCM dénaturée est utilisée comme substrat, et « disparaît » donc du pool de DCM.
- (3) Le métabolisme microbien est associé à l'excrétion d'exopolymères non-dénaturés, qui tendent eux aussi à diminuer la part de DCM dénaturée dans le pool de DCM.

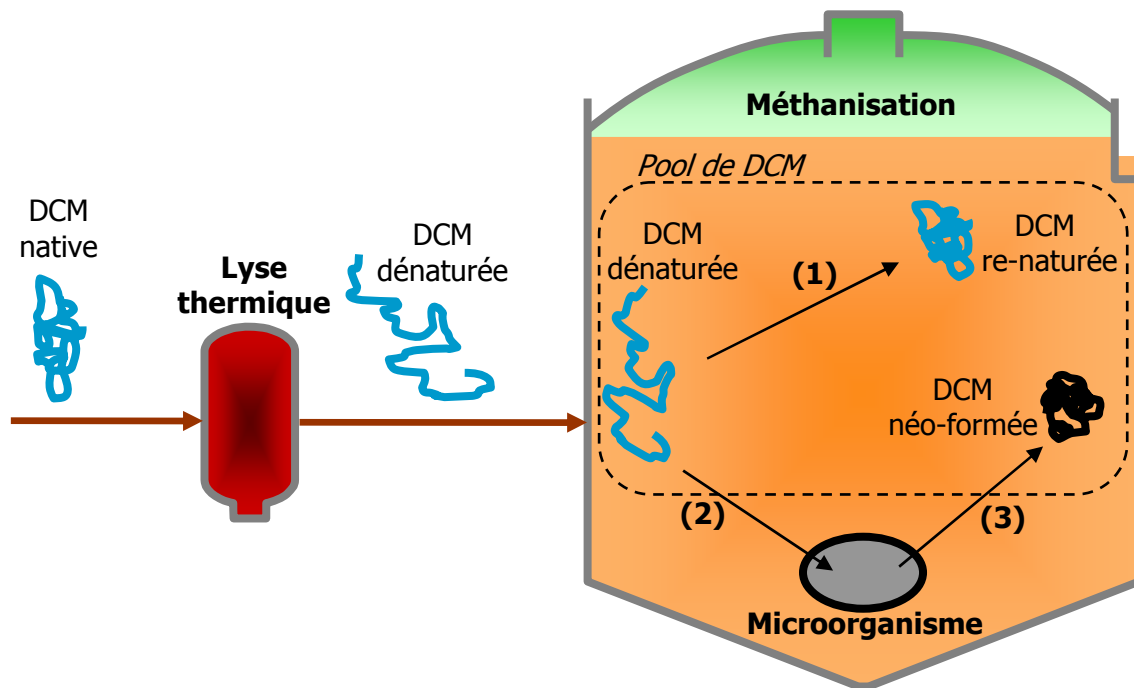


Figure III-21 : Hypothèses de récupération par la DCM de sa capacité de sorption au cours de la digestion anaérobie.

L'affinité des CTOs pour la DCM de la boue TTDSS est cependant plus faible de 1 à 1,7 unités logarithmiques que pour la boue DSS (Figure III-15). Le modèle obtenu prédit lui aussi des valeurs plus faibles que pour DSS, ce qui suggère que cette plus faible affinité est en partie due aux propriétés physico-chimiques de la boue TTDSS. En revanche, la surestimation de $\log K_{DCM}$ (Figure III-19) légèrement supérieure aux erreurs répertoriées

pour les individus inclus dans le modèle (boues PS, SS et DSS) indique que les caractéristiques de boue incluses dans le modèle ne suffisent pas à prédire précisément le comportement de TTDSS. On peut émettre l'hypothèse qu'une partie de la DCM de TTSS n'a pas été re-naturée, et qu'une fraction de DCM dénaturée persiste dans TTDSS : la dénaturation thermique ne serait ainsi pas totalement réversible. Selon cette hypothèse, la caractéristique manquante dans le modèle serait liée au caractère dénaturé (comme le potentiel zeta, par exemple).

Cette étude des équilibres de sorption dans différentes boues nourrit les questionnements relatifs à la biodisponibilité dans les systèmes de digestion anaérobie.

Dans l'hypothèse largement admise « aqueux = biodisponible » (Artola-Garicano *et al.*, 2003; Langford *et al.*, 2005b; Urase & Kikuta, 2005), nos résultats montrent que la digestion anaérobie abaisse le pourcentage de CTOs biodisponibles. Au cours du procédé de digestion anaérobie, la biodégradation susceptible de s'opérer induirait une diminution de la concentration totale en CTOs, et la concentration en CTOs biodisponibles diminuerait d'autant plus. En mode opératoire de type batch, la biodisponibilité des CTOs diminuerait donc au cours du temps, alors qu'en mode continu, elle serait constante mais inférieure. Ainsi, le **mode opératoire batch** pourrait s'avérer favorable à l'élimination des CTOs. Lorsque l'alimentation est pré-traitée thermiquement, le pourcentage de CTOs biodisponibles est sensiblement supérieur après digestion, du fait de la re-naturation de la DCM. Mais si l'abaissement de la concentration totale en CTOs, dû à la biodégradation au cours de la digestion anaérobie, était pris en compte, la concentration en CTOs biodisponibles diminue aussi. Les mêmes conclusions peuvent donc être tirées quant aux conditions opératoires optimales.

Par ailleurs, le **pré-traitement thermique** des boues engendre une diminution de la biodisponibilité des CTOs dans la boue d'alimentation (SS/TTSS, Figure III-20). Le pourcentage de CTOs biodisponibles reste inférieur après digestion aussi, d'un facteur 10 (DSS/TTDSS). Comme il est peu probable que ce facteur 10 soit compensé par des disparités de biodégradation et donc de concentration totale, on peut supposer que la concentration en CTOs biodisponibles est aussi plus faible dans TTDSS par rapport à DSS. Que ce soit en mode batch ou continu, le traitement thermique pourrait donc abaisser les performances d'abattement des CTOs, si l'on admet que leur biodisponibilité est limitante (Chang *et al.*, 2003; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2006; Patureau & Trably, 2006). Mais le pré-traitement conduisant à la solubilisation de matière organique qui s'en retrouve mieux dégradée, on peut supposer que le **cométabolisme** des CTOs pourrait être stimulé par ce pré-traitement, ce qui entraînerait une meilleure dégradation des CTOs. **Deux effets antagonistes** s'opèrent alors. Lequel est prépondérant en relation à l'élimination des CTOs ?

Mais la fraction aqueuse n'est peut-être pas réellement la fraction biodisponible. Il n'est effectivement pas évident qu'un CTO niché dans la cavité hydrophobe formée par les repliements tridimensionnels d'un colloïde de l'ordre de 1 µm de taille soit disponible envers les microorganismes épurateurs, faisant environ cette taille. Une hypothèse selon laquelle le compartiment libre soit biodisponible mais pas le compartiment sorbé à la DCM semble d'aussi bon sens que la précédente : les CTOs libres sont très mobiles et ne sont pas isolés

de leur environnement par la matière à laquelle il sont sorbés. Selon cette hypothèse, le traitement thermique augmenterait la biodisponibilité des CTOs dans les réacteurs continus de digestion anaérobie : 0,18% de pyrène libre dans DSS et 0,38% dans TTDSS (Figure III-20).

De plus, l'hypothèse selon laquelle une fraction de CTOs sorbés aux particules est biodisponible (Fountoulakis *et al.*, 2006) ne peut être *a priori* écartée : les microorganismes se trouvent essentiellement en phase particulaire. Un CTO sorbé dans le voisinage très proche d'un microorganisme pourra probablement traverser la paroi de celui-ci et être métabolisé. Mais s'il se trouve sorbé trop loin du microorganisme, il ne pourra probablement pas être absorbé. Ce problème pourrait être abordé selon une approche statistique : quelle est la probabilité qu'un CTO sorbé aux particules se trouve assez proche d'un microorganisme pour traverser sa paroi, si tant est que le transport soit possible avec ce microorganisme ? Cette probabilité est-elle négligeable ou bien du même ordre que la probabilité qu'un CTO libre et donc mobile rencontre un microorganisme capable de l'absorber ? Beaucoup de données manquent pour répondre à ces questions de manière mathématique.

Le couplage d'approches chimique et physique pour la caractérisation poussée des boues d'épuration a permis de relier les constantes d'équilibre de sorption des CTOs aux caractéristiques des boues et des CTOs. Deux modèles ont été obtenus qui décrivent les valeurs expérimentales de manière satisfaisante. Ils font appel à de nombreuses caractéristiques (16 et 17 prédicteurs), qui constituent autant de mesures.

Les modèles ont été établis pour une certaine gamme de chaque prédicteur : ils sont *a priori* valides dans l'espace défini par ces gammes. Hors de cet espace, utiliser ces modèles relève de l'extrapolation, et n'est donc pas fiable. L'hypothèse de corrélation linéaire entre K_{part}/K_{DCM} et leurs prédicteurs respectifs renforce le caractère local de ces modèles. Il ne sera donc pas recommandé de les appliquer dans des sols, par exemple. Par contre, les échantillons de boue utilisés pour la construction des modèles sont relativement variés, dans le référentiel des boues, ce qui garantit une certaine généralité du modèle dans ce référentiel.

Dans les modèles établis, les caractéristiques des boues se sont révélées être les paramètres les plus influents. Parmi ces paramètres, l'influence de certains avait été précédemment mentionnée dans la littérature, tels que la taille des particules (Ivashechkin *et al.*, 2004) et la taille de la DCM (Raber & Kogel-Knabner, 1997), d'autres sont relativement nouveaux, comme la densité de la matière minérale, qui fait appel à une technique très peu employée dans les échantillons environnementaux (plutôt en agroalimentaire, cristallographie et matériaux). La pertinence de ce travail réside dans la **quantification** et la **confrontation** de tous ces paramètres de boue et aussi de CTO, qui a permis leur **hiérarchisation**.

De cette hiérarchisation ont émergé des prédicteurs d'influence majeure, qui se retrouvent aux positions (1 ; 0), (-1 ; 0), (0 ; 1) ou (0 ; -1) dans le cercle des corrélations entre prédicteurs et composantes principales: *Proteins* et *F4* dans l'exemple de $\log K_{DCM}$ (Figure III-22). Les prédicteurs d'influence négligeable se trouvent au centre, et peuvent être supprimés (*n5C*, *nOH*). L'analyse du cercle des corrélations laisse aussi entrevoir des prédicteurs aux coordonnées très proches (*F1* et *F3* par exemple), tout comme des prédicteurs diamétralement opposés (*Proteins* et *COD*) : cela suggère la corrélation ou l'anti-

corrélations de ces variables. En effet, au sein des 3 boues PS, SS et DSS, les prédicteurs COD et Proteins sont linéairement corrélés avec $R^2=0,98$, tout comme VFA , $F1$, $F3$ et ρ_{min} avec $F4$ (respectivement 0,91, 0,98, 0,99, et 0,94). Parmi ces trois boues, l'information est partiellement redondante, et un prédicteur « représentant » peut être sélectionné par groupe de corrélation selon des critères pratiques notamment, de façon à minimiser le travail de caractérisation.

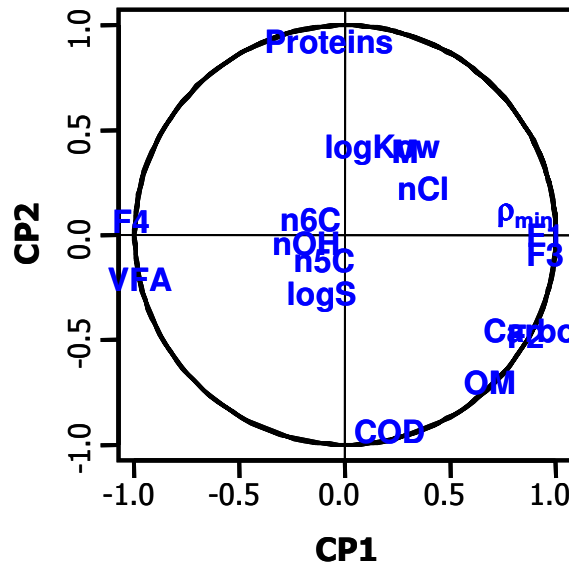


Figure III-22 : Cercle des corrélations entre les prédicteurs et les composantes principales CP1 et CP2 du modèle $\log K_{DCM}$ obtenu.

Ainsi, 3 prédicteurs ont été sélectionnés pour $\log K_{DCM}$ et pour $\log K_{part}$: un prédicteur chimique de particules/DCM, un prédicteur physique de particules/DCM et un prédicteur de CTO. Un nouveau modèle PLS a été généré pour chacun :

$$\log K_{part} = 11.21 + 0.232 \log K_{ow} - 2.84 \text{COD} + 0.317 \rho_{min}, \quad \text{dim}=2, R^2=0,707$$

$$\log K_{DCM} = 14.14 + 0.193 \log K_{ow} - 3.084 \text{COD} - 0.0141 F4, \quad \text{dim}=2, R^2=0,820$$

Les modèles obtenus sont bien sûr **moins précis**, puisque les R^2 du modèle complet valaient respectivement 0,813 et 0,824. Ils sont de plus **très spécifiques**, car les corrélations prises en compte pour éliminer certains prédicteurs ne sont pas universelles : elles ne sont pas par exemple vérifiées par les données obtenues par Mottet *et al.* (2009) sur un plus large panel de boues. Enfin, ces modèles sont **très sensibles** aux erreurs de mesure, puisque chaque prédicteur a un poids très important, alors que dans le modèle complet, le poids est réparti, et les erreurs expérimentales peuvent s'équilibrer. En conclusion, il n'est pas recommandé d'utiliser ces modèles simplifiés dans un but prédictif.

En revanche, ils présentent l'avantage de pouvoir comparer le poids relatif des caractéristiques des boues et des CTOs, et le poids relatif des paramètres physique et

chimique. L'une des deux caractéristiques des boues est prépondérante pour $\log K_{\text{part}}$ comme pour $\log K_{\text{DCM}}$, mais il s'agit de la caractéristique chimique pour le premier, et physique pour le second (Figure III-23). Cette simplification confirme donc le rôle prépondérant de la masse molaire de la DCM (Raber & Kogel-Knabner, 1997; Holbrook *et al.*, 2004), le rôle prépondérant de la teneur en protéines des particules ainsi que le rôle secondaire des caractéristiques des CTOs.

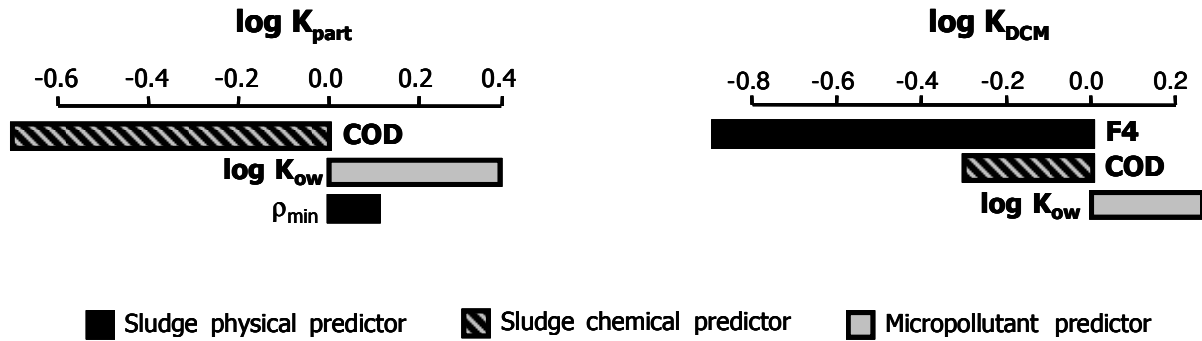


Figure III-23 : Coefficients centrés réduits des prédicteurs inclus dans le modèle PLS simplifié de $\log K_{\text{part}}$ et $\log K_{\text{DCM}}$.

Ces modèles simplifiés ne doivent pas être utilisés dans un but prédictif, pour les raisons évoquées précédemment : les modèles complets doivent être préférés. Le rayonnement de ce travail dans la communauté scientifique serait tout-à-fait discutable si la presque totalité des mesures (aux prédicteurs négligeables prêts) était nécessaire à la prédiction des K_{part} et K_{DCM} (modèle complet). Heureusement, nous avons démontré, grâce à la boue de validation, que toutes ces mesures ne sont pas nécessaires pour prédire le comportement d'un CTO donné dans une boue donnée : certains logiciels permettent de gérer les données manquantes. Les coordonnées de chaque prédicteur dans le repère formé par les composantes principales des modèles sont connues. A partir de ces coordonnées, un prédicteur manquant peut être estimé. L'équation du modèle peut alors être appliquée pour la prédiction. **Cette méthode ouvre de larges possibilités d'utilisation des deux modèles, façonnable selon les outils de mesure à disposition.** Toutefois, la prédiction est d'autant plus fiable que les prédicteurs choisis sont de grande influence. Dans l'exemple présenté, tel était le cas : *COD*, *Proteins* et ρ_{min} ont été sélectionnés pour les particules, et *COD*, *Proteins* et *F4* pour la DCM. Ces six mesures constituent donc les meilleurs **indicateurs** parmi les prédicteurs testés, et permettent à eux seuls, grâce à un logiciel adéquat, de prédire de façon satisfaisante les équilibres de sorption des CTOs dans les boues.

Enfin, il peut être noté que **les valeurs de K_{part} et K_{DCM} , exprimées en mL/g_{OC}, sont très semblables**, excepté pour les boues TTSS et TTDSS (Figure III-15). Cette remarque suggère que les propriétés du carbone organique des particules et de la DCM sont très proches, probablement en raison de leur histoire commune. En revanche, la forte énergie thermique apportée durant le traitement semble bouleverser l'homogénéité entre particules

et DCM. De ce fait, en l'absence d'épisode de traitement thermique, l'un ou l'autre des K_{part} et K_{DCM} pourrait être prédit, et le second déduit : le nombre d'indicateurs nécessaires à l'utilisation des modèles obtenus serait alors diminué à 3.

Par ailleurs, cette remarque légitime l'utilisation d'une **technique innovante** pour la caractérisation de la DCM : **la fluorescence 3D**. A l'heure actuelle, cette technique est applicable uniquement à la phase aqueuse des boues, et donc à la caractérisation de la DCM. Des recherches sont actuellement menées pour développer la fluorescence 3D sur la matrice boue, dans le cadre du post-doctorat de Mathieu MULLER (Veolia/INRA).

Ainsi, la phase aqueuse des boues PS, SS, TTSS et DSS a pu être caractérisée. Pour cela, les échantillons ont été excités successivement à des longueurs d'onde λ_{ex} de 200 à 400 nm, et la fluorescence émise à λ_{em} entre 280 et 550 nm détectée (Spectromètre LS 55, Perkin-Elmer). Ainsi, pour chaque couple de longueur d'excitation et d'émission, l'intensité de fluorescence (unité arbitraire, u.a.) a été déterminée, et les spectres 3D construits (Figure III-24).

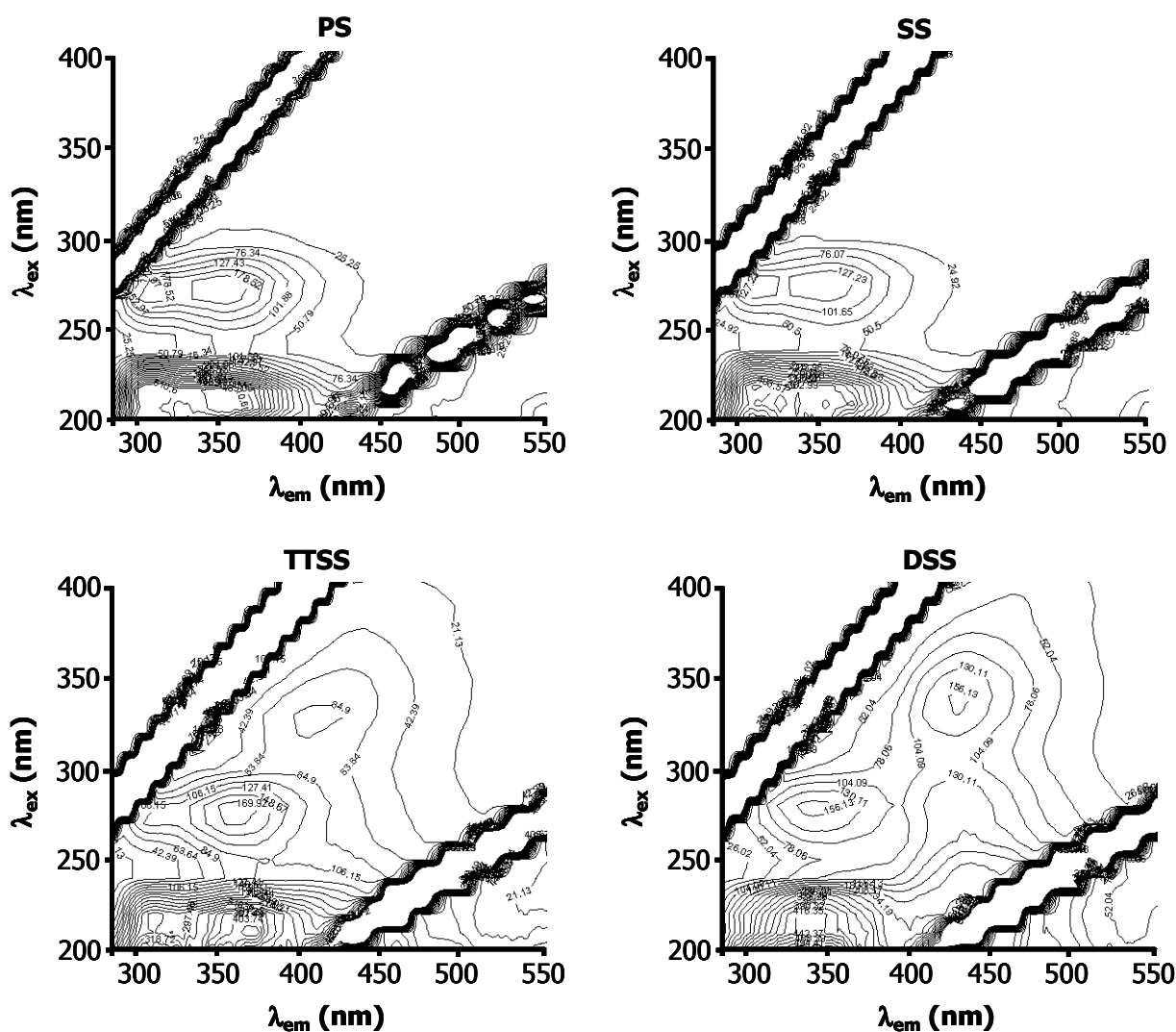


Figure III-24 : Spectre de fluorescence 3D des phases aqueuses de PS (25 mg_{Co}/L), SS (16 mg_{Co}/L), TTSS (25 mg_{Co}/L) et DSS (22 mg_{Co}/L).

Très brièvement, la propriété de fluorescence de certaines molécules est liée à la présence de fluorophores dans leur structure chimique. Ces fluorophores sont des entités chimiques capables de passer d'un état d'énergie électronique fondamental à un état excité, par absorption de photons d'énergie donnée. Ils restituent ensuite une partie de l'énergie absorbée par émission de photons : c'est la fluorescence. La capacité de fluorescence est liée à la présence d'électrons π délocalisés : les doubles liaisons conjuguées, les noyaux aromatiques et les hétérocycles insaturés caractérisent les fluorophores. La fluorescence constitue donc un outil particulièrement pertinent pour la caractérisation de la DCM en référence aux phénomènes de sorption, puisque les motifs aromatiques jouent un rôle majeur dans les interactions de sorption des CTOs hydrophobes.

L'environnement électronique varie d'une molécule fluorescente à l'autre, du fait de leur structure chimique primaire et de leur structure tri-dimensionnelle. Ainsi, pour un fluorophore donné, l'énergie du rayonnement (liée à λ_{ex}) capable de provoquer l'excitation est caractéristique, tout comme l'énergie du rayonnement émis (liée à λ_{em}), qui dépend de la part de l'énergie absorbée qui est réémise. Ainsi, le plan défini par λ_{ex} et λ_{em} peut être divisé en zones spécifiques de familles de fluorophores. Chen *et al.* (2003) ont ainsi défini 5 régions : les zones I et II caractéristiques des protéines contenant respectivement les acides aminés aromatiques tyrosine et tryptophane, la zone III spécifique des structures similaires aux acides fulviques, la zone IV aux sous-produits protéiques microbiens et la zone V des fluorophores analogues aux acides humiques (Figure III-25). Au sein de ces zones, les massifs résultent d'une multitude de fluorophores, chacun contribuant en position et en intensité selon sa structure et sa concentration.

Pour l'exploitation des spectres présentés en Figure III-24, les volumes de fluorescence de chaque zone ont donc été déterminés, et normalisés par la concentration en carbone organique et aussi par l'aire de la zone (Figure III-25). Les propriétés de la DCM en terme d'intensité de fluorescence de chaque zone, et de répartition entre zones ont ainsi pu être confrontées aux valeurs de K_{DCM} des 4 boues.

Les fortes similitudes entre PS et SS en terme de sorption se reflétaient parfaitement en terme de propriétés de fluorescence, avec des valeurs absolues d'intensité et des profils de répartition quasi-identiques.

La région qui pourrait expliquer la plus forte affinité des CTOs pour la DCM de DSS est la zone des substances humiques-like. La fluorescence de ce massif est multipliée par 4 durant le processus de digestion anaérobie. Celle du massif fulvique-like l'est aussi, mais dans une moindre mesure. Les substances humiques-like sont des molécules aux propriétés proches des substances humiques : elle sont fortement stabilisées (rapport DCO/CO faible), très aromatiques, et globalement de poids moléculaire élevé. Il est donc cohérent que ce massif soit (i) augmenté par le traitement biologique et (ii) lié à la forte capacité de sorption de la DCM. Ces observations confirment donc les conclusions précédemment tirées.

Par ailleurs, ces données de fluorescence 3D peuvent être mises en parallèle des modèles PLS obtenus pour K_{DCM} . Notamment dans le modèle simplifié, la fraction de DCM de petite

taille ($F4$) et le ratio DCO/CO (COD) apparaissent comme d'influence majeure, et négative pour tous deux. Ces deux prédicteurs sont liés au massif humique-like :

- Lorsque $F4$ augmente, la proportion de DCM de plus grande taille ($F1$, $F2$, $F3$) diminue, ce qui implique une diminution de l'affinité des HAPs/NP/PCBs pour la DCM totale (Figure III-23). Les substances humiques-like sont des molécules de haut poids moléculaire (Shin *et al.*, 1999) : l'augmentation de la fraction $F4$ dans un échantillon est donc corrélée à une diminution de la proportion en substances humiques-like.
- De même, les substances humiques sont caractérisées par des degrés d'oxydation (DCO/CO, prédicteur nommé COD) faibles. L'augmentation de COD signifie donc la diminution de la proportion de substances humiques-like, cohérente avec la diminution de K_{DCM} .

En outre, la plus forte teneur en protéines dans DSS par rapport à PS et SS, détectée par la méthode de Bradford (Tableau III-2), ne s'accompagne pas d'une augmentation nette de fluorescence de type protéique, mais plutôt d'une légère diminution (Figure III-25). Cette contradiction peut probablement être imputée aux méthodes de dosage des protéines : par la méthode de Bradford, l'indicateur protéique est la quantité de liaisons peptidiques, alors qu'en fluorescence, l'indicateur protéique est la quantité d'acides aminés aromatiques. Il se peut que ces indicateurs évoluent différemment.

A cette disparité prêt, les données obtenues en fluorescence 3D corroborent les résultats obtenus en terme de caractérisation des boues PS, SS et DSS, mais aussi en terme d'impact sur la constante d'équilibre K_{DCM} . En revanche, la fluorescence se substituerait difficilement à la caractérisation physico-chimique employée, dans le sens où certains prédicteurs d'influence majeure ne peuvent être détectés par fluorescence, comme les AGVs par exemple.

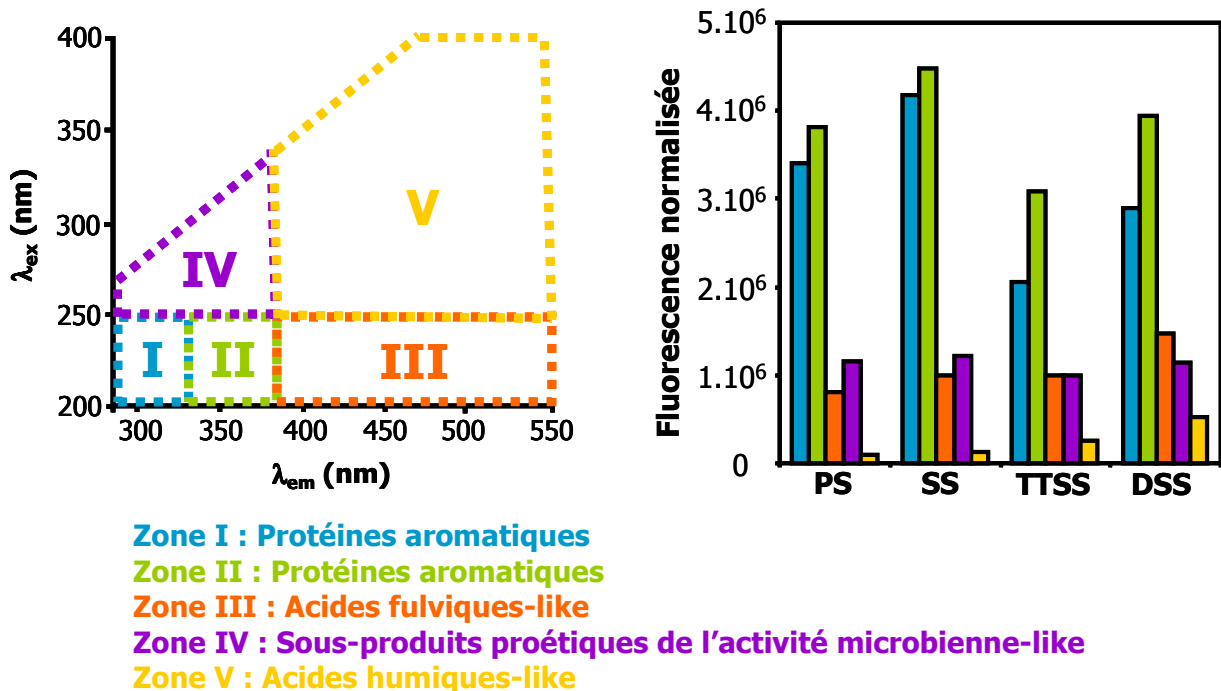


Figure III-25 : Répartition de la fluorescence de la DCM de PS, SS, TTSS et DSS dans les 5 zones définies par Chen *et al.* (2003).

Le massif humique-like est aussi augmenté après traitement thermique (facteur 2), indiquant que la lyse thermique libère des molécules humiques-like initialement présentes en phase particulaire, ou bien qu'elle produit de nouvelles molécules par réaction de Maillard par exemple. Or l'augmentation de ce type de molécules est accompagnée d'une perte d'aptitude à la sorption, attribuée à des modifications d'ordre tri-dimensionnel. La structure tri-dimensionnelle des molécules influence l'environnement électronique de leur fluorophore. Dans le cas d'une molécule à structure tri-dimensionnelle avec beaucoup de repliements, et donc une condensation de la matière, l'énergie absorbée durant l'excitation va être en plus grande partie dissipée de manière non-radiative, sous forme d'énergie vibrationnelle ou rotationnelle. Le rayonnement émis sera donc de plus faible énergie que pour cette même molécule à l'état « déplié », ce qui sous-entend une longueur d'onde d'émission plus élevée (relation de Planck : l'énergie d'un rayonnement est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde). En effet, le sommet du massif des substances humiques, se trouve à la même longueur d'excitation pour TTSS et DSS (335 nm), mais est légèrement décalé en émission : 410 nm pour TTSS et 430 nm pour DSS. Ce décalage suggère que les matières humiques ont une structure plus lâche dans TTSS que dans DSS. L'hypothèse de dénaturation tri-dimensionnelle de la DCM est donc confortée par les données de fluorescence obtenues. Par conséquent, si la fluorescence 3D pourrait difficilement remplacer la caractérisation physico-chimique des boues, elle apporte néanmoins de nouveaux éléments.

Cette petite parenthèse sur la fluorescence 3D avait pour but d'introduire une technique hautement attractive, rapide et non destructive et d'en souligner les potentialités. Les résultats préliminaires obtenus se sont avérés cohérents avec les données de sorption, et donc tout-à-fait encourageants. Des recherches sont actuellement poursuivies pour développer cette technique, sur la phase particulaire notamment. Mais dans le cadre de cette thèse, l'exploitation des spectres 3D n'a pas été plus approfondie.

La suite des travaux s'appuie sur les modèles prédictifs obtenus à partir de la caractérisation physico-chimique des boues. Ces modèles rendent possible la prédiction des phénomènes de sorption dans un quelconque procédé de digestion anaérobie, pourvu que sa matrice en soit caractérisée. L'outil développé dans ce paragraphe permettra donc d'étudier l'impact de l'interaction de sorption entre matrice et CTOs sur l'abattement des CTOs, lorsqu'elle s'opère de manière concomitante aux autres interactions identifiées en synthèse bibliographique.

IV METHANISATION de BOUES CONTAMINEES en HAPs/NP/PCBs

Ce second volet de résultats et discussion sera axé sur le devenir de HAPs/NP/PCBs au cours de la digestion anaérobie de boues contaminées. Deux approches seront adoptées pour analyser les mesures d'abattement obtenues. La première approche, tout à fait classique, considèrera le procédé comme une boîte noire. Dans une seconde approche plus innovante, les mécanismes qui conditionnent l'abattement des HAPs seront plus finement étudiés : la biodisponibilité sera quantifiée grâce aux modèles de sorption préalablement établis, le cométabolisme sera caractérisé et l'intégration de données microbiologiques sera tentée pour compléter la démarche.

IV.1 Avant-propos

Au cours de ce volet de recherche, des mesures de biodégradation des CTOs ont été pratiquées au cours de la méthanisation de boues d'épuration contaminées. Des boues d'alimentation différentes ont été sélectionnées de façon à faire varier non seulement les vitesses de réaction, en référence à la biodégradabilité de cette boue, mais aussi les caractéristiques de la matrice présente dans le procédé (boue digérée). Comme nous l'avons vu au chapitre III.3, l'affinité des CTOs pour une matrice donnée dépend des propriétés physico-chimiques de cette matrice. La boue d'alimentation conditionnera donc les équilibres de sorption qui s'établiront au sein du procédé. Si l'on admet qu'un lien existe entre phénomènes de sorption et biodisponibilité, cette stratégie permettra donc de faire varier la biodisponibilité des CTOs. De plus, les vitesses de transformation de la matière sont aussi dépendantes de la composition de cette matière, de son accessibilité et de sa biodégradabilité. La stratégie choisie peut donc potentiellement permettre de faire varier le métabolisme basal, et par conséquent le cométabolisme dans les systèmes de digestion anaérobie.

Pour obtenir des caractéristiques d'alimentation différentes, deux boues « réelles » ont été tout d'abord échantillonnées sur site (boue primaire PS et boue secondaire SS). Etant donné l'intérêt porté sur les pré-traitements en amont de la digestion anaérobie, et à la vue des résultats intéressants obtenus en matière de sorption, un pré-traitement thermique a aussi été appliqué à la boue PS avant sa méthanisation. Toutefois, ces trois substrats n'ont pas permis de générer des performances de digestion anaérobie très différentes. La stratégie d'alimentation s'est alors orientée vers la fabrication de substrats composites. Ainsi, la boue SS a été mélangée à de la cellulose micro-cristalline en proportions de DCO égales pour obtenir CSS. La cellulose étant un substrat entièrement biodégradable, le substrat CSS devrait induire un haut cométabolisme. De plus, le pourcentage de DCM dans l'alimentation étant divisé par un facteur 2, des répercussions sur la concentration en DCM et donc sur la fraction aqueuse de CTOs sont attendues. Enfin, la cinquième boue d'alimentation a été fabriquée par dilution de la boue SS avec son propre surnageant, de façon à augmenter la proportion de DCM sans modifier les propriétés ni des particules ni de la DCM. La DCM étant généralement plus facilement biodégradable que la matière particulaire, et permettant de déplacer les CTOs vers la fraction aqueuse par sorption, la boue SupSS a été conçue de façon à favoriser un fort cométabolisme et une forte biodisponibilité.

Avant d'aborder les résultats de devenir des HAPs/NP/PCBs au cours de la digestion anaérobie de ces boues, les difficultés rencontrées quant à la quantification des pertes abiotiques qui peuvent survenir au cours du procédé seront exposées dans une première partie (paragraphe IV.2). Puis les deux approches adoptées pour étudier le devenir des HAPs/NP/PCBs seront successivement présentées en paragraphes IV.3 et IV.4. Finalement, le chapitre se terminera par une discussion globale de ces paragraphes.

IV.2 De la difficulté de quantifier les pertes abiotiques

Afin de quantifier l'activité biologique responsable de la biodégradation des CTOs, les pertes non biologiques, nommées « abiotiques », qui sont dûes à des processus physico-chimiques (volatilisation, photolyse, dégradation chimique...) doivent être déterminées puis soustraites à l'abattement total. Pour cela, l'activité biologique doit être bloquée sans toutefois modifier la matrice, afin de s'assurer que les pertes abiotiques soient identiques avec et sans activité biologique.

Plusieurs stratégies sont rencontrées dans la littérature pour l'obtention d'un témoin abiotique dans le contexte de la digestion anaérobie de boues contaminées. Certains exemples sont présentés dans le Tableau IV-1. La stérilisation par la température est largement employée. En revanche, la stérilité doit être maintenue après le traitement. Cette stratégie est donc envisageable dans le cas des systèmes clos correspondants au mode opératoire batch (Tableau IV-1) mais elle impose de lourdes contraintes pratiques lors de la digestion anaérobie en mode continu. Les mêmes contraintes sont associées aux autres traitements physiques envisageables, tels que les irradiations γ par exemple. De plus, malgré la répétition d'expositions à la chaleur espacées de phases de croissance (visant les microorganismes sporulants), une activité biologique peut persister (Dionisi *et al.*, 2006; Bertin *et al.*, 2007).

Tableau IV-1 : Stratégies employées et résultats obtenus lors de la mise en œuvre de témoins abiotiques.

Stratégie	Mode opératoire	Activité biologique	Pertes abiotiques	Référence
Thermique : 1 cycle à 121°C, 20 min	Batch	Non détectée	< 10 % (HAPs)	(Chang <i>et al.</i> , 2003)
Thermique : 1 cycle à 121°C, 20 min	Batch	Non détectée	< 10 % (NP)	(Chang <i>et al.</i> , 2005b)
Thermique : 3 cycles à 121°C, 1h	Batch	Détectée	Non quantifiables	(Bertin <i>et al.</i> , 2007)
Thermique : 3 cycles à 121°C, 1h	Batch	Détectée	Non quantifiables	(Dionisi <i>et al.</i> , 2006)
Chimique : 4% de formaldéhyde	Batch	Non détectée	< 10 % (Naphtalène)	(Christensen <i>et al.</i> , 2004)
Chimique : azide de sodium (NaN ₃)	Continu	Non détectée	10 à 20 % (PCBs)	(Patureau & Trably, 2006)
Chimique : azide de sodium (NaN ₃)	Continu	Non détectée	< 10 % (NP, NP _n EO)	(Patureau <i>et al.</i> , 2008)
Chimique : azide de sodium (NaN ₃)	Continu	Non détectée	0 à 25 % (HAPs)	(Trably <i>et al.</i> , 2003)

L'utilisation d'agents chimiques est plus adaptée au dispositif expérimental continu. Le formaldéhyde est une substance très toxique, suspectée cancérigène (classé R40). Pour des raisons de sécurité, il est préférable d'éviter son utilisation. L'azide de sodium est donc le

meilleur compromis entre contraintes pratiques, sécurité et efficacité. Il inhibe la cytochrome oxydase des bactéries Gram négatives. Bien que les bactéries Gram positives y soient résistantes, son utilisation à la concentration de 100 mM pour 40 g_{MS}/L (Trably *et al.*, 2003; Patureau *et al.*, 2008) semble garantir la stérilité de réacteurs anaérobies, mais pas à 50 mM (Trably, 2002). Enfin, l'acidification à pH 2, utilisée en conditions aérobies, a permis de bloquer l'activité biologique (Hernandez-Raquet *et al.*, 2007) et de démontrer que les pertes abiotiques en NP n'étaient pas significatives.

Nous retiendrons donc ces deux dernières options pour la quantification de pertes abiotiques en réacteurs continu : azide de sodium et acidification.

Des essais préliminaires ont été planifiés en mode batch dans un premier temps, afin de valider le blocage de l'activité biologique dans le cas particulier de notre inoculum, et afin d'ajuster la concentration nécessaire en NaN₃.

IV.2.1 Tests en batch avec NaN₃ et à pH 2

Cinq fioles ont été préparées à partir d'un inoculum issu d'un digesteur traitant des boues contaminées en HAPs et de la boue SS comme substrat :

- Fiole « Témoin biologique » : inoculum + substrat
- Fiole « Témoin froid » : inoculum (production de gaz soustraite au Témoin biologique)
- Fiole « NaN₃ 50 mM » : inoculum + substrat + 50 mM d'azide de sodium
- Fiole « NaN₃ 10 mM » : inoculum + substrat + 10 mM d'azide de sodium
- Fiole « pH 2 » : inoculum + substrat + acide chlorhydrique pour acidifier à pH=2.

Les cumuls de volume et la composition du gaz produit dans ces fioles sont présentés en Figure IV-1. Dans les fioles contenant de l'azide de sodium et acidifiée, le volume de gaz produit est très faible : il est dilué d'un facteur approximatif de 4 dans le ciel gazeux initial, et peut ramener la teneur en certains gaz en dessous de leur seuil de quantification. L'estimation du pourcentage d'H₂, CO₂ et CH₄ dans NaN₃ 50 mM, d'H₂, N₂, CO₂ et CH₄ dans NaN₃ 10 mM, et de N₂ dans la fiole pH 2 sont donc imprécises.

Le biogaz produit au sein de la fiole Témoin biologique contenait environ 65% de CH₄ et 35% de CO₂, ce qui est caractéristique de bonnes conditions méthanogènes.

Les proportions entre azide de sodium et matières sèches dans la fiole NaN₃ 50 mM sont identiques à celles répertoriées dans la littérature (Trably *et al.*, 2003; Patureau & Trably, 2006). Dans cette fiole, la majorité du gaz produit est du N₂, provenant de la décomposition de l'azide. Des traces d'H₂, de CO₂ et de CH₄ ont été détectées dans le ciel gazeux, qui n'ont pu être précisément quantifiées (< 1,5 %). Leur somme n'excède pas 9 mL/g_{DCO} introduite. Ces gaz d'origine potentiellement biologique représentent moins de 3 % du biogaz produit par le Témoin biologique. On peut donc en conclure que les activités acétogènes et méthanogènes sont très fortement inhibées dans la fiole NaN₃ 50 mM.

La production de N₂ dans la fiole NaN₃ 10 mM semble inférieure à la fiole NaN₃ 50 mM, en raison de la plus faible quantité de NaN₃ introduite. Des traces d'H₂ et de CH₄ y ont aussi été détectées. En revanche, la production de CO₂ y est supérieure, de sorte que les gaz d'origine

biologique dans cette fiole atteignent 10 % du volume produit dans le Témoin biologique, indiquant une inhibition moins marquée que dans la fiole NaN_3 50 mM.

Il n'a pas été détecté d' H_2 ni de CH_4 dans la fiole acidifiée. La forte production de CO_2 observée est probablement d'origine chimique, avec une forte désorption du CO_2 dissout et de ses formes carbonates. Le pH de 2 apparaît donc adéquat pour bloquer les activités acétogènes et méthanogènes. Cette hypothèse est renforcée par la cinétique très rapide de production de gaz par la fiole pH 2 en comparaison à la fiole Témoin biologique (Figure IV-2). Les fioles contenant de l'azide de sodium présentent un profil cinétique globalement plus similaire au Témoin biologique qu'à la fiole pH 2, avec toutefois une production initiale rapide dans les 2 premiers jours (d'origine chimique peut-être), un ralentissement, puis une reprise de la production entre 15 et 20 jours.

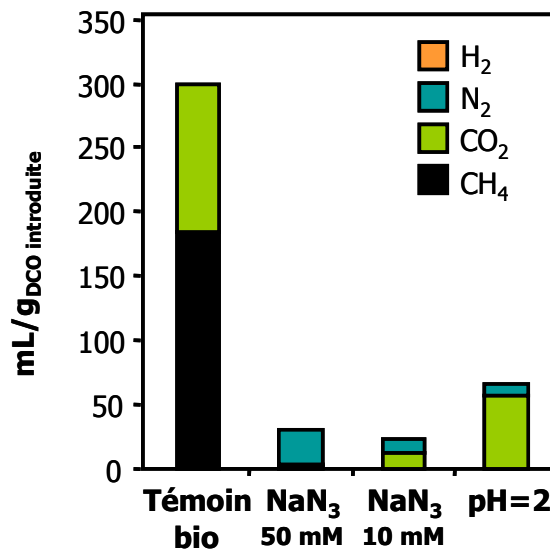


Figure IV-1 : Volume de gaz produits au bout de 20 jours par unité de DCO initialement introduite lors des tests de stérilité en batch.

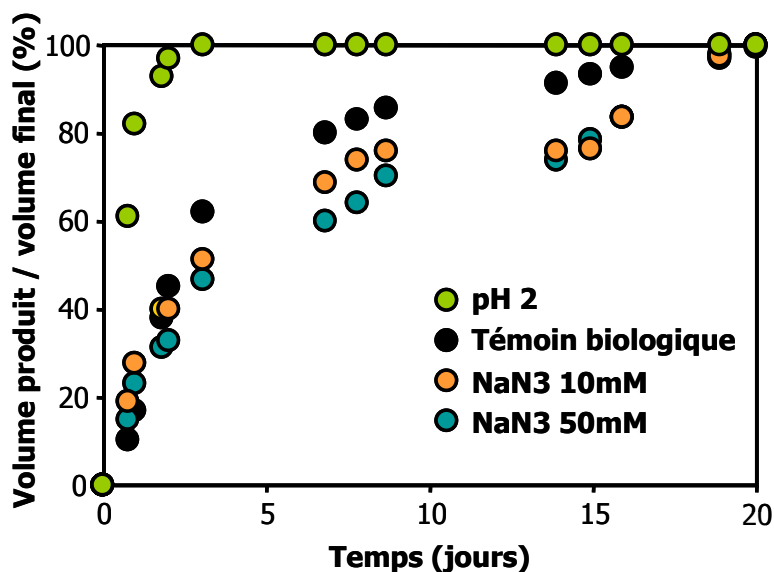


Figure IV-2 : Cinétique de production de gaz au cours des essais en batch.

Les concentrations en HAPs en début et fin de cinétiques sont présentées en Figure IV-3. Des pertes significatives en fluorène sont apparues dans les trois fioles. Pour ce qui est des autres HAPs, les variations observées pour les fioles contenant de l'azide de sodium peuvent être dues aux erreurs expérimentales, et notamment à l'hétérogénéité de la boue. En revanche, des pertes de l'ordre de 10 à 20 % sont observées pour le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène dans le réacteur acidifié, mais aucun abattement significatif des autres composés.

Ces essais préliminaires permettent de conclure que l'acidification à pH 2 permet de bloquer toute activité biologique responsable de la production de gaz, mais qu'elle entraîne des pertes en HAPs de faible poids moléculaire, probablement par des processus physico-chimiques. L'azide de sodium à 50 mM inhibe de façon satisfaisante cette activité biologique, et entraîne un bon recouvrement de tous les HAPs, à l'exception du fluorène.

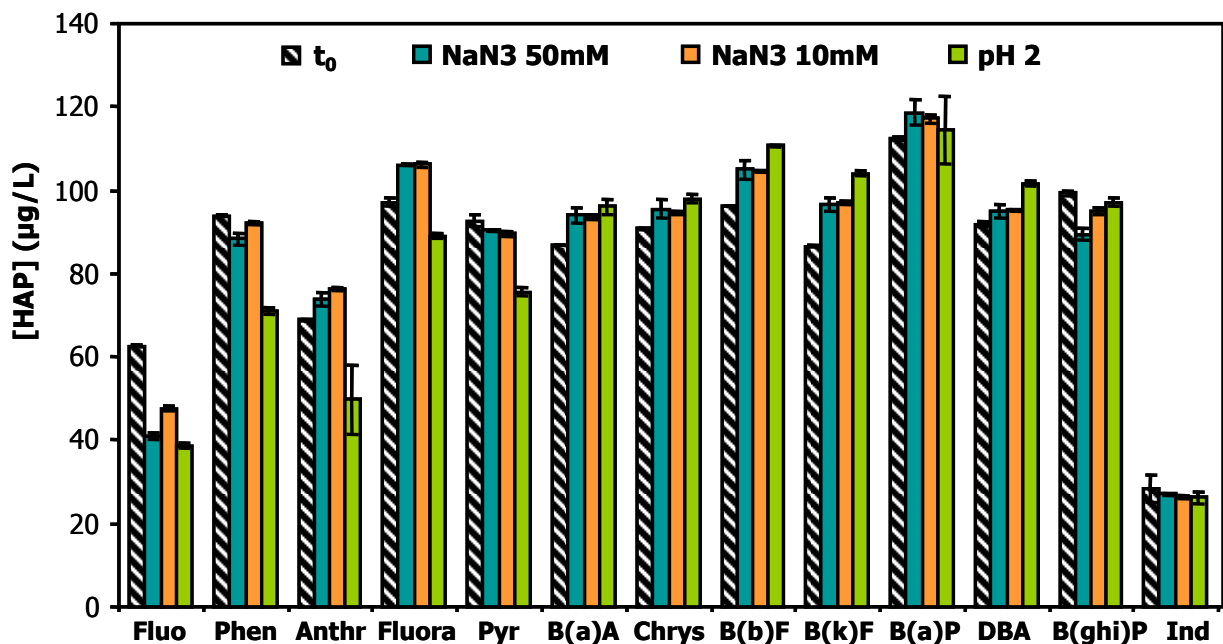


Figure IV-3 : Concentration initiale (t_0) et concentration finale dans les fioles avec azide de sodium et dans la fiole acidifiée à pH 2. L'écart-type est obtenu par deux extractions d'une même fiole.

IV.2.2 Réacteurs continus avec NaN₃ et à pH 2

Les premiers essais menés en mode continu avec NaN₃ n'ont pas permis de maintenir la stérilité (selon le critère d'abattement de la matière organique) sur une longue période. De plus, en démarrant le réacteur à faible concentration en NaN₃ (25 mM) et en l'augmentant progressivement (doublée au bout de 2 TSH, puis de nouveau doublée au bout de 3 TSH), une activité de biodégradation des CTOs était toujours détectée, même à la concentration finale de 100 mM. L'abattement de matière organique constaté était couplé à une production de CO₂, H₂ et CH₄ (respectivement 15, <1 et 2 % du ciel gazeux). Certains microorganismes sont donc capables de développer une résistance à l'azide de sodium. Par conséquent, les pertes abiotiques ont été quantifiées durant le régime transitoire au cours du démarrage de réacteurs, avec azide et à pH 2. La concentration élevée de 100 mM a été choisie pour

minimiser le risque de survie et d'adaptation des populations. Afin de vérifier l'inhibition d'activité biologique, la concentration théorique en matière organique en sortie a été estimée à partir des mesures de concentration en matière organique en entrée (voir méthode au paragraphe II.4.1.2), et comparée à la concentration mesurée (Figure IV-4). Les concentrations mesurées se sont avérées très proches des concentrations théoriques attendues pour un réacteur parfaitement stérile et infiniment mélangé. Sur la période de démarrage, l'inhibition de l'activité acétogène et méthanogène a donc été prouvée par ces analyses, qui ont été confirmées par l'absence de gaz d'origine biologique en concentration quantifiable.

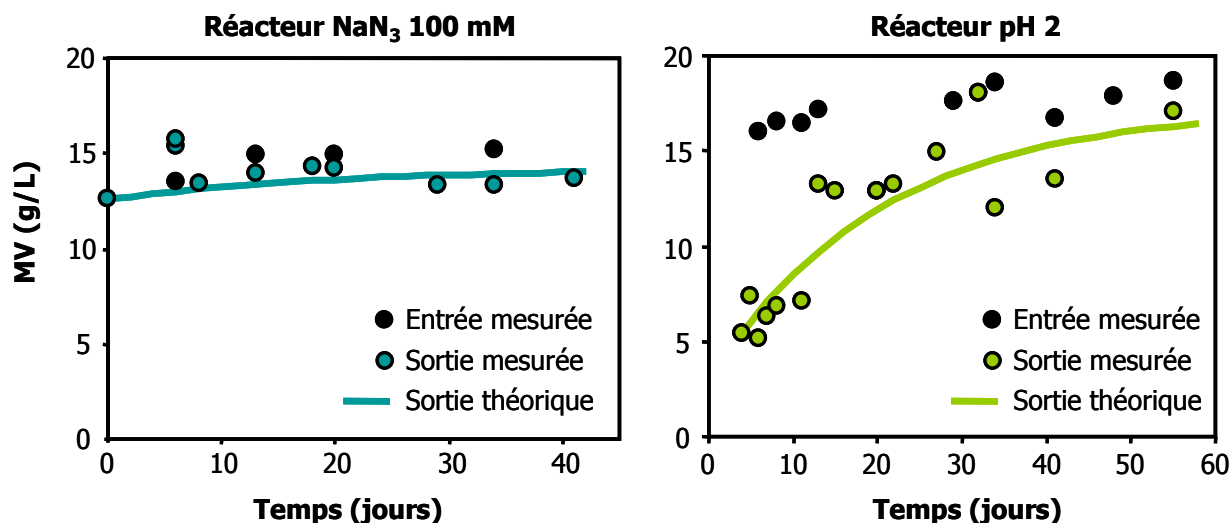


Figure IV-4 : Suivi de la concentration en matière organique/volatile en entrée et en sortie des réacteurs avec azide et à pH 2 lors du démarrage de ces réacteurs, et comparaison des valeurs expérimentales aux valeurs théoriques de sortie.

Malgré l'inhibition biologique constatée, des pertes en HAPs et NP ont été mesurées dans les deux réacteurs (Figure IV-5). Du fait de la méthode de calcul employée, l'écart-type sur l'abattement moyen est important, et l'abattement n'est pas significatif pour certains HAPs de haut poids moléculaire. En revanche, l'abattement des HAPs de faible poids moléculaire et du NP sont significatifs et élevés dans les deux cas par rapport à la littérature (Tableau IV-1). Pour expliquer ces phénomènes, différentes hypothèses ont été posées :

- **Volatilisation** : Bien que les pertes observées en batch étaient minimales, la volatilisation pourrait jouer un rôle non négligeable dans le cas du dispositif expérimental continu. Toutefois, aucune volatilisation significative n'a pu être détectée dans un réacteur biologique (résultat mentionné dans le paragraphe IV.3). De plus, une approche de modélisation dans un procédé aéré, qui favorise la volatilisation, a démontré que ce processus ne représentait qu'une faible part de l'abattement observé (1 % pour le pyrène), et que seules les molécules de faible poids moléculaire étaient volatilisées de manière significative (Byrns, 2001). La volatilisation à elle seule ne peut donc pas expliquer les pertes mesurées.
- **Dégradation chimique** : la présence de NaN₃ dans le milieu pourrait induire des réactions conduisant à la transformation des HAPs. Mais l'absence totale de pertes en

HAPs en batch et en présence de NaN_3 (Figure IV-3) permet d'écartier l'hypothèse de réaction directe entre NaN_3 et les HAPs. Il s'agirait donc de mécanismes indirects. Les pertes pourraient être plus élevées dans notre cas par rapport à celles énoncées dans la littérature du fait du dopage : le faible temps de contact entre boue et HAPs n'aurait pas permis de stabiliser leurs interactions, ce qui favoriserait une séquestration de plus grande ampleur que dans les matrices « naturellement » contaminées, stabilisées.

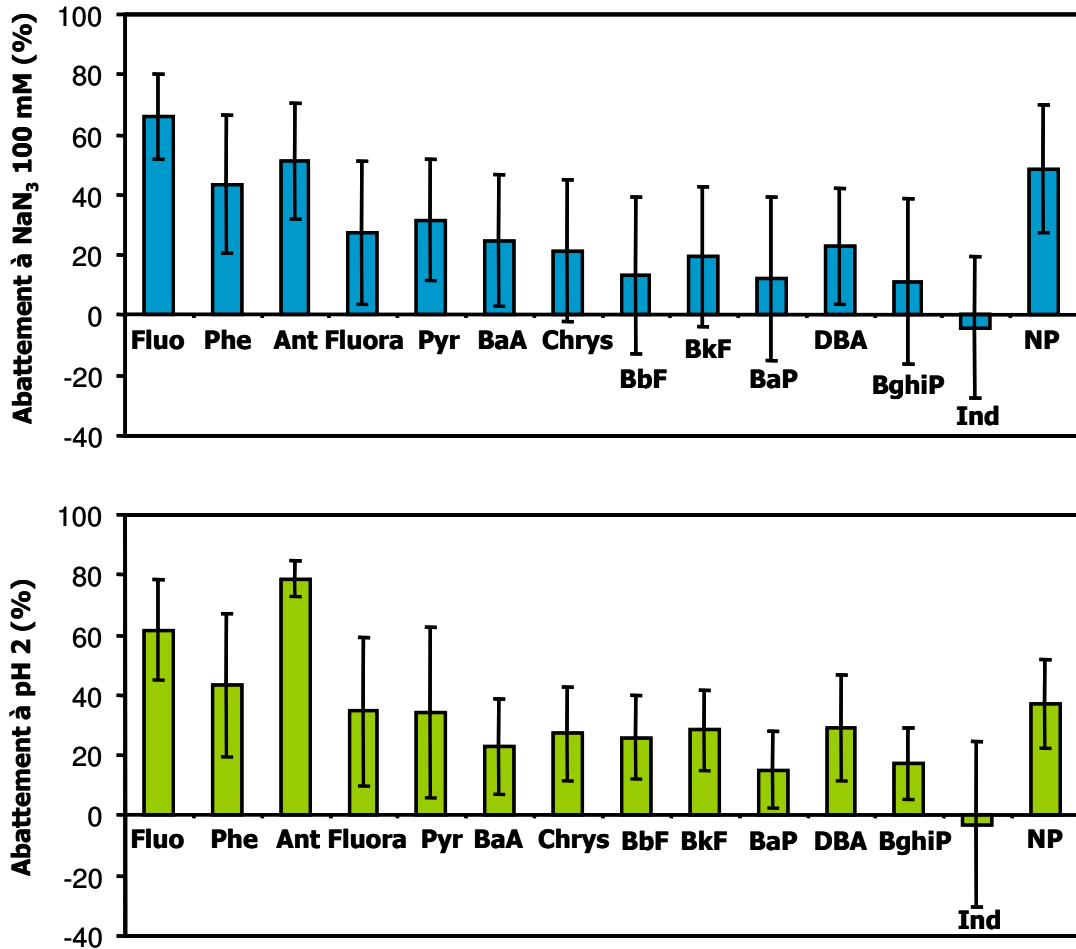


Figure IV-5 : Abattements en HAPs et NP mesurés pendant le démarrage des réacteurs avec NaN_3 et à pH 2 (Moyennes et écart-types calculés à partir de 6 mesures pratiquées durant les 25 premiers jours).

- **Dégradation biologique** : Bien qu'aucune minéralisation de matière organique n'ait été détecté, on ne peut écartier l'éventualité qu'une activité biologique persiste, en particulier une activité microbienne fermentaire sans dégagement gazeux (premières étapes de la méthanisation, Figure I-5). Cette activité n'est pas détectable par mesure en phase gazeuse, ni par mesure de masse de matière. Elle est probable en présence de NaN_3 , puisque cet agent chimique n'inhibe pas les bactéries Gram positives. Or, le genre majoritairement impliqué dans les étapes d'hydrolyse et acidogénèse est *Clostridium*, à Gram positif (Moletta, 2008). Cependant, bien que la structure en floccs génère des microenvironnements au pH parfois différent de 1 unité pH par rapport au milieu liquide (Gieseke *et al.*, 2006), la persistance d'une activité microbienne à pH 2 est quant à elle

plus discutable. Par ailleurs, la présence d'une activité enzymatique extracellulaire est aussi envisageable, avec toutefois une dénaturation probable des enzymes à pH 2.

Parmi ces 3 hypothèses, la volatilisation pourrait être vraisemblablement écartée. Restent donc les hypothèses de dégradation biologique et de dégradation chimique / séquestration. La méthodologie employée pour vérifier cette dernière hypothèse est développée dans le paragraphe suivant.

IV.2.3 Stabilisation de la matrice dopée : réacteur bi-étagé

Afin de vérifier l'hypothèse de forte séquestration liée à notre stratégie de dopage, deux réacteurs continus à même TSH avec NaN_3 à 100 mM ont été placés en série. Le premier réacteur est alors considéré comme réacteur de vieillissement/stabilisation, présentant le même abattement que présenté en Figure IV-5. Le second réacteur est donc alimenté en boue stabilisée, pour laquelle, une moindre séquestration est attendue. L'inhibition du deuxième étage a été vérifiée selon les critères d'abattement de matière organique et de production de biogaz. Cependant, de forts abattements ont été quantifiés dans ce réacteur pour certains HAPs (Figure IV-6).

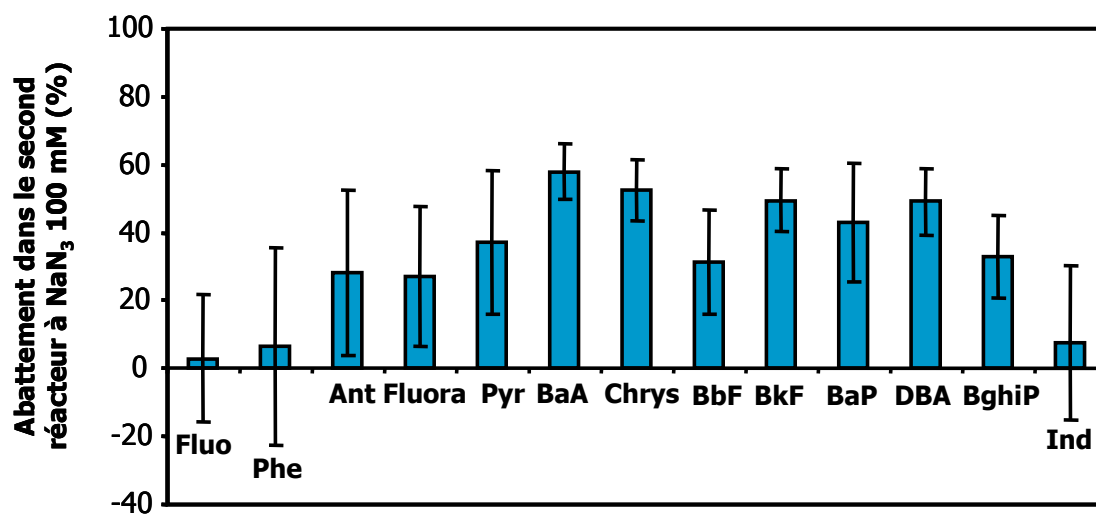


Figure IV-6 : Abattements en HAPs obtenus dans le second réacteur avec NaN_3 en série.

Un effet concentration est notable (Figure IV-7) : pour les HAPs fortement abattus dans le premier étage (faible poids moléculaire, Figure IV-5), leur concentration est fortement abaissée dans l'alimentation du deuxième étage, dans lequel l'abattement est alors amoindri. L'indeno(1,2,3,c,d)pyrène est originellement présent en plus faible concentration (20 $\mu\text{g/L}$ contre 100 $\mu\text{g/L}$), ce qui explique son faible abattement. Pour les autres HAPs, le pourcentage d'abattement dans le deuxième étage est supérieur au premier étage, malgré une plus faible concentration. Ainsi, l'hypothèse d'instabilité de la boue dopée peut être réfutée.

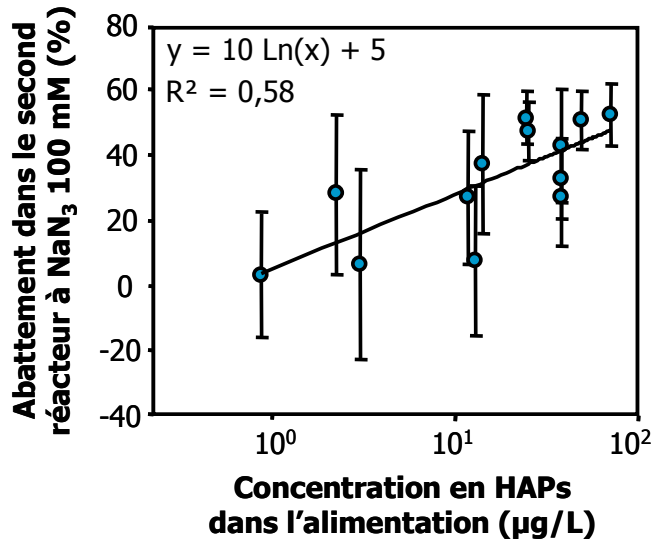


Figure IV-7 : Effet concentration observé sur les abattements dans le second réacteur avec NaN₃ en série.

Ces expériences nous orientent donc vers **l'hypothèse d'ordre biologique** : des microorganismes fermentaires assureraient la dégradation des HAPs en présence de NaN₃. Le premier étage aurait alors permis l'enrichissement en cette population, et donc un meilleur abattement au deuxième étage. La présence de microorganismes actifs pourrait être mesurée pour alimenter cette hypothèse. L'activité spécifique fermentaire pourrait être vérifiée par mesure des acides organiques produits (lactate, succinate et fumarate par exemple). Cette thématique fait l'objet de recherches à venir au sein du LBE, car la quantification des pertes abiotiques est primordiale pour l'évaluation de l'activité biologique de biodégradation des HAPs.

*En conséquence des difficultés exposées dans ce chapitre IV.2, les pertes abiotiques n'ont pas pu être quantifiées lors de ces travaux de thèse. Les résultats de digestion anaérobie de boues contaminées présentés dans les paragraphes suivants (IV.3 et IV.4) engloberont donc les mécanismes abiotiques et biologiques. A noter que de nombreuses études portant sur l'abattement de CTOs lors de la méthanisation de boues ne quantifient pas la composante abiotique (Tartakovsky et al., 2000; Bernal-Martinez et al., 2005; Benabdallah El-Hadj et al., 2006; Carballa et al., 2006; Benabdallah El-Hadj et al., 2007b; Zhang et al., 2008). Néanmoins, lorsque des témoins abiotiques ont été obtenus par ailleurs, les pertes abiotiques restaient faibles (Tableau IV-1), indiquant que la biodégradation est le mécanisme prépondérant. **Ainsi, les abattements mesurés seront assimilés à de la biodégradation. Ici, le terme biodégradation ne fera pas nécessairement appel à un processus de minéralisation, mais à la disparition de la forme native des HAPs/NP/PCBs.***

IV.3 Approche « boîte noire » : prédiction du devenir des HAPs/NP/PCBs à partir de l'entrant

INFLUENCE OF FEED CHARACTERISTICS ON MICROPOLLUTANTS REMOVAL DURING THE ANAEROBIC DIGESTION OF CONTAMINATED SLUDGE

Maialen Barret, Glenda Cea Barcia, Amélie Guillon, Hélène Carrère & Dominique Patureau
D'après l'article soumis au Journal of Hazardous Materials

Abstract: PAHs, PCBs and NP removals were measured during the continuous anaerobic digestion of five different sludge. The reactors were fed with either primary/secondary sludge (PS/SS), or thermally treated PS, or cellulose added SS, or dissolved and colloidal matter (DCM) added SS. These various feeding conditions induced variable levels of micropollutants bioavailability (assumed to limit their biodegradation) and of overall metabolism (supposed to be linked to micropollutants metabolism throughout cometabolism). On one hand, overall metabolism was higher with secondary sludge than with primary sludge, and the same tendency was observed for micropollutants removal. However, when overall metabolism was enhanced thanks to cellulose addition, a negative influence on micropollutants removal was observed. This suggested that either the cometabolic synergy would be linked to a specific metabolism or cometabolism was not limiting in this case. On the other hand, micropollutants bioavailability was presumably decreased by thermal treatment and increased by DCM adding. In both cases, micropollutants removal was reduced. These results suggest that neither overall metabolism nor bioavailability would absolutely limit micropollutants removal. Each phenomenon might alternatively predominate according to the feed characteristics.

IV.3.1 Introduction

Organic micropollutants such as Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and PolyChloroBiphenyls (PCBs) are efficiently removed from wastewaters: for examples 75% of PCBs are removed within a WasteWater Treatment Plant (WWTP) in Greece (Katsoyiannis & Samara, 2004) and respectively 76 and 98% of PCBs and PAHs in Paris, France (Blanchard *et al.*, 2004). However, biodegradation only accounts for a little fraction of this removal. Indeed, PAHs and PCBs present very low water solubility and are highly hydrophobic. These properties favour their sorption to organic matter. As a consequence, sorption into the solid effluent (sludge) was demonstrated to be the main removal mechanism for PAHs and PCBs (Manoli & Samara, 1999; Byrns, 2001; Blanchard *et al.*, 2004; Katsoyiannis & Samara, 2004). Thus, their concentration in sludge reaches 0.001 to 10 $\mu\text{g}_{\text{PAH}}/\text{g}_{\text{DM}}$ (Bodzek & Janoszka, 1999;

Blanchard *et al.*, 2004; Abad *et al.*, 2005) and 0.01 to 1 $\mu\text{g}_{\text{PCB}}/\text{g}_{\text{DM}}$ (Blanchard *et al.*, 2004; Katsoyiannis & Samara, 2004; Abad *et al.*, 2005), according to the influent and the WWTP characteristics.

Nonylphenol (NP) is produced within WWTP, as a byproduct of the aerobic/anoxic biodegradation of long chain ethoxylated nonylphenols (Di Corcia, 1998; Corvini *et al.*, 2006). Due to its recalcitrance and hydrophobicity, NP accumulates in biological unit and is removed from wastewater throughout sorption to residual matter and clarification (Hung *et al.*, 2004; Koh *et al.*, 2005). NP occurs in sludge at typical concentration of about 100 $\mu\text{g}_{\text{NP}}/\text{g}_{\text{DM}}$ (Fountoulakis *et al.*, 2005; Aparicio *et al.*, 2007).

Sludge have to be stabilized before its final disposal such as agricultural application or landfilling. Among the available treatments, anaerobic digestion presents the advantages of (i) efficient reduction of sludge solids and (ii) production of a renewable fuel, as organic matter is converted into biogas. Anaerobic digestion followed by land application is thus the most sustainable route for sludge treatment (Suh & Rousseaux, 2002). In addition, the anaerobic consortia involved in this bioprocess were shown to partially remove PAHs (Trably *et al.*, 2003; Dionisi *et al.*, 2006; Bernal-Martinez *et al.*, 2009), PCBs (Patureau & Trably, 2006; Bertin *et al.*, 2007; El-Hadj *et al.*, 2007) and NP (Chang *et al.*, 2005b; Patureau *et al.*, 2008). However, the comparison of published data exhibits a strong variability in anaerobic micropollutants removals. Indeed, PCBs removal ranged from 12% (Patureau & Trably, 2006) to 98% (El-Hadj *et al.*, 2007) in continuous mode, and NP removal varied from 0% in continuous mode (Hernandez-Raquet *et al.*, 2007) to 40% in batch mode operated during the same retention time (Chang *et al.*, 2005b). This variability highlights a lack of understanding of the mechanisms which determine micropollutants removal. Nonetheless, several operationnal parameters were shown to influence their removal. For example, higher retention time (Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2006; El-Hadj *et al.*, 2007) and higher temperature operation (Trably *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2004; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2006; El-Hadj *et al.*, 2007) were shown to enhance micropollutants removal. In addition to these operating conditions, microbial population, bioavailability and cometabolism were found to influence micropollutants removal. Indeed, an adapted inoculum is favorable (Trably *et al.*, 2003), suggesting that the abundance of micropollutants degrading microorganisms is determining. Besides, micropollutants bioavailability is usually assumed to limit their biodegradation (Chang *et al.*, 2003; Patureau & Trably, 2006), which is consistent with higher removal measured when micropollutants are transferred to aqueous phase thanks to surfactants (Chang *et al.*, 2005b). PAHs, PCBs and NP are recalcitrant compounds, and their biodegradation is likely to occur thanks to cometabolic and syntrophic interactions, linked with the overall metabolism and with the structure of microbial population. Thus, an additionnal readily biodegradable carbon source can enhance micropollutants removal (Chang *et al.*, 2005b; Dionisi *et al.*, 2006), probably due to the stimulation of the overall metabolism. Furthermore, the sludge chemical or physical pretreatments used to solubilize matter and to enhance its biodegradability were demonstrated to favour micropollutants removal in some cases (Table 1), as a possible consequence of bioavailability and/or cometabolism enhancement. Finally, the anaerobic biodegradation of micropollutants is influenced by their own physico-chemical properties (Chang *et al.*, 2003; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2006; Carballa *et al.*, 2006).

In this study, the removal of PAHs, PCBs and NP was measured for different feed characteristics, at fixed anaerobic digestion operating conditions (retention time, temperature, inoculum, chemical oxygen demand and micropollutants load). The feed characteristics varied according to sludge origin, to thermal treatment and to the preparation of sludge composites by mixing with cellulose or sludge supernatant. The objective was to identify the inlet sludge key parameters and the micropollutants properties which determine their removal and might help to predict their fate.

IV.3.2 Experimental section

Chemicals. All solvents were purchased from J.T.Baker. The studied compounds are listed in Table 2. PAHs and PCBs powders were obtained from Dr Ehrenstorfer GmbH. Each compound was separately dissolved in dichloromethane at 1 g/L. The pure 4-nonylphenol (NP) isomer mixture was purchased from Interchim. It was diluted in hexane to reach 40 g/L. The spiking mix was prepared from these individual concentrated solutions, to the final concentration of 100 mg/L except for indeno(1,2,3,c,d)pyrene (20 mg/L) and for nonylphenol (2 g/L).

The 10 mg/L standard solution of PAHs in acetonitrile, the 10 mg/L standard solution of PCBs and of tetrachloronaphtalene (TCN) in hexane and the 100 mg/L of NP in hexane were provided by Dr Ehrenstorfer GmbH. For quantification, the standard solutions were diluted to obtain 6 calibration levels from 10 to 1 000 µg/L in acetonitrile for PAHs, from 100 to 1 000 µg/L in dichloromethane for PCBs and from 500 to 5 000 µg/L in hexane for NP. Standards were stored at -20 °C.

Sludge samples. The experiments were carried out using five different sludge samples. The primary sludge sample (PS) was collected at the primary settling tank outlet of a domestic WWTP treating 33 000 PE (Person Equivalent). A part of this sample was hydrolysed at 165°C during 30 min in a Zipperclave reactor to obtain the thermally treated primary sludge sample (TTPS). The secondary sludge sample (SS) came from the biological aerobic unit of a domestic plant treating 250 000 PE with a very low sludge retention time (0.4 day). The CSS sample was obtained by mixing SS with cellulose particles (20 µm, Sigma-Aldrich) at 50/50 of chemical oxygen demand (COD).

Centrifugation of SS (10 000 *g*, 20 min) followed by filtration at 1.2 µm (Whatman GF/C filter) were carried out to separate the particles from the supernatant, this latter containing the dissolved and colloidal matter (DCM). Afterwards, SS was diluted with its own supernatant at volumic proportions of 3:1 (sludge : supernatant) to provide the fifth sludge sample SupSS.

Prior to their direct use or to composite preparation, PS and SS were stored at -20°C.

All these samples were then diluted with deionised water to reach 24 ± 5 g_{COD}/L and spiked at 5 µg/g_{DM} for each PCB and PAH except for indeno(1,2,3,c,d)pyrene (1 µg/g_{DM}), and 100 µg_{NP}/g_{DM}.

Experimental setup. The anaerobic digestion of PS, TTPS, SS, CSS and SupSS was performed in stirred lab-scale reactors of 5L. Temperature was regulated at 35°C thanks to hot water circulation in the external jacket. The feed was stored at 4°C. Six times per day, it was pumped into the reactor just after pumping out the digested sludge. This latter was collected in tanks at 4°C. Hence, the reactors were operated at a retention time of 20 days and an organic load of $1.2 \pm 0.2 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}/\text{day}$. For the start-up, they were filled with methanogenic sludge coming from an anaerobic mesophilic reactor adapted to PAHs-polluted sludge, and directly fed at the normal operating conditions. The reactors were run during 4-5 retention times.

The pH and the biogas volumetric production were monitored on line. Once a week, 7-days composite samples were taken from the feeding tank, the outlet tank and the gaseous phase. Removals were calculated when the steady-state was achieved.

A sorbent cartridge (ORBO, Supelco) was placed at the gaseous outlet of the reactor fed with SupSS during 7 days, to quantify the micropollutants volatilisation.

Analytical methods. The phase containing the dissolved and colloidal matter was separated from the total sludge samples by centrifugation (10 000 *g*, 20 min) followed by filtration at 1.2 μm . The dry matter (DM, $\text{g}_{\text{DM}}/\text{L}$) in total sludge and in dissolved/colloidal phase was measured by weighing the sample after heating at 105°C during 24 h. The proteins and carbohydrates in total sludge samples were respectively analysed according to Lowry (Lowry *et al.*, 1951) and anthrone (Dreywood, 1946) methods. The standard curves 20 – 100 mg/L were obtained with bovine serum albumin (BSA) for proteins (expressed in $\text{g}_{\text{eqBSA}}/\text{L}$) and with glucose for carbohydrates ($\text{g}_{\text{eqGlu}}/\text{L}$). The chemical oxygen demand in total sludge (COD, $\text{g}_{\text{O}_2}/\text{L}$) was determined thanks to Merck Spectroquant kits, in accordance with the ISO 15 705. The samples were diluted to be in the range 150 – 1 500 $\text{mg}_{\text{COD}}/\text{L}$. The volatile fatty acids (VFA) acetate, propionate, iso-butyrate, butyrate, iso-valerate and valerate concentrations were determined in dissolved/colloidal phase by gas chromatography (GC800, Fisons Instruments).

A fraction of each sludge sample was freeze-dried and ground in order to quantify the lipids and the micropollutants. The lipid content was defined as the matter extractible with petroleum ether (PEEM). The extraction was performed with an Accelerated Solvent Extractor (Dionex) operating at 70 bars and 105°C. PAHs, PCBs and NP were extracted from the ORBO cartridge thanks to a Soxhlet setup, operated during 16h at 60°C, with 200 mL of hexane/acetone (50:50 v:v). Extraction from inlet and outlet sludge samples and quantification in all extracts were performed according to Barret *et al.* (2009b).

PLS regression. The partial least-squares (PLS) technique is based on constructing PLS factors by minimizing the covariance between the dependant variable (Y block) and the explicative variables (X block). The prediction of Y block is then calculated with a multivariable linear regression on the X block using the software R version 1.2.2 for Windows and by using PLS functions developed elsewhere (Durand). The first PLS factor accounts for the highest percentage of variance, and the following factors for decreasing amounts of variance. The number of PLS factors (dimension, dim) of the models was determined by

minimizing the mean squared predictions error (predicted residual sum of squares, PRESS) through a cross-validation procedure.

This technique was used to model the micropollutants removal. X block was composed of inlet sludge characteristics and of micropollutants characteristics, whereas Y block consisted of the removal values in percentage.

IV.3.3 Results and discussion

VFAs did not accumulate within the five reactors (Tableau IV-3), which indicates that the biodegradation was completed and that the organic load was appropriate. Moreover, methane content in biogas was about 70 %, except for the reactor fed with CSS which will be discussed later (Figure IV-8). As a conclusion, reactors were operated in good methanogenic conditions.

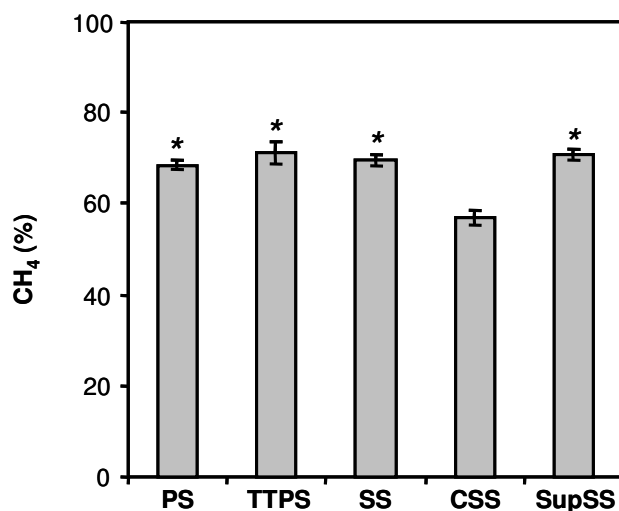


Figure IV-8 : Average methane percentage of the biogas produced under the different feedings. Means labelled with a star are not significantly different (p-value=0.05).

The removal of PAHs, NP and PCBs are presented in Figure IV-9. Since PAHs volatilisation was undetectable in the reactor fed with SupSS, the calculated removals include two main mechanisms: biodegradation and sequestration. An analysis of variance was performed for each micropollutant between the removals measured in the 3 or 5 reactors (PCBs removal was not measured in reactors fed with CSS and SupSS). For most compounds, removals in the different reactors were statistically different.

Slightly substituted PCBs exhibited lower removals (Figure IV-9). Indeed, PCBs anaerobic degradation is initiated by reductive dechlorination (Smidt & de Vos, 2004). Hence, the apparent removal of slightly substituted PCBs results from their degradation and from their production by dechlorination of highly substituted PCBs. Two cascade reactions are likely to occur:



As a result, we only considered the fate of PCB180.

Influence of sludge origin on micropollutant removal. Primary sludge (PS) and secondary sludge (SS) presented similar composition (Tableau IV-3). As SS was sampled in an aerated tank with very low retention time, it is not stabilized, which explains the weak differences with PS. PS and SS slightly differed in proteins and lipids content: both were higher in PS. As microbial cells and exopolymeric substances structuring the sludge flocs are mainly constituted of proteins (Sponza, 2003), their content may be an indicator of hardly biodegradable matter. Higher lipid content suggests a higher proportion of hydrophobic material, hardly accessible during the anaerobic digestion. These slight differences are probably responsible for the lower COD and DM removal with PS feeding. The removal of all micropollutants was also lower with PS feeding. Benabdallah El-Hadj et al. (2007b) observed contradictory results about NP degradation with primary and secondary sludge feeding, with respective removals of 27 % and 20 %. However, information given by the authors about the origin and characteristics of their sludge samples is scarce. If their secondary sludge sample originated from a WWTP with more common retention time (several days), its biodegradability would be lower than the SS used in this study (Bougrier *et al.*, 2008), and also lower than PS (Gavala *et al.*, 2003), which would imply the lower NP removal observed in secondary sludge than in primary sludge. As a conclusion, a link between sludge matter biodegradation and micropollutants removal may exist. Nevertheless, the origin of sludge is not the determining factor. Sludge matter characteristics and its biodegradability are likely to be more reliable indicators.

Influence of sludge thermal treatment on micropollutant removal. To investigate more thoroughly the link between sludge characteristics, sludge degradation and micropollutants removal, a thermal treatment was applied to PS to obtain TTPS. This pre-treatment improved the dry matter removal from 49 to 60 % (Tableau IV-3), which is in accordance with literature. Indeed, thermal pre-treatment as well as ozone and ultrasound pretreatments, were previously shown to enhance sludge biodegradability and methane production (Gavala *et al.*, 2003; Graja *et al.*, 2005; Bougrier *et al.*, 2006; Bougrier *et al.*, 2007). Bougrier et al. (2008) established that the higher the initial biodegradability, the lower the pretreatment effect. This may explain the positive but low effect (11 % enhancement) of thermal treatment in our case, since the raw PS exhibited a high removal.

On the contrary, micropollutants removal was slightly reduced by thermal pre-treatment (Figure IV-9). Studies concerning the impact of these pretreatments on organic micropollutants fate are scarce. The solubilization of PAHs resulting from matter solubilization by ozonation was demonstrated (Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2007b), probably due to PAHs sorption to the solubilized dissolved and colloidal matter. On the contrary, after thermal treatment, no PAHs transfer into aqueous phase was detected (Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2007b), or the aqueous fraction was found to decrease in both feed sludge and digested sludge because of dissolved and colloidal matter denaturing (Barret *et al.*, 2009b). Usually, the aqueous fraction of micropollutants is assumed to be the bioavailable fraction towards sludge microorganisms (Artola-Garicano *et al.*, 2003; Ivashechkin *et al.*, 2004; Dionisi *et al.*, 2006). According to this hypothesis, the bioavailability of micropollutants should be increased by ozonation, whereas it should be decreased by thermal pre-treatment.

Furthermore, the second hypothesis widely postulated is that micropollutants biodegradation is limited by their bioavailability (Chang *et al.*, 2003; Patureau & Trably, 2006). According to this, ozone pretreatment should enhance micropollutants biodegradation as a result of the bioavailability increase, and the thermal treatment should not, due to the bioavailability decrease. Both effects were previously observed: ozonation positively impacted on PAHs and LAS removal and no impact or even a negative impact were detected for ultrasound and thermal treatment (Tableau IV-2), which corroborated the hypotheses. The lower removal of micropollutants measured in this study after thermal pretreatment is thus consistent with the previously published data, and might be explained by lower bioavailability.

In addition to bioavailability, cometabolism is known to influence micropollutants metabolism. However, in spite of a higher overall metabolism proven by higher DM removal (Tableau IV-3), micropollutants removal was not improved, indicating that the cometabolic interactions are not linked to the overall metabolism. Either a specific metabolism is involved in cometabolic interactions, or the micropollutants biodegradation is limited by another phenoma, such as bioavailability.

Tableau IV-2 : Effect of sludge physical or chemical pretreatments on the removal of dry matter and of micropollutants during anaerobic digestion.

Pretreatment	Micropollutants	Effect on dry matter removal	Effect on micropollutants removal
Thermal ¹	NP	+	No effect
Thermal ²	PPCPs	+	No effect
Thermal ³	LAS	?	-
Ozonation ³	LAS	?	+
Ozonation ⁴	PAHs	+	+
Ozonation ⁵	PAHs	-	+
Ultrasound ⁶	Naphtalene, pyrene	+	No effect

¹Benabdallah El-Hadj *et al.* (2007b), ²Carballa *et al.* (2006), ³Carballa *et al.* (2009), ⁴Bernal-Martinez *et al.* (2007), ⁵Bernal-Martinez *et al.* (2009) et ⁶Benabdallah El-Hadj *et al.* (2007a).

PPCPs: pharmaceuticals and personal care products; LAS: linear alkylbenzene sulphonates

Tableau IV-3 : Feed characteristics and removals measured for the five operated reactors (average value and standard deviation from 5 measurements performed at steady-state).

Feeding	COD g_{O_2}/L	DM g_{DM}/L	DCM % of total DM	Proteins g_{eqBSA}/g_{DM}	Sludge carbohydrates from cellulose g_{eqGIU}/g_{DM}	Carbohydrates from cellulose g_{eqGIU}/g_{DM}	Lipids g_{PEEM}/g_{DM}	VFA g_{VFA}/g_{DM}
PS	28 ± 4	24 ± 2	5 ± 1	0,27 ± 0.03	0.29 ± 0.09	0	0.13 ± 0.05	0.03 ± 0.02
TTPS	27 ± 3	20 ± 2	11 ± 2	0.32 ± 0.10	0.29 ± 0.15	0	0.15 ± 0.06	0.04 ± 0.01
SS	22 ± 2	19 ± 1	4 ± 4	0.25 ± 0.02	0.30 ± 0.10	0	0.10 ± 0.04	0.04 ± 0.04
CSS	27 ± 2	21 ± 4	8 ± 7	0.16 ± 0.03	0.20 ± 0.19	0.46	0.06 ± 0.04	0.02 ± 0.04
SupSS	19 ± 2	16 ± 2	14 ± 4	0.29 ± 0.05	0.26 ± 0.06	0	0.10 ± 0.05	0.10 ± 0.02
Removal (%)								
PS	57 ± 7	49 ± 9	49 ± 10	38 ± 12	88 ± 1		79 ± 7	93 ± 3
TTPS	64 ± 10	60 ± 10	33 ± 9	51 ± 15	84 ± 10		83 ± 8	100 ± 5
SS	67 ± 7	58 ± 10	43 ± 10	41 ± 16	81 ± 14		79 ± 5	97 ± 3
CSS	83 ± 4	79 ± 5	52 ± 30	53 ± 11	98 ± 1		nm	100 ± 5
SupSS	62 ± 5	52 ± 11	62 ± 25	49 ± 9	90 ± 3		nm	100 ± 4

nm: not measured

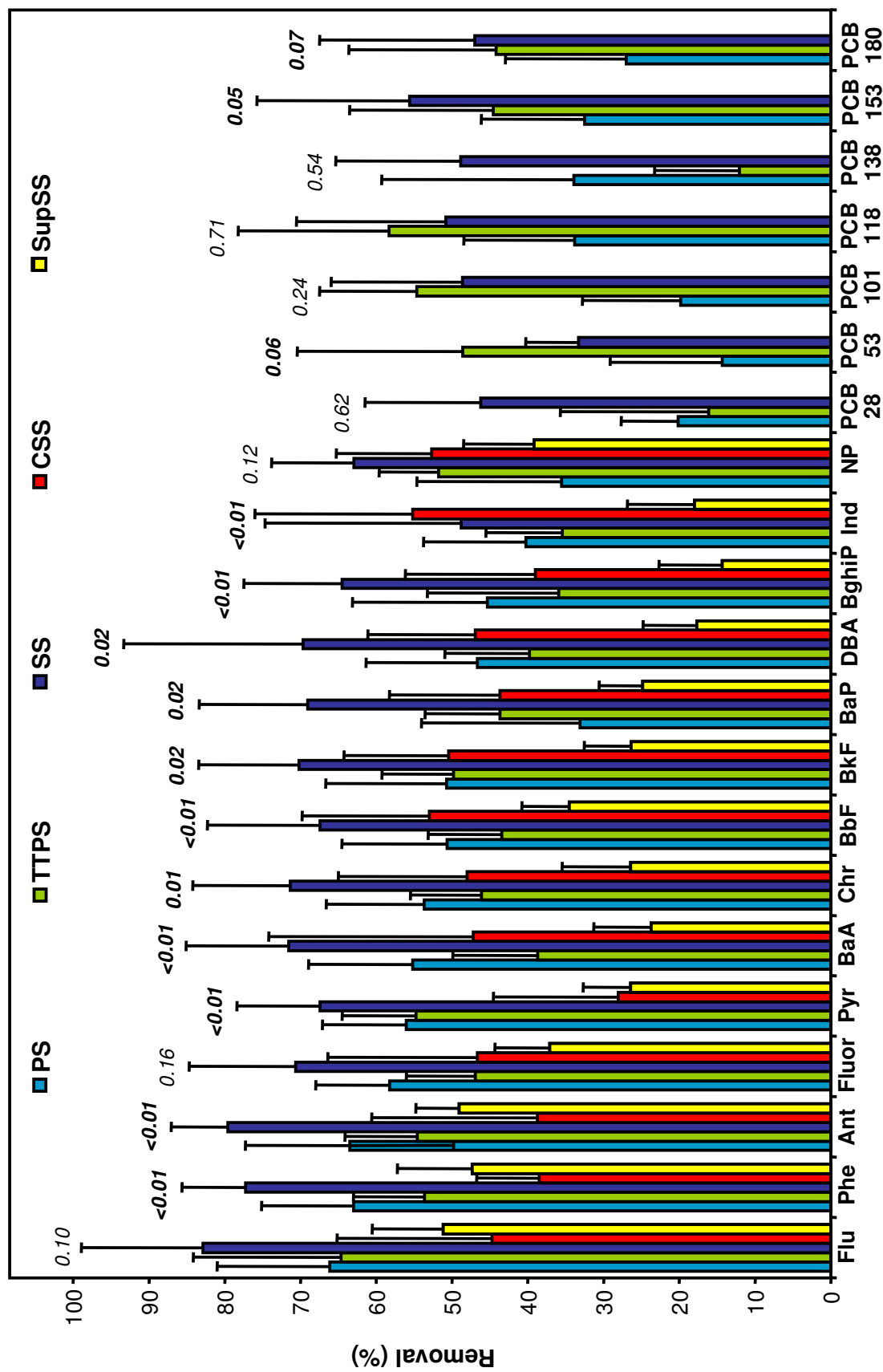
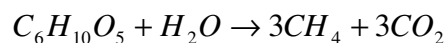


Figure IV-9 : Micropolluants removal with PS, TTPS, SS, CSS and SupSS feeds. For each compound, the p-value between the 5 (3 for PCBs) sets of measurements is indicated in italic.

Influence of cellulose addition on micropollutant removal. As a readily biodegradable particulate compound, cellulose was added to SS in order to reach a high level of overall cometabolism.

Cellulose is a polymer of glucose. The mass balance of monomeric pattern conversion (Symons & Buswell, 1933) predicts the production of a biogas composed of 50% of methane during cellulose degradation:



This explains why the methane content in reactor fed with CSS decreased ($57 \pm 2 \%$) in comparison to the one fed with SS ($69 \pm 1\%$, Figure IV-8). The extent of COD and DM removal enhancement (Tableau IV-3) as well as the low carbohydrates content in digested CSS (not statistically different from digested SS) suggest that all the cellulose was metabolized (100% removal). The rates of cellulose and sludge matter degradation could thus be calculated. Hence, the overall metabolism was found to be stimulated with CSS ($1.1 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}/\text{day}$ removed with CSS, against $0.7 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}/\text{day}$ with SS), whereas the specific sludge matter metabolism was divided by a two fold factor comparing to SS feeding ($0.4 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}/\text{day}$ with CSS against $0.7 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}/\text{day}$ with SS). However, micropollutants removal did not increase. On the contrary, it decreased of a 1.6 ± 0.4 fold factor (Figure IV-9). The addition of readily biodegradable substrates such as yeast extract, melasse and cellulose had already been performed in several batch experiments. The results were contradictory: in some cases the removal rate of PAHs, NP and PCBs increased (Chang *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005b; Dionisi *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2008), whereas the removals of PCBs (Bertin *et al.*, 2007) and of brominated micropollutants (Gerecke *et al.*, 2006) was not affected. Such discrepancies might be ascribed to different physico-chemical and microbial sludge properties. Depending on the microbial population, overall metabolism stimulation might concern or not the microorganisms involved in micropollutants degradation.

Influence of dissolved and colloidal matter addition on micropollutant removal. In SupSS, the proportion of dissolved and colloidal matter was multiplied by a 3 fold factor, in comparison to SS (Tableau IV-3). As particulate desintegration and hydrolysis are assumed to limit sludge methanisation, higher COD and DM removals were expected for SupSS than for SS. On the contrary, COD and DM removal were reduced of approximately 10 % (Tableau IV-3). This slight decrease of the overall metabolism might be due to a concentration effect: SupSS contained $19 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}$, whereas SS contained $22 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}$ (Tableau IV-3). An inhibitory effect might also have occurred: VFAs concentration reached 1.6 g/L in SupSS (Tableau IV-3), in which acetate accounted for 44 %. Nonetheless, VFAs were totally removed (Tableau IV-3): they were not responsible for the inhibition of the methanogenic consortium. The hypothetical inhibition would have been caused by an unidentified component of DCM.

As a result of overall metabolism decrease, the potential cometabolic effect on micropollutants removal would be negative. Indeed, micropollutants were less efficiently removed (Figure IV-9). The high acetate concentration in feed might contribute to lower their biodegradation, as polyaromatic hydrocarbons biodegradation is supposed to produce

acetate and hydrogen (Christensen *et al.*, 2004) The acetate metabolic fluxes modification caused by high acetate load might cause the modification of micropollutants metabolism. In SupSS, DCM proportion was enhanced without the denaturing phenomena reported for thermal treatment (Barret *et al.*, 2009b). According to the bioavailability hypotheses previously mentioned, micropollutants bioavailability may have been increased. As micropollutants removal decreased, overall metabolism decrease or inhibitory effects might predominate in comparison to the bioavailability effect.

Regression model. The presumable effect on bioavailability, the presumable effect on cometabolic (in reference to the measured overall metabolism) and the measured micropollutants removal were summarized in Tableau IV-4. The performances of anaerobic digestion of PS, TTPS, SS, CSS and SupSS tend to show that cometabolism and bioavailability would alternatively predominate and limit micropollutants removal. The predominant phenomena may be determined by the inlet characteristics.

Tableau IV-4 : Comparison of the different feeds and confrontation of micropollutants removal to the relative bioavailability (according to the usual hypotheses) and cometabolism (assumed to be linked to overall metabolism).

Feedings comparison	Presumable effect on bioavailability	Presumable effect on cometabolism	Measured effect on micropollutants removal
SS with PS	?	+	+
TTPS with PS	-	+	-
CSS with SS	?	+	-
SupSS with SS	+	-	-

The feeds differed one from the other in different parameters so that conclusions were difficult to withdraw about the individual effect of each parameter. To precisely isolate the effect of each one, a PLS multivariate linear regression was performed. The regression led to the following model (dimension 6):

$$\text{REMOVAL} = 151 + 0.41\log K_{ow} - 0.077M - 1.94n5C - 3.08n6C - 1.86nCl - 11.8nOH + 0.08\log H + 131DCM - 24.0\text{Proteins} - 45.7\text{Carbo} - 336\text{Lipids} - 54.2\text{Cellulose} - 577\text{VFA}$$

The modeled and measured removals of the 71 considered individuals were in good agreement (Figure IV-10), which indicates a good representation of the removal variability by the selected predictors. Including the COD, DM, proteins and carbohydrates removal data did not improve the model accuracy (data not shown), suggesting that the relevant information is contained in the inlet.

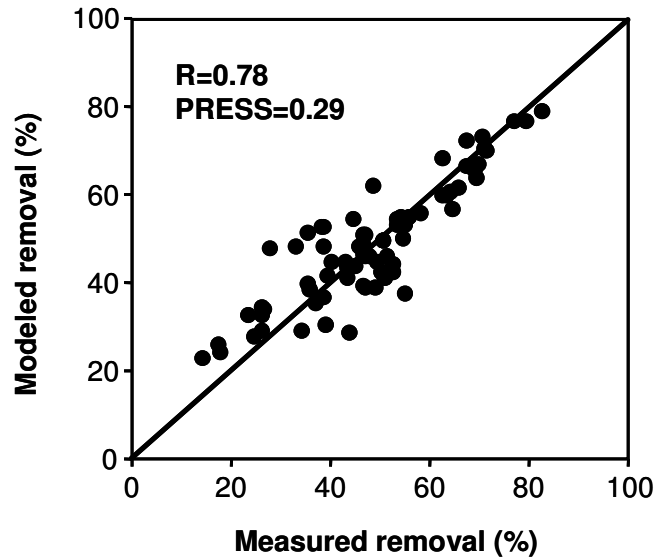


Figure IV-10 : Modelled vs measured values of micropollutants removal during the anaerobic digestion of PS, TTPS, SS, CSS and SupSS.

The weight of the feed and micropollutants characteristics could be compared throughout the confrontation of the centered and reduced regression coefficients (Figure IV-11). The VFAs content was found to be the most influent parameter. This is due to the lower micropollutants removal reported with SupSS feeding, rich in VFAs. A possible direct inhibition by VFAs was mentioned in the previous paragraph, but the inhibition might be caused by an undetermined compound. The effect of this unknown inhibitor would be correlated with the presence of VFAs. Lipids content was the second most important parameter. On one hand, hydrophobic material may be hardly accessible for microorganisms, and thus lower the overall cometabolism. On the other hand, it favours micropollutants sorption to particles (Barret *et al.*, 2009b) and may lower their bioavailability. Both agonist effects may account for the strong negative effect of lipids. The cellulose presence was shown to increase the overall metabolism, but to decrease the sludge matter metabolism, which resulted in a decrease of micropollutant removal. This negative parameter was the third most influent one.

The only positive parameter of feed was the proportion of DCM, probably because it determined the aqueous and bioavailable fraction of micropollutants, and because DCM is a readily bioaccessible substrate.

Micropollutants characteristics also account for removal differences. The number of 6 carbon rings had the most negative effect. Indeed, the higher the aromaticity, the more recalcitrant to biodegradation (Chang *et al.*, 2003; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2006). The influence of Henry's law constant ($\log H$) was negligible, which confirms the very low removal throughout volatilisation.

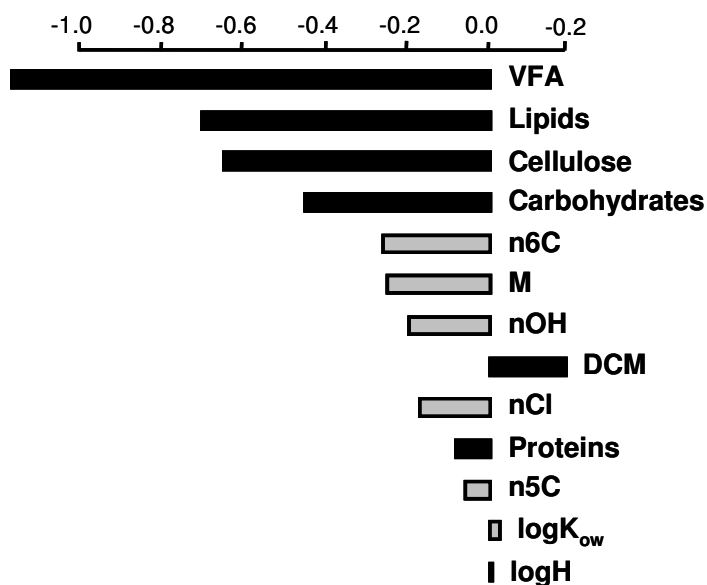


Figure IV-11 : Centered and reduced regression coefficients. Coefficients related to feed sludge characteristics are black coloured, whereas those related to micropollutants are represented in grey.

IV.3.4 Conclusion

The removal of PAHs, NP and PCBs by anaerobic digestion strongly varied as a function of feed sludge characteristics. The sample of primary sludge was slightly richer in proteins and lipids than the sample of secondary sludge. These differences may account for the slightly lower removal of COD and of micropollutants in PS.

The thermal treatment applied to PS decreased micropollutants removal, whereas the overall metabolism was stimulated. When cellulose was added, the micropollutants removal did not increase in spite of higher overall metabolism. These results demonstrated that the cometabolic synergy with micropollutants metabolism is not determined by the overall metabolism. The synergy might be linked to a more specific metabolism, or cometabolism did not limit the micropollutants removal in these cases.

On the contrary, the overall metabolism in the reactor fed with high DCM proportion was lowered while micropollutants bioavailability was hypothetically enhanced, which led to lower micropollutants removals. In this case, cometabolic limitation was likely to predominate on bioavailability limitation.

According to the considered reactor, higher or lower removals could be hypothetically explained either by cometabolism variations or by different levels of bioavailability. This suggests that one mechanism can not be identified as the absolute limiting factor. More research is thus needed to precisely investigate and quantify both mechanisms, and determine their relative weight. Nonetheless, the results suggested that a deep characterization of the feed may help to predict the removal of micropollutants.

IV.4 Approche intégrée

Dans ce paragraphe, une approche intégrée est développée afin d'ouvrir la boîte noire que constitue le procédé de digestion anaérobie. Une démarche intégrée est nécessaire dans la mesure où plusieurs mécanismes s'opèrent de manière concomitante. Ici, sont couplées les études des trois mécanismes identifiés comme majeurs: biodisponibilité, interactions cométaboliques et présence/diversité des acteurs microbiens. Ainsi, nous avons souhaité quantifier les potentiels physique, cométabolique et microbiologique associés à ces mécanismes et les confronter aux données de biodégradation des CTOs.

Au sein des PCBs, seule la dégradation du PCB 180 peut être strictement caractérisée, en raison des réactions en chaînes évoquées dans le paragraphe précédent. Or l'observation de l'influence des caractéristiques de plusieurs molécules d'une même famille sur les trois potentiels présentait pour nous un grand intérêt.

Il en résulte que cette approche intégrée s'est focalisée sur **la famille des HAPs**, avec pour cible d'étude du potentiel microbiologique le gène *bssA*. L'étude de ce potentiel microbiologique sera développée dans une première partie. Dans la mesure où la méthode d'évaluation de cette composante de l'approche intégrée n'a pas fourni de résultats pouvant être intégrés aux autres mesures, seuls les composantes biodisponibilité et cométabolisme ont pu être associées, et valorisées sous forme d'un article scientifique (paragraphe IV.4.2).

IV.4.1 Etude du potentiel microbiologique

L'approche ici développée vise à répondre à plusieurs questions gravitant autour du potentiel microbiologique de biodégradation des CTOs. Le modèle d'étude est constitué par les microorganismes présents dans 7 réacteurs de digestion anaérobie (Figure IV-12), et l'indicateur fonctionnel choisi est le gène *bssA*, dont l'enzyme est supposée impliquée dans la biodégradation des molécules aromatiques.

La première interrogation concerne le caractère **ubiquiste** des microorganismes dégradant les CTOs. Des écosystèmes ne subissant pas la pression de sélection constituée par la présence de CTOs (phases stationnaires 1 des réacteurs R1 à R3) seront étudiés afin d'explorer cet aspect.

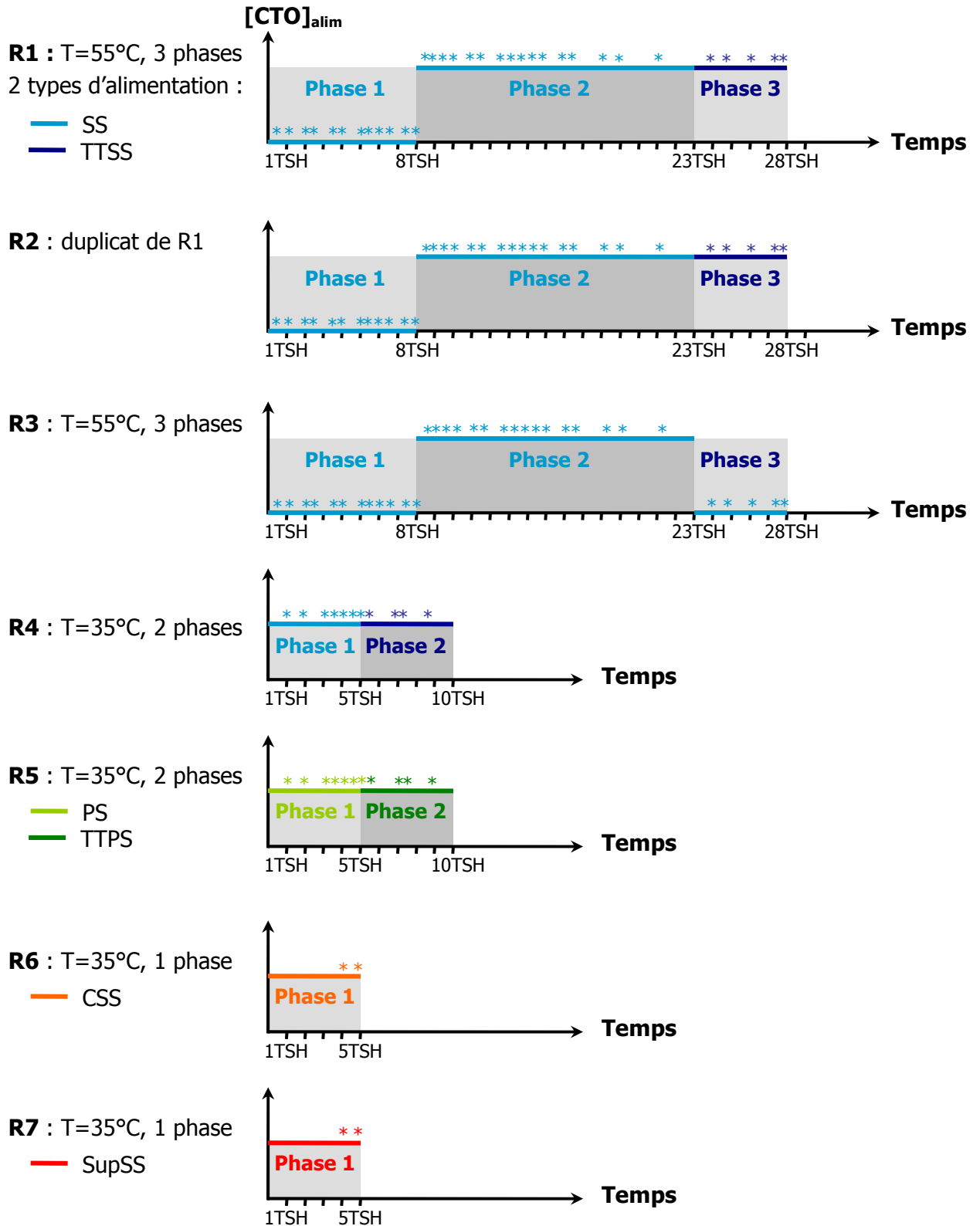


Figure IV-12 : Synthèse des différents réacteurs mis en œuvre. Les étoiles représentent les prélèvements pratiqués.

Par ailleurs, différents niveaux de **biodisponibilité** des CTOs et des **conditions cométaboliques** variées (en quantité et en qualité) sont susceptibles de favoriser ou de défavoriser la croissance de certains de ces microorganismes. Pour une même concentration en CTOs ($5 \mu\text{g}_{\text{HAP}}/\text{g}_{\text{MS}}$), les différentes matrices d'alimentation étudiées (boue primaire/secondaire, brute/thermolysée/supplémentée) constituent les leviers utilisés pour générer différents niveaux de biodisponibilité et cométabolisme (phases stationnaires de R1 à R7). La quantité et la diversité des microorganismes portant *bssA* pourront être reliées à ces leviers. Enfin, si au sein des écosystèmes stabilisés, la quantité et la diversité des microorganismes dégradant les molécules aromatiques varient avec la biodisponibilité des CTOs et le cométabolisme, on peut se demander si la **dynamique d'évolution des microorganismes portant *bssA*** est calquée sur la dynamique d'évolution de la communauté totale. Ces dynamiques pourront aussi être confrontées à la dynamique d'évolution de la biodisponibilité et du cométabolisme, elle-même liée aux paramètres macroscopiques dans le réacteur. Ici, les phases transitoires succédant aux changements d'alimentation dans R1 à R5 seront étudiées. R1 à R3 sont tout particulièrement intéressants car l'amplitude des changements de biodisponibilité y est importante pour un cométabolisme fixe (transition phase 1 à phase 2). La troisième phase de R3 a été spécialement conçue pour observer l'influence d'une chute brutale de biodisponibilité.

Dans les prélèvements réalisés au fil du temps d'opération des réacteurs, les ADN génomiques ont été extraits. Les concentrations d'ADN récupérées s'échelonnent entre 5 et 60 ng/ μL . L'amplification de la région v3 de l'ADNr 16S a généré un unique produit proche de la taille escomptée (205 pb), garantissant ainsi l'intégrité de l'ADN extrait.

Le système de détection du gène *bssA* a ensuite été mis en œuvre sur le témoin positif (ADN d'*Azoarcus sp.* CIB). Un unique produit de PCR est obtenu, à la taille attendue : environ 300 pb (Figure IV-13A), ce qui tend à valider le système de détection employé. Au sein de la gamme de température d'hybridation testée, un optimum apparaît autour de 51°C.

La gamme de température d'hybridation a aussi été testée sur un échantillon (R5, prélèvement 22, dilution 50 soit 1 ng_{ADN} par tube PCR), car l'optimum peut être différent dans les échantillons réels. Cependant, aucune amplification n'a pu être détectée (résultat non montré). Par défaut, la température d'hybridation de 51°C est choisie pour la suite des expérimentations.

Pour augmenter l'amplification des échantillons, ceux-ci ont été ajoutés en quantité supérieure à 1 ng par tube de PCR (Figure IV-13B : R5 22 d10) et une protéine chaperonne nommée T4gp32 a été introduite (Figure IV-13B : T4+). T4gp32 est issue de la traduction du gène 32 du bactériophage T4. Elle facilite le travail de l'ADN-polymérase en stabilisant l'ADN simple brin pendant l'élongation, et rend donc la PCR plus efficace. En présence de plus grande quantité d'ADN initial, deux bandes sont apparues plus nettement dans le cas de R5 22, mais à des tailles très importantes : > 1 000 pb. Il s'agit donc de bandes aspécifiques. Cependant, aucun effet de la T4gp32 n'a été noté sur les autres échantillons, son utilisation n'a donc pas été retenue pour la suite.

La quantité initiale d'ADN ayant une influence, nous avons été plus loin en introduisant les échantillons dans les tubes PCR sans dilution, ce qui correspondait à 5 à 60 ng (Figure

IV-13C). Or de telles concentrations peuvent avoir un effet inhibiteur sur la polymérisation, pour des raisons d'encombrement stérique notamment. Pour essayer de détecter cette inhibition potentielle, les PCR ont été menées en double : chacun des deux tubes contenant 5 à 60 ng d'ADN de l'échantillon, et le second contenant en plus 1 ng d'ADN d'*Azoarcus sp.* CIB. Par cette méthode, l'inhibition totale de la polymérisation a pu être détectée pour l'échantillon R1 25 (pas de bande issue du témoin), une inhibition partielle pour R4 20 et R5 22 (bande faible), et aucune inhibition dans les autres cas présentés (bande aussi intense que le témoin seul). En revanche, dans les échantillons seuls, la bande attendue à 300 pb n'est toujours pas apparue, alors que des bandes aspécifiques ont été révélées. Pour résoudre ce problème d'aspécificité, des conditions d'hybridation plus stringentes ont été appliquées, en augmentant la température à 55°C, sans succès (Figure IV-13D). Pour tenter d'abaisser le seuil de détection du gène *bssA*, le nombre de cycles PCR a été augmenté à 35. Mais cela a eu pour conséquence d'amplifier des fragments aspécifiques en plus grand nombre, sans pour autant qu'une bande proche de 300 pb n'émerge (non montré).

Cette tentative de quantification du potentiel microbiologique associé à la dégradation des molécules aromatiques n'a donc pas abouti. Des copies du gène *bssA* n'ont pas pu être amplifiées en quantité détectable dans nos échantillons. Deux explications peuvent être avancées :

- (1) Le gène *bssA* est peut être réellement **absent** des échantillons de réacteur. En effet, bien qu'un abattement de tous les CTOs ait été détecté dans les réacteurs, l'activité benzyl-succinate synthase comme activation de la biodégradation des noyaux aromatiques des HAPs/NP/PCBs en conditions méthanogènes reste une hypothèse (voir paragraphe I.3.2.1).
- (2) Le gène *bssA* est peut-être présent, mais à des niveaux **inférieurs à la limite de détection**. Les HAPs/NP/PCBs représentent une source infinitésimale de carbone et d'énergie : de l'ordre de 0,01% de la masse dans les boues. On peut donc supposer qu'un très faible pourcentage des génomes extraits contient le gène *bssA*. Au moment de l'hybridation, la quantité de sondes fixées aux gènes *bssA* est une fonction de la quantité de cibles *bssA* et de l'affinité des sondes pour ces cibles. La quantité de sondes appariées de manière non spécifique dépend elle aussi du nombre de cibles aspécifiques et de l'affinité des sondes pour celles-ci. Les appariements aspécifiques résultent d'une très faible affinité pour une quantité importante de cibles, alors que les appariements spécifiques sont caractérisés par une extrêmement forte affinité mais un très faible nombre de cibles. La compétition entre les deux types d'appariement pourrait expliquer la génération de bandes aspécifiques, alors qu'aucune bande spécifique n'est détectée. Cette difficulté hypothétique de détection découle des conditions opératoires choisies, à savoir des micro-concentrations en CTOs, proches de la réalité des systèmes d'épuration.

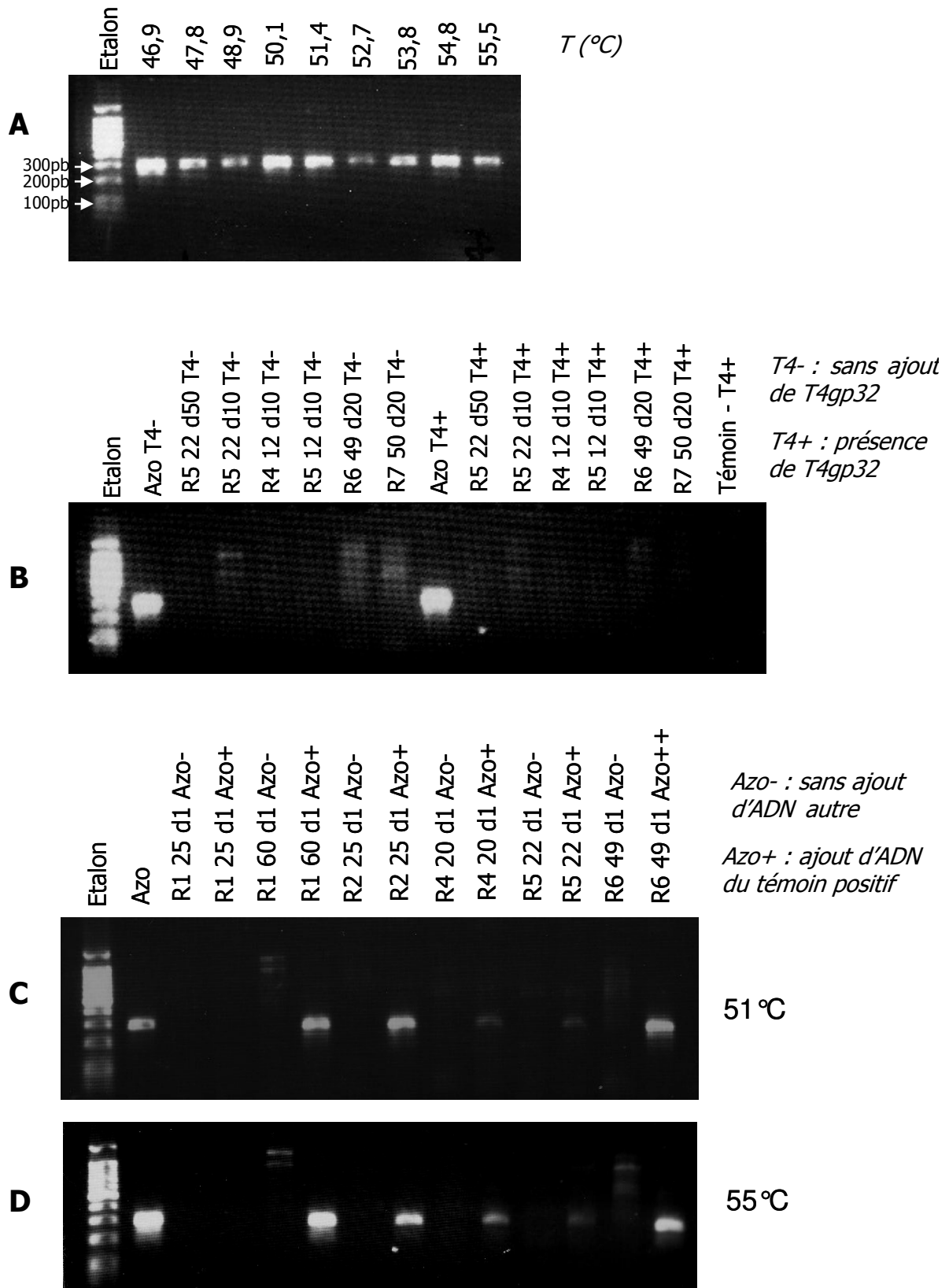


Figure IV-13 : Gels d'électrophorèse obtenus après PCR *bssA* du témoin positif à différentes températures (A), des échantillons de réacteurs avec et sans protéine chaperonne T4gp32 (B), des échantillons de réacteur non dilués avec et sans ADN témoin (C) et à haute température (D).

Les résultats obtenus ne permettent pas de déterminer si l'indicateur choisi est adapté à la fonction ciblée. Pour le valider, un système dans lequel on pourrait s'affranchir du problème de seuil de détection est nécessaire. Ce système devrait probablement présenter des concentrations en HAPs beaucoup plus élevées. De fortes concentrations en HAPs sont rencontrées dans des sols hautement pollués en hydrocarbures. Dans ce type de sols, le gène *bssA* a pu être détecté (Robert Duran, communication personnelle). Mais ce type de matrices « naturellement » contaminées (suite à une marée noire ou à une forte activité industrielle) contient un mélange complexe d'hydrocarbures, dont des HAPs mais aussi des molécules monoaromatiques pour lesquelles l'activation par la benzyl-succinate synthase est avérée. En conclusion, il est difficile de trouver un échantillon permettant de valider l'utilisation du gène *bssA* comme indicateur de biodégradation des HAPs. Une possibilité serait de construire cet échantillon en laboratoire, par méthode d'enrichissement notamment.

IV.4.2 Biodisponibilité et cométabolisme

PAHs FATE DURING THE ANAEROBIC DIGESTION OF CONTAMINATED SLUDGE : DO BIOAVAILABILITY OR COMETABOLISM LIMIT THEIR REMOVAL ?

Maialen Barret, Hélène Carrère, Liliana Delgadillo & Dominique Patureau
D'après l'article soumis au journal Water Research

Abstract: The anaerobic removal of 13 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) was measured in five continuous anaerobic digestors with different feed sludge, in which abiotic losses were neglected. These feeds were chosen to generate different levels of PAH bioavailability and cometabolism within the reactors. Based on the accurate modelling of PAH sorption in sludge, the aqueous fraction (including free and sorbed-to-dissolved-and-colloidal-matter PAHs) was demonstrated to be bioavailable, which validated a widespread assumption about micropollutants bioavailability in sludge.

It was also demonstrated that bioavailability is not the only influencing factor. Indeed, PAHs biodegradation resulted from a combination of bioavailability and cometabolism. An equation adapted from Criddle (1993, *The Kinetics of Cometabolism*. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 1048-1056) that takes into account both mechanisms was shown to fit the experimental data, with dry matter removal rate identified as the criteria for cometabolism. The existence of a threshold of dry matter cometabolism was suggested, below which PAHs removal would not be possible. The parameters of the Criddle equation were demonstrated to depend on PAH molecular structure, and the results suggest that they would also be influenced by substrate composition and microbial population.

This research provided original outcomes for the assessment of micropollutants fate. Indeed, the understanding of the driving mechanisms was improved, which has implications for the optimization of micropollutants removal.

IV.4.2.1 Introduction

Hydrophobic micropollutants carried by wastewaters concentrate into sludge (Manoli & Samara, 1999; Byrns, 2001; Blanchard *et al.*, 2004). As a consequence, the removal of these micropollutants during anaerobic digestion largely impacts the suitability of digested sludge for agricultural disposal and is an important issue. Their removal, including biological and abiotic mechanisms, considerably varies between the various published studies about anaerobic digestion of contaminated sludge. Apart from the operating conditions which can account for significant differences (Trably *et al.*, 2003; El-Hadj *et al.*, 2007), bioavailability and cometabolism were identified as the hypothetical mechanisms which drive the biodegradation of micropollutants (Dionisi *et al.*, 2006; Patureau & Trably, 2006).

Bioavailability, defined as the concentration available for degradation by the microorganisms, is usually assumed to govern the biodegradation of hydrophobic micropollutants within sludge processes (Chang *et al.*, 2003; Patureau & Trably, 2006). As a consequence, their biodegradation kinetics are modeled according to first order kinetics (Artola-Garicano *et al.*, 2003; Urase & Kikuta, 2005; Dionisi *et al.*, 2006). In the example of a PAH, this formalism would give :

$$r_{\text{PAH}} = k_1 * C_{\text{PAH,bio}} \quad (1)$$

where r_{PAH} is the biodegradation rate of a given PAH ($\mu\text{g}_{\text{PAH}}/\text{L}/\text{day}$), k_1 is the first order constant (1/day) and $C_{\text{PAH,bio}}$ is the bioavailable concentration of the PAH ($\mu\text{g}/\text{L}$).

Moreover, the aqueous micropollutants are assumed to be bioavailable by some researchers (Artola-Garicano *et al.*, 2003; Urase & Kikuta, 2005; Dionisi *et al.*, 2006), so that equation (1) gives equation (2):

$$r_{\text{PAH}} = k_1 * C_{\text{PAH,aqu}} \quad (2)$$

where $C_{\text{PAH,aqu}}$ is the aqueous concentration of the PAH ($\mu\text{g}_{\text{PAH}}/\text{L}$).

The definition for bioavailable fraction assumed in equation (2) was disproved by Fountoulakis *et al.* (2006) who found that a fraction of sorbed-to-particles micropollutants was also bioavailable to microorganisms. Moreover, the aqueous fraction includes free and sorbed-to-DCM (dissolved and colloidal matter) micropollutants (Barret *et al.*, 2009a). These two sludge compartments are usually not differentiated in literature even though interactions between micropollutants and DCM are likely to condition their bioavailability (Perminova *et al.*, 2001).

As a conclusion, understanding and modelling of PAH bioavailability in sludge is still a topic that deserves further research. In particular, it is important to clearly assess which one(s) of the three micropollutant compartments (i.e. free, sorbed-to-DCM and/or sorbed-to-particles) is (are) really bioavailable, and should be taken into account in equation (1).

On the other hand, no methanogenic consortium was shown until now to grow with PAHs over 4 rings as the sole carbon source. Their biodegradation under methanogenic conditions, firstly reported by Trably *et al.* (2003), is only possible when it is combined with other metabolic routes. These cometabolic routes - and as a result, the micropollutants biodegradation - can thus be stimulated by the addition of a readily biodegradable substrate (Chang *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005b; Dionisi *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008). To account

for the influence of both bioavailability and cometabolism, equation (1) may thus be completed with an additional term.

Criddle (1993) proposed an equation to model the cometabolism of a non-growing substrate N with a growing substrate S:

$$r_N = (T_{N,S}r_S + k_N X) \left(\frac{C_N}{K_N + C_N} \right) \quad (3),$$

where r_N is the removal rate of N ($\mu\text{g}_N/\text{L}/\text{day}$), $T_{N,S}$ is the transformation capacity of the non-growing substrate N with S as cometabolic substrate ($\mu\text{g}_N/\text{g}_S$), k_N is the maximum specific rate of non-growing substrate biodegradation in the absence of growing substrate ($\mu\text{g}_N/\text{g}_X/\text{day}$), X is the concentration of microorganisms involved in the metabolism of N (g_X/L), C_N ($\mu\text{g}_N/\text{L}$) is the concentration of non-growing substrate and K_N is the half-saturation constant of N in the Monod formalism ($\mu\text{g}_N/\text{L}$).

Equation (3) refers to simple systems, *i.e.* with only one growing substrate, one non-growing substrate, in pure culture and without any complex matrix. As a consequence, the sorption phenomena and the subsequent bioavailability limitation are not taken into account. In the complex case of PAHs as the non-growing substrate, equation (3) has thus to be modified. In particular, the bioavailability limitation can be accounted for by replacing the total concentration of non-growing substrate by $C_{\text{PAH,bio}}$:

$$r_{\text{PAH}} = (T_{\text{PAH,S}}r_S + k_{\text{PAH}} X) \left(\frac{C_{\text{PAH,bio}}}{K_{\text{PAH}} + C_{\text{PAH,bio}}} \right) \quad (4),$$

where $T_{\text{PAH,S}}$ is the PAH transformation capacity with S as cometabolic substrate ($\mu\text{g}_{\text{PAH}}/\text{g}_S$), k_{PAH} is the maximum specific rate of PAH biodegradation in the absence of cometabolic substrate ($\mu\text{g}_{\text{PAH}}/\text{g}_X/\text{day}$), X is the concentration of microorganisms involved in PAH metabolism (g_X/L) and K_{PAH} is the half-saturation constant of PAH in the Monod formalism ($\mu\text{g}_{\text{PAH}}/\text{L}$).

In equation (4), three mechanisms are taken into account: (i) bioavailability is accounted for throughout $C_{\text{PAH,bio}}$; (ii) the k_{PAH} and K_{PAH} parameters are representative of the response of the PAH metabolic route to the PAH bioavailable concentration (including transporters and enzymes affinity for their substrate); and (iii) $T_{\text{PAH,S}}$ stands for cometabolic interaction between the S substrate metabolism and the PAH metabolism.

Finally, since PAH concentrations in sludge are usually low, $C_{\text{PAH,bio}}$ can be assumed to be lower than the corresponding half saturation constant K_{PAH} . PAH biodegradation can thus be assumed to follow a pseudo-first order kinetics as a function of PAHs bioavailable concentration, like hypothesized in equation (1). As a consequence, equation (4) can be simplified to:

$$r_{\text{PAH}} = (T_{\text{PAH,S}}r_S + k_{\text{PAH}} X) \left(\frac{C_{\text{PAH,bio}}}{K_{\text{PAH}}} \right) \quad (5).$$

In this study, different bioavailability and cometabolism levels were confronted to PAHs biodegradation rate during the anaerobic digestion of contaminated sludge. The objectives were (i) to identify which compartment(s) of PAHs is (are) bioavailable to microorganisms in

sludge, and (ii) to determine if PAH biodegradation is either limited only by bioavailability (Equation 1) or result from a combination of bioavailability and cometabolism influences (Equation 5).

IV.4.2.2 Materials and Methods

Chemicals. All solvents were purchased from J.T.Baker. PAHs powders were obtained from Dr Ehrenstorfer GmbH. From these powders, a spiking mix was prepared in acetonitrile at 100 mg/L for each PAH except for indeno(1,2,3,c,d)pyrene (20 mg/L).

The 10 mg/L standard solution of PAHs in acetonitrile was provided by Dr Ehrenstorfer GmbH. For quantification, the standard solutions were diluted to obtain 6 calibration levels from 10 to 1,000 µg/L. Standards were stored at – 20 °C.

Sludge samples. The experiments were carried out using five different sludge samples. The primary sludge sample (PS) was collected at the outlet of a primary settling tank of a domestic wastewater treatment plant treating 33 000 PE (Person Equivalent). A part of this sample was hydrolysed at 165°C during 30 min in a Zipperclave reactor to obtain the thermally treated primary sludge sample (TTPS). The secondary sludge sample (SS) came from the biological aerobic unit of another domestic plant treating 250 000 PE with a very low sludge retention time (0.4 day). The fourth sample, CSS, was obtained by mixing SS with cellulose particles (20 µm, Sigma-Aldrich) at 50/50 of chemical oxygen demand (COD). Centrifugation of SS (10 000 g, 20 min) followed by filtration at 1.2 µm (GF/C filter, Whatman) were carried out to separate the particles from the supernatant, containing the dissolved and colloidal matter (DCM). Afterwards, SS was diluted with its own supernatant at volumic proportions of 3:1 (sludge : supernatant) to provide the fifth sludge sample SupSS. Prior to their direct use or to composite preparation, PS and SS were stored at -20°C. All these samples were finally diluted with deionised water to reach 24 ± 5 g_{COD}/L and spiked at 5 µg/g_{DM} for each PAH except for indeno(1,2,3,c,d)pyrene (1 µg/g_{DM}).

Experimental setup. The anaerobic digestion of PS, TTPS, SS, CSS and SupSS was performed in five independent stirred lab-scale reactors of 5L. Temperature was regulated at 35°C using hot water circulation in the external jacket. The feed was stored at 4°C. Six times a day, it was pumped into the reactor just after pumping out the digested sludge, collected in tanks at 4°C. Hence, the reactors were operated at a retention time of 20 days and an organic load of 1.2 ± 0.2 g_{COD}/L/day. For the start-up, reactors were filled with methanogenic sludge coming from a wastewater treatment plant which treats an urban PAH-polluted influent, and directly fed at 1.2 g_{COD}/L/day and 20 days of retention time. The reactors were run for 5 retention times.

When steady state was achieved (after 4 retention times), 7-days composite samples were taken once a week from the feed tank, the outlet tank and the gaseous phase.

For the quantification of PAHs flux carried by the gaseous phase, the gaseous outlet of the reactor fed with SupSS passed through a sorbent cartridge (ORBO, Supelco) for 7 days.

Analytical methods. Five inlet and outlet composite samples from steady-state were analyzed. Chemical oxygen demand (COD, quantification limit: 1g_{O2}/L), dry matter (DM, quantification limit: 2 g_{DM}/L), organic matter (OM, quantification limit: 2 g_{OM}/L), proteins (quantification limit: 0.2 g_{eqBSA}/L), carbohydrates (quantification limit: 0.2 g_{eqGlu}/L), organic carbon in particles (POC, quantification limit: 0.05 g_{OC}/g_{DM}) and in DCM (DCOC, quantification limit: 0.02 g_{OC}/L), volatile fatty acids (VFAs, quantification limit: 0.1 g/L), mineral density (ρ_{\min}) and low molecular weight DCM fraction ($F_{<1kDa}$) were determined according to Barret et al. (2010).

Immediately after sampling the gaseous outlet, PAHs were extracted from the sorbent cartridge using a Soxhlet setup, operated for 16h at 60°C, with 200 mL of hexane/acetone (50:50 v:v). Accelerated solvent extraction from inlet and outlet sludge freeze-dried samples and quantification in all extracts by liquid chromatography and fluorimetric detection were performed according to the materials and methods described elsewhere (Trably et al., 2004).

Reaction rates. The analyses performed on the inlet and outlet samples allowed us to calculate the removal rates r (g/L/day or $\mu\text{g/L/day}$) within the reactors at steady state:

$$r = \frac{Q(C_{\text{in}} - C_{\text{out}})}{V} \quad (6)$$

where Q is the inlet/outlet flow (L/day), C_{in} and C_{out} are the concentrations of a given component respectively in the inlet and the outlet (g/L or $\mu\text{g/L}$), and V is the reactor volume (L).

The removal rates were calculated for COD, DM, OM, proteins, carbohydrates and for PAHs.

Assessment of PAH distribution between the sludge compartments. According to Barret et al. (2009a), a PAH present in sludge can be located in one among three physical compartments: the freely dissolved one (concentration $C_{\text{PAH,free}}$, $\mu\text{g/mL}$), the sorbed-to-DCM one (concentration $C_{\text{PAH,DCOC}}$, $\mu\text{g/g}_{\text{DCOC}}$) and the sorbed-to-particles one (concentration $C_{\text{PAH,POC}}$, $\mu\text{g/g}_{\text{POC}}$). At equilibrium, the three-compartment system can be described by the two following equations:

$$K_{\text{part}} = \frac{C_{\text{PAH,POC}}}{C_{\text{PAH,free}}} \quad (7) \quad \text{and} \quad K_{\text{DCM}} = \frac{C_{\text{PAH,DCOC}}}{C_{\text{PAH,free}}} \quad (8),$$

where K_{part} is the equilibrium constant of micropollutant sorption to particles (mL/g_{POC}) and K_{DCM} is the equilibrium constant of sorption to DCM (mL/g_{DCOC}). The total volumetric concentration of PAH ($C_{\text{PAH,tot}}$, $\mu\text{g/L}$) can thus be expressed as follows:

$$C_{\text{PAH,tot}} = C_{\text{PAH,free}} + C_{\text{PAH,DCOC}} [\text{DCOC}] + C_{\text{PAH,POC}} [\text{POC}] \quad (9),$$

where [DCOC] is the concentration of dissolved and colloidal organic carbon (g_{OC}/L), and [POC] is the concentration of particulate organic carbon (g_{OC}/L).

From the reactors outlet characteristics, the equilibrium constants K_{part} and K_{DCM} were calculated for each PAH in each reactor, according to previously developed models (Barret

et al., 2010). K_{part} values were estimated from the density of sludge mineral matter, the ratio between chemical oxygen demand and organic carbon in particles, and PAHs characteristics; K_{DCM} from the percentage of below 1kDa DCM fraction, the VFA content, the mineral density and PAHs characteristics.

Afterwards, based on the measurement of outlet total concentration ($C_{PAH,tot}$, $\mu\text{g/L}$, measured as detailed in 2.4) and on equations (9) to (12), the **volumetric** concentrations of free ($C_{PAH,free}$, $\mu\text{g/L}$), sorbed-to-DCM ($C_{PAH,DCM}$, $\mu\text{g/L}$), aqueous ($C_{PAH,aqu}$, $\mu\text{g/L}$) and sorbed-to-particles ($C_{PAH,part}$, $\mu\text{g/L}$) PAHs were estimated in bioreactors as follows:

$$C_{PAH,free} = \frac{C_{PAH,total}}{1 + K_{DCM}[DCOC] + K_{part}[POC]} \quad (9)$$

$$C_{PAH,DCM} = \frac{K_{DCM}[DCOC]C_{PAH,total}}{1 + K_{DCM}[DCOC] + K_{part}[POC]} \quad (10)$$

$$C_{PAH,aqu} = C_{PAH,free} + C_{PAH,DCM} \quad (11)$$

$$C_{PAH,part} = \frac{K_{part}[POC]C_{PAH,total}}{1 + K_{DCM}[DCOC] + K_{part}[POC]} \quad (12)$$

IV.4.2.3 Results and discussion

From the inlet and outlet concentrations (Tableau IV-5), the PAHs removal rates in each bioreactor could be calculated according to equation (6). These measured removals stand not only for biodegradation but also for abiotic mechanisms, among which volatilization. In the reactor fed with SupSS, we determined that PAHs losses throughout volatilization were below 1 % (data not shown), which is negligible. PAH losses throughout volatilization can be assumed to be also negligible in the four other reactors since they were carried out with identical set-up. Although some additional mechanisms can account for abiotic losses, one previous study performed with the same set-up as ours demonstrated that the total abiotic losses of low molecular weight PAHs reached 25 %, and were negligible for higher molecular weight ones (Trably et al., 2003). In other studies, abiotic losses remained below 10 % (Chang *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2004), demonstrating that the total abiotic losses of PAHs during anaerobic digestion are usually low. On the basis of our volatilization experiment and of literature data, we neglected the abiotic losses and the biodegradation rates were taken as equal to the removal rates. Hence, depending on the PAH and on the feed, biodegradation rates were found to range from 0.2 to 5.2 $\mu\text{g}_{PAH}/\text{L}/\text{day}$.

Tableau IV-5 : Inlet and outlet concentrations of PAHs ($\mu\text{g/L}$, average of five steady state samples and standard deviation).

	PS		TTPS		SS		CSS		SupSS	
	C_{in}	C_{out}	C_{in}	C_{out}	C_{in}	C_{out}	C_{in}	C_{out}	C_{in}	C_{out}
Fluorene	54	18	42	15	44	8	18	10	24	12
	± 6	± 8	± 14	± 2	± 20	± 3	± 6	± 4	± 5	± 2
Phenanthrene	142	53	70	32	103	23	36	22	57	30
	± 20	± 12	± 22	± 4	± 20	± 8	± 8	± 10	± 6	± 2
Anthracene	89	32	61	28	65	13	30	19	42	21
	± 13	± 6	± 16	± 3	± 12	± 4	± 5	± 8	± 6	± 1
Fluoranthene	125	52	71	38	88	26	59	31	77	49
	± 10	± 7	± 20	± 7	± 12	± 7	± 7	± 13	± 1	± 4
Pyrene	151	66	122	55	106	34	53	38	77	57
	± 11	± 9	± 29	± 9	± 19	± 6	± 10	± 20	± 6	± 6
Benzo(a)anthracene	191	86	65	40	124	35	68	36	79	60
	± 10	± 9	± 10	± 8	± 24	± 10	± 8	± 15	± 5	± 7
Chrysene	129	60	68	36	92	26	75	39	89	66
	± 7	± 7	± 10	± 7	± 15	± 8	± 7	± 17	± 8	± 7
Benzo(b)fluoranthene	192	95	78	44	118	38	197	93	219	143
	± 11	± 10	± 14	± 7	± 24	± 12	± 16	± 24	± 7	± 28
Benzo(k)fluoranthene	150	74	61	31	99	29	114	56	122	90
	± 9	± 8	± 15	± 5	± 13	± 9	± 10	± 19	± 8	± 9
Benzo(a)pyrene	49	32	57	32	48	15	78	44	107	81
	± 6	± 4	± 10	± 8	± 12	± 4	± 12	± 14	± 9	± 8
Dibenzo(a,h)anthracene	130	69	63	38	96	29	109	58	122	100
	± 7	± 8	± 11	± 9	± 10	± 9	± 12	± 22	± 8	± 10
Benzo(g,h,i)perylene	150	82	46	29	101	36	53	32	70	61
	± 6	± 9	± 10	± 10	± 18	± 9	± 12	± 14	± 5	± 6
Indeno(1,2,3,c,d)pyrene	25	15	10	6	17	9	18	8	19	16
	± 1	± 3	± 2	± 1	± 2	± 3	± 2	± 3	± 1	± 1

Limitation by bioavailability only: first order kinetics. The sorption equilibrium constants estimated from the sludge outlet characteristics (Tableau IV-6) are presented in Tableau IV-7. The standard errors calculated from the data given in Barret et al. (2010) were 0.2 for $\log K_{part}$ and 0.3 for $\log K_{DCM}$, which ensures that the set of data contained some significant differences. Taken as a whole, the highest values were obtained in the reactor fed with SupSS, probably because of its mineral density being the highest one. This sludge characteristic indeed strongly enhances PAH affinity for particles and for DCM (Barret et al., 2010). The $\log K_{part}$ and $\log K_{DCM}$ varied from 3.6 for low molecular weight PAHs to 5.5 for high molecular weight ones. These values are similar to PAH sorption constants of other digested sludge samples (Barret et al., 2010). Based on these equilibrium constants, the distribution of PAHs between compartments was calculated according to equations (9) to (12) (Figure IV-14). In a given reactor, PAHs characteristics strongly influenced their percentage in the free compartment, whereas they slightly affected the aqueous compartment and did not significantly influence the sorbed-to-particles compartment. For the

aqueous and sorbed-to-particles compartments, the effect of sludge characteristics was stronger than the micropollutants influence since variations between reactors were higher than variations between PAHs within one reactor. As a conclusion, the strategy based on the use of different feeds to generate different PAH compartment distributions was successful. The confrontation of these distributions to biodegradation rates was thus possible.

Tableau IV-6 : Inlet and outlet sludge characteristics (average of five steady state samples).

		PS		TTPS		SS		CSS		SupSS	
		C _{in}	C _{out}	C _{in}	C _{out}	C _{in}	C _{out}	C _{in}	C _{out}	C _{in}	C _{out}
COD	<i>g_{O2}/L</i>	28	12	27	9.2	22	7.2	26	4.9	20	6.6
DM	<i>g_{DM}/L</i>	24	12	20	9.1	19	8.3	21	5.1	16	7.1
OM	<i>g_{OM}/L</i>	18	6.3	13	4.7	13	3.7	18	2.7	11	3.4
Proteins	<i>g_{eqBSA}/L</i>	6.4	3.9	6.4	3.4	4.9	3.4	3.4	1.8	4.4	2.4
Carbohydrates	<i>g_{eqGlu}/L</i>	6.9	0.8	5.8	0.5	5.9	0.9	14.2	0.3	3.9	0.3
POC	<i>g_{OC}/L</i>	nm	3.7	nm	2.6	nm	1.8	nm	1.5	nm	1.7
PCOD/POC	<i>g_{O2}/g_{OC}</i>	nm	2.98	nm	2.82	nm	3.20	nm	2.71	nm	2.94
ρ_{min}	<i>g/mL</i>	nm	2.78	nm	2.77	nm	2.93	nm	2.72	nm	3.00
DCOC	<i>g_{OC}/L</i>	nm	0.16	nm	0.22	nm	0.22	nm	0.08	nm	0.29
VFA	<i>g/L</i>	0.60	0.06	0.51	ql	0.26	0.06	0.32	ql	1.50	ql
F_{<1kDa}	<i>%</i>	nm	50	nm	100	nm	7	nm	8	nm	38

nm: not measured; ql : below quantification limit.

Tableau IV-7 : log K_{part} and log K_{DCM} determined in the reactor outlets according to Barret *et al.* (2009b).

	PS		TTPS		SS		CSS		SupSS	
	log K _{part}	log K _{DCM}	log K _{part}	log K _{DCM}	log K _{part}	log K _{DCM}	log K _{part}	log K _{DCM}	log K _{part}	log K _{DCM}
Fluorene	3.6	4.0	3.7	4.0	3.8	4.4	3.6	4.1	4.1	4.5
Phenanthrene	3.9	4.2	4.0	4.2	4.2	4.6	4.0	4.3	4.5	4.6
Anthracene	3.9	4.2	4.0	4.2	4.1	4.6	3.9	4.3	4.4	4.6
Fluoranthene	3.9	4.3	4.0	4.3	4.2	4.7	3.9	4.4	4.4	4.9
Pyrene	4.2	4.5	4.3	4.4	4.4	4.8	4.2	4.6	4.7	5.1
Benzo(a)anthracene	4.3	4.8	4.4	4.6	4.5	4.8	4.3	4.7	4.8	5.2
Chrysene	4.4	4.8	4.5	4.7	4.6	5.0	4.4	4.9	4.9	5.2
Benzo(b)fluoranthene	4.4	4.9	4.5	4.7	4.6	5.1	4.5	4.9	4.9	5.3
Benzo(k)fluoranthene	4.5	4.8	4.6	4.8	4.7	5.3	4.6	5.0	5.0	5.3
Benzo(a)pyrene	4.4	4.8	4.5	4.8	4.6	5.2	4.4	4.9	4.9	5.5
Dibenzo(a,h)anthracene	4.7	5.0	4.7	5.0	4.9	5.4	4.7	5.5	5.2	5.5
Benzo(g,h,i)perylene	4.6	5.0	4.7	5.0	4.8	5.4	4.6	5.2	5.1	5.2
Indeno(1,2,3,c,d)pyrene	4.4	4.8	4.4	4.8	4.6	5.2	4.4	4.9	4.9	5.0

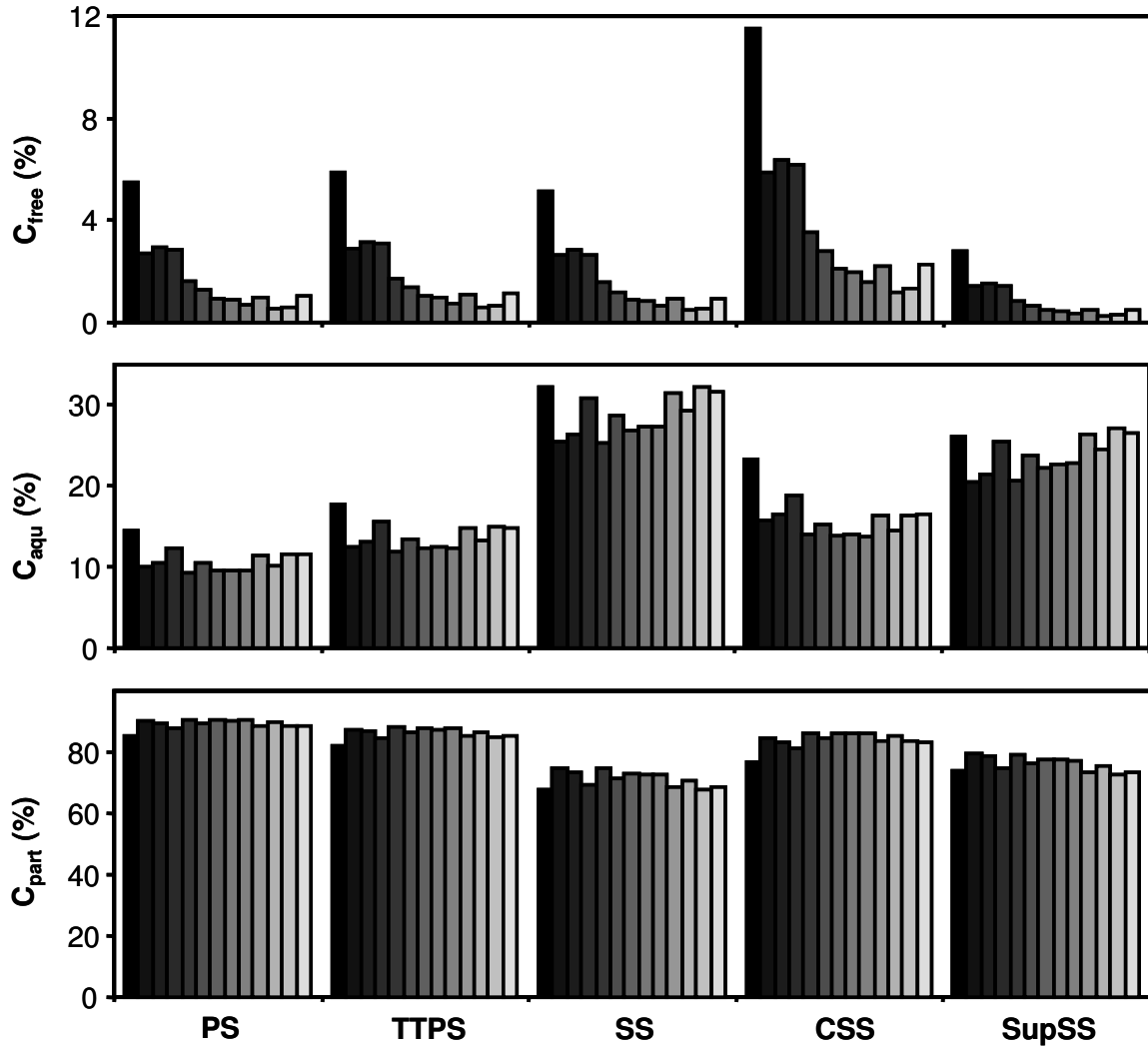


Figure IV-14 : Free (top), aqueous (middle) and sorbed-to-particles (bottom) concentrations of PAHs in the reactors fed with PS, TTPS, SS, CSS and SupSS, as a percentage of total concentration. PAHs are classified like in Tableau IV-5, from fluorene (black) to indeno(1,2,3,c,d)pyrene (lightest grey).

In the examples of the two most studied PAHs, fluoranthene and benzo(k)fluoranthene, the calculated biodegradation rates are plotted as a function of their free, aqueous and sorbed-to-particles concentrations (Figure IV-15). No linear correlation was observed between biodegradation rates and aqueous concentrations, implying that equation (2) could not describe our experimental data. The same absence of correlation was observed for all PAHs (data not shown). These results suggest that one among the two hypotheses leading to equation 2 was wrong: either bioavailability is not the only phenomenon that conditions PAHs biodegradation, or the bioavailable fraction is not equal to the aqueous fraction. Moreover, biodegradation rates did not correlate neither with free, total (Figure IV-15), sorbed-to-DCM nor sorbed-to-particles (data not shown) PAH concentrations. The conclusion of these observations is that either bioavailability is not the only affecting factor, or there is no link between sorption phenomena and bioavailability. Nevertheless, these assumptions may be right in specific systems (Artola-Garicano et al., 2003), for example when cometabolism does not vary, and false in our case where cometabolism varies. Whatever the

wrong assumption, this outcome is of great importance, because both hypotheses "bioavailability is the limiting factor" and "aqueous fraction is the only bioavailable fraction" are widespread (Artola-Garicano *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003; Uruse & Kikuta, 2005; Dionisi *et al.*, 2006; Patureau & Trably, 2006).

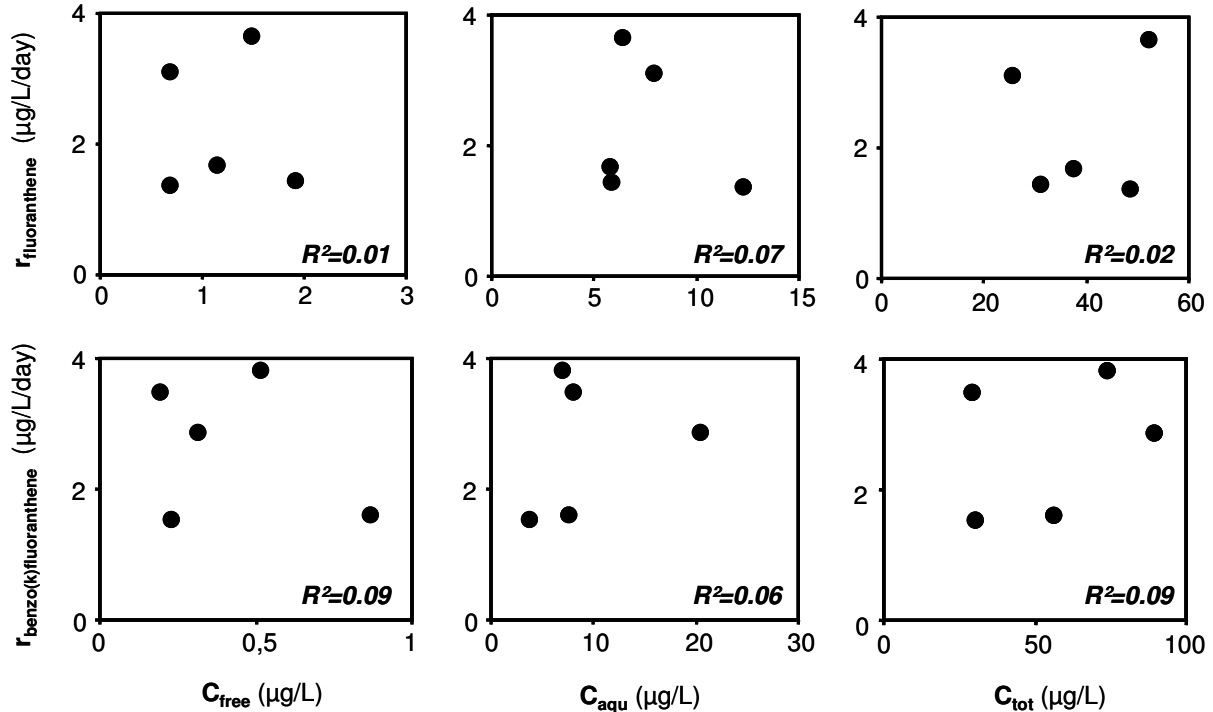


Figure IV-15 : removal rate of fluoranthene (top) and benzo(k)fluoranthene (bottom) as a function of their concentration in the different compartments. The linear correlation coefficient R^2 is indicated in each case.

As limitation by bioavailability only, modelled according to equation (1), was shown not to fit our experimental data, the modelling of combined limitation by bioavailability and cometabolism was considered throughout equation (5).

Combined influences by bioavailability and cometabolism: Criddle model. In view of the fact that the five reactors were inoculated with the same sludge and were carried out in the same operating conditions, we assumed that the microbial population, and thus the kinetic parameters of PAH metabolic route, were similar. As a result, the term $k_{PAH} X / K_{PAH}$ was assumed to be constant for a given PAH in all bioreactors.

The biodegradation rates of COD, DM, OM, proteins and carbohydrates were calculated from the data presented in Tableau IV-7, according to equation (6). They were confronted to PAH biodegradation rates, normalized either with their free, aqueous or particulate concentrations. The correlation coefficients corresponding to each regression performed between one substrate biodegradation rate and one normalization method for PAH biodegradation rates in the reactors fed with PS, TTPS, SS and SupSS are presented in Tableau IV-8. The best correlation was found between dry matter biodegradation rates and

normalized-to-aqueous-concentration PAHs biodegradation rates, suggesting that the following relationship, originating from equation (5) was verified:

$$\frac{r_{PAH}}{C_{PAH,aqu}} = \frac{T_{PAH,DM}}{K_{PAH}} r_{DM} + \frac{k_{PAH} X}{K_{PAH}} = A r_{DM} + B \quad (13)$$

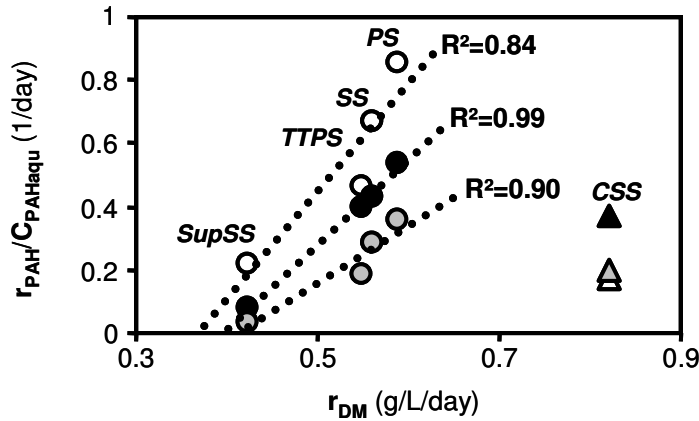


Figure IV-16 : Normalized-to-aqueous-concentration degradation rate of phenanthrene (white), benzo(k)fluoranthene (black) and benzo(g,h,i)perylene (grey) as a function of dry matter removal rate in the five reactors. CSS data (triangles) were excluded from linear regression. The exact r_{DM} values for SupSS, TTPS, SS, PS ad CSS were respectively 0.36, 0.55, 0.56, 0.58 and 0.82 g/L/day.

Tableau IV-8 : Median and range of the correlation coefficients obtained for the 13 PAHs between their normalized removal rate and substrate removal rate in the reactors fed with PS, TTPS, SS and SupSS.

	r_{PAH}/C_{free} 1/day	r_{PAH}/C_{aqu} 1/day	r_{PAH}/C_{tot} 1/day
r_{COD} ($g_{COD}/L/day$)	0.01 <0.01-0.11	0.33 0.19-0.67	<0.01 <0.01-0.04
r_{DM} ($g_{DM}/L/day$)	0.19 0.03-0.49	0.87 0.64-0.99	0.25 0.07-0.54
r_{OM} ($g_{OM}/L/day$)	0.06 <0.01-0.17	0.84 0.15-0.99	0.09 <0.01-0.23)
$r_{proteins}$ ($g_{proteins}/L/day$)	0.54 0.43-0.81	0.01 <0.01-0.19	0.43 0.14-0.57
$r_{carbohydrates}$ ($g_{carbo}/L/day$)	0.03 <0.01-0.16	0.83 0.12-0.99	0.06 <0.01-0.26

Correlation for phenanthrene, benzo(k)fluoranthene and benzo(g,h,i)perylene are presented as example in Figure IV-16, and the detailed regression parameters are presented in Tableau IV-9. Among PAHs, the regression coefficient ranged from 0.64 (benzo(a)pyrene) to 0.99 (benzo(k)fluoranthene). Two PAHs among 13 exhibited a R^2 below 0.80 (benzo(a)pyrene and benzo(a)anthracene). This unsatisfactory coefficients may be due to experimental errors, but nonetheless they remain in the minority. Normalized-to-aqueous-concentration biodegradation rates were also found to strongly correlate with organic matter and carbohydrates biodegradation rates, with slightly lower regression coefficients (respective medians of 0.84 and 0.83, Tableau IV-8).

Tableau IV-9 : Regression parameters of $r_{\text{PAH}}/C_{\text{PAH,aqu}}=f(r_{\text{DM}})$.

	$T_{\text{PAH,OM}}/K_{\text{PAH}}$ <i>L/g_{DM}</i>	$k_{\text{PAH,X}}/K_{\text{PAH}}$ <i>1/day</i>	R^2
Fluorene	3.1	-1.1	0.87
Phenanthrene	3.4	-1.3	0.84
Anthracene	3.4	-1.2	0.82
Fluoranthene	2.3	-0.9	0.82
Pyrene	3.3	-1.3	0.90
Benzo(a)anthracene	2.8	-1.1	0.79
Chrysene	2.9	-1.2	0.92
Benzo(b)fluoranthene	3.0	-1.3	0.95
Benzo(k)fluoranthene	2.7	-1.1	0.99
Benzo(a)pyrene	1.9	-0.8	0.64
Dibenzo(a,h)anthracene	2.3	-0.9	0.91
Benzo(g,h,i)perylene	1.8	-0.8	0.90
Indeno(1,2,3,c,d)pyrene	1.3	-0.5	0.82

Such correlations tend to show that the aqueous fraction of PAHs corresponds to their bioavailable compartment. This widespread assumption (Urase & Kikuta, 2005; Dionisi *et al.*, 2006) was thus validated thanks to the experimental approach developed here. Hence, sorbed-to-DCM micropollutants were shown to be bioavailable in sludge, as well as free micropollutants. On one hand, micropollutants which are sorbed to low molecular weight DCM might be able to cross the microbial membranes in the form of micropollutant-DCM complex. Indeed, some molecules up to a few kDa were shown to cross bacterial porins (Nikaido, 2003). On the other hand, a mechanism has been recently proposed by Smith *et al.* (2009), who observed an enhanced biodegradation of phenanthrene when it is sorbed to humic acids. From their experiments, the authors concluded to a humic acid-mediated transport of phenanthrene. Humic acids might transport the sorbed micropollutants either directly to the cell surface or to the unstirred boundary layer in the immediate vicinity of the cell surface (Smith *et al.*, 2009), prior to the diffusion of free micropollutants throughout cell membranes. Such DCM-mediated transport, in addition to micropollutant-DCM complex

crossing, might explain why sorbed-to-DCM micropollutants as well as free micropollutants were found to be bioavailable in our experiments.

PAH biodegradation rates in reactors fed with PS, TTPS, SS and SupSS strongly correlated with dry matter biodegradation rate, but it was not the case for PAH biodegradation with CSS feeding. Indeed, the transformation capacity $T_{PAH,S}$ is likely to depend on the substrate composition. PS, TTPS, SS and SupSS originated from sludge samples whereas CSS contained some exogenous material (cellulose). As a consequence, the PAH transformation capacity with dry matter from PS, TTPS, SS and SupSS may be similar, relatively to CSS. This might explain why the data from CSS feeding were out of correlation. This specificity of $T_{PAH,S}$ coefficient might also explain the discrepancies between published studies about the positive or nul or negative effect of an additional carbon source on micropollutants fate (Dionisi *et al.*, 2006; Gerecke *et al.*, 2006; Bertin *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008). In addition, the CSS feed may imply a deep modification of microbial population, implying adaptation/specialization to cellulose substrate. Such a population shift, leading to the modification of k_{PAH} and K_{PAH} parameters, might contribute to modify the PAHs metabolism.

The regressions between $r_{PAH}/C_{PAH,aqu}$ and r_{DM} exhibited negative origins, that is to say a negative specific biodegradation rate of PAHs in absence of co-substrates (Figure IV-16). A negative biodegradation rate would mean a production of PAH, which is not possible.

On one hand, these negatives values could be linked to the PAHs recalcitrance to biodegradation under methanogenic conditions. The fact that cometabolism would be necessary for the biodegradation of PAHs might explain the existence of a threshold r_0 , linked to the negative values of k_{PAH} . Under this hypothesis, PAHs biodegradation would not be possible at very low DM degradation rate ($r_{PAH} = 0$ for $r_{DM} < r_0$), and beyond the r_{DM} threshold value (r_0), r_{PAH} would be proportional to r_{DM} . We thus propose a new equation to formalise the threshold assumption:

$$\frac{r_{PAH}}{C_{PAH,aqu}} = \frac{T_{PAH,DM}}{K_{PAH}} (r_{DM} - r_0) \quad (14)$$

On the other hand, as sludge organic matter is a complex substrate, the biodegradation rate r_{DM} results from different rates, referring to different cometabolic routes. Some of these routes are connected to PAH route, either within one microorganism or throughout syntrophy between several microorganisms, and some other routes might not be connected. We thus determined the biodegradation rates of specific components, such as carbohydrates and proteins. No correlation was found between $r_{PAH}/C_{PAH,aqu}$ and $r_{proteins}$, for which the regression coefficients remained below 0.19 (Table 4). In counterpart, $r_{PAH}/C_{PAH,aqu}$ correlated well to carbohydrates biodegradation rates (median of 0.83, Table 4), with negative origins (data not shown). Carbohydrates biodegradation rate is thus linked to cometabolic routes. However, there is no evidence that carbohydrates metabolic route would be connected to PAHs route. $r_{PAH}/C_{PAH,aqu}$ correlation with $r_{carbohydrates}$ might only be due to the correlation between carbohydrates and dry matter biodegradation ($R^2 = 0.91$) within bioreactors fed with PS, TTPS, SS and SupSS. Nonetheless, if the connected and unconnected routes could be identified, and the unconnected ones subtracted from r_{DM} , the regression origin might become nul or positive.

The regression slopes ($T_{PAH,DM} / K_{PAH}$) and origins ($k_{PAH}X / K_{PAH}$) extracted from the regressions performed for each compound were plotted as a function of PAH molecular weight (Figure IV-17), which exhibited a linear tendency. As the cometabolic threshold ($-k_{PAH}X / T_{PAH,DM}$) was also found to moderately correlate with PAH characteristics (Figure IV-17), the variations of $T_{PAH,DM} / K_{PAH}$ and $k_{PAH}X / K_{PAH}$ are not only due to K_{PAH} variations. As a result, the three parameters $T_{PAH,DM}$, k_{PAH} and K_{PAH} are likely to be molecule-dependent.

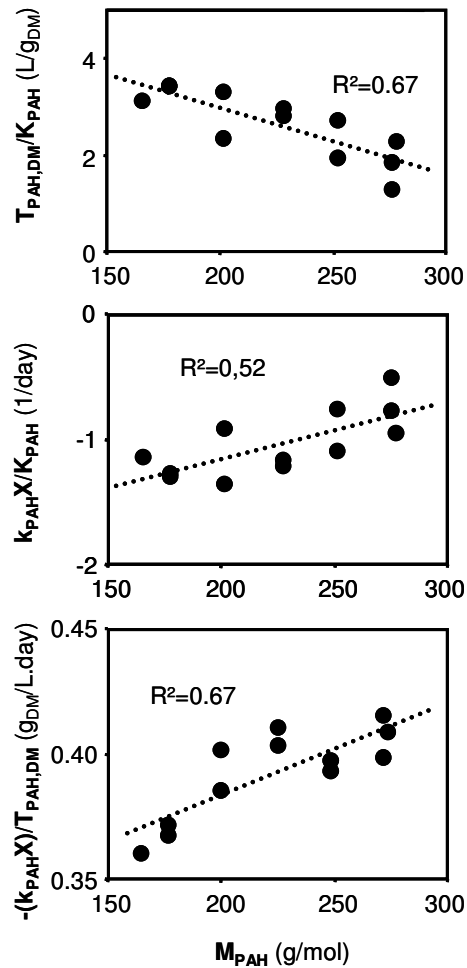


Figure IV-17 : $T_{PAH,DM} / K_{PAH}$ (regression slope), $k_{PAH}X / K_{PAH}$ (regression origin) and $-k_{PAH}X / T_{PAH,DM}$ (threshold) as a function of PAHs molecular mass. The slopes of linear regression curves indicated on the figure were statistically different from 0 ($p=0.05$).

Parameters explaining the different biodegradation rates between PAHs and between bioreactors. The results obtained here allowed us to identify the parameters which are likely to explain the differences in PAH removal rates reported in literature.

For a given bioreactor with cometabolic flux higher than the cometabolism threshold, the results suggest that three parameters could explain the differences observed between PAH biodegradations (Chang *et al.*, 2003; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2006):

- (1) Half saturation constant K_{PAH} is likely to vary as a function of PAH molecular structure.
- (2) The transformation capacity $T_{PAH,S}$ may differ among the PAH family. Indeed, according to the PAH structure, the carbon and energy fluxes per gram of PAH differ, so that the needed cometabolic flux is not the same.
- (3) k_{PAH} coefficient was shown to vary as well as $T_{PAH,S}$.

As high molecular weight PAHs are usually less efficiently removed (Chang *et al.*, 2003; Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2006), K_{PAH} could be assumed to increase when PAHs molecular weight increases, and $T_{PAH,S}$ and k_{PAH} to decrease.

Besides, for a given PAH, four parameters could account for differences between reactors with different feeds (Chang *et al.*, 2008):

- (1) Sorption phenomena determine the bioavailable (identified as aqueous) concentration of micropollutants. These phenomena differentiate PAH bioavailability, and thus their biodegradation, between reactors.
- (2) Half saturation constant K_{PAH} and specific biodegradation rate k_{PAH} probably depend on microbial consortium. In this study, these coefficients were supposed not to vary between all reactors except the one fed with CSS, because they were initially inoculated with the same consortium and received similar substrates. However, different consortia could exhibit different K_{PAH} and k_{PAH} . This microbial effect could account for biodegradation differences reported when bioaugmentation strategy was developed (Trably *et al.*, 2003)
- (3) $T_{PAH,S}$ coefficient is likely to depend on the substrate S , which might have played a role in the different fate of PAHs in the reactor fed with CSS.

IV.4.2.4 Conclusion

Based on a three compartment approach to model sorption phenomena, the distribution of 13 PAHs between free, sorbed-to-DCM and sorbed-to-particles compartments was confronted to their biodegradation during anaerobic digestion of contaminated sludge, under the assumption that abiotic losses were negligible. The widespread assumption that aqueous PAHs (sum of free and sorbed-to-DCM PAHs) are bioavailable was thus experimentally validated. Bioavailability was shown to slightly vary between PAHs within a given reactor, whereas it strongly differed between reactors with various feeds. The modelling of PAHs biodegradation by bioavailability limitation only could not represent the variability between PAHs and between bioreactor feeds. A model adapted from Criddle (1993), which takes into account combined influences by bioavailability and by cometabolism, was shown to fit the experimental data. In this model, dry matter biodegradation rate was identified as the most relevant cometabolic flux. A cometabolic threshold for dry matter biodegradation rate was suggested, below which PAH biodegradation might not be possible. The experimental data also suggest that differences in PAH biodegradation rates might be due to PAHs bioavailability (differing only between reactors), to half saturation constant K_{PAH} and maximal specific biodegradation rate k_{PAH} of the PAH metabolic route (depending on PAH structure and on microbial consortium), and to cometabolic capacity $T_{PAH,S}$ (as a function of PAH and of reactor feed). This work provided important outcomes to understand, to model and to

predict the fate of PAHs during sludge anaerobic digestion, and should help plant managers to optimize the process operation and to reach higher elimination. These outcomes might be transposed to a wide range of hydrophobic micropollutants.

IV.5 Discussion

L'article portant sur l'influence des caractéristiques de l'alimentation sur le devenir des CTOs au cours de la digestion anaérobie (paragraphe IV.3) a suggéré qu'une caractérisation approfondie de la matrice d'alimentation pouvait permettre de prédire le devenir des HAPs/NP/PCBs. Ainsi, les concentrations en AGVs et en lipides ont été identifiées comme les caractéristiques majeures de l'alimentation, associées à un impact négatif sur l'abattement des HAPs/NP/PCBs. La proportion de matière boue dans le compartiment DCM a été la seule caractéristique associée à un effet positif. Comme souvent dans la littérature, les concepts de biodisponibilité et de cométabolisme ont été évoqués pour expliquer des différences observées entre réacteurs. Mais ces évocations restent basées sur des hypothèses, et les explications avancées méritent donc d'être validées.

En revanche, même si un lien existe probablement entre la matrice d'alimentation et les processus qui seront mis en jeu lors de sa digestion anaérobie, lien qui a permis l'obtention d'un modèle prédictif, le caractère déterministe de ce lien peut être mis en doute. En effet, les paramètres opératoires tels que temps de séjour et charge de substrat, tout comme l'inoculum utilisé sont susceptibles de moduler ce déterminisme, alors qu'ils ont été fixés pour cette étude. Cette approche prédictive, liée à l'appréhension du procédé en tant que boîte noire, a donc laissé place par la suite à une approche mécanistique, qui se veut **plus fondamentale et plus générique**.

Ainsi, dans un second temps, nous avons souhaité ouvrir cette boîte noire, pour concrétiser les notions de biodisponibilité et de cométabolisme et vérifier des hypothèses courantes les concernant. Pour cela, la répartition des HAPs entre les trois compartiments de boues a pu être estimée dans 5 systèmes différents, grâce au modèle prédictif précédemment conçu (Chapitre III), et confrontée à la vitesse de dégradation des HAPs et des co-substrats présents dans l'alimentation. En effet, pour représenter les interactions cométaboliques notamment, cette approche mécanistique s'appuie sur des calculs de **vitesse de réaction**, par opposition à l'approche boîte noire communément basée sur le calcul de **pourcentages d'abattelements**.

L'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence trois processus qui conditionnent l'abattement des HAPs (Figure IV-18), grâce à l'adaptation du formalisme de Criddle (1993) que nous avons proposé et qui décrit nos données expérimentales de manière satisfaisante. Initialement, le formalisme de Criddle s'applique en présence d'un seul substrat de croissance et d'un seul co-substrat, en culture liquide et en souche pure, pour modéliser un cométabolisme particulier : un cométabolisme découlant de l'aspécificité des enzymes et des cofacteurs. En généralisant et en adaptant ce formalisme, nous avons intégré trois processus

dans l'expression de la vitesse de dégradation de chaque HAP au cours de la digestion anaérobie de boues contaminées :

$$r_{\text{PAH}} = (T_{\text{PAH,DM}} r_{\text{DM}} + k_{\text{PAH}} X) \left(\frac{C_{\text{PAH,aqu}}}{K_{\text{PAH}}} \right)$$

avec r_{PAH} : vitesse de biodégradation du HAP ;
 $T_{\text{PAH,DM}}$: coefficient de proportionnalité entre les vitesses de biodégradation des matières sèches et du HAP ;
 r_{DM} : vitesse de biodégradation des matières sèches ;
 k_{PAH} : vitesse spécifique maximale de biodégradation d'un HAP ;
 X : concentration en biomasse impliquée dans la biodégradation du HAP ;
 $C_{\text{PAH,aqu}}$: concentration de HAPs en phase aqueuse, donc biodisponibles ;
 K_{PAH} : constante de demi-saturation dans le formalisme de Michaelis-Menten.

Ainsi, la **concentration biodisponible** constitue la première limitation. Seuls les HAPs libres et sorbés à la DCM sont disponibles pour et « perçus » par le système spécifique de dégradation des HAPs. Ainsi, la vitesse de réaction associée au pur métabolisme des HAPs dépend de la concentration aqueuse en HAPs. Littéralement, la biodisponibilité est prise en compte dans le formalisme adapté de Criddle (1993) par :

$$r_{\text{PAH}} = f(C_{\text{PAH,aqu}})$$

Ainsi, dans la gamme des DCMs testées, quelle que soit la composition de la DCM sur laquelle les HAPs sont sorbés, ces derniers restent biodisponibles. Ceci indique que les mécanismes qui gouvernent la biodisponibilité sont peut-être peu spécifiques relativement aux différentes DCMs considérées, comme par exemple le mécanisme de transport vers le milieu intra-cellulaire. De ce fait, **les propriétés physico-chimiques de la DCM** n'influencent pas directement la biodisponibilité des HAPs. En revanche, les propriétés physico-chimiques de la DCM influencent très fortement l'affinité des HAPs pour celle-ci, et jouent donc sur la répartition des HAPs entre les 3 compartiments physiques de boue : en ce sens, les propriétés physico-chimiques influencent indirectement la biodisponibilité des HAPs.

Ensuite, dans le formalisme adapté de Criddle (1993), les performances de la machinerie (protéines de transport, enzymes) responsable du métabolisme des HAPs, en réponse à la concentration biodisponible, constitue la première fonction qui lie la concentration biodisponible et la vitesse de réaction. Elle englobe l'efficacité des processus de transport et l'affinité des enzymes pour ce substrat. Cette **fonction nommée métabolique** peut être modélisée selon le formalisme de Monod, extension de l'équation de Michaelis-Menten s'appliquant aux enzymes. La simplification de l'équation due aux très faibles concentrations en HAPs considérées conduit ici à une cinétique de pseudo-premier ordre :

$$r_{\text{PAH}} = r_{\text{PAH}}^{\text{MAX}} * \frac{C_{\text{PAH,aqu}}}{K_{\text{PAH}} + C_{\text{PAH,aqu}}} \approx r_{\text{PAH}}^{\text{MAX}} * \frac{C_{\text{PAH,aqu}}}{K_{\text{PAH}}} = k_1 * C_{\text{PAH,aqu}}$$

Enfin, le **cométabolisme** modifie la **vitesse maximale** de transformation des HAPs, c'est-à-dire r_{PAH}^{MAX} dans le formalisme de Monod, en fonction de la vitesse de dégradation de la matière sèche :

$$r_{PAH}^{MAX} = f(r_{DM})$$

La régression linéaire pratiquée sur les points expérimentaux suggère deux expressions pour f , associées à deux zones de validité :

$$r_{DM} < \text{Seuil} \Rightarrow r_{PAH}^{MAX} = 0$$

$$r_{DM} \geq \text{Seuil} \Rightarrow r_{PAH}^{MAX} = T_{PAH,DM} * r_{DM} + k_{PAH} * X$$

Cette vitesse maximale est nulle en-dessous d'un seuil de cométabolisme (en référence matière sèche), et au-dessus de ce seuil, le potentiel de dégradation des HAPs augmente de façon couplée au flux cométabolique.

A noter que la cinétique de pseudo-premier ordre obtenue lorsque r_{PAH}^{MAX} est invariant, c'est-à-dire pour un cométabolisme fixé, rejoint l'utilisation du modèle de pseudo-premier ordre dans la littérature lorsqu'un seul substrat et une condition de biodégradation sont considérés (Chang *et al.*, 2003; Langford *et al.*, 2005a; Urase & Kikuta, 2005; Dionisi *et al.*, 2006).

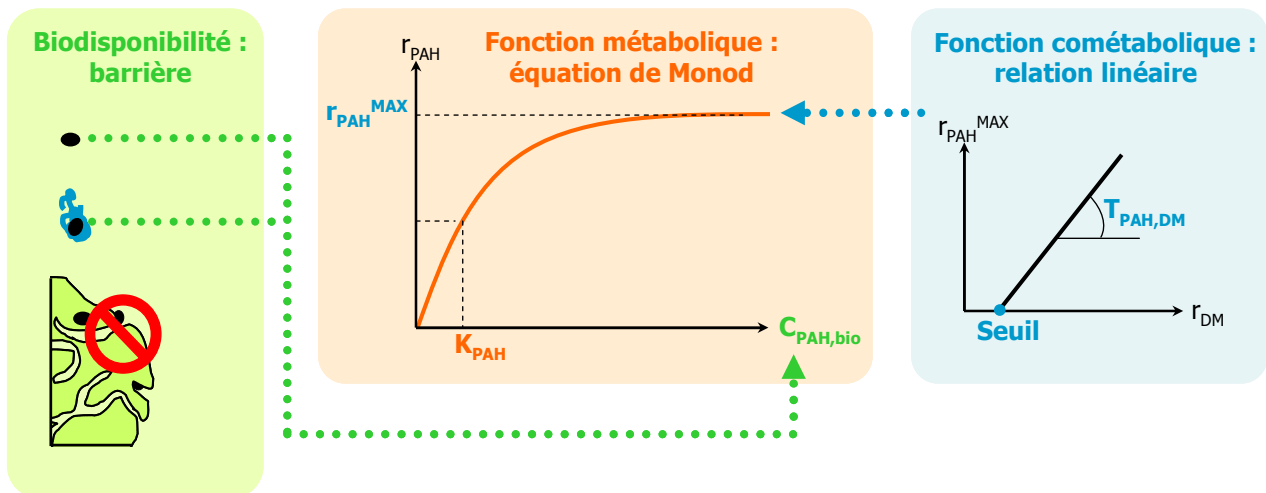


Figure IV-18 : Représentation des 3 fonctions déterminant la biodégradation d'un HAP donné.

La matière qui constitue les boues est diverse : les boues peuvent être considérées comme un assemblage de différents substrats. Cette représentation des boues rejoint celle employée dans le modèle ADM1 (Batstone *et al.*, 2002), qui vise à modéliser la biodégradation des boues lors de leur digestion anaérobie. Les écosystèmes microbiens de digestion anaérobie qui utilisent ces substrats présentent eux aussi une certaine diversité. Au sein des réacteurs, ces diversités se croisent pour générer différentes configurations possibles de métabolisme des substrats de la boue et de métabolisme des HAPs (Figure IV-19).

Le **cométabolisme** considéré ici, c'est-à-dire à **l'échelle du réacteur**, peut englober des interactions strictement cométaboliques et des interactions syntrophiques (S_1 et S_3 , Figure IV-19) telles que définies à l'échelle de l'individu (paragraphe I.3.3 et I.3.4). Par ailleurs, différentes interactions strictement cométaboliques peuvent avoir lieu au sein d'un même microorganisme possédant une fonction de dégradation des HAPs, lorsque plusieurs substrats y empruntent différentes voies métaboliques connectées à celle des HAPs (S_1 et S_2 , Figure IV-19). Enfin, certaines voies du réseau métabolique d'un microorganisme dégradant les HAPs peuvent ne pas être connectées à la voie des HAPs dans cet organisme (S_4 , Figure IV-19), ou bien certains substrats de boue peuvent être métabolisés par des microorganismes qui ne sont pas impliqués dans la dégradation des HAPs (S_5 , Figure IV-19).

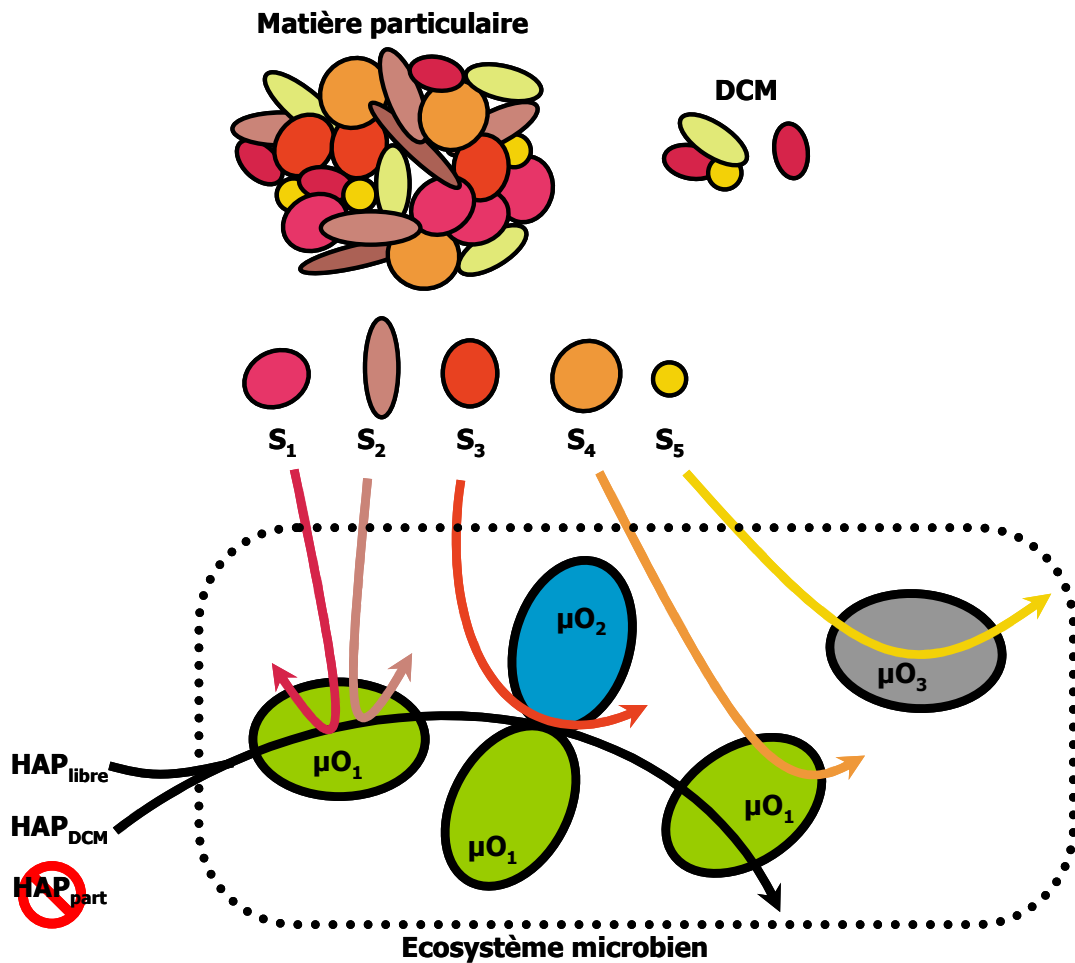


Figure IV-19 : Représentation des interactions cométaboliques. La matière qui constitue les boues se décompose en substrats S_i , qui empruntent des voies métaboliques différentes. Trois types de microorganismes participent au métabolisme de ces substrats : ceux métabolisant aussi les HAPs (μO_1), ceux interagissant de façon syntrophique avec les μO_1 (μO_2), et ceux ne jouant aucun rôle dans la biodégradation des HAPs (μO_3).

Aux configurations précédemment évoquées s'ajoute un cas supplémentaire qui n'est pas représenté au sein des Figure IV-19 et Figure IV-20 : le cas d'un substrat qui serait à la fois métabolisé avec une connection au métabolisme des HAPs et métabolisé de façon

totalemment déconnectée. Plusieurs voies métaboliques entreraient donc en compétition pour ce substrat, ce qui serait extrêmement difficile à prendre en compte, à moins de poser certaines hypothèses, telles que une fraction constante de distribution du flux de ce substrat entre les deux types de voie métabolique.

Par ailleurs, les voies métaboliques associées aux substrats S_i peuvent être connectées entre elles, et les produits de la dégradation des S_i peuvent eux-même emprunter des voies différentes.

La complexité précédemment discutée transparait en partie dans les résultats exposés au sein du paragraphe IV.4.2. En particulier, les résultats obtenus pour le réacteur alimenté en boue CSS tendent à montrer que la cellulose pourrait être un substrat de type S_4 ou S_5 . Malgré la possible diversité des interactions s'opérant dans un même réacteur et les éventuelles différences entre les réacteurs alimentés en PS, TTPS, SS et SupSS, une forte corrélation a été obtenue entre r_{PAH} et la vitesse de biodégradation de la matière sèche totale r_{DM} , somme des vitesses de dégradation des substrats S_1 à S_5 . L'ordonnée à l'origine négative (le seuil) suggère qu'une partie de la matière sèche adopte les configurations S_4 et S_5 . Si l'on pouvait isoler les substrats, identifier les catégories S_4 et S_5 , soustraire leur vitesse de dégradation à la vitesse de dégradation globale r_{DM} et par conséquent ne prendre en compte que ceux jouant un rôle cométabolique ou syntrophique, une ordonnée à l'origine supérieure ou égale à 0 pourrait être obtenue (Exemple simplifié en Figure IV-20).

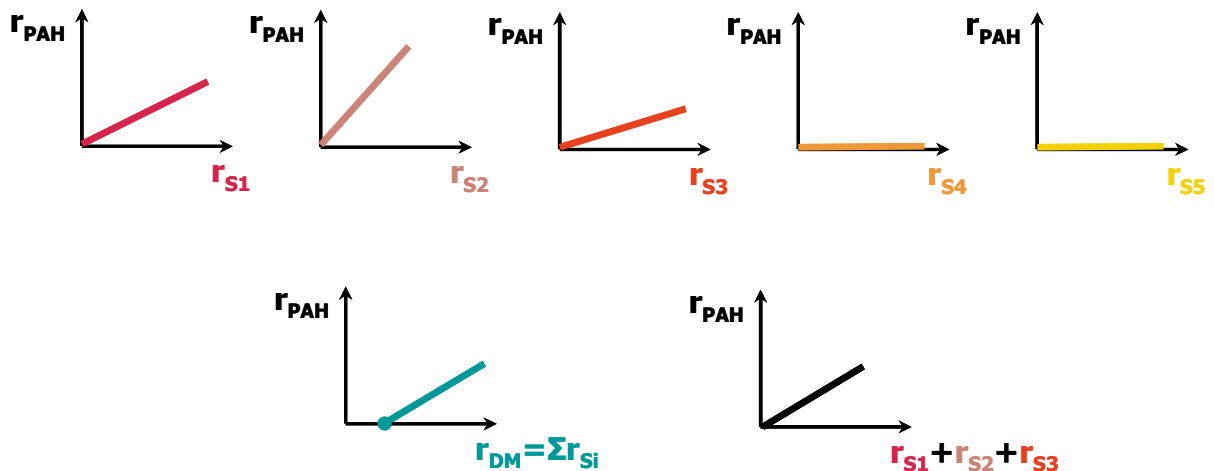


Figure IV-20 : Illustration (i) des fonctions cométaboliques liant la vitesse de dégradation d'un HAP avec la vitesse de dégradation de chaque substrat cométabolique isolé (hypothèse de proportionnalité), (ii) de l'absence de corrélation avec les substrats non cométaboliques (hypothèse de cométabolisme nécessaire à la dégradation des HAPs), et (iii) de la résultante de ces fonctions lorsque tous les substrats sont présents.

Malgré la complexité évoquée, le formalisme adapté de Criddle (1993) a pu être utilisé, alors qu'il s'applique initialement à des systèmes très simples. Ainsi, la fonction cométabolique trouvée qui lie la vitesse de dégradation de chaque HAP avec la vitesse de dégradation de la matière sèche s'avère relativement simple et très globale. Cette fonction suggère que la

diversité et l'abondance des substrats cométaboliques varie peu parmi les systèmes étudiés. La même suggestion s'applique aux microorganismes impliqués. Ainsi, une hypothèse pourrait être formulée quant aux interactions cométaboliques avec les voies de dégradation des HAPs : elles pourraient concerner des **voies métaboliques centrales** qui seraient partagées par de nombreux microorganismes. La forte redondance fonctionnelle qui en découlerait expliquerait les similarités entre les comportements des écosystèmes présents dans les différents réacteurs.

Malheureusement, la tentative de biologie moléculaire ciblant les microorganismes qui possèdent une fonction de biodégradation des HAPs n'a pas abouti (paragraphe IV.4.1). Cette approche aurait pu fournir des éléments de réponse en terme d'abondance et de diversité microbienne, et renseigner sur la variable représentant la biomasse dans l'équation de Criddle (1993) : X. Ces éléments restent donc à approfondir.

Bien qu'elle appelle certains approfondissements, cette démarche d'ouverture de boîte noire a néanmoins permis d'expliquer des résultats qui ne pouvaient qu'être justifiés par des hypothèses dans la démarche classique (paragraphe IV.3). En effet, le Tableau IV-4 peut être alimenté par les résultats obtenus, et les effets présumés du passage d'une alimentation à une autre précisés (Tableau IV-10). Certaines hypothèses posées dans le paragraphe IV.3 ont ainsi pu être validées, comme par exemple l'abaissement de la biodisponibilité par lyse thermique de PS, la plus grande biodisponibilité des HAPs dans SS par rapport à PS et à CSS et dans SupSS par rapport à SS. Enfin, l'approche mécanistique concorde avec l'approche boîte noire en cette conclusion que l'un ou l'autre de la biodisponibilité ou du cométabolisme peuvent prévaloir : l'effet biodisponibilité prévaut lorsque l'on compare SS et PS, et l'effet cométabolisme pour ce qui est de SupSS et SS.

Tableau IV-10 : Effets mesurés du passage d'une alimentation à une autre, et détermination du processus prédominant par confrontation de ces effets à celui mesuré sur la biodégradation des HAPs.

Comparaison des alimentations	Effet mesuré sur la biodisponibilité ($C_{PAH,aqu}$)	Effet mesuré sur le cométabolisme (r_{DM})	Effet mesuré sur la vitesse de dégradation des HAPs (r_{PAH})	Processus prédominant
TTPS à PS	-	-	-	Biodisponibilité
SS à PS	+	-	+	Biodisponibilité
SupSS à SS	+	-	-	Cométabolisme
CSS à SS	-	?	-	?

Dans le cas de TTPS et PS, des effets agonistes sont mesurés sur la biodisponibilité et le cométabolisme : tous deux contribuent à diminuer r_{PAH} . Le poids relatifs de chacun de ces deux processus peut être quantifié grâce aux paramètres du formalisme adapté de Criddle (1993). Ainsi, la prédominance de la biodisponibilité a été déterminée. La boue d'alimentation CSS ayant induit un comportement hors corrélation, il est difficile de conclure

quant à son effet sur le cométabolisme, et donc quant à la prédominance de la biodisponibilité ou du cométabolisme.

En terme d'opération de procédés, ces résultats démontrent que la vitesse de dégradation des HAPs peut être optimisée en maximisant leur concentration aqueuse dans le procédé ou bien en augmentant la vitesse de dégradation des matières sèches des boues.

La maximisation de la concentration en HAPs en phase aqueuse a été précédemment discutée (paragraphe III.3.2), et l'utilisation du mode opératoire batch suggérée. Or si la mise en œuvre de réacteurs batchs en laboratoire serait intéressante, l'application de ce mode opératoire à l'échelle industrielle reste peu réaliste, car les meilleures performances de méthanisation sont obtenues pour une alimentation et un soutirage continu (Moletta, 2008). Une autre option pour augmenter $C_{\text{PAH,aqu}}$ consisterait à minimiser les recirculations d'effluents liquides peu concentrés en DCM, qui diluent et tendent à réduire la concentration en DCM dans les procédés et donc $C_{\text{PAH,aqu}}$. Toutefois, ce type de recirculation peut par ailleurs s'avérer bénéfique pour les conditions de mélange et pour les performances globales du traitement.

Par réduction du temps de séjour, la vitesse de dégradation des matières sèches peut être augmentée, mais au détriment du rendement épuratoire (pourcentage d'abattement). De même, la vitesse de biodégradation des HAPs serait augmentée au détriment du rendement d'élimination. Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi une sensible diminution de l'abattement des HAPs a été constatée en passant de 26 à 22 puis à 18 jours de TSH (Benabdallah El-Hadj *et al.*, 2006). Or la diminution du TSH est intéressante dans la mesure où elle permet de réduire la taille du digesteur pour un débit d'effluent donné.

Trouver le meilleur compromis entre la multitude de paramètres d'évaluation des procédés n'est pas aisé, et fait appel à une approche complexe de modélisation/optimisation. Toutefois, les données générées par cette étude fournissent des éléments utiles pour la recherche de ce compromis.

***V CONCLUSIONS &
PERSPECTIVES***

L'objectif de cette thèse était d'identifier les mécanismes qui déterminent le devenir des HAPs/NP/PCBs au cours de la digestion anaérobie de boues d'épuration contaminées. La limitation par leur biodisponibilité, du fait des interactions de sorption s'établissant avec la matrice, est largement évoquée dans la littérature. Une importante première partie de cette étude a donc été axée sur l'étude des phénomènes de sorption.

Dans un premier temps, les paramètres pertinents pour prendre en compte les phénomènes de sorption dans les procédés d'épuration ont été déterminés. Ainsi, il a été démontré que les **cinétiques de sorption et de désorption** pouvaient être considérées comme **instantanées** en référence aux cinétiques de biodégradation mesurées dans la littérature. La sorption de CTOs de petite taille était connue pour être extrêmement rapide dans les boues. Ce résultat a été étendu à des molécules de haut poids moléculaire, à plus fort encombrement stérique, et ayant donc un accès aux sites d'interactions ralenti. De plus, la cinétique de désorption de ces molécules a été démontrée comme étant tout aussi rapide. Bien qu'au cours des procédés de dépollution, sorption et désorption se succèdent très probablement, seules les cinétiques de sorption avaient été auparavant étudiées. Ce résultat présente donc un grand intérêt, et démontre qu'il n'est pas nécessaire d'inclure des paramètres cinétiques pour rendre compte des phénomènes de sorption/désorption dans les procédés : le système pourra être considéré à l'état d'équilibre à tout moment.

En terme d'équilibre, le caractère irréversible de la sorption des CTOs aux matrices environnementales, mentionné dans la littérature, a aussi été étudié, toujours pour cette même raison de succession de transferts de sorption/désorption dans les systèmes réels. L'équilibre de désorption des HAPs dans une boue secondaire, atteint après un très long temps de contact, s'est avéré identique à l'équilibre de sorption atteint après une heure de contact. La sorption des CTOs dans les boues s'est donc avérée **réversible** dans les conditions de vieillissement des CTOs en contact avec la boue. La dimension temps de contact n'est donc pas indispensable pour décrire le comportement de sorption/désorption des CTOs. L'irréversibilité relatée dans la littérature pourrait s'expliquer par le fait que les CTOs sorbés et **séquestrés** ne soient pas différenciés, et/ou par la conception bi-compartmentée de la matrice boue.

Cette conception bi-compartiments a par la suite été confrontée à l'**approche tri-compartiments**, utilisée dans les milieux aquatiques de l'Environnement, mais innovante dans la matrice boue. En différenciant les CTOs libres, ceux sorbés à la DCM, et ceux sorbés aux particules, et en considérant ainsi deux équilibres de sorption (à la DCM et aux particules), les importants biais découlant de l'approche bi-compartiments habituelle (aqueux/sorbés aux particules) ont été mis en évidence. L'approche tri-compartiments a donc été adoptée pour la suite de l'étude.

Une **méthodologie** a été développée pour déterminer les deux constantes d'équilibre de sorption d'un CTO dans une boue donnée. Elle a ensuite été appliquée aux HAPs/NP/PCBs dans cinq boues différentes. Les échantillons de boue ont été sélectionnés de façon à représenter la grande variabilité de la matrice boue dans les systèmes d'épuration, tandis que les 21 molécules étudiées ont permis de balayer un relativement large panel de

caractéristiques physico-chimiques au sein des CTOs hydrophobes, notamment un $\log K_{ow}$ s'échelonnant entre 4 et 7. Ainsi, l'influence des caractéristiques de chacun des deux acteurs CTO et boue a pu être quantifiée. Ce travail a révélé que les caractéristiques des boues avaient un poids plus important que les caractéristiques des CTOs dans la détermination des constantes d'équilibre. Ainsi, l'estimation de ces constantes à partir de la seule hydrophobicité, par exemple selon la corrélation de Karickhoff dans les sols, peut générer d'importantes erreurs. De plus, des caractéristiques **chimiques** aussi bien que **physiques** ont été identifiées comme fortement influentes. Nous retiendrons le rôle de la teneur en protéines et la densité de la matière minérale pour ce qui est de la sorption aux particules, et le rôle de la teneur en protéines encore et aussi de la taille des entités dans le cas de la DCM. Le couplage des caractérisations chimiques et physiques s'est donc avéré très pertinent, et a informé quant aux mécanismes majeurs qui gouvernent les équilibres de sorption. Au-delà de cette production de connaissance, un **outil prédictif** a été généré à partir de la grande quantité de données obtenues. En effet, les deux modèles obtenus permettent d'estimer les constantes d'équilibre de sorption d'un CTO donné dans une boue donnée, à partir de leur caractérisation. Cet outil a offert la perspective de confronter le comportement physique des CTOs, c'est-à-dire leurs interactions de sorption, avec l'efficacité d'un procédé de digestion anaérobie à éliminer ces CTOs.

Dans le deuxième volet de ces travaux de recherche, la digestion anaérobie continue de boues contaminées en HAPs/NP/PCBs a été mise en œuvre pour des boues aux caractéristiques variables, obtenues par prélèvement sur sites industriels et transformées au laboratoire. Une démarche a ainsi été déployée afin d'ouvrir la boîte noire que constitue ce procédé, et d'explorer les notions de biodisponibilité et de cométabolisme. Les essais menés en biologie moléculaire n'ont pas permis d'intégrer la composante microbiologique à cette approche. Cependant, l'abattement de chacun des HAPs a pu être modélisé selon l'équation de Criddle, qui prend en compte leur biodisponibilité, les caractéristiques cinétiques de leur métabolisme, et le couplage de la dégradation des HAPs à la dégradation des matières sèches par cométabolisme.

Ainsi, des éléments tendent à trancher quant à la controverse qui concerne la correspondance de la **biodisponibilité** avec les compartiments de CTOs libres / sorbés à la DCM / sorbés aux particules. Ici, l'ensemble du compartiment aqueux, englobant les CTOs libres et ceux sorbés à la DCM, a été identifié comme biodisponible, soit corrélé aux cinétiques de dégradation. De ce fait, l'hypothèse la plus largement admise pour la modélisation du devenir des CTOs dans les boues a été confirmée. La sorption des CTOs à la DCM n'abaisse pas leur aptitude à être éliminés, probablement parce que la DCM, de relativement petite taille dans les boues, pourrait vraisemblablement transporter les CTOs du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire des microorganismes impliqués dans la dégradation des CTOs. Aux trois compartiments physiques des boues correspondent donc deux compartiments biologiques : CTOs libres et sorbés à la DCM seraient assimilables à la fraction biodisponible, et CTOs sorbés aux particules à la fraction non-biodisponible. En aucun cas ce résultat ne remet en cause la pertinence de l'approche tri-compartiments en matière de sorption : celle-ci est nécessaire pour estimer précisément la répartition des CTOs

entre les compartiments aqueux et sorbés aux particules, et donc la répartition entre le biodisponible et le non-biodisponible.

La biodisponibilité est souvent considérée comme le facteur qui limite la biodégradation des CTOs tels que les HAPs. Or, les résultats obtenus ici montrent que des **limitations par les caractéristiques cinétiques de la voie métabolique des HAPs**, résultant des caractéristiques des mécanismes de transport et de la machinerie enzymatique, **ainsi que par le cométabolisme**, en terme de vitesse de dégradation des matières sèches, s'opèrent de manière concomitante. En conclusion, l'évaluation du devenir des HAPs au cours de la digestion anaérobie ne peut se réduire à l'estimation de leur biodisponibilité, mais les trois processus de biodisponibilité, cinétique du métabolisme des HAPs et cométabolisme doivent être considérés, selon le formalisme adapté de Criddle (Criddle, 1993).

Par ailleurs, ces résultats offrent d'importantes **perspectives de recherches**. Sur la thématique des phénomènes de sorption, la pertinence de l'approche tri-compartiments ayant été démontrée, le travail accompli pourrait être élargi à un plus grand **nombre de boues** et à une plus grande **variété de CTOs**. La **caractérisation des boues** pourrait aussi être approfondie en élargissant les méthodologies employées et en sélectionnant les plus pertinents. Ceci dans le but de valider et de consolider les modèles de prédiction des constantes d'équilibre obtenus, mais aussi afin de générer des modèles de ce type qui soient plus génériques et permettent de prédire précisément le devenir d'une large gamme de CTOs dans les stations d'épuration, notamment au niveau de leur distribution de flux en sortie de séparation gravitaire et au sein d'unités de traitement biologiques. De fait, les modèles de K_{part} et K_{DCM} obtenus lors de cette étude ont été conçus pour répondre à une question scientifique précise : comment les HAPs/NP/PCBs se répartissent-ils entre les trois compartiments de boue dans les réacteurs de digestion anaérobie étudiés ? Ces modèles pourraient être utilisés pour bien d'autres applications en tant que tels, mais leur généricité relative (en terme de variété de CTOs et de boues) constitue un profond verrou. Après la levée de ce verrou, les modèles complétés constitueraient un puissant outil de prédiction du devenir des CTOs au sein des systèmes de traitement. Toutefois, la nature des interactions entre CTOs et matrice boue diffère fortement selon que le CTO soit hydrophile ou hydrophobe, par exemple. Il n'est donc pas réaliste de viser un modèle absolument générique, la levée de verrou ne sera que partielle.

Dans ce contexte d'approfondissement des modèles de sorption obtenus, l'hypothèse de **dénaturation** de la DCM qui provoquerait la perte d'aptitude à l'interaction avec les CTOs après lyse thermique devrait être validée, et le processus de renaturation étudié. Le potentiel zeta nous apparaît comme un outil prometteur pour cette investigation.

Du point de vue de la mise en œuvre de la digestion anaérobie de boues contaminées, la tentative de quantification des **pertes abiotiques** a soulevé de nombreuses questions. Les pertes significatives obtenues dans les réacteurs contenant de l'azide de sodium semblent résulter de phénomènes biologiques. La mise en évidence de ces phénomènes, soit via la détection d'une **activité biologique de fermentation** et de production d'intermédiaires métaboliques caractéristiques (approche chimique), soit via la détection de microorganismes

fermentaires actifs (approche de microbiologie classique ou moléculaire), pourrait valider cette hypothèse. La compréhension des phénomènes observés pourrait permettre de proposer de nouvelles solutions pour quantifier les pertes abiotiques, nécessaires à l'étude des mécanismes strictement et purement biologiques. Elle produira aussi probablement des connaissances sur le plan microbiologique, dans la mesure où l'azide de sodium constitue une pression de sélection à la suite de laquelle, malgré une forte inhibition du procédé dans sa globalité, l'abattement des CTOs est au contraire apparu faiblement inhibé. Contre toute attente, les écosystèmes sélectionnés via l'azide de sodium présenteraient des performances attractives. Ces écosystèmes méritent donc une attention particulière.

Les pertes abiotiques n'ayant pu être quantifiées ici, les résultats obtenus dans les réacteurs de digestion anaérobie sont valides si tant est que celles-ci restent faibles, ce que la littérature tend à montrer. Au-delà de cette validation, multiplier les mesures d'abattement en HAPs à différents niveaux de biodisponibilité et de cométabolisme, pour des substrats cométaboliques variables, et des écosystèmes différents serait d'un grand intérêt. En effet, les corrélations observées pour quatre conditions seraient consolidées si un plus grand nombre d'individus était considéré. Ainsi, la démonstration que **le compartiment aqueux est le compartiment biodisponible** serait renforcée. Les **mécanismes de transport** des HAPs seuls et des HAPs véhiculés par de la DCM vers le milieu intracellulaire pourraient alors être étudiés, pour approfondir la compréhension de la biodisponibilité. L'influence de la taille de la DCM sur le transport des HAPs sorbés est un point qui mériterait une attention particulière. La mise en évidence du **lieu de la réaction** de dégradation irait de pair avec cette étude du transport. En effet, il est communément admis que les réactions de biodégradation des CTOs s'opèrent dans le milieu intracellulaire. Cette hypothèse devrait être explorée.

De plus, multiplier les conditions de biodégradation des HAPs rendrait possible l'estimation des **paramètres de l'équation de Criddle : $T_{PAH,S}$, K_{PAH} et k_{PAH}** .

Les HAPs de haut poids moléculaire sont admis comme plus **récalcitrants** que les HAPs de petite taille. Par comparaison des dits coefficients, l'origine de cette constatation empirique pourrait être identifiée : soit une affinité des HAPs pour le système enzymatique (K_{PAH}) différente, soit une vitesse spécifique de dégradation (k_{PAH}) différente, ou encore un coefficient de couplage ($T_{PAH,S}$) avec le flux cométabolique variable. Les valeurs des paramètres qui différencient les HAPs pourraient être confrontées aux caractéristiques moléculaires des HAPs, pour mettre en évidence le lien entre structure et activité, et donc révéler un éventuel déterminisme structurel.

Ensuite, l'influence des caractéristiques du substrat pourrait être observée plus finement et la **spécificité des interactions cométaboliques** pourrait être précisée, en identifiant les substrats qui sont directement impliqués dans des interactions cométaboliques, et en quantifiant spécifiquement ces interactions. Pour ce faire, deux stratégies complémentaires sont envisageables : constituer des **substrats modèles par assemblage maîtrisé** de différents composés ou bien étudier des boues « naturelles » variées. Pour l'exploitation des données de biodégradation des HAPs et des boues obtenues grâce à ces stratégies, une méthode consisterait à s'appuyer sur le **modèle ADM1** par exemple (Batstone *et al.*, 2002).

En effet, les **réseaux métaboliques** caractéristiques de la digestion anaérobie sont détaillés dans ce modèle. Les voies de biodégradation des HAPs pourraient être intégrées à cette base solide et relativement complète, de façon à caractériser les interactions cométaboliques.

L'identification des substrats spécifiquement cométabolisés, couplée à l'étude de la biodégradation à faible flux cométabolique fournirait de plus des éléments de réponse quant à l'existence du **seuil métabolique** suggéré par les résultats obtenus.

Enfin, le lien avec la **structure de la population microbienne** impliquée dans le métabolisme des HAPs et/ou des substrats cométabolisés pourrait être établi. Pour cela, les réactions enzymatiques de biodégradation des HAPs, les séquences d'ADN qui les codent et les microorganismes qui les portent doivent être impérativement renseignés au préalable. Cette étape est indispensable en amont de la conception d'outils moléculaires les plus fiables et performants possibles.

Bien sûr, il serait intéressant d'élargir cette démarche à d'autres CTOs que les HAPs. Notamment au travers de la famille des PCBs, un autre type de cométabolisme pourrait être appréhendé.

Les axes de recherche ainsi définis permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la dégradation des CTOs au sein du système très complexe formé par les digesteurs anaérobies. De cette future production de connaissance émergeront peut-être des moyens d'action en vue de l'optimisation de l'élimination des CTOs au cours de ce procédé.

La démarche scientifique développée au cours de ces travaux de thèse pourrait être extrapolée à **d'autres systèmes** tels que des sols ou sédiments, afin d'étudier la dynamique des CTOs dans des écosystèmes de l'Environnement. En effet, la pertinence de l'approche tri-compartiments a été démontrées vis-à-vis de la biodisponibilité des HAPs envers les microorganismes épurateurs. Transposée dans l'Environnement, cette approche pourrait constituer un outil puissant d'évaluation de la biodisponibilité des CTOs envers le biotope, et alimenterait donc les études d'impact écotoxicologique.

***VI REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES***

- Abad, E., Martinez, K., Planas, C., Palacios, O., Caixach, J. & Rivera, J. (2005).** Priority organic pollutant assessment of sludges for agricultural purposes. *Chemosphere* **61**, 1358-1369.
- Achong, G. R., Rodriguez, A. M. & Spormann, A. M. (2001).** Benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp strain T: Cloning, sequencing, transcriptional organization, and its role in anaerobic toluene and m-xylene mineralization. *Journal of Bacteriology* **183**, 6763-6770.
- Ahel, M., Giger, W., Molnar, E. & Ibric, S. (2000).** Determination of nonylphenol polyethoxylates and their lipophilic metabolites in sewage effluents by normal-phase high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Croatica Chemica Acta* **73**, 209-227.
- Ahring, B. K. (2003).** Biomethanation I. In *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, pp. 220. Edited by T. Sheper: Springer-Verlag.
- Andreadakis, A. D. (1993).** Physical and Chemical-Properties of Activated-Sludge Floc. *Water Research* **27**, 1707-1714.
- Annweiler, E., Michaelis, W. & Meckenstock, R. U. (2002).** Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and tetralin indicate a new metabolic pathway. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 852-858.
- Annweiler, E., Materna, A., Safinowski, M., Kappler, A., Richnow, H. H., Michaelis, W. & Meckenstock, R. U. (2000).** Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 5329-5333.
- Aparicio, I., Santos, J. L. & Alonso, E. (2007).** Simultaneous sonication-assisted extraction, and determination by gas chromatography-mass spectrometry, of di-(2-ethylhexyl)phthalate, nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and polychlorinated biphenyls in sludge from wastewater treatment plants. *Analytica Chimica Acta* **584**, 455-461.
- Aquino, S. F., Chernicharo, C. A. L., Soares, H., Takemoto, S. Y. & Vazoller, R. F. (2008).** Methodologies for determining the bioavailability and biodegradability of sludges. *Environmental Technology* **29**, 855-862.
- Arias-Estevez, M., Fernandez-Gandara, D., Garcia-Falcon, M. S., Garcia-Rio, L., Mejuto, J. C. & Simal-Gandara, J. (2007).** Sorption of PAHs to colloid dispersions of humic substances in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **79**, 251-254.
- Artola-Garicano, E., Borkent, I., Damen, K., Jager, T. & Vaes, W. H. J. (2003).** Sorption kinetics and microbial biodegradation activity of hydrophobic chemicals in sewage sludge: Model and measurements based on free concentrations. *Environmental Science & Technology* **37**, 116-122.
- Barragan, M. J. L., Diaz, E., Garcia, J. L. & Carmona, M. (2004).** Genetic clues on the evolution of anaerobic catabolism of aromatic compounds. *Microbiology-Sgm* **150**, 2018-2021.

- Barret, M., Patureau, D., Latrille, E. & Carrère, H. (2009a).** A three-compartment model for micropollutants sorption in sludge: methodological approach and implication. *Water Research*, In press.
- Barret, M., Carrere, H., Latrille, E., Wisniewski, C. & Patureau, D. (2009b).** Micropollutants and sludge characterization to model sorption equilibria. *Environmental Science & Technology*, In press.
- Barret, M., Carrere, H., Latrille, E., Wisniewski, C. & Patureau, D. (2010).** Micropollutant and sludge characterization for modeling sorption equilibria. *Environmental Science & Technology*, In press.
- Bartoszek, M., Polak, J. & Sulkowski, W. W. (2008).** NMR study of the humification process during sewage sludge treatment. *Chemosphere* **73**, 1465-1470.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., Sanders, W. T. M., Siegrist, H. & Vavilin, V. A. (2002).** Anaerobic digestion model no. 1 (ADM1). IWA Task Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes. London: IWA.
- Bedard, D. L. (2008).** A Case Study for Microbial Biodegradation: Anaerobic Bacterial Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls-From Sediment to Defined Medium. *Annual Review of Microbiology* **62**, 253-270.
- Bedard, D. L., Ritalahti, K. A. & Loffler, F. E. (2007).** The Dehalococcoides population in sediment-free mixed cultures metabolically dechlorinates the commercial polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1260. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 2513-2521.
- Beller, H. R. & Spormann, A. M. (1999).** Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp strain T. *Fems Microbiology Letters* **178**, 147-153.
- Beller, H. R., Kane, S. R., Legler, T. C. & Alvarez, P. J. J. (2002).** A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. *Environmental Science & Technology* **36**, 3977-3984.
- Beller, H. R., Kane, S. R., Legler, T. C., McKelvie, J. R., Lollar, B. S., Pearson, F., Balsler, L. & MacKay, D. M. (2008).** Comparative assessments of benzene, toluene, and xylene natural attenuation by quantitative polymerase chain reaction analysis of a catabolic gene, signature metabolites, and compound-specific isotope analysis. *Environmental Science & Technology* **42**, 6065-6072.
- Benabdallah El-Hadj, T., Dosta, J. & Mata-Alvarez, J. (2006).** Biodegradation of PAH and DEHP micro-pollutants in mesophilic and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. *Water Science and Technology* **53**, 99-107.
- Benabdallah El-Hadj, T., Dosta, J., Marquez-Serrano, R. & Mata-Alvarez, J. (2007a).** Effect of ultrasound pretreatment in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion with emphasis on naphthalene and pyrene removal. *Water Research* **41**, 87-94.
- Benabdallah El-Hadj, T., Franchini, E., Labanda, J., Dosta, J. & Mata-Alvarez, J. (2007b).** DEHP and NPE behaviour in primary and secondary sludge during a combined

thermal or ultrasound pretreatments with anaerobic digestion. In *11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion*. Edited by IWA. Brisbane, Australia, 23-27 September.

Benoit, P., Madrigal, I., Preston, C. M., Chenu, C. & Barriuso, E. (2008). Sorption and desorption of non-ionic herbicides onto particulate organic matter from surface soils under different land uses. *European Journal of Soil Science* **59**, 178-189.

Bernal-Martinez, A., Carrere, H., Patureau, D. & Delgenes, J. P. (2005). Combining anaerobic digestion and ozonation to remove PAH from urban sludge. *Process Biochemistry* **40**, 3244-3250.

Bernal-Martinez, A., Carrere, H., Patureau, D. & Delgenes, J. P. (2007). Ozone pre-treatment as improver of PAH removal during anaerobic digestion of urban sludge. *Chemosphere* **68**, 1013-1019.

Bernal-Martinez, A., Patureau, D., Delgenes, J. P. & Carrere, H. (2009). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) during anaerobic digestion with recirculation of ozonated digested sludge. *Journal of Hazardous Materials* **162**, 1145-1150.

Bertin, L., Capodicasa, S., Occulti, F., Girotti, S., Marchetti, L. & Fava, F. (2007). Microbial processes associated to the decontamination and detoxification of a polluted activated sludge during its anaerobic stabilization. *Water Research* **41**, 2407-2416.

Beulke, S., Brown, C. D., Dubus, I. G. & Walker, A. (2001). Characterisation of sorption for the modelling of pesticide fate. In *Pesticide behaviour in soils and water. Proceedings of a Symposium organized by the British Crop Protection Council, Brighton, UK, 13-15 November 2001*.

Bitton, G. (1994). *Wastewater microbiology*. New York: Wiley-Liss.

Blanchard, M., Teil, M. J., Ollivon, D., Legenti, L. & Chevreuril, M. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in wastewaters and sewage sludges from the Paris area (France). *Environmental Research* **95**, 184-197.

Bodzek, D. & Janoszka, B. (1999). Comparison of polycyclic aromatic compounds and heavy metals contents in sewage sludges from industrialized and non-industrialized region. *Water Air and Soil Pollution* **111**, 359-369.

Bogan, B. W., Lamar, R. T., Burgos, W. D. & Tien, M. (1999). Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo alpha pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. *Letters in Applied Microbiology* **28**, 250-254.

Bogolte, B. T., Ehlers, G. A. C., Braun, R. & Loibner, A. P. (2007). Estimation of PAH bioavailability to *Lepidium sativum* using sequential supercritical fluid extraction - a case study with industrial contaminated soils. *European Journal of Soil Biology* **43**, 242-250.

Bosma, T. N. P., Middeldorp, P. J. M., Schraa, G. & Zehnder, A. J. B. (1997). Mass Transfer Limitation of Biotransformation: Quantifying Bioavailability. *Environmental Science & Technology* **31**, 248-252.

Bougrier, C. (2005). Optimisation du procédé de méthanisation par mise en place d'un co-traitement physico-chimique : application au gisement de biogaz représenté par les boues

d'épuration des eaux usées. In *Science des procédés*, pp. 276. Montpellier: Université Montpellier II.

Bougrier, C., Delgenes, J. P. & Carrere, H. (2007). Impacts of thermal pre-treatments on the semi-continuous anaerobic digestion of waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal* **34**, 20-27.

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

Bougrier, C., Albasi, C., Delgenes, J. P. & Carrere, H. (2006). Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. *Chemical Engineering and Processing* **45**, 711-718.

Byrns, G. (2001). The fate of xenobiotic organic compounds in wastewater treatment plants. *Water Research* **35**, 2523-2533.

Cai, Q. Y., Mo, C. H., Wu, Q. T., Zeng, Q. Y. & Katsoyiannis, A. (2007). Occurrence of organic contaminants in sewage sludges from eleven wastewater treatment plants, China. *Chemosphere* **68**, 1751-1762.

Carballa, M., Omil, F. & Lema, J. M. (2009). Influence of Different Pretreatments on Anaerobically Digested Sludge Characteristics: Suitability for Final Disposal. *Water Air and Soil Pollution* **199**, 311-321.

Carballa, M., Omil, F., Alder, A. C. & Lema, J. M. (2006). Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and personal care products. *Water Science and Technology* **53**, 109-117.

Carballa, M., Fink, G., Omil, F., Lema, J. M. & Ternes, T. (2008). Determination of the solid-water distribution coefficient (K-d) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge. *Water Research* **42**, 287-295.

Chang, B. V., Chang, S. W. & Yuan, S. Y. (2003). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge. *Advances in Environmental Research* **7**, 623-628.

Chang, B. V., Yu, C. H. & Yuan, S. Y. (2004). Degradation of nonylphenol by anaerobic microorganisms from river sediment. *Chemosphere* **55**, 493-500.

Chang, B. V., Chiang, F. & Yuan, S. Y. (2005a). Biodegradation of nonylphenol in sewage sludge. *Chemosphere* **60**, 1652-1659.

Chang, B. V., Chiang, F. & Yuan, S. Y. (2005b). Anaerobic degradation of nonylphenol in sludge. *Chemosphere* **59**, 1415-1420.

Chang, B. V., Chang, I. T. & Yuan, S. Y. (2008). Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **80**, 145-149.

- Chang, W., Um, Y. & Holoman, T. R. P. (2006).** Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation coupled to methanogenesis. *Biotechnology Letters* **28**, 425-430.
- Chen, J. F., Wong, M. H., Wong, Y. S. & Tam, N. F. Y. (2008).** Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp a bacterial strain isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin* **57**, 695-702.
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J. A. & Booksh, K. (2003).** Fluorescence excitation - Emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology* **37**, 5701-5710.
- Chen, Y., Jiang, S., Yuan, H., Zhou, Q. & Gu, G. (2007).** Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Research* **41**, 683-689.
- Chiou, C. T., Malcolm, R. L., Brinton, T. I. & Kile, D. E. (1986).** Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environmental Science & Technology* **20**, 502-508.
- Christensen, N., Batstone, D. J., He, Z., Angelidaki, I. & Schmidt, J. E. (2004).** Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from sewage sludge by anaerobic degradation. *Water Science and Technology* **50**, 237-244.
- Chu, C. P. & Lee, D. J. (2004).** Multiscale structures of biological flocs. *Chemical Engineering Science* **59**, 1875-1883.
- Chung, N. H. & Alexander, M. (1998).** Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils. *Environmental Science & Technology* **32**, 855-860.
- Coates, J., Woodward, J., Allen, J., Philp, P. & Lovley, D. (1997).** Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Applied Environmental Microbiology* **63**, 3589-3593.
- Conrad, A., Cadoret, A., Corteel, P., Leroy, P. & Block, J. C. (2006).** Adsorption/desorption of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) and azoproteins by/from activated sludge flocs. *Chemosphere* **62**, 53-60.
- Cornelissen, G., Rigterink, H., Ferdinandy, M. M. A. & Van Noort, P. C. M. (1998).** Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environmental Science & Technology* **32**, 966-970.
- Corti, A., Frassinetti, S., Vallini, G., Dantone, S., Fichi, C. & Solaro, R. (1995).** Biodegradation of Nonionic Surfactants .1. Biotransformation of 4-(1-Nonyl)Phenol by a *Candida-Maltosa* Isolate. *Environmental Pollution* **90**, 83-87.
- Corvini, P. F. X., Schaffer, A. & Schlosser, D. (2006).** Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols - our evolving view. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 223-243.
- Coschigano, P. W. (2000).** Transcriptional Analysis of the *tutE* *tutFDGH* Gene Cluster from *Thauera aromatica* Strain T1 10.1128/AEM.66.3.1147-1151.2000. *Applied Environmental Microbiology* **66**, 1147-1151.

Cottin, N. C. & Merlin, G. (2007). Study of pyrene biodegradation capacity in two types of solid media. *Science of the Total Environment* **380**, 116-123.

Criddle, C. S. (1993). The Kinetics of Cometabolism. *Biotechnology and Bioengineering* **41**, 1048-1056.

Cupples, A. M. (2008). Real-time PCR quantification of Dehalococcoides populations: Methods and applications. *Journal of Microbiological Methods* **72**, 1-11.

Cutter, L., Sowers, K. R. & May, H. D. (1998). Microbial dechlorination of 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl under anaerobic conditions in the absence of soil or sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2966-2969.

Cutter, L. A., Watts, J. E. M., Sowers, K. R. & May, H. D. (2001). Identification of a microorganism that links its growth to the reductive dechlorination of 2,3,5,6-chlorobiphenyl. *Environmental Microbiology* **3**, 699-709.

Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T. & Rulkens, W. (2002). The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere* **46**, 1235-1245.

Da Silva, M. L. B. & Alvarez, P. J. J. (2004). Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 4720-4726.

Davidova, I. A., Gieg, L. M., Duncan, K. E. & Suflita, J. M. (2007). Anaerobic phenanthrene mineralization by a carboxylating sulfate-reducing bacterial enrichment. *Isme Journal* **1**, 436-442.

Dean, J. R. & Scott, W. C. (2004). Recent developments in assessing the bioavailability of persistent organic pollutants in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **23**, 609-618.

Degrémont (1989). Mémento technique de l'eau : Tome 1, pp. 592. Rueil-Malmaison: Degrémont.

Degrémont (2005). Mémento technique de l'eau, pp. 1-785: Degrémont.

Delbès, C. (2000). Diversité et dynamique structurales et fonctionnelles de la communauté microbienne d'un digesteur anaérobie : approche moléculaire à partir des ADNr 16S et ARNr 16s, pp. 169: Université Claude Bernard Lyon I.

Di Corcia, A. (1998). Characterization of surfactants and their biointermediates by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **794**, 165-185.

Diaz, E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology* **7**, 173-180.

Diaz, E. (Communication personnelle).

Dignac, M. F., Ginestet, P., Rybacki, D., Bruchet, A., Urbain, V. & Scribe, P. (2000). Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: Nature of residual organic matter. *Water Research* **34**, 4185-4194.

Ding, Y. S., Ashley, D. L. & Watson, C. H. (2007). Determination of 10 carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 5966-5973.

Dionisi, D., Bertin, L., Bornoroni, L., Capodicasa, S., Papini, M. P. & Fava, F. (2006). Removal of organic xenobiotics in activated sludges under aerobic conditions and anaerobic digestion of the adsorbed species. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **81**, 1496-1505.

Drazenka Selesi, R. U. M. (2009). Anaerobic degradation of the aromatic hydrocarbon biphenyl by a sulfate-reducing enrichment culture. *FEMS Microbiology Ecology* **68**, 86-93.

Dreywood, R. (1946). Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* **18**, 499.

Duedahl-Olesen, L., White, S. & Binderup, M. L. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in Danish smoked fish and meat products. *Polycyclic Aromatic Compounds* **26**, 163-184.

Duran, R. (Communication personnelle).

Durand, J. F. Partial least-squares regression: From linearity to nonlinear additive spline modeling. May be accessed at <http://jf-durand-pls.com/>.

During, R. A., Krahe, S. & Gath, S. (2002). Sorption Behavior of nonylphenol in terrestrial soils. *Environmental Science & Technology* **36**, 4052-4057.

Ehlers, G. A. C. & Loibner, A. P. (2006). Linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biomimetic methodology: A review of geosorbent characterisation. and (bio)availability prediction. *Environmental Pollution* **141**, 494-512.

El-Hadj, T. B., Dosta, J. & Mata-Alvarez, J. (2006). Biodegradation of PAH and DEHP micro-pollutants in mesophilic and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. *Water Science and Technology* **53**, 99-107.

El-Hadj, T. B., Dosta, J., Torres, R. & Mata-Alvarez, J. (2007). PCB and AOX removal in mesophilic and thermophilic sewage sludge digestion. *Biochemical Engineering Journal* **36**, 281-287.

Eschenbach, A., Wienberg, R. & Mahro, B. (1998). Fate and stability of nonextractable residues of C-14 PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. *Environmental Science & Technology* **32**, 2585-2590.

Eskicioglu, C., Kennedy, K. J. & Droste, R. L. (2006). Characterization of soluble organic matter of waste activated sludge before and after thermal pretreatment. *Water Research* **40**, 3725-3736.

Fagervold, S. K., May, H. D. & Sowers, K. R. (2007). Microbial reductive dechlorination of aroclor 1260 in Baltimore Harbor sediment microcosms is catalyzed by three phylotypes within the phylum Chloroflexi. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 3009-3018.

Fagervold, S. K., Watts, J. E. M., May, H. D. & Sowers, K. R. (2005). Sequential reductive dechlorination of meta-chlorinated polychlorinated biphenyl congeners in sediment microcosms by two different Chloroflexi phylotypes. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 8085-8090.

Fennell, D. E., Nijenhuis, I., Wilson, S. F., Zinder, S. H. & Haggblom, M. M. (2004). Dehalococcoides ethenogenes strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants. *Environmental Science & Technology* **38**, 2075-2081.

Finlayson, J. C., Liao, B., Droppo, I. G., Leppard, G. G. & Liss, S. N. (1998). The relationship between the structure of activated sludge flocs and the sorption of hydrophobic pollutants. *Water Science and Technology* **37**, 353-357.

Foght, J. (2008). Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: Pathways and prospects. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **15**, 93-120.

Fountoulakis, M., Drillia, P., Pakou, C., Kampioti, A., Stamatelatou, K. & Lyberatos, G. (2005). Analysis of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in sewage sludge by high performance liquid chromatography following microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* **1089**, 45-51.

Fountoulakis, M. S., Stamatelatou, K., Batstone, D. J. & Lyberatos, G. (2006). Simulation of DEHP biodegradation and sorption during the anaerobic digestion of secondary sludge. *Water Science and Technology* **54**, 119-128.

Futagami, T., Goto, M. & Furukawa, K. (2008). Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. *Chemical Record* **8**, 1-12.

Fytili, D. & Zabaniotou, A. (2008). Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods--A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **12**, 116-140.

Galushko, M., Schink, Widdel, (1999). Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium. *Environmental Microbiology* **1**, 415-420.

Gao, J. P., Maguhn, J., Spitzauer, P. & Kettrup, A. (1998a). Sorption of pesticides in the sediment of the Teufelsweiher pond (Southern Germany). I: Equilibrium assessments, effect of organic carbon content and pH. *Water Research* **32**, 1662-1672.

Gao, J. P., Maguhn, J., Spitzauer, P. & Kettrup, A. (1998b). Sorption of pesticides in the sediment of the teufelsweiher pond (Southern Germany). II: competitive adsorption, desorption of aged residues and effect of dissolved organic carbon. *Water Research* **32**, 2089-2094.

Gavala, H. N., Yenal, U., Skiadas, I. V., Westermann, P. & Ahring, B. K. (2003). Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature. *Water Research* **37**, 4561-4572.

Gerecke, A. C., Giger, W., Hartmann, P. C., Heeb, N. V., Kohler, H.-P. E., Schmid, P., Zennegg, M. & Kohler, M. (2006). Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge. *Chemosphere, Brominated Flame Retardants (BFRs) in the Environment - Papers presented at the Third International Workshop on Brominated Flame Retardants held in Toronto, Canada, 6-9 June 2004* **64**, 311-317.

Gerstl, Z. (1990). Estimation of organic chemical sorption by soils. *Journal of Contaminant Hydrology* **6**, 357-375.

Ghanem, A., Bados, P., Estaun, A. R., de Alencastro, L. F., Taibi, S., Einhorn, J. & Mougin, C. (2007). Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof in French urban sewage sludge. *Chemosphere* **69**, 1368-1373.

Gibson, J. & S. Harwood, C. (2002). Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annual Review of Microbiology* **56**, 345-369.

Gieseke, A., Tarre, S., Green, M. & de Beer, D. (2006). Nitrification in a biofilm at low pH values: Role of in situ microenvironments and acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 4283-4292.

Gijzen, H. J. (2001). Anaerobes, aerobes and phototrophs - A winning team for wastewater management. *Water Science and Technology* **44**, 123-132.

Graja, S., Chauzy, J., Fernandes, P., Patria, L. & Cretenot, D. (2005). Reduction of sludge production from WWTP using thermal pretreatment and enhanced anaerobic methanisation. *Water Science and Technology* **52**, 267-273.

Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H. & Raecker, T. (2002). Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environmental Science & Technology* **36**, 1676-1680.

Hamaker, J. W. & Thompson, J. M. (1972). Adsorption. In *Organic chemicals in the soil environment*, pp. 49-143. Edited by C. A. I. Goring & J. W. Hamaker. New York: Marcel Dekker Inc.

Hassett, J. J. & Banwart, W. L. (1987). The sorption of nonpolar organics by soils and sediments. *SSSA Special Publication, Soil Science Society of America*.

Heider, J., Spormann, A. M., Beller, H. R. & Widdel, F. (1998). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *Fems Microbiology Reviews* **22**, 459-473.

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

Hernandez-Raquet, G., Soef, A., Delgenes, N. & Balaguer, P. (2007). Removal of the endocrine disrupter nonylphenol and its estrogenic activity in sludge treatment processes. *Water Research* **41**, 2643-2651.

Hickman, Z. A. & Reid, B. J. (2005). Towards a more appropriate water based extraction for the assessment of organic contaminant availability. *Environmental Pollution* **138**, 299-306.

Hickman, Z. A., Swindell, A. L., Allan, I. J., Rhodes, A. H., Hare, R., Semple, K. T. & Reid, B. J. (2008). Assessing biodegradation potential of PAHs in complex multi-contaminant matrices. *Environmental Pollution* **156**, 1041-1045.

Hiraishi, A. (2008). Biodiversity of dehalorespiring bacteria with special emphasis on polychlorinated biphenyl/dioxin dechlorinators. *Microbes and Environments* **23**, 1-12.

Holbrook, R. D., Love, N. G. & Novak, J. T. (2004). Investigation of Sorption Behavior between Pyrene and Colloidal Organic Carbon from Activated Sludge Processes. *Environmental Science & Technology* **38**, 4987-4994.

Holscher, T., Krajmalnik-Brown, R., Ritalahti, K. M., von Wintzingerode, F., Gorisch, H., Löffler, F. E. & Adrian, L. (2004). Multiple nonidentical reductive-dehalogenase-homologous genes are common in Dehalococcoides. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5290-5297.

Hou, S. G., Sun, H. W. & Gao, Y. (2006). Sorption of small metabolites of nonylphenol polyethoxylates in single and complex systems on aquatic suspended particulate matter. *Chemosphere* **63**, 31-38.

Hung, N. V., Tateda, M., Ike, M., Fujita, M., Tsunoi, S. & Tanaka, M. (2004). Sorption of biodegradation end products of nonylphenol polyethoxylates onto activated sludge. *Journal of Environmental Sciences-China* **16**, 564-569.

Ilani, T., Schulz, E. & Chefetz, B. (2005). Interactions of organic compounds with wastewater dissolved organic matter: role of hydrophobic fractions. *Journal of Environmental Quality* **34**, 552-562.

Ivashechkin, P., Corvini, P. F. X. & Dohmann, M. (2004). Behaviour of endocrine disrupting chemicals during the treatment of municipal sewage sludge. *Water Science and Technology* **50**, 133-140.

Jackson, B. E., Bhupathiraju, V. K., Tanner, R. S., Woese, C. R. & McInerney, M. J. (1999). *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Archives of Microbiology* **171**, 107-114.

Jolly, C., Katsiadaki, I., Morris, S., Le Belle, N., Dufour, S., Mayer, I., Pottinger, T. G. & Scott, A. P. (2009). Detection of the anti-androgenic effect of endocrine disrupting environmental contaminants using in vivo and in vitro assays in the three-spined stickleback. *Aquatic Toxicology* **92**, 228-239.

Jouanneau, Y., Willison, J. C., Meyer, C., Krivobok, S., Chevron, N., Besombes, J. L. & Blake, G. (2005). Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation. *Environmental Science & Technology* **39**, 5729-5735.

Jurgella, G. F., Marwah, A., Malison, J. A., Peterson, R. & Barry, T. P. (2006). Effects of xenobiotics and steroids on renal and hepatic estrogen metabolism in lake trout. *General and Comparative Endocrinology* **148**, 273-281.

Kakareka, S. V., Kukharchyk, T. I. & Khomich, V. S. (2005). Study of PAH emission from the solid fuels combustion in residential furnaces. *Environmental Pollution* **133**, 383-387.

Kane, S. R., Beller, H. R., Legler, T. C. & Anderson, R. T. (2002). Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene-degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation* **13**, 149-154.

Karickhoff, S. W., Brown, D. S. & Scott, T. A. (1979). Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Research* **13**, 241-248.

Katsoyiannis, A. & Samara, C. (2004). Persistent organic pollutants (POPs) in the sewage treatment plant of Thessaloniki, northern Greece: occurrence and removal. *Water Research* **38**, 2685-2698.

Katsoyiannis, A. & Samara, C. (2005). Persistent organic pollutants (POPs) in the conventional activated sludge treatment process: fate and mass balance. *Environmental Research* **97**, 245-257.

Katsoyiannis, A. & Samara, C. (2007). The fate of dissolved organic carbon (DOC) in the wastewater treatment process and its importance in the removal of wastewater contaminants. *Environmental Science and Pollution Research* **14**, 284-292.

Katsoyiannis, A., Zouboulis, A. & Samara, C. (2006). Persistent organic pollutants (POPs) in the conventional activated sludge treatment process: model predictions against experimental values. *Chemosphere* **65**, 1634-1641.

Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., FennerCrisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T. & Tilson, H. A. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the US EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* **104**, 715-740.

Kawasaki, N., Araki, M., Nakamura, T. & Tanada, S. (2001). Inclusion behavior of 4-nonylphenol into cyclodextrin derivatives. *Journal of Colloid and Interface Science* **238**, 215-218.

Keiding, K. & Nielsen, P. H. (1997). Desorption of organic macromolecules from activated sludge: Effect of ionic composition. *Water Research* **31**, 1665-1672.

Kim, H. S. & Weber, W. J. (2005). Optimizing Contaminant Desorption and Bioavailability in Dense Slurry Systems. 2. PAH Bioavailability and Rates of Degradation. *Environmental Science & Technology* **39**, 2274-2279.

Kjellerup, B. V., Sun, X., Ghosh, U., May, H. D. & Sowers, K. R. (2008). Site-specific microbial communities in three PCB-impacted sediments are associated with different in situ dechlorinating activities. *Environmental Microbiology* **10**, 1296-1309.

- Koh, Y. K. K., Lester, J. N. & Scrimshaw, M. D. (2005).** Fate and behavior of alkylphenols and their polyethoxylates in an activated sludge plant. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **75**, 1098-1106.
- Kohli, J., Lee, H. B. & Peart, T. E. (2006).** Organic contaminants in Canadian municipal sewage sludge. Part II. Persistent chlorinated compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Water Quality Research Journal of Canada* **41**, 47-55.
- Kordel, W., Hennecke, D. & Franke, C. (1997).** Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. *Chemosphere* **35**, 107-119.
- Kraaij, R., Seinen, W. & Tolls, J. (2002).** Direct evidence of sequestration in sediments affecting the bioavailability of hydrophobic organic chemicals to benthic deposit-feeders. *Environmental Science & Technology* **36**, 3525-3529.
- Krahe, S., Doring, R. A., Huisman, J. A., Horn, A. L. & Gath, S. (2006).** Statistical modeling of the partitioning of nonylphenol in soil. *Water Air and Soil Pollution* **172**, 221-237.
- Krajmalnik-Brown, R., Holscher, T., Thomson, I. N., Saunders, F. M., Ritalahti, K. M. & Loffler, F. E. (2004).** Genetic Identification of a Putative Vinyl Chloride Reductase in *Dehalococcoides* sp. Strain BAV1. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 6347-6351.
- Krauss, M. & Wilcke, W. (2005).** Persistent organic pollutants in soil density fractions: distribution and sorption strength. *Chemosphere* **59**, 1507-1515.
- Kube, M., Beck, A., Zinder, S. H., Kuhl, H., Reinhardt, R. & Adrian, L. (2005).** Genome sequence of the chlorinated compound respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nature Biotechnology* **23**, 1269-1273.
- Kube, M., Heider, J., Amann, J., Hufnagel, P., Kuhner, S., Beck, A., Reinhardt, R. & Rabus, R. (2004).** Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Archives of Microbiology* **181**, 182-194.
- Lai, K. M., Johnson, K. L., Scrimshaw, M. D. & Lester, J. N. (2000).** Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environmental Science & Technology* **34**, 3890-3894.
- Langford, K. H., Scrimshaw, M. D., Birkett, J. W. & Lester, J. N. (2005a).** The partitioning of alkylphenolic surfactants and polybrominated diphenyl ether flame retardants in activated sludge batch tests. *Chemosphere* **61**, 1221-1230.
- Langford, K. H., Scrimshaw, M. D., Birkett, J. W. & Lester, J. N. (2005b).** Degradation of nonylphenolic surfactants in activated sludge batch tests. *Water Research* **39**, 870-876.
- Lee, C. & Kuo, L. (1999).** Quantification of the dissolved organic matter effect on the sorption of hydrophobic organic pollutant: application of an overall mechanistic sorption model. *Chemosphere* **38**, 807-821.
- Lee, D. Y. & Farmer, W. J. (1989).** Dissolved organic matter interaction with napropamide and four other nonionic pesticides. *Journal of Environmental Quality* **18**.

Lee, P. K. H., Macbeth, T. W., Sorenson, K. S., Jr., Deeb, R. A. & Alvarez-Cohen, L. (2008). Quantifying Genes and Transcripts To Assess the In Situ Physiology of "Dehalococcoides" spp. in a Trichloroethene-Contaminated Groundwater Site 10.1128/AEM.02199-07. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 2728-2739.

Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Horth, P., Haehnel, W., Schiltz, E., Schagger, H. & Heider, J. (1998). Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glyceryl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Molecular Microbiology* **28**, 615-628.

Leutwein, C. & Heider, J. (2001). Succinyl-CoA:(R)-benzylsuccinate CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. *Journal of Bacteriology* **183**, 4288-4295.

Leutwein, C. & Heider, J. (2002). (R)-benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase of *Thauera aromatica*, an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway. *Archives of Microbiology* **178**, 517-524.

Li, Y. Y. & Noike, T. (1992). Upgrading of Anaerobic-Digestion of Waste Activated-Sludge by Thermal Pretreatment. *Water Science and Technology* **26**, 857-866.

Liao, B. Q., Droppo, I. G., Leppard, G. G. & Liss, S. N. (2006). Effect of solids retention time on structure and characteristics of sludge flocs in sequencing batch reactors. *Water Research* **40**, 2583-2591.

Liao, B. Q., Allen, D. G., Droppo, I. G., Leppard, G. G. & Liss, S. N. (2001). Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Research* **35**, 339-350.

Liss, S. N., Liao, B. Q., Droppo, I. G., Allen, D. G. & Leppard, G. G. (2002). Effect of solids retention time on floc structure. *Water Science and Technology* **46**, 431-438.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Fan, A. L. & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-271.

Lu, J., Jin, Q., He, Y. L. & Wu, J. (2007). Biodegradation of nonylphenol polyethoxylates under Fe(III)-reducing conditions. *Chemosphere* **69**, 1047-1054.

Lu, J., Jin, Q., He, Y., Wu, J., Zhang, W. & Zhao, J. (2008). Anaerobic degradation behavior of nonylphenol polyethoxylates in sludge. *Chemosphere* **71**, 345-351.

Luo, J. P., Ma, M., Liu, C., Zha, J. M. & Wang, Z. J. (2009). Impacts of particulate organic carbon and dissolved organic carbon on removal of polycyclic aromatic hydrocarbons, organochlorine pesticides, and nonylphenols in a wetland. *Journal of Soils and Sediments* **9**, 180-187.

Luppi, L. I., Hardmeier, I., Babay, P. A., Itria, R. F. & Erijman, L. (2007). Anaerobic nonylphenol ethoxylate degradation coupled to nitrate reduction in a modified biodegradability batch test. *Chemosphere* **68**, 2136-2143.

- Mackay, D. & Fraser, A. (2000).** Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution* **110**, 375-391.
- Mancera-Lopez, M., Esparza-Garcia, F., Chavez-Gomez, B., Rodriguez-Vazquez, R., Saucedo-Castaneda, G. & Barrera-Cortes, J. (2008).** Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* **61**, 151-160.
- Manoli, E. & Samara, C. (1999).** Occurrence and mass balance of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Thessaloniki sewage treatment plant. *Journal of Environmental Quality* **28**, 176-187.
- Marquardt, D. (1963).** An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *SIAM Journal of Applied Mathematics* **11**, 431-441.
- Maxin, C. R. & Kogel-Knabner, I. (1995).** Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) to water-soluble soil organic matter. *European Journal of Soil Science* **46**, 193-204.
- Maymo-Gatell, X., Chien, Y.-t., Gossett, J. M. & Zinder, S. H. (1997).** Isolation of a Bacterium That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene. *Science* **276**, 1568-1571.
- McCarthy, J. F. & Zachara, J. M. (1989).** Subsurface transport of contaminants. *Environmental Science & Technology* **23**.
- Meckenstock, R. U., Annweiler, E., Michaelis, W., Richnow, H. H. & Schink, B. (2000).** Anaerobic Naphthalene Degradation by a Sulfate-Reducing Enrichment Culture. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2743-2747.
- Mininni, G., Sbrilli, A., Braguglia, C. M., Guerriero, E., Marani, D. & Rotatori, M. (2007).** Dioxins, furans and polycyclic aromatic hydrocarbons emissions from a hospital and cemetery waste incinerator. *Atmospheric Environment* **41**, 8527-8536.
- Mitra, S. & Dickhut, R. M. (1999).** Three-phase modeling of polycyclic aromatic hydrocarbon association with pore-water-dissolved organic carbon. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1144-1148.
- Moletta, R. (2008).** *La méthanisation*. Editions Tec & Doc Lavoisier.
- Mottet, A., François, E., Latrille, E., Steyer, J. P., Déléris, S., Vedrenne, F. & Carrère, H. (2009).** Estimation of anaerobic biodegradability indicators for waste activated sludge. *Chemical Engineering Journal*, Submitted.
- Musat, F., Galushko, A., Jacob, J., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Wilkes, H., Schink, B. & Rabus, R. (2009).** Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology* **11**, 209-219.
- Nakada, N., Yasojima, M., Okayasu, Y., Komori, K., Tanaka, H. & Suzuki, Y. (2006).** Fate of oestrogenic compounds and identification of oestrogenicity in a wastewater treatment process. *Water Science and Technology* **53**, 51-63.

Natarajan, M. R., Wu, W. M., Sanford, R. & Jain, M. K. (1999). Degradation of biphenyl by methanogenic microbial consortium. *Biotechnology Letters* **21**, 741-745.

Natarajan, M. R., Wu, W. M., Nye, J., Wang, H., Bhatnagar, L. & Jain, M. K. (1996). Dechlorination of polychlorinated biphenyl congeners by an anaerobic microbial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology* **46**, 673-677.

Nielsen, P. H., Thomsen, T. R. & Nielsen, J. L. (2004). Bacterial composition of activated sludge - importance for floc and sludge properties. *Water Science and Technology* **49**, 51-58.

Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593-656.

Northcott, G. L. & Jones, K. C. (2000). Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment. *Environmental Pollution* **108**, 19-43.

Northcott, G. L. & Jones, K. C. (2001). Partitioning, extractability, and formation of nonextractable PAH residues in soil. 1. Compound differences in aging and sequestration. *Environmental Science & Technology* **35**, 1103-1110.

Oleszczuk, P. (2007). Investigation of potentially bioavailable and sequestered forms of polycyclic aromatic hydrocarbons during sewage sludge composting. *Chemosphere* **70**, 288-297.

Oleszczuk, P. (2008). Tenax-TA extraction as predictor for free available content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in composted sewage sludges. *Journal of Environmental Monitoring* **10**, 883-888.

Park, C., Muller, C. D., Abu-Orf, M. M. & Novak, J. T. (2006). The effect of wastewater cations on activated sludge characteristics: Effects of aluminum and iron in floc. *Water Environment Research* **78**, 31-40.

Patureau, D. & Trably, E. (2006). Impact of anaerobic and aerobic processes on PolyChloroBiphenyl removal in contaminated sewage sludge. *Biodegradation* **17**, 9-17.

Patureau, D., Delgenes, N. & Delgenes, J. P. (2008). Impact of sewage sludge treatment processes on the removal of the endocrine disruptors nonylphenol ethoxylates. *Chemosphere* **72**, 586-591.

Pelmont, J. (2005). *Biodégradations et métabolismes. Les bactéries pour les technologies de l'environnement.* EDP Sciences.

Perminova, I. V., Grechishcheva, N. Y., Kovalevskii, D. V., Kudryavtsev, A. V., Petrosyan, V. S. & Matorin, D. N. (2001). Quantification and prediction of the detoxifying properties of humic substances related to their chemical binding to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology* **35**, 486-490.

- Plaza, C., Xing, B., Fernández, J. M., Senesi, N. & Polo, A.** Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by humic acids formed during composting. *Environmental Pollution* **157**, 257-263.
- Poerschmann, J. & Kopinke, F. D. (2001).** Sorption of very hydrophobic organic compounds (VHOCs) on dissolved humic organic matter (DOM). 2. Measurement of sorption and application of a Flory-Huggins concept to interpret the data. *Environmental Science & Technology* **35**, 1142-1148.
- Puinean, A. M., Labadie, P., Hill, E. M., Osada, M., Kishida, M., Nakao, R., Novillo, A., Callard, I. P. & Rotchell, J. M. (2006).** Laboratory exposure to 17 beta-estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* **79**, 376-383.
- Purcaro, G., Navas, J. A., Guardiola, F., Conte, L. S. & Moret, S. (2006).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in frying oils and snacks. *Journal of Food Protection* **69**, 199-204.
- Raber, B. & Kogel-Knabner, I. (1997).** Influence of origin and properties of dissolved organic matter on the partition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *European Journal of Soil Science* **48**, 443-455.
- Rau, J. Y., Tseng, H. H., Lin, M. D., Wey, M. Y., Lin, Y. H., Chu, C. W. & Lee, C. H. (2008).** Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon emission from open burning of joss paper. *Atmospheric Environment* **42**, 1692-1701.
- Regeard, C., Maillard, J. & Holliger, C. (2004).** Development of degenerate and specific PCR primers for the detection and isolation of known and putative chloroethene reductive dehalogenase genes. *Journal of Microbiological Methods* **56**, 107-118.
- Reichenberg, F. & Mayer, P. (2006).** Two complementary sides of bioavailability: accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1239-1245.
- Reid, B. J., Stokes, J. D., Jones, K. C. & Semple, K. T. (2000).** Nonexhaustive Cyclodextrin-Based Extraction Technique for the Evaluation of PAH Bioavailability. *Environmental Science & Technology* **34**, 3174-3179.
- Reinik, M., Tamme, T., Roasto, M., Juhkam, K., Tenno, T. & Kiis, A. (2007).** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in meat products and estimated PAH intake by children and the general population in Estonia. *Food Additives and Contaminants* **24**, 429-437.
- Ressler, B. P., Kneifel, H. & Winter, J. (1999).** Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of humic acid-like residues during bacterial PAH degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**, 85-91.
- Rey-Salgueiro, L., Garcia-Falcon, M. S., Martinez-Carballo, E. & Simal-Gandara, J. (2008).** Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. *Food Chemistry* **108**, 607-615.

Richnow, H. H., Eschenbach, A., Mahro, B., Seifert, R., Wehrung, P., Albrecht, P. & Michaelis, W. (1998). The use of C-13-labelled polycyclic aromatic hydrocarbons for the analysis of their transformation in soil. *Chemosphere* **36**, 2211-2224.

Richnow, H. H., Eschenbach, A., Mahro, B., Kastner, M., Annweiler, E., Seifert, R. & Michaelis, W. (1999). Formation of nonextractable soil residues: A stable isotope approach. *Environmental Science & Technology* **33**, 3761-3767.

Ritalahti, K. M., Amos, B. K., Sung, Y., Wu, Q. Z., Koenigsberg, S. S. & Loffler, F. E. (2006). Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple Dehalococcoides strains. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 2765-2774.

Rockne, K. J. & Strand, S. E. (1998). Biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments. *Environmental Science & Technology* **32**, 3962-3967.

Rockne, K. J. & Strand, S. E. (2001). Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and biphenyl by a denitrifying enrichment culture. *Water Research* **35**, 291-299.

Rockne, K. J., Chee-Sanford, J. C., Sanford, R. A., Hedlund, B. P., Staley, J. T. & Strand, S. E. (2000). Anaerobic Naphthalene Degradation by Microbial Pure Cultures under Nitrate-Reducing Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1595-1601.

Rothermich, M. M., Hayes, L. A. & Lovley, D. R. (2002). Anaerobic, sulfate-dependent degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated harbor sediment. *Environmental Science & Technology* **36**, 4811-4817.

Routledge, E. J. & Sumpter, J. P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**, 241-248.

Ruiz, T., Wisniewski, C., Kaosol, T. & Persin, F. (2007). Influence of organic content in dewatering and shrinkage of urban residual sludge under controlled atmospheric drying. *Process Safety and Environmental Protection* **85**, 104-110.

Safinowski, M. & Meckenstock, R. U. (2004). Enzymatic reactions in anaerobic 2-methylnaphthalene degradation by the sulphate-reducing enrichment culture N 47. *Fems Microbiology Letters* **240**, 99-104.

Safinowski, M. & Meckenstock, R. U. (2006). Methylation is the initial reaction in anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Environmental Microbiology* **8**, 347-352.

Sander, M. & Pignatello, J. (2007). On the reversibility of sorption to black carbon: distinguishing true hysteresis from artificial hysteresis caused by dilution of a competing adsorbate. *Environmental Science & Technology* **41**, 843-849.

Schievano, A., Pognani, M., D'Imporzano, G. & Adani, F. (2008). Predicting anaerobic biogasification potential of ingestates and digestates of a full-scale biogas plant using chemical and biological parameters. *Bioresource Technology* **99**, 8112-8117.

Schrap, S. M. & Opperhuizen, A. (1992). On the Contradictions between Experimental Sorption Data and the Sorption Partitioning Model. *Chemosphere* **24**, 1259-1282.

Semple, K. T., Morriss, A. W. J. & Paton, G. I. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science* **54**, 809-818.

Semple, K. T., Doick, K. J., Wick, L. Y. & Harms, H. (2007). Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environmental Pollution* **150**, 166-176.

Semple, K. T., Doick, K. J., Jones, K. C., Burauel, P., Craven, A. & Harms, H. (2004). Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science & Technology* **38**, 228A-231A.

Servos, M. R. & Muir, D. C. G. (1989). Effect of suspended sediment concentration on the sediment to water partition coefficient for 1,3,6,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environmental Science & Technology* **23**, 1302-1306.

Sheahan, D. A., Brighty, G. C., Daniel, M., Kirby, S. J., Hurst, M. R., Kennedy, J., Morris, S., Routledge, E. J., Sumpter, J. P. & Waldock, M. J. (2002). Estrogenic activity measured in a sewage treatment works treating industrial inputs containing high concentrations of alkylphenolic compounds; a case study. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 507-514.

Shin, H.-S., Monsallier, J. M. & Choppin, G. R. (1999). Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid. *Talanta* **50**, 641-647.

Shinoda, Y., Akagi, J., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H., Sakai, Y. & Kato, N. (2005). Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: Isolation and degradation genes. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **69**, 1483-1491.

Smidt, H. & de Vos, W. M. (2004). Anaerobic microbial dehalogenation. *Annual Review of Microbiology* **58**, 43-73.

Smith, K. E. C., Thullner, M., Wick, L. Y. & Harms, H. (2009). Sorption to Humic Acids Enhances Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation. *Environmental Science & Technology* **43**, 7205-7211.

Smits, T. H. M., Devenoges, C., Szylnski, K., Maillard, J. & Holliger, C. (2004). Development of a real-time PCR method for quantification of the three genera *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfitobacterium* in microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* **57**, 369-378.

Soto, A. M., Justica, H., Wray, J. W. & Sonnenschein, C. (1991). Paranonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from polystyrene. *Environnement and Health Perspective* **92**, 167-173.

- Sponza, D. T. (2003).** Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme and Microbial Technology* **32**, 375-385.
- Stringfellow, W. T. & Alvarez-Cohen, L. (1999).** Evaluating the relationship between the sorption of PAHs to bacterial biomass and biodegradation. *Water Research* **33**, 2535-2544.
- Suh, Y. J. & Rousseaux, P. (2002).** An LCA of alternative wastewater sludge treatment scenarios. *Resources Conservation and Recycling* **35**, 191-200.
- Sung-Keun Rhee, D. E. F., Max M Häggblom, Lee J Kerkhof, (2003).** Detection by PCR of reductive dehalogenase motifs in a sulfidogenic 2-bromophenol-degrading consortium enriched from estuarine sediment. *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 317-324.
- Swindell, A. L. & Reid, B. J. (2006).** Comparison of selected non-exhaustive extraction techniques to assess PAH availability in dissimilar soils. *Chemosphere* **62**, 1126-1134.
- Symons, G. E. & Buswell, A. M. (1933).** The methane fermentation of carbohydrates. *Journal of the American Chemical Society* **55**, 2028-2036.
- Tang, J. X., Liste, H. H. & Alexander, M. (2002).** Chemical assays of availability to earthworms of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere* **48**, 35-42.
- Tartakovsky, B., Hawari, J. & Guiot, S. R. (2000).** Enhanced dechlorination of Aroclor 1242 in an anaerobic continuous bioreactor. *Water Research* **34**, 85-92.
- Ten Hulscher, T. E. M. & Cornelissen, G. (1996).** Effect of temperature on sorption equilibrium and sorption kinetics of organic micropollutants - a review. *Chemosphere* **32**, 609-626.
- Ternes, T. A., Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H. & Joss, A. (2004).** A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Research* **38**, 4075-4084.
- Thiele, B., Heinke, V., Kleist, E. & Guenther, K. (2004).** Contribution to the structural elucidation of 10 isomers of technical p-nonylphenol. *Environmental Science & Technology* **38**, 3405-3411.
- Thiele-Bruhn, S. & Brummer, G. W. (2004).** Fractionated extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from polluted soils: estimation of the PAH fraction degradable through bioremediation. *European Journal of Soil Science* **55**, 567-578.
- Thomas, P. & Dong, J. (2006).** Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **102**, 175-179.
- Trably, E. (2002).** Etude et optimisation de la biodégradation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) et de Polychlorobiphényles (PCBs) au cours de la digestion anaérobie et aérobie de boues urbaines contaminées, pp. 281: Université de Montpellier II, USTL.

Trably, E., Patureau, D. & Delgenes, J. P. (2003). Enhancement of polycyclic aromatic hydrocarbons removal during anaerobic treatment of urban sludge. *Water Science and Technology* **48**, 53-60.

Trably, E., Delgenes, N., Patureau, D. & Delgenes, J. P. (2004). Statistical tools for the optimization of a highly reproducible method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **84**, 995-1008.

Trably, E., Lackner, S., Batstone, D. J., Patureau, D. & Schmidt, J. E. (2005). Identification of Nonyl-Phenol degraders in anaerobic enrichment of activated sludge mixture. In *4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference - Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment*. Edited by IWA. Brisbane, Gold Coast Australia, 17-20 july.

Uruse, T. & Kikuta, T. (2005). Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Research* **39**, 1289-1300.

Vaes, W. H. J., UrrestarazuRamos, E., Verhaar, H. J. M., Seinen, W. & Hermens, J. L. M. (1996). Measurement of the Free Concentration Using Solid-Phase Microextraction: Binding to Protein. *Analytical Chemistry* **68**, 4463-4467.

Vallini, G., Frassinetti, S. & Scorzetti, G. (1997). *Candida aquatextoris* sp nov, a new species of yeast occurring in sludge from a textile industry wastewater treatment plant in Tuscany, Italy. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 336-340.

van der Meer, J. R., de Vos, W. M., Harayama, S. & Zehnder, A. J. (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **56**, 677-694.

van Straalen, N. M., Donker, M. H., Vijver, M. G. & van Gestel, C. A. M. (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* **136**, 409-417.

Varlet, V., Serot, T., Knockaert, C., Cornet, J., Cardinal, M., Monteau, F., Le Bizec, B. & Prost, C. (2007). Organoleptic characterization and PAH content of salmon (*Salmo salar*) fillets smoked according to four industrial smoking techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**, 847-854.

Vinken, R., Hollrigl-Rosta, A., Schmidt, B., Schaffer, A. & Corvini, P. F. X. (2004). Bioavailability of a nonylphenol in dependence on the association to dissolved humic substances. *Water Science and Technology* **50**, 277-283.

von Wintzingerode, F., Schlötelburg, C., Hauck, R., Hegemann, W. & Göbel, U. B. (2001). Development of primers for amplifying genes encoding CprA- and PceA-like reductive dehalogenases in anaerobic microbial consortia, dechlorinating trichlorobenzene and 1,2-dichloropropane. *FEMS Microbiology Ecology* **35**, 189-196.

Washer, C. E. & Edwards, E. A. (2007). Identification and expression of benzylsuccinate synthase genes in a toluene-degrading methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 1367-1369.

Watts, J. E. M., Fagervold, S. K., May, H. D. & Sowers, K. R. (2005). A PCR-based specific assay reveals a population of bacteria within the Chloroflexi associated with the reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *Microbiology-Sgm* **151**, 2039-2046.

Weast, R. C. & Selby, S. M. (1966). *Handbook of chemistry and physics*, 47th edn. USA: The Chemical Rubber Co.

Weller, M. G., Simon, E., Pfortner, P., Dosch, M. & Niessner, R. (1998). Detection of bound residues by enzyme immunoassay. In *Pesticide Bound Residues in Soil (Report of a Workshop, September 3-4, 1996)*: Wiley-VCH, DFG.

Winderl, C., Schaefer, S. & Lueders, T. (2007). Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. *Environmental Microbiology* **9**, 1035-1046.

Winderl, C., Anneser, B., Griebler, C., Meckenstock, R. U. & Lueders, T. (2008). Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 792-801.

Wold, S., Martens, H. & Wold, H. (1983). The Multivariate Calibration-Problem in Chemistry Solved by the PIs Method. *Lecture Notes in Mathematics* **973**, 286-293.

Wu, Q. Z., Sowers, K. R. & May, H. D. (2000). Establishment of a polychlorinated biphenyl-dechlorinating microbial consortium, specific for doubly flanked chlorines, in a defined, sediment-free medium. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 49-53.

Wu, Q. Z., Watts, J. E. M., Sowers, K. R. & May, H. D. (2002). Identification of a bacterium that specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly flanked chlorines. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 807-812.

Xu, R., Lau, N. L. A., Ng, K. L. & Obbard, J. P. (2004). Application of a Slow-Release Fertilizer for Oil Bioremediation in Beach Sediment. *Journal of Environmental Quality* **33**, 1210-1216.

Xu, S. S., Liu, W. X. & Tao, S. (2006). Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons in China. *Environmental Science & Technology* **40**, 702-708.

Yamamoto, H., Liljestrand, H. M., Shimizu, Y. & Morita, M. (2003). Effects of physical-chemical characteristics on the sorption of selected endocrine disruptors by dissolved organic matter surrogates. *Environmental Science & Technology* **37**, 2646-2657.

Yan, T., LaPara, T. M. & Novak, P. J. (2006). The reductive dechlorination of 2,3,4,5-tetrachlorobiphenyl in three different sediment cultures: evidence for the involvement of phylogenetically similar Dehalococcoides-like bacterial populations. *Fems Microbiology Ecology* **55**, 248-261.

Yang, H. H. & Chen, C. M. (2004). Emission inventory and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere at a suburban area in Taiwan. *Chemosphere* **56**, 879-887.

- Yang, S., Yoshida, N., Baba, D. & Katayama, A. (2008).** Anaerobic biodegradation of biphenyl in various paddy soils and river sediment. *Chemosphere* **71**, 328-336.
- Ye, F. X. & Li, Y. (2007).** Biosorption and biodegradation of pentachlorophenol (PCP) in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Biodegradation* **18**, 617-624.
- Yi, T. & Harper, J., Willie F. (2007a).** The effect of biomass characteristics on the partitioning and sorption hysteresis of 17[alpha]-ethinylestradiol. *Water Research* **41**, 1543-1553.
- Yi, T. & Harper, W. F. (2007b).** The effect of biomass characteristics on the partitioning and sorption hysteresis of 17 alpha-ethinylestradiol. *Water Research* **41**, 1543-1553.
- Zhang, J., Yang, M., Zhang, Y. & Chen, M. X. (2008).** Biotransformation of nonylphenol ethoxylates during sewage treatment under anaerobic and aerobic conditions. *Journal of Environmental Sciences-China* **20**, 135-141.
- Zhang, X. M. & Young, L. Y. (1997).** Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4759-4764.
- Zhou, J. L., Liu, R., Wilding, A. & Hibberd, A. (2007).** Sorption of selected endocrine disrupting chemicals to different aquatic colloids. *Environmental Science & Technology* **41**, 206-213.

LISTE DES FIGURES

Figure 0-1 : Principales sources et voies de dissémination de molécules à impact écotoxicologique (exemples en italique).....	2
Figure I-1: Schéma de station d'épuration traditionnelle.....	6
Figure I-2 : Voies de minéralisation de la matière organique en présence de différents accepteurs d'électrons (Gijzen, 2001).....	7
Figure I-3 : Structuration des floccs dans les boues.....	8
Figure I-4 : Répartition des entités dans les compartiments soluble / colloïdal / particulaire selon leur taille.....	10
Figure I-5 : Etapes de la digestion anaérobie.	14
Figure I-6 : Filière d'épuration considérée dans cette étude.	16
Figure I-7 : Structure de l'isomère du nonylphénol (NP) linéaire, du nonylphénol mono-éthoxylé (NP ₁ EO) linéaire, du nonylphénol di-éthoxylé (NP ₂ EO) linéaire et du nonylphénol mono-éthoxylé carboxylé (NP ₁ EC) linéaire.	20
Figure I-8 : Structure des 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques prioritaires selon l'USEPA.....	21
Figure I-9 : Structure des sept polychlorobiphényles visés par la législation française.....	22
Figure I-10 : Mécanismes s'opérant dans les STEPs qui sont responsables de l'abattement des HAPs et PCBs présents dans la ligne eau.	23
Figure I-11 : Réaction de déhalogénéation réductrice hydrogénéolytique d'une molécule chlorée.	27
Figure I-12 : Arbre phylogénétique représentant dans l'encadré en pointillés les phylotypes PCB-déhalorespirants avérés (•), les phylotypes PCB-déhalorespirants supposés, identifiés grâce au système développé par Watts <i>et al.</i> (2005) (◊) et les phylotypes <i>Dehalococcoides</i> déhalorespirants d'autres substrats chlorés (Kjellerup <i>et al.</i> , 2008). L'échelle indique 10 substitutions pour 100 nucléotides.....	29
Figure I-13 : Représentation des intermédiaires métaboliques identifiés lors de la dégradation anaérobie du naphthalène, et schémas réactionnels hypothétiques.....	31
Figure I-14 : Voies de conversion des molécules monoaromatiques éthylbenzène, p-cresol et toluène en benzoyl-CoA (Gibson & S. Harwood, 2002).....	33
Figure I-15 : Voie de biodégradation anaérobie du benzoyl-CoA (Gibson & S. Harwood, 2002).....	34
Figure I-16 : Organisation de l'opéron <i>bss</i> codant pour la benzyl-succinate synthase (gènes <i>bssCAB</i>), pour une protéine activatrice (gène <i>bssD</i>) et pour une protéine de fonction inconnue (gène <i>bssE</i>) chez <i>Thaurea aromatica</i> K172 (Leuthner <i>et al.</i> , 1998).	34
Figure I-17 : Schématisation de la syntrophie.....	36
Figure I-18 : Equation bilan de dégradation du naphthalène (Christensen <i>et al.</i> , 2004) de l'anthracène, du pyrène et du benzo(k)fluoranthène en acétate et hydrogène.	37
Figure I-19 : Schématisation du cométabolisme dans le cas général des CTOs utilisables comme source de carbone qualifiable de cométabolisme carboné (A) et dans le cas particulier des PCBs où se succèdent probablement un cométabolisme respiratoire puis carboné (B).....	39

Figure I-20 : Représentation des modèles mathématiques utilisés pour la sorption du nonylphénol dans des sols en A (During <i>et al.</i> , 2002), pour des pesticides dans des sédiments en B (Gao <i>et al.</i> , 1998b) et pour des herbicides dans un sol en C (Benoit <i>et al.</i> , 2008).....	44
Figure I-21 : Différenciation des fractions biodisponible, bioaccessible et séquestrée en référence au procédé/processus étudié.	55
Figure I-22 : Synthèse des états physiques possibles pour le phénanthrène dans les boues, et correspondance avec les compartiments biologiques biodisponible, bioaccessible et séquestré, inspiré d'une illustration de Semple <i>et al.</i> (2004).....	56
Figure I-23 : Notion de bioaccessibilité et biodisponibilité, et flux de CTOs en présence de biodégradation (A) ou d'un extractant (B) (Semple <i>et al.</i> , 2007). La taille des flèches précise l'importance relative des différents flux.	58
Figure I-24 : Représentation schématique des fractions physiques de trois matrices M1, M2 et M3, des fractions physiques des CTOs dans cette matrice, de la fraction bioaccessible estimée par une méthode X et par une méthode Y, et de la fraction réellement dégradée (dans ce cas, la méthode d'évaluation Y est adaptée car une corrélation apparaît entre bioaccessibilité selon Y et biodégradation/bioaccumulation).	59
Figure I-25 : Représentation des interactions et rétroactions s'opérant entre les trois acteurs du système constitué par les CTOs dans le procédé de digestion anaérobie, et influence de ces mécanismes sur la biodégradation.	61
Figure II-1 : Obtention des échantillons de boues utilisés lors des expérimentations.	66
Figure II-2 : Autoclave de traitement thermique des boues.....	68
Figure II-3 : Représentation du dispositif de digestion anaérobie.	73
Figure II-4 : Zones consensus dans la séquence du gène <i>bssA</i>	83
Figure II-5 : Illustration de la méthode de calcul des abattements du B(k)F au cours du démarrage d'un réacteur.	85
Figure III-1 : PAHs remaining in aqueous phase (percentage of initial concentration) during the sorption kinetics experiment.	93
Figure III-2 : Representation of the free, sorbed-to-DCM, sorbed-to-particles and sequestered fractions of a micropollutant in sludge.....	94
Figure III-3 : $K_{\text{partition}}$ values (mL/g _{part}) obtained in flasks A1, A2, A3, F1, F2, F3 for PAHs. The standard deviation corresponds to duplicate analyses of aqueous phase. The p-values obtained from the analysis of variance (ANOVA) between the A group and the F group of $K_{\text{partition}}$ are indicated in italic for each PAH. (p-value above 0.05 indicates that the two groups are not statistically different).....	95
Figure III-4 : PAH losses during sludge aging as a percentage of initial concentration (60 µg/L).....	95
Figure III-5 : Coefficients de partage du fluoranthène en absence et en présence de compétiteurs (12 HAPs, NP, 7 PCBs).	98
Figure III-6 : Méthodologie imaginée pour faire varier uniquement la concentration en DCM.....	100
Figure III-7 : Representation of the three-compartment model of a micropollutant in sludge.....	104
Figure III-8 : Ratio between measured and theoretical aqueous COD (mg/L) (black circles) and pH (grey triangle) as a function of sludge dilution factor. The dotted frame indicates the range of dilution factors used for sorption experiments.....	106

Figure III-9 : Percentage of initially spiked PAHs that remain in aqueous phase as a function of equilibration time. Since PAHs are spiked in liquid form, at time 0, the aqueous fraction is assumed to be 100 %. 107

Figure III-10 : Measured (mark) and modelled (line) K_{global} (mL/g_{PART}) as a function of DCM concentration (g/L). The α coefficient (for dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene and indeno(1,2,3,c,d)pyrene), K_{part} , K_{DCM} and regression coefficients estimated thanks to the algorithm are presented on each graph. The corresponding logarithmic values and standard deviation for K_{part} and K_{DCM} are presented in Tableau III-1. 109

Figure III-11 : $\log K_{part}$ (black rounds) and $\log K_{DCM}$ (grey rounds) as a function of PAHs $\log K_{ow}$ 110

Figure III-12 : Percentage of free (plots) and aqueous (linked plots) concentrations modelled for a theoretical weakly hydrophobic PAH ($\log K_{ow}=4.2$, square) and for a theoretical very hydrophobic PAH ($\log K_{ow}=6.8$, triangle) as a function of dissolved and colloidal matter concentration, particulate concentration being fixed at 10 g/L. For this simulation, K_{part} and K_{DCM} of both PAHs were estimated thanks to the relationship presented in Figure 3. The reversion point is located at 6.01 g_{DCM}/L, which corresponds to 25.5 % of aqueous PAHs. Over this value, aqueous fraction is slightly higher for the very hydrophobic PAH than for the weakly hydrophobic one. 111

Figure III-13 : Synthèse des équilibres et transferts identifiés dans le système CTO-boue. 114

Figure III-14 : Démarche expérimentale d'étude de l'influence des caractéristiques des CTOs et des boues sur les équilibres de sorption. 116

Figure III-15 : $\log K_{DCM}$ and $\log K_{part}$ as a function of micropollutants hydrophobicity for PS (white dots), SS (blue triangles), DSS (orange dots), TTSS (green triangles) and TTSS (black dots). The raw data are presented in Tableau III-5 (Supporting Information). 124

Figure III-16 : Experimental (dots) and modeled (curve) K_{global} as a function of DCM concentration in SS (black) and TTSS (grey) for indeno(1,2,3,c,d)pyrene. 125

Figure III-17 : Centered and reduced regression coefficients of the predictors for $\log K_{part}$ (A) and for $\log K_{DCM}$ (B). The sludge predictors are indicated in grey, the micropollutants predictors in white. The error bars represent the interval of 95% confidence based on six independant estimates of the coefficients. These estimates were carried out on six sets of randomly selected individuals, each set representing 70% of the total individuals (41 and 32 individuals for, respectively, K_{part} and K_{DCM}). 127

Figure III-18 : Sludge sample preparation steps (in box) prior to sorption experiments and characterization. Chemical analyses are in italic only whereas physical analyses are in bold italic. 131

Figure III-19 : Box-whisker plots illustrating the dispersion of errors between predicted and measured values of K_{part} and K_{DCM} for the individuals included in regression (grey) and for those used for validation (black). Symbols represent maximum (upper –), mean (•) and minimum (lower –), box shows 75th percentile (top line), 50th percentile (middle line) and 25th percentile (bottom line), and whiskers show 90th and 10th percentile (upper and bottom whiskers)..... 131

Figure III-20 : Pourcentage de pyrène libre (A) et sorbé à la DCM (B), et répartition du pyrène entre phase aqueuse et particulaire (C) dans les boues SS, TTSS, DSS et TTDSS.....	133
Figure III-21 : Hypothèses de récupération par la DCM de sa capacité de sorption au cours de la digestion anaérobie.....	134
Figure III-22 : Cercle des corrélations entre les prédicteurs et les composantes principales CP1 et CP2 du modèle log K_{DCM} obtenu.....	137
Figure III-23 : Coefficients centrés réduits des prédicteurs inclus dans le modèle PLS simplifié de log K_{part} et log K_{DCM}	138
Figure III-24 : Spectre de fluorescence 3D des phases aqueuses de PS (25 mg _{CO} /L), SS (16 mg _{CO} /L), TTSS (25 mg _{CO} /L) et DSS (22 mg _{CO} /L).....	139
Figure III-25 : Répartition de la fluorescence de la DCM de PS, SS, TTSS et DSS dans les 5 zones définies par Chen <i>et al.</i> (2003).....	141
Figure IV-1 : Volume de gaz produits au bout de 20 jours par unité de DCO initialement introduite lors des tests de stérilité en batch.....	147
Figure IV-2 : Cinétique de production de gaz au cours des essais en batch.....	147
Figure IV-3 : Concentration initiale (t_0) et concentration finale dans les fioles avec azide de sodium et dans la fiole acidifiée à pH 2. L'écart-type est obtenu par deux extractions d'une même fiole.	148
Figure IV-4 : Suivi de la concentration en matière organique/volatile en entrée et en sortie des réacteurs avec azide et à pH 2 lors du démarrage de ces réacteurs, et comparaison des valeurs expérimentales aux valeurs théoriques de sortie.....	149
Figure IV-5 : Abattements en HAPs et NP mesurés pendant le démarrage des réacteurs avec NaN ₃ et à pH 2 (Moyennes et écart-types calculés à partir de 6 mesures pratiquées durant les 25 premiers jours).....	150
Figure IV-6 : Abattements en HAPs obtenus dans le second réacteur avec NaN ₃ en série.	151
Figure IV-7 : Effet concentration observé sur les abattements dans le second réacteur avec NaN ₃ en série.	152
Figure IV-8 : Average methane percentage of the biogas produced under the different feedings. Means labelled with a star are not significantly different (p-value=0.05).	157
Figure IV-9 : Micropollutants removal with PS, TTPS, SS, CSS and SupSS feeds. For each compound, the p-value between the 5 (3 for PCBs) sets of measurements is indicated in italic.	161
Figure IV-10 : Modelled vs measured values of micropollutants removal during the anaerobic digestion of PS, TTPS, SS, CSS and SupSS.	164
Figure IV-11 : Centered and reduced regression coefficients. Coefficients related to feed sludge characteristics are black coloured, whereas those related to micropollutants are represented in grey.	165
Figure IV-12 : Synthèse des différents réacteurs mis en œuvre. Les étoiles représentent les prélèvements pratiqués.....	167
Figure IV-13 : Gels d'électrophorèse obtenus après PCR <i>bssA</i> du témoin positif à différentes températures (A), des échantillons de réacteurs avec et sans protéine chaperonne T4gp32 (B), des échantillons de réacteur non dilués avec et sans ADN témoin (C) et à haute température (D).	170
Figure IV-14 : Free (top), aqueous (middle) and sorbed-to-particles (bottom) concentrations of PAHs in the reactors fed with PS, TTPS, SS, CSS and SupSS, as a	

percentage of total concentration. PAHs are classified like in Tableau IV-5, from fluorene (black) to indeno(1,2,3,c,d)pyrene (lightest grey). 179

Figure IV-15 : removal rate of fluoranthene (top) and benzo(k)fluoranthene (bottom) as a function of their concentration in the different compartments. The linear correlation coefficient R^2 is indicated in each case. 180

Figure IV-16 : Normalized-to-aqueous-concentration degradation rate of phenanthrene (white), benzo(k)fluoranthene (black) and benzo(g,h,i)perylene (grey) as a function of dry matter removal rate in the five reactors. CSS data (triangles) were excluded from linear regression. The exact r_{DM} values for SupSS, TTPS, SS, PS ad CSS were respectively 0.36, 0.55, 0.56, 0.58 and 0.82 g/L/day. 181

Figure IV-17 : $T_{PAH,DM} / K_{PAH}$ (regression slope), $k_{PAH}X / K_{PAH}$ (regression origin) and $-k_{PAH}X/T_{PAH,DM}$ (threshold) as a function of PAHs molecular mass. The slopes of linear regression curves indicated on the figure were statistically different from 0 ($p=0.05$). 184

Figure IV-18 : Représentation des 3 fonctions déterminant la biodégradation d'un HAP donné. 188

Figure IV-19 : Représentation des interactions cométaboliques. La matière qui constitue les boues se décompose en substrats S_i , qui empruntent des voies métaboliques différentes. Trois types de microorganismes participent au métabolisme de ces substrats : ceux métabolisant aussi les HAPs (μO_1), ceux interagissant de façon syntrophique avec les μO_1 (μO_2), et ceux ne jouant aucun rôle dans la biodégradation des HAPs (μO_3). 189

Figure IV-20 : Illustration (i) des fonctions cométaboliques liant la vitesse de dégradation d'un HAP avec la vitesse de dégradation de chaque substrat cométabolique isolé (hypothèse de proportionnalité), (ii) de l'absence de corrélation avec les substrats non cométaboliques (hypothèse de cométabolisme nécessaire à la dégradation des HAPs), et (iii) de la résultante de ces fonctions lorsque tous les substrats sont présents. 190

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1: Réglementation de l'épandage de boues contaminées en CTOs (arrêté du 8 Janvier 1998). 12

Tableau I-2 : Liste des composés reconnus comme perturbateurs endocriniens par les organismes UKEA (United Kingdom Environment agency), USEPA (United States Environmental Agency), OSPAR (Oslo and Paris Commission), JEA (Japan Environment Agency), and WWF (World Wildlife Fund). 19

Tableau I-3 : Concentrations en PCBs dans les boues d'épuration (mg/kg). 24

Tableau I-4 : Concentrations en HAPs dans les boues d'épuration (mg/kg). 24

Tableau I-5 : Inventaire des consortia microbiens capable d'utiliser les HAPs, le NP et le biphényle comme seule source de carbone. 38

Tableau I-6 : Valeur de potentiel redox pour les principaux accepteurs d'électrons (Diaz, 2004; Smidt & de Vos, 2004). 40

Tableau I-7 : Comparaison des valeurs de $\log K_{DCM}$ obtenues pour différentes matrices et différents HAPs, et mise en évidence de l'influence des caractéristiques de chacun des deux acteurs.....	48
Tableau I-8 : Exemples de définitions de la biodisponibilité.	53
Tableau II-1 : Composition initiale des 5 boues étudiées, puis volumes de boue, de phase aqueuse et d'eau à mélanger afin d'obtenir les composites. Les concentrations exactes en DCM et particules sont ensuite calculées.	71
Tableau II-2 : Temps de rétention (min) des HAPs et couples de longueurs d'onde d'excitation / émission (nm) utilisés pour leur détection par fluorimétrie.....	79
Tableau II-3 : Temps de rétention (min) et ions d'identification/ quantification et de confirmation (m/z) pour la détection des PCBs par spectrométrie de masse.....	80
Tableau III-1 : $\log K_{ow}$, partition coefficient K_{global} and coefficient R^2 obtained from linear regression of $C_{part}=f(C_{aqu})$ at $0.7 g_{DCM}/L$, and equilibrium constants extracted from K_{global} dependence to DCM concentration in the range 0.6 to $4.5 g_{DCM}/L$.....	108
Tableau III-2 : Particles and DCM characteristics.	123
Tableau III-3 : Physicochemical characteristics of the PAHs, NP and PCBs.....	130
Tableau III-4 : MS program for PCBs quantification after gas chromatography separation.	130
Tableau III-5 : $\log K_{part}$ and $\log K_{DCM}$ values for PAHs, NP and PCBs in the five sludge samples.	132
Tableau IV-1 : Stratégies employées et résultats obtenus lors de la mise en œuvre de témoins abiotiques.	145
Tableau IV-2 : Effect of sludge physical or chemical pretreatments on the removal of dry matter and of micropollutants during anaerobic digestion.....	159
Tableau IV-3 : Feed characteristics and removals measured for the five operated reactors (average value and standard deviation from 5 measurements performed at steady-state).....	160
Tableau IV-4 : Comparison of the different feeds and confrontation of micropollutants removal to the relative bioavailability (according to the usual hypotheses) and cometabolism (assumed to be linked to overall metabolism).....	163
Tableau IV-5 : Inlet and outlet concentrations of PAHs ($\mu g/L$, average of five steady state samples and standard deviation).	177
Tableau IV-6 : Inlet and outlet sludge characteristics (average of five steady state samples).....	178
Tableau IV-7 : $\log K_{part}$ and $\log K_{DCM}$ determined in the reactor outlets according to Barret <i>et al.</i> (2009b).	178
Tableau IV-8 : Median and range of the correlation coefficients obtained for the 13 PAHs between their normalized removal rate and substrate removal rate in the reactors fed with PS, TTPS, SS and SupSS.....	181
Tableau IV-9 : Regression parameters of $r_{PAH}/C_{PAH,aqu}=f(r_{DM})$.	182
Tableau IV-10 : Effets mesurés du passage d'une alimentation à une autre, et détermination du processus prédominant par confrontation de ces effets à celui mesuré sur la biodégradation des HAPs.	191