



HAL
open science

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

Eric Trably

► **To cite this version:**

Eric Trably. 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. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2002. Français. NNT: . tel-02834200

HAL Id: tel-02834200

<https://hal.inrae.fr/tel-02834200>

Submitted on 7 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-INGENIEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

***Formation Doctorale : Génie des procédés
Ecole Doctorale : Science et procédés biologiques et industriels***

devant être présentée et soutenue publiquement

par

Eric TRABLY

Le Vendredi 13 Décembre 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***

JURY

M. J-P. DELGENES Directeur de Recherches, INRA Narbonne	, Directeur de Thèse
M. P. CAUMETTE Professeur, Univ. PAU	, Rapporteur
M. J-L. MOREL Professeur, ENSAIA Nancy	, Rapporteur
M^{me} I. DEPORTES Ingénieur, ADEME Angers	, Examinatrice
M^{me} D. PATUREAU Chargée de Recherches, INRA Narbonne	, Examinatrice
M. A. GRASMICK Professeur, Univ. Montpellier II	, Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Biotechnologie de L'Environnement (LBE) de l'INRA de Narbonne.

J'en remercie son directeur, **Monsieur Jean-Philippe DELGENES**, pour m'avoir accueilli et pour l'intérêt qu'il a manifesté envers ce travail. Je lui exprime ma reconnaissance pour avoir mis à ma disposition toutes les ressources nécessaires et disponibles pour mener à bien ce travail (et il en a fallu.....).

Je cherche en vain les termes qui me permettraient de décrire la profonde gratitude et l'immense reconnaissance que j'éprouve envers **Madame Dominique PATUREAU-STEYER**, directrice adjointe et en charge de l'équipe micropolluants. Alors, pour son soutien quotidien, pour son attention portée sur mes conditions de travail, pour son encadrement, pour ses conseils et surtout pour sa confiance de tous les instants qui m'ont permis de m'épanouir professionnellement et scientifiquement au cours de ce travail de thèse, je l'exprimerais finalement en un mot mais qui prendra ici toute sa vraie valeur : Merci, Domi !!!!

Je remercie également les deux organismes qui ont soutenu financièrement ce projet, c'est à dire l'ADEME et l'INRA.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'ensemble du jury, M^{me} **I. DEPORTES** de l'ADEME, M^f le professeur **A. GRASMICK** de l'Université Montpellier II, et plus particulièrement aux rapporteurs M^f le professeur **P. CAUMETTE** de l'Université de Pau et M^f le professeur **J.-L. MOREL** de l'ENSAIA-NANCY pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également pour leur collaboration M^f **BEAUBRAS** de la station d'épuration de Lunéville, M^f **CARIA** de l'INRA-ARRAS, M^f **CRAVEDI** de l'INRA de Toulouse, M^f **DE-GUARDIA** du CEMAGREF de Rennes, M^f **GOULAS** de l'université de Pau, M^{me} **HOUOT** de l'INRA Paris-Grignon, M^f **LICHTFOUSE** de l'INRA de Dijon.

Je tiens à remercier en priorité **Diana et Nicolas BERNET**, **Thierry CONTE**, **Patrick DABERT**, **Sylvie FARINE**, **Pascal GRAS**, **Frédérique HABOUZIT**, **Véronique MAUGENET**, **Nadine LE**

THINH et *Jean-Philippe STEYER* pour leur sympathie et leur disponibilité. Je remercie également toute l'équipe de Microbiologie Moléculaire et tout particulièrement *Marion LECLERC* et *Valérie BRU* pour leur aide et leurs conseils.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à *Lucie BERTHE*, *Estelle BODET*, *Vanessa CARETTE*, *Laure DUBOIS*, *Emma GUTTERIEZ*, *Sophie TCHICAYA* et *Sébastien CHANTEREAU* pour leur participation active à ce projet lors de leur stage et pour leur dynamisme (alors toujours prêt pour une journée à 100 à l'heure ?).

J'exprime une pensée très chaleureuse à tous les stagiaires avec qui j'ai passé des moments très agréables et à qui je souhaite bon courage, notamment *Gustavo ALVARADO*, *Arodi BERNAL*, *Daisy BOUGARD*, *Loic FENOUIL*, *Mohamed MERZOUKI*, *Sébastien MICHAUD*, *Abdul MOUNEIMNE*, *Nicolas ROUSSELON*, *Consuelo RUIZ*, *Raul SNELL-CASTRO*,

Enfin, et par dessus tout, je souhaite adresser mes meilleurs sentiments à nos amis narbonnais avec qui nous avons passé trois années formidables : à tonton Steph, dit « l'Agullo » ou « le Parrain », à tonton Will, dit « le Combet », à tonton Olive et Céline, dit « Titou », à tonton Francky et Amandine, dit « le coach », et, même s'ils ne sont pas de Narbonne, à tonton Joël, dit « Jojo » et à tonton Fabien et Agnès, dit « Flux ». **MERCI POUR VOTRE AMITIE ET POUR VOTRE SOUTIEN !!!**

ABREVIATIONS

- AGV**..... Acides Gras Volatils (en g.l⁻¹)
- ANOVA** Test statistique de comparaison de variances multiples (à un facteur)
- ASE**..... Extraction accélérée par solvant (*Accelerated Solvent Extraction*)
- CMC**.....Concentration Micellaire Critique (en mM ou en g.l⁻¹).
- CTO**..... Composés Traces Organiques
- DCO**..... Demande Chimique en Oxygène (en g.l⁻¹)
- EPA**.....Agence de Protection de l'Environnement (USA)
(*Environmental Protection Agency*)
- FLUO**.....Fluorimètre (détecteur de fluorescence)
- GC-MS**.....Chromatographie en phase gazeuse – Spectromètre de masse
(*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*)
- GC-ECD**..... Chromatographie en phase gazeuse – Détecteur à capture d'électrons
(*Gas Chromatography – Electron Capture Detector*)
- GC-FID**.....Chromatographie en phase gazeuse – Détecteur à ionisation de flamme
(*Gas Chromatography – Flame Ionization Detector*)
- HAPs**..... Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
- MES**..... Matières en suspension (en g.l⁻¹)
- MS**.....Matières Sèches (en g.l⁻¹)
- MV**..... Matières Volatiles (en g.l⁻¹)
- PCBs**..... PolyChloroBiphényles
- PDA**.....Barrette de photodiodes (PhotoDiodeArray)
- RP-HPLC**..... Chromatographie Liquide Hautes Performances en phase inverse
(*Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography*)
- SPE**.....Extraction sur phase solide (*Solid Phase Extraction*)
- SSCP** Technique moléculaire d'identification de population bactérienne ou *archaea*
(*Single Strand Chain Polymorphism*) (d'après Delbès, 2000)

ABREVIATIONS (HAPs)

FluoFluorène

Phe Phénanthrène

AnthAnthracène

FluorFluoranthène

PyrPyrène

B(a)anthBenzo(a)anthracène

ChrysChrysène

B(b)fluor Benzo(b)fluoranthène

B(k)fluor Benzo(k)fluoranthène

B(a)pyrBenzo(a)pyrène

DB Dibenzo(ah)anthracène

B(ghi)p Benzo(ghi)pérylène

Indeno Indeno (123cd)pyrène

TABLE DES MATIERES

<i>Table des Matières</i>	p.4
<i>Liste des Tableaux et Figures</i>	p.9

<u>INTRODUCTION</u>	p.14
----------------------------------	------

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAP A. La gestion des boues urbaines	p.19
A1. Définition et caractéristiques des boues urbaines	p.20
A2. Les filières d'élimination des boues urbaines	p.22
A3. Les filières de traitement des boues urbaines	p.25
A3-1. Généralités sur les filières de traitement.....	p.25
A3-2. La digestion anaérobie des boues urbaines.....	p.27
A3-2-1. Principes généraux de la digestion anaérobie.....	p.28
A3-2-2. Paramètres influençant la digestion anaérobie.....	p.30
A3-2-3. Configurations technologiques de digesteurs anaérobies industriels.....	p.33
A3-2-4. Avantages – Inconvénients de la digestion anaérobie.....	p.34
A3-3. La digestion aérobie des boues urbaines.....	p.35
A3-3-1. Paramètres influençant la digestion aérobie.....	p.35
A3-3-2. Avantages – Inconvénients de la digestion aérobie.....	p.37
A4. Les micropolluants organiques dans les boues urbaines	p.38
CHAP B. Les Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques (ou HAPs)	p.41
B1. Présentation générale des HAPs	p.42
B1-1. Définition et Caractéristiques.....	p.42
B1-2. Sources en HAPs.....	p.42
B1-3. Toxicité des HAPs.....	p.44
B1-4. Réglementation et teneurs en HAPs dans les boues.....	p.46
B2. Méthodes d'analyse des HAPs	p.49
B2-1. Préparation et traitement des échantillons.....	p.51
B2-2. Méthodes d'extraction des HAPs.....	p.51
B2-2-1. Extraction des HAPs d'une matrice liquide aqueuse.....	p.51
B2-2-2. Extraction des HAPs d'une matrice solide.....	p.52
B2-3. Techniques de purification et de fractionnement des extraits ou « clean up ».....	p.60
B2-4. Techniques de séparation et de détection des HAPs.....	p.61
B2-4-1. Analyse par GC-MS, GC-ECD ou GC-FID.....	p.61
B2-4-2. Analyse par RP-HPLC-Fluo ou RP-HPLC-PDA.....	p.62

B3. La dégradation des HAPs	p.66
B3-1. Mécanismes de dégradation des HAPs par voie biologique.....	p.66
<i>B3-1-1. Biodégradation aérobie des HAPs</i>	p.66
<i>B3-1-2. Biodégradation anaérobie des HAPs</i>	p.73
B3-2. Aspects physico-chimiques de la dégradation des HAPs	p.77
<i>B3-2-1. Interactions des HAPs avec la matrice solide</i>	p.77
<i>B3-2-2. Effet de la température et pertes abiotiques</i>	p.79
<i>B3-2-3. Modélisation des limitations dues au transfert de matière</i>	p.79
<i>B3-2-4. Effet des surfactants sur la biodisponibilité des HAPs</i>	p.80
B3-3. Techniques de bioremédiation et de bioaugmentation	p.82
<i>B3-3-1. Bioremédiation de sols et de boues contaminés</i>	p.82
<i>B3-3-2. Techniques de bioaugmentation</i>	p.84
B3-4. Aspects écotoxicologiques	p.85
CHAP C. Les PolyChloroBiphényles (ou PCBs)	p.87
C1. Présentation générale des PCBs	p.88
C1-1. Définition et caractéristiques des PCBs	p.88
C1-2. Sources et toxicité des PCBs	p.89
C2. Méthodes d'analyse des PCBs	p.91
C3. La dégradation des PCBs	p.91
C3-1. Mécanismes de dégradation des PCBs par voie biologique	p.92
<i>C3-1-1. Biodégradation aérobie des PCBs</i>	p.94
<i>C3-1-2. Biodégradation anaérobie des PCBs</i>	p.94
C3-2. Aspects physico-chimiques de la dégradation des PCBs	p.96
C3-3. Techniques de bioremédiation et de bioaugmentation	p.97
<u>Chap D. MATERIEL ET METHODES</u>	p.99
D1. Dispositif expérimental	p.100
D1-1. Réacteurs de digestion anaérobie	p.100
D1-2. Réacteurs de digestion aérobie	p.103
D1-3. Matériel et solutions standards	p.106
<i>D1-3-1. Solvants et verrerie</i>	p.106
<i>D1-3-2. Préparation des solutions standards d'HAPs et de boues contaminées</i> ...	p.106
D2. Matériel biologique	p.108
D2-1. Ecosystèmes de digestion anaérobie	p.108
D2-2. Ecosystèmes de digestion aérobie	p.109
D3. Méthodes analytiques	p.109
D3-1. Mesures classiques de suivi de réacteurs de digestion	p.109
D3-2. Méthode d'analyse des HAPs et PCBs	p.111
<i>D3-2-1. Extraction Liquide-Liquide des HAPs de la fraction liquide</i>	p.112
<i>D3-2-2. Extraction sur phase solide (SPE) des HAPs/PCBs de la fraction liquide</i> p.112	
<i>D3-2-3. Extraction au Soxhlet des HAPs de la fraction solide</i>	p.113
<i>D3-2-4. Extraction à l'ASE des HAPs/PCBs de la fraction solide</i>	p.113
<i>D3-2-5. Analyse des HAPs par RP-HPLC – Fluorimétrie / PDA</i>	p.114

D3-2-6. Analyse des PCBs par GC-ECD	p.115
D4. Méthode de caractérisation moléculaire des espèces méthanogènes de digesteurs anaérobies (population d'archaeobactéries)	p.116
D4-1. Conservation des échantillons	p.117
D4-2. Extraction-purification de l'ADN total	p.117
D4-3. Amplification de la région V3 de l'ADNr 16S	p.117
D4-4. Principe de la SSCP	p.120
D4-5. Clonage de la région V3 dans <i>E.coli</i>	p.120
D4-6. Identification des clones	p.121
D4-6-1. Quantification et purification des inserts	p.121
D4-6-2. Séquençage des inserts	p.121
D4-6-3. Analyse des séquences	p.122
D5. Méthode de suivi de radioéléments (¹⁴C-Benzo(a)pyrène)	p.122
D5-1. Dispositif expérimental	p.122
D5-1-1. Bioréacteurs anaérobies	p.122
D5-1-2. Inoculum anaérobie	p.123
D5-2. Préparation de boues supplémentées en ¹⁴ C-benzo(a)pyrène.....	p.123
D5-3. Méthode d'analyse des échantillons marqués au ¹⁴ C	p.124
D6. Méthodes d'analyse des résultats	p.125
D6-1. Plans d'expérience (mise au point de l'extraction à l'ASE)	p.125
D6-2. Tests statistiques	p.126
D6-3. Méthode de calcul des performances des réacteurs de digestion	p.127

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAP E. Optimisation et validation d'une chaîne d'analyse de 14 HAPs présents dans des boues urbaines contaminées.....	p.128
E1. Optimisation de la chaîne d'analyse de 14 HAPs par RP-HPLC fluorimétrie	p.129
E1-1. Détermination des conditions d'élution	p.130
E1-2. Identification des pics d'élution	p.131
E1-3. Optimisation de la détection fluorimétrique	p.134
E2. Optimisation de l'extraction des HAPs d'un échantillon de boues.....	p.136
E2-1. Optimisation de l'extraction des HAPs de la fraction liquide	p.136
E2-1-1. Extraction liquide/liquide	p.136
E2-1-2. Extraction sur phase solide SPE	p.136
E2-2. Optimisation de l'extraction des HAPs de la fraction solide	p.139
E2-2-1. Optimisation de l'extraction à l'ASE	p.139
E2-2-2. Optimisation de la reprise de l'échantillon après extraction	p.142
E3. Validation de la fiabilité de la méthode analytique proposée	p.144
E3-1. Comparaison avec la méthode de référence d'extraction au Soxhlet	p.144
E3-2. Validation de la méthode à l'aide de boues certifiées	p.146
E3-3. Influence de l'étape de séchage des boues et performances de recouvrement de la méthode proposée	p.147

CHAP F. Mise en évidence du potentiel naturel d'élimination des HAPs et des PCBs au cours de la digestion mésophile anaérobie et aérobie de boues urbaines contaminées p.150

F1. Présentation de la méthode de calcul des performances d'éliminationp.151

- F1-1. Estimation des performances de réduction en Matières Sèchesp.152
- F1-2. Cas des Composés Traces Organiques : exemple du fluoranthène p.154

F2. Mise en évidence du potentiel d'élimination de 13 HAPs au cours de la digestion de boues contaminées..... p.157

- F2-1. Potentiel d'élimination des HAPs sous conditions anaérobies mésophiles p.157
 - F2-1-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion* p.157
 - F2-1-2. Performances d'élimination des HAPs sous conditions méthanogènes* p.158
- F2-2. Potentiel d'élimination des HAPs sous conditions aérobie mésophilesp.161
 - F2-2-1. Caractérisation des conditions aérobie de digestion* p.162
 - F2-2-2. Performances d'élimination des HAPs sous conditions aérobie*p.162

F3. Mise en évidence du potentiel d'élimination de 7 PCBs au cours de la digestion de boues contaminées p.169

- F3-1. Potentiel d'élimination des PCBs sous conditions anaérobies mésophilesp.169
 - F3-1-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion* p.169
 - F3-1-2. Performances d'élimination des PCBs sous conditions méthanogènes*..... p.170
- F3-2. Potentiel d'élimination des PCBs sous conditions aérobie mésophiles p.174
 - F3-2-1. Caractérisation des conditions aérobie de digestion* p.174
 - F3-2-2. Performances d'élimination des PCBs sous conditions aérobie* p.174

CHAP G. Optimisation du potentiel anaérobie et aérobie d'élimination des HAPs... p.179

G1. Influence des conditions opératoires de digestion.....p.180

- G1-1. Essai préliminaire – influence du temps de séjour hydraulique sous conditions anaérobies méthanogènes p.180
 - G1-1-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion*p.180
 - G1-1-2. Comparaison des performances d'élimination des HAPs* p.181
- G1-2. Influence du prétraitement des boues avant digestionp.183
 - G1-2-1. Influence du broyage du substrat* p.183
 - G1-2-2. Influence de la stérilisation sous UV du substrat* p.187
- G1-3. Influence de la température de digestionp.191
 - G1-3-1. Influence de la température sous conditions anaérobies* p.192
 - G1-3-2. Influence de la température sous conditions aérobie* p.198

G2. Influence de l'ajout d'activateurs de diffusionp.204

- G2-1. Essai préliminaire-ajout d'antimousse KEMAZURTM sous conditions anaérobies . p.204
 - G2-1-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion*p.204
 - G2-1-2. Influence du KEMAZURTM sur les performances d'élimination des HAPs* p.205
- G2-2. Ajout de surfactants non ioniques p.206
 - G2-2-1. Influence des surfactants sous conditions anaérobies*p.208
 - G2-2-2. Influence des surfactants sous conditions aérobie* p.212
- G2-3. Ajout d'un agent solubilisant : le méthanolp.216
 - G2-3-1. Influence de l'ajout de méthanol sous conditions anaérobies* p.217
 - G2-3-2. Influence de l'ajout de méthanol sous conditions aérobie* p.219

CHAP H. Caractérisation du potentiel d'élimination des HAPs sous conditions anaérobies méthanogènes	p.223
H1. Devenir du ¹⁴C-Benzo(a)pyrène sous conditions anaérobies méthanogènes	p.224
H1-1. Suivi du ¹⁴ C-Benzo(a)pyrène au sein d'un réacteur témoin	p.224
H1-2. Suivi du ¹⁴ C-Benzo(a)pyrène au sein d'un réacteur biologique	p.227
H2. Influence de l'adaptation aux HAPs de l'inoculum méthanogène	p.231
H2-1. Potentiel d'élimination des HAPs d'un inoculum non-adapté	p.232
H2-1-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion	p.232
H2-1-2. Comparaison des performances d'élimination des HAPs d'un inoculum adapté et non adapté aux HAPs.	p.232
H2-2. Essai de bioaugmentation de l'inoculum non adapté	p.234
H2-2-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion	p.235
H2-2-2. Influence de l'inoculum bioaugmenté sur les performances d'élimination des HAPs.....	p.235
H2-3. Essai de bioaugmentation de l'inoculum adapté	p.237
H2-3-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion.....	p.238
H2-3-2. Influence de l'inoculum bioaugmenté sur les performances d'élimination des HAPs.....	p.238
H3. Implication de l'activité méthanogène dans l'élimination des HAPs	p.239
H3-1. Le rendement en biogaz : indicateur de l'activité de l'écosystème méthanogène et de l'élimination des HAPs	p.239
H3-2. Influence du blocage de l'étape de méthanogénèse	p.240
H4. Caractérisation de la flore anaérobie méthanogène (identification de la communauté <i>archaea</i>)	p.242
H4-1. Profils SSCP de la communauté <i>archaea</i> des différents réacteurs étudiés	p.242
H4-2. Séquençage et positionnement des clones <i>archaea</i> des réacteurs ADA et NADA au sein d'un arbre phylogénétique	p.248

<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	p.253
---	-------

<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	p.257
---	-------

<i>ANNEXE I : Liste des publications et travaux</i>	p.279
--	-------

<i>ANNEXE II : Récapitulatif des performances des réacteurs étudiés</i>	p.280
--	-------

TABLEAUX ET FIGURES

Chapitre A : La gestion des boues urbaines

- Tableau A1** : Composition moyenne en matières sèches (MS) et matières volatiles (MV) des boues d'épuration urbaines. (p.21)
- Tableau A2** : Productions annuelles de boues urbaines et filières d'élimination dans différents pays d'Europe et aux Etats-Unis. (p.24)
- Tableau A3** : Temps de séjour appliqués en fonction des caractéristiques de fermentation méthanique (MV= Matières Volatiles). (p.32)
- Tableau A4** : Concentrations maximales en micropolluants organiques autorisées dans les boues avant élimination par épandage agricole (arrêté du 08 Janvier 1998). (p.39)
- Figure A1** : Distribution en France du devenir des boues issues de stations d'épuration urbaines. (p.24)
- Figure A2** : Principales étapes retrouvées dans les filières de traitement des boues d'épuration urbaines. (p.25)
- Figure A3** : Voies de dégradation de la matière organique sous conditions anaérobies méthanogènes. (p.28)
- Figure A4** : Effet de la température sur la production de biogaz en fermentation méthanique. (p.31)
- Figure A5** : Techniques d'agitation pour digesteurs anaérobies. (p.32)
- Figure A6** : Représentation schématique d'un digesteur anaérobie fonctionnant à faible charge en alimentation discontinue. (p.33)
- Figure A7** : Représentation schématique d'un couple de digesteurs anaérobies fonctionnant à moyenne et forte charge en alimentation continue. (p.34)

Chapitre B : Les Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques (HAPs)

- Tableau B1** : Propriétés physico-chimiques des HAPs. (p.43)
- Tableau B2** : Devenir des HAPs en station d'épuration des eaux usées. (p.46)
- Tableau B3** : Concentrations moyennes et maximales en HAPs mesurées dans les boues urbaines en France, réglementation en vigueur et ½ vie moyenne dans les sols. (p.47)
- Tableau B4** : Principaux paramètres retrouvés dans la littérature pour l'extraction au Soxhlet. (p.57)
- Tableau B5** : Principaux paramètres retrouvés dans la littérature pour l'extraction accélérée par solvant (ASE). (p.58)
- Tableau B6** : Principaux paramètres cités dans la littérature pour la séparation des HAPs par RP-HPLC et leur détection par fluorimétrie. (p.65)
- Figure B1** : Formules chimiques des 16 HAPs considérés comme prioritaires par l'EPA (Environmental Protection Agency – USA). (p.43)
- Figure B2** : Schéma d'activation métabolique du Benzo(a)pyrène dans une cellule d'organisme supérieur. (p.45)
- Figure B3** : Concentrations en Benzo(a)pyrène mesurées dans des boues urbaines contaminées et fournies par 9 laboratoires d'analyse agréés. (p.50)
- Figure B4** : Représentation du modèle cinétique d'extraction de Pawliszyn. (p.53)
- Figure B5** : Niveaux d'énergie des différentes interactions impliquées dans les liaisons HAP↔matrice solide organique. (p.54)
- Figure B6** : Représentation schématique du système d'extraction au Soxhlet. (p.56)
- Figure B7** : Représentation schématique du système d'extraction accélérée par solvant ou ASE. (p.59)
- Figure B8** : Voie métabolique de dégradation du Naphtalène chez *Pseudomonas putida*. (p. 67)
- Figure B9** : Voie métabolique de dégradation de l'Anthracène chez *Pseudomonas aeruginosa*. (p.68)
- Figure B10** : Voie métabolique de dégradation du Phénanthrène chez *Pseudomonas* sp. (p.68)
- Figure B11** : Voies métaboliques de dégradation du Pyrène chez *Mycobacterium* sp. PYR-1. (p. 70)
- Figure B12** : Voie métabolique de dégradation du Phénanthrène par différentes espèces de champignons de la pourriture blanche. (p.71)
- Figure B13** : Représentation schématique de l'organisation et de la régulation de l'opéron *nah* impliqué dans le catabolisme du Naphtalène. (p.72)
- Figure B14** : Représentation schématique du potentiel redox hydrogène (Eh) pour différentes réactions consommant la matière organique (CH₂O). (p.75)

Figure B15 : Hypothèse de voie métabolique de dégradation du Naphtalène sous conditions anaérobies sulfato-réductrices. (p.76)

Figure B16 : Modèle conceptuel de dissolution des HAPs en présence de surfactant. (p.81)

Chapitre C : Les PolyChloroBiphényles (PCBs)

Tableau C1 : Solubilités de différents PCBs dans l'eau et concentrations dans les boues urbaines en France. (p.89)

Figure C1 : Formules chimiques des 7 PCBs concernés par l'arrêté du 08 Janvier 1998 concernant l'épandage des boues urbaines. (p.88)

Figure C2 : Voie de dégradation du biphényl et x-chlorobiphényl chez *Pseudomonas* sp. LB400. (p.93)

Figure C3 : Mécanisme proposé de déchloration réductrice sous conditions anaérobies. (p.95)

Chapitre D : Matériel et Méthodes

Tableau D1 : Variables opératoires et caractéristiques des réacteurs anaérobies. (p. 102)

Tableau D2 : Variables opératoires et caractéristiques des réacteurs aérobies. (p. 105)

Tableau D3 : Concentrations moyennes en HAPs et PCBs mesurées dans les différents lots de boues mixtes fraîches contaminées utilisées comme Substrat au cours de l'étude. (p. 107)

Tableau D4 : Séquence des amorces utilisées. (p.119)

Tableau D5 : Paramètres des PCR effectuées sur le thermocycler 9700. (p.119)

Figure D1 : Représentation schématique des réacteurs anaérobies de digestion. (p. 101)

Figure D2 : Représentation schématique des réacteurs de digestion de boues urbaines. (p.104)

Figure D3 : Schéma de principe d'une chaîne d'analyse des HAPs au sein d'une matrice solide ou liquide. (p.111)

Figure D4 : Les différentes étapes de l'identification bactérienne. (p.118)

Figure D5 : Représentation schématique d'un réacteur anaérobie de digestion utilisé avec des radioéléments. (p.123)

Photo D1 : Photographie des réacteurs anaérobies de digestion. (p. 101)

Photo D2 : Photographie de réacteurs aérobies de digestion de boues urbaines. (p. 104)

Chapitre E : Optimisation et validation d'une chaîne d'analyse de 14 HAPs présents dans des boues urbaines contaminées

Tableau E1 : Erreurs de répétabilité et de reproductibilité de l'analyse HPLC couplé à un fluorimètre en fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission testées au cours de l'optimisation de la chaîne d'analyse. (p.135)

Tableau E2 : Pourcentages de recouvrement par extraction liquide/liquide et sur phase solide (SPE). (p.138)

Tableau E3 : Concentrations, erreurs de reproductibilité et tests statistiques pour chaque HAPs en fonction des différents paramètres testés lors de 3 plans d'expériences réalisés au cours de l'optimisation de l'extraction accélérée par solvants (ASE) sur boues mixtes urbaines (3 lots différents). (p.140)

Tableau E4 : Efficacité de recouvrement obtenu lors de l'extraction de boues sèches à l'ASE en fonction des paramètres de reprise après évaporation à sec (Quantité d'Acétonitrile, Agitation 10 min. et Diffusion 30 min.). (p.143)

Tableau E5 : Efficacité de recouvrement de l'extraction au Soxhlet en fonction des paramètres d'extraction. (p.145)

Tableau E6 : Détermination des concentrations en HAPs à l'ASE et par analyse HPLC-fluorimètre sur boues certifiées et comparaison avec les données fournies par une moyenne de 11 laboratoires internationaux agréés. (p.146)

Tableau E7 : Estimation des pertes dues à la méthode de séchage des échantillons de boues liquides. (p.147)

Tableau E8 : Performances de recouvrement de la méthode proposée préalablement optimisée. (p. 149)

- Figure E1 :** Chromatogrammes d'élution pour (1.A) une solution standard en HAPs et (1.B) un échantillon d'extrait de boues mixtes urbaines (extraction à l'ASE). (p.132)
- Figure E2 :** Comparaison de 4 spectres d'adsorption UV d'HAPs en milieu complexe (longueurs d'onde de 200 à 400 nm) donné par l'analyse au détecteur à barrette de diodes – série A-, par rapport aux spectres fournis dans la littérature – série B. (p.133)

Chapitre F : Mise en évidence du potentiel naturel d'élimination des HAPs et des PCBs lors de la digestion mésophile anaérobie et aérobie de boues urbaines naturellement contaminées

- Tableau F1 :** Concentrations en HAPs mesurées dans la phase liquide aqueuse et comparaison avec les concentrations retrouvées dans la phase solide pour le réacteur témoin T35. (p.154)
- Tableau F2 :** Concentrations moyennes en HAPs dans le substrat (boues fraîches) et pour les réacteurs anaérobies en pseudo-équilibre témoin T35 et biologique ADA. (p.159)
- Tableau F3 :** Concentrations moyennes en HAPs dans le substrat (boues fraîches) et pour les réacteurs aérobies en pseudo-équilibre témoin Taéro et biologique Aéro. (p.167)
- Tableau F4 :** Concentrations moyennes en PCBs dans le substrat (boues fraîches) et pour les réacteurs en pseudo-équilibre témoin TPCB et biologique ADAPCB. (p.171)
- Tableau F5 :** Concentrations moyennes en PCBs dans le substrat (boues fraîches) et pour les réacteurs aérobies en pseudo-équilibre témoin TaéroPCB et biologique AéroPCB. (p.177)
- Figure F1 :** Concentrations en Matières Sèches Totales (MSt) dans le cas du Substrat (1.A), des réacteurs anaérobies mésophiles témoin T35 et biologique ADA (1.B), de la concentration théorique calculée (1.C) et des pourcentages de réduction des MSt, pour le témoin (1.D) et pour le réacteur ADA (1.E) au cours du temps de stabilisation. (p.153)
- Figure F2 :** Concentrations brutes et totales en Fluoranthène dans le cas du Substrat (2.A et 2.C), des réacteurs témoin T35, biologiques ADA et théorique (2.B et 2.D) et des performances d'élimination du Fluoranthène (en %) pour le réacteur témoin (2.E) et pour le réacteur ADA (2.F). (p.156)
- Figure F3 :** Pertes abiotiques (réacteur témoin T35) et biologique (réacteur ADA) en HAPs sous conditions anaérobies strictes en fonction du nombre croissant de cycles benzéniques. (p.158)
- Figure F4 :** Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs pour le réacteur ADA en fonction du nombre croissant de cycles benzéniques. (p.160)
- Figure F5 :** Pertes abiotiques en HAPs au sein des réacteurs témoins sous conditions anaérobies (T35) et aérobies (Taero) en fonction du nombre croissant de cycles benzéniques. (p.163)
- Figure F6 :** Pertes apparentes totales (abiotiques et biologiques) dans le cas de réacteurs anaérobie (réacteur ADA) et aérobie (réacteur Aéro) en fonction du nombre croissant de cycles benzéniques. (p.164)
- Figure F7 :** Pertes corrigées potentiellement dues à l'activité biologique dans le cas de réacteurs anaérobies (réacteur ADA) et aérobies (réacteur Aéro), en fonction du nombre croissant de cycles benzéniques. (p.165)
- Figure F8 :** Facteurs d'efficacité dans le cas de réacteurs anaérobie (ADA) et aérobie (Aero). (p.166)
- Figure F9 :** Concentrations brutes en HAPs dans des boues contaminées (Substrat) et en sortie de réacteur de digestion anaérobie (ADA) et aérobie (Aéro). (p.167)
- Figure F10 :** Pertes abiotiques en PCB (réacteur témoin TPCB) et biologique (réacteur ADAPCB) sous conditions anaérobies strictes en fonction du poids moléculaire croissant. (p.170)
- Figure F11 :** Pertes calculées potentielles en PCBs dues à l'action biologique sous conditions anaérobies strictes en fonction du poids moléculaire croissant (réacteur ADAPCB). (p.172)
- Figure F12 :** Facteur d'efficacité d'élimination des PCBs en fonction du poids moléculaire du PCB (réacteur ADAPCB). (p.173)
- Figure F13 :** Pertes abiotiques en PCBs des réacteurs témoins fonctionnant sous conditions anaérobies (TPCB) et aérobies (TaéroPCB) en fonction du poids moléculaire croissant des PCBs. (p.175)
- Figure F14 :** Pertes totales en PCBs (abiotiques et biologiques) sous conditions anaérobies (ADAPCB) et aérobies (AéroPCB) en fonction du poids moléculaire croissant. (p.176)
- Figure F15 :** Facteurs d'efficacité d'élimination des PCBs dans le cas de réacteurs anaérobie (ADAPCB) et aérobie (AéroPCB). (p.176)
- Figure F16 :** Concentrations brutes en PCBs dans des boues contaminées avant traitement (Substrat) et en sortie de réacteurs de digestion anaérobie (ADAPCB) et aérobie (AéroPCB). (p.178)

Chapitre G : Optimisation du potentiel anaérobie et aérobie d'élimination des HAPs

Tableau G1 : Concentrations en HAPs mesurées dans la phase liquide aqueuse par comparaison avec les concentrations retrouvées dans la phase solide pour le BRIJ 35 (G1a), Tergitol-NP10 (G1b) et pour le Tyloxapol (G1c) à 1g.l^{-1} . (p.208)

- Figure G1 :** Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies méthanogènes fonctionnant avec un temps de séjour de 40 jours (ADA) et de 20 jours (ADA20). (p.182)
- Figure G2:** Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies méthanogènes fonctionnant avec un temps de séjour de 40 jours (ADA) et de 20 jours (ADA20). (p.182)
- Figure G3:** Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies avec un substrat en boues contaminées non broyées (ADA) ou broyées mécaniquement (BADA). (p.185)
- Figure G4 :** Concentrations en HAPs dans des boues contaminées sans traitement (Substrat) et après broyage mécanique (Substrat broyé). (p.186)
- Figure G5 :** Concentrations en HAPs dans des boues contaminées sans traitement (Substrat) et après stérilisation sous UV (254 nm) (Substrat Stérilisé). (p.189)
- Figure G6 :** Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies soit « de base » (ADA20), soit alimentés avec un substrat broyé (BADA) ou un substrat stérilisé (ADASTER). (p.189)
- Figure G7:** Facteurs d'efficacité dans le cas de réacteurs anaérobies alimentés avec un substrat non broyé (ADA20), préalablement broyé (BADA) ou stérilisé sous UV (ADASTER). (p.190)
- Figure G8 :** Pertes abiotiques en HAPs dans le cas de réacteurs témoins anaérobies à 35°C (T35), 45°C (T45) et 55°C (T55). (p.193)
- Figure G9 :** Pertes apparentes en HAPs dans le cas de réacteurs biologiques anaérobies à 35°C (ADA), 45°C (ADA45) et 55°C (ADA55). (p.194)
- Figure G10:** Pertes corrigées en HAPs potentiellement dues à l'activité biologique dans le cas de réacteurs biologiques anaérobies à 35°C (ADA), 45°C (ADA45) et 55°C (ADA55). (p.195)
- Figure G11:** Facteurs d'efficacité dans le cas de réacteurs anaérobies à 35°C (ADA), 45°C (ADA45) et 5°C (ADA55). (p.196)
- Figure G12:** Pertes abiotiques en HAPs dans le cas de réacteurs témoins aérobie à 35°C (Aéro), 45°C (Aéro45) et 55°C (Aéro55). (p.199)
- Figure G13:** Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs biologiques aérobie à 35°C (Aéro), 45°C (Aéro45) et 55°C (Aéro55). (p.200)
- Figure G14:** Pertes potentielles d'élimination biologique des HAPs dans le cas de réacteurs biologiques aérobie à 35°C (Aéro), 45°C (Aéro45) et 55°C (Aéro55). (p.201)
- Figure G15:** Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas de réacteurs biologiques aérobie à 35°C (Aéro), 45°C (Aéro45) et 55°C (Aéro55). (p.202)
- Figure G16:** Concentrations brutes en HAPs dans des boues contaminées avant traitement (Substrat) et en sortie de réacteur de digestion anaérobie mésophile 35°C (ADA) et aérobie mésophile 35°C (Aéro) ou 45°C (Aéro45°C). (p.203)
- Figure G17:** Pertes apparentes des HAPs dans le cas d'un réacteur anaérobie (ADA) et supplémenté avec de l'antimousse (ADAKEM). (p.205)
- Figure G18:** Facteurs d'efficacité des HAPs dans le cas d'un réacteur anaérobie (ADA) et supplémenté avec de l'antimousse (ADAKEM). (p.206)
- Figure G19:** Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs biologiques anaérobies de base (ADA20) ou supplémentés avec un surfactant non ionique, soit du Brij35 (ADABRIJ), soit du Tergitol-NP10 (ADATERGI) soit du Tyloxapol (ADATYLOX). (p.210)
- Figure G20:** Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas de réacteurs biologiques anaérobies de base (ADA20) ou supplémentés avec un surfactant non ionique, soit du Brij35 (ADABRIJ), soit du Tergitol-NP10 (ADATERGI) soit du Tyloxapol (ADATYLOX). (p.211)
- Figure G21:** Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs biologiques aérobie de base (Aéro) ou supplémentés avec un surfactant non ionique, soit du Brij35 (AéroBRIJ), soit du Tergitol-NP10 (AéroTERGI) soit du Tyloxapol (AéroTYLOX). (p.213)
- Figure G22:** Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas de réacteurs biologiques aérobie de base (Aéro) ou supplémentés avec un surfactant non ionique, soit du Brij35 (AéroBRIJ), soit du Tergitol-NP10 (AéroTERGI) soit du Tyloxapol (AéroTYLOX). (p.214)
- Figure G23:** Pertes apparentes des HAPs dans le cas d'un réacteur anaérobie supplémenté avec du méthanol (ADAMET) et du réacteur anaérobie de base (ADA20). (p.218)
- Figure G24:** Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas d'un réacteur anaérobie supplémenté avec du méthanol (ADAMET) et du réacteur anaérobie de base (ADA20). (p.218)

- Figure G25:** Pertes apparentes en HAPs dans le cas d'un réacteur aérobique supplémenté avec du méthanol (AéroMET) et du réacteur aérobique de base (Aéro). (p.220)
- Figure G26:** Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas d'un réacteur aérobique supplémenté avec du méthanol (AéroMET) et du réacteur aérobique de base (Aéro). (p.220)
- Figure G27:** Concentrations brutes en HAPs dans des boues contaminées avant traitement (Substrat) et en sortie de réacteur de digestion supplémenté avec du méthanol soit sous anaérobiose (ADAMET), soit sous aérobiose (Aéromet). (p.221)

Chapitre H : Caractérisation du potentiel d'élimination des HAPs sous conditions anaérobies méthanogènes

- Tableau H1:** Répartition de la radioactivité au sein des différentes fractions d'un échantillon de substrat (avec azide) et du réacteur témoin à l'équilibre. (p.225)
- Tableau H2:** Répartition de la radioactivité au sein des différentes fractions d'un échantillon de substrat et du réacteur biologique à l'équilibre. (p.230)
- Tableau H3:** Performances moyennes de méthanogénèse et de réduction des HAPs des 7 réacteurs d'intérêt (profils SSCP déterminés de la population *archaea*). (p.242)
- Figure H1:** Evolution des concentrations en radioactivité totale (a) dans le substrat et en sortie de réacteur témoin, (b) pour la courbe théorique et (c) par comparaison entre les mesures et les concentrations attendues, estimation des pertes en radioactivité totale au cours du procédé. (p.226)
- Figure H2:** Vitesse de production de biogaz au cours du temps (réacteur biologique). (p.227)
- Figure H3:** Evolution des concentrations en radioactivité totale (a) dans le substrat et en sortie de réacteur biologique, (b) de la courbe théorique et (c) par comparaison entre les mesures et les concentrations attendues, évolution des pertes en radioactivité totale au cours du procédé. (p.229)
- Figure H4:** Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies inoculés à partir d'un écosystème adapté (réacteur ADA et témoin T35) et non adapté (NADA) aux HAPs. (p.233)
- Figure H5:** Facteurs d'efficacité des HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies inoculés à partir d'un écosystème adapté (réacteur ADA et témoin T35) et non adapté (NADA) aux HAPs. (p.234)
- Figure H6:** Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies inoculés à partir d'un écosystème adapté aux HAPs (réacteur ADA), non adapté (NADA) avec une fraction en écosystème adapté de 4% (NADA4+) et de 10 % (NADA10+). (p.236)
- Figure H7:** Facteurs d'efficacité des HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies inoculés à partir d'un écosystème adapté aux HAPs (réacteur ADA), non adapté (NADA) avec une fraction en écosystème adapté de 4% (NADA4+) et de 10 % (NADA10+). (p.237)
- Figure H8:** Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies inoculés à partir d'un écosystème adapté aux HAPs (réacteur ADA) ou bioaugmenté avec des sédiments fortement contaminés (ADABIO). (p.238)
- Figure H9:** Facteurs d'efficacité des HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies inoculés à partir d'un écosystème adapté aux HAPs (réacteur ADA) ou bioaugmenté avec des sédiments fortement contaminés (ADABIO). (p.239)
- Figure H10:** Rendement en biogaz en fonction des pertes en Pyrène mesurées pour les réacteurs méthanogènes inoculés avec un écosystème adapté (ADA (35°C), ADA45 (45°C) et ADA55°C)) ou avec un ajout d'écosystème adapté dans un non adapté aux HAPs (NADA (à 0%), NADA4+ (à 4%) et NADA10+ (à 10%)). (p.240)
- Figure H11:** Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies méthanogènes (ADA), stérilisé chimiquement (T35) ou strictement acidogène (ADACH4). (p.241)
- Figure H12:** Profils SSCP alignés de la communauté *archaea* des écosystèmes d'inoculation non adapté (NADA) et adapté aux HAPs (ADA) et du substrat en boues fraîches d'alimentation au temps initial (t0) et au temps final (tf). (p.244)
- Figure H13:** Profils SSCP de la population *archaea* de divers écosystèmes à l'équilibre pour les réacteurs non adaptés - série 1- (NADA) ou adapté à 4 % (NADA4+), à 10 % (NADA10+) et des réacteurs à écosystème adapté – série 2 - à 35°C (ADA), 45°C (ADA45), 55°C (ADA55) et après ajout de KEMAZUR (ADAKEM). (unité arbitraire en ordonnées). (p.246)
- Figure H14:** Profils SSCP et assignation des groupes de clones isolés (nom et nombre de clones isolés) de la population *archaea* des écosystèmes à l'équilibre pour les réacteurs non adapté – série FBx - (NADA) et adapté aux HAPs – série FAX -(ADA) (unité arbitraire en ordonnées). (p.249)
- Figure H15:** Arbre phylogénétique *archaea* et positionnement des groupes de clones issus des réacteurs ADA (FA) et NADA (FB). (p.252)

L'activité humaine conduit inexorablement à la production de déchets divers et variés : déchets industriels, déchets ménagers, eaux usées urbaines,... Afin de limiter l'impact d'une dissémination non contrôlée de ces rejets dans le milieu naturel, il est indispensable de les traiter et d'en recycler les principaux constituants (traitement des eaux usées urbaines et industrielles, recyclage du verre, du papier, de certains plastiques,...). Pour cela, les moyens mis en œuvre par les instances gouvernementales sont essentiellement d'ordre législatif et ont pour principaux objectifs de sensibiliser, voire de contraindre, les différents acteurs (collectivités locales, consommateurs, industriels,...) à mieux respecter leur environnement. Chaque rejet est donc strictement réglementé par des textes de lois qui, de plus, tendent à se renforcer tant au niveau européen qu'au niveau international en vue d'aboutir à une meilleure conservation de notre environnement naturel.

Dans le cadre de lois réglementant le rejet d'eaux résiduaires urbaines, les normes en vigueur sont actuellement très restrictives vis à vis des différentes formes de pollution qui pourraient engendrer une perturbation problématique de l'équilibre écologique (contamination des nappes phréatiques, eutrophisation des rivières,..). Le développement de procédés performants de traitement des eaux a donc été nécessaire pour limiter au maximum le rejet de polluants dans le milieu naturel. De plus, la situation en 1991 de l'assainissement des collectivités locales en France indique que seulement 60 % des eaux usées rejoignaient une station d'épuration et qu'à peine 40 % de cette pollution était éliminée (*Agences de l'eau, 1994*). Les exigences en terme d'assainissement et de traitement ont donc été réévaluées avec pour objectif d'obtenir, avant fin 2005, plus de 80 % de raccordement aux stations d'épuration avec un minimum de 70 % d'élimination de la pollution organique dite "classique" (directive européenne du 21 Mai 1991 et décret n°94-469 du 03 Juin 1994). Dans certaines zones dites « sensibles » où l'impact environnemental d'une pollution peut être important, l'élimination de l'azote et du phosphore a été également exigée. Afin de répondre à l'ensemble de ces contraintes environnementales et suite à un flux toujours croissant en eaux résiduaires urbaines à traiter, les procédés de traitement biologiques et physico-chimiques se sont alors généralisés. Par voie de conséquence, le développement de ces procédés de traitement au sein des stations d'épuration a conduit à la production d'une autre forme de déchet tout aussi problématique : LES BOUES URBAINES.

Longtemps considéré comme une filière secondaire au traitement de l'eau, le traitement des boues représente depuis quelques années un réel enjeu environnemental,

économique et social. En France, la production annuelle en boues urbaines est estimée à plus de 900 000 tonnes de matières sèches, soit plus de 9 millions de tonnes de boues fraîches (Mathevon, 1999). Caractérisées par un volume relativement important (plus de 95% d'eau) et par une composition nuisible pour l'environnement (composés hautement fermentescibles, métaux lourds, micro-organismes pathogènes, micropolluants organiques,...), les boues urbaines posent de réels problèmes de gestion pour les exploitants de stations et les collectivités locales. Actuellement, plusieurs filières d'élimination sont à la disposition du producteur de boues en fonction des caractéristiques et des quantités de boues produites (Mathevon, 1999): (i) La première consiste en leur mise en décharge. Jusqu'à présent tolérée, cette filière a été récemment interdite (1^{er} Juillet 2002) dans le cas de déchets non ultimes, sauf dérogations préfectorales, (ii) la seconde, l'incinération, offre une certaine souplesse aux producteurs de boues (peu de stockage, peu d'intermédiaires,...) mais reste une filière relativement coûteuse (fonctionnement, entretien, élimination des mâchefers, transport des boues,...) et exigeante vis à vis de la qualité des boues (étape de séchage obligatoire), (iii) la dernière filière consiste en l'épandage des boues sur des terres agricoles. Cette filière d'élimination par valorisation agricole est basée sur l'apport aux sols cultivés d'un certain nombre d'éléments fertilisants par les boues, riches en matière organique et autres éléments nutritifs. Cependant, la composition nuisible des boues et le rejet social de leur utilisation sur des sols agricoles ont conduit, en France, à la mise en place de normes restrictives qui tendent encore à se renforcer avec les nouvelles directives européennes. Le durcissement de ces normes a pour principal objectif de sécuriser et de pérenniser cette filière qui se trouve être la plus écologique et souvent la moins onéreuse, mais également la moins bien perçue (Brunet, 1998).

Ainsi, le développement durable de l'épandage agricole des boues urbaines passe obligatoirement par une qualité connue et constante des boues. A cette fin, il s'avère nécessaire de réduire leur pouvoir fermentescible, leur volume et, d'une manière générale, leur teneur en polluants organiques. Plusieurs procédés de stabilisation peuvent alors être mis en œuvre comme le compostage, la digestion anaérobie mésophile, la digestion aérobie thermophile et la stabilisation physico-chimique par addition de chaux. En dépit du fait que le compostage soit le procédé le plus approprié pour le traitement de boues avant épandage agricole, la digestion anaérobie de boues urbaines présente certains avantages non négligeables comme ceux de posséder de forts rendements de dégradation de la pollution

organique tout en produisant une énergie valorisable (biogaz) et en ne nécessitant que de faibles apports énergétiques. Le taux de réduction en micro-organismes pathogènes reste cependant moyen et il est parfois préférable d'utiliser d'autres procédés comme la digestion aérobie thermophile, plus coûteux en terme énergétique mais plus performant d'un point de vue hygiénisation totale (Ellisalde et al., 1994).

Même si les boues urbaines ont été traitées et stabilisées, l'un des principaux risques liés à leur valorisation agricole se situe au niveau de l'accumulation dans les sols de composés toxiques pour l'environnement comme les métaux lourds et les micropolluants organiques. Parmi l'ensemble des molécules organiques retrouvées dans les boues urbaines et susceptibles d'induire des effets toxiques sur l'homme et son environnement, quelques unes sont soumises à la réglementation française. C'est notamment le cas des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) et des PolyChloroBiphényles (PCBs) qui sont particulièrement surveillés en raison de leurs fortes propriétés toxiques et carcinogènes même à faibles concentrations. Conséquence directe de leur faible solubilité dans l'eau et de leur relative ubiquité dans l'environnement, les HAPs et PCBs ont tendance à s'adsorber facilement aux fractions solides et à se concentrer plus particulièrement dans les boues urbaines. L'épandage agricole de boues contaminées par des micropolluants organiques représente alors une source non négligeable de contamination des sols et augmente d'autant plus le risque d'un impact significatif tant au niveau environnemental qu'au niveau sanitaire (Feix et al., 1995).

L'étude du devenir de ces composés au cours du traitement des boues urbaines est donc particulièrement intéressante pour le producteur de boues souhaitant valoriser ses boues par épandage. Cependant, l'analyse de ces composés au sein d'une matrice boue est rendue particulièrement complexe par leur nature très hydrophobe, leur faible concentration (de l'ordre du $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$) et leur forte affinité pour la matière organique et autres matières en suspension. Les avancées technologiques de ces dernières années vis à vis de l'extraction et de l'analyse des éléments traces organiques, ont toutefois permis d'obtenir des résultats relativement fiables pour tout type de matrice, dont les boues urbaines. La biodégradation des HAPs et des PCBs a donc pu être largement étudiée sous différentes conditions d'oxydoréduction, études essentiellement réalisées dans le cas de sols et de sédiments contaminés. Ainsi, la biodégradation des HAPs sous conditions aérobies a été longuement étudiée depuis quelques années, dans des sédiments et des sols naturels fortement contaminés (Beckles et al., 1998 ; Goodin and Webber, 1995). Cependant, encore peu d'études ont été réalisées

sous conditions d'anaérobiose stricte. En effet, ce n'est que depuis le début des années 90 que la biodégradation des HAPs sous conditions méthanogènes a été étudiée (*Kirk and Lester, 1990*). Longtemps considérée comme irréalisable, quelques récents résultats ont montré la possibilité d'une dégradation biologique significative, pour des HAPs de faibles poids moléculaires, sous des conditions anaérobies sulfato-réductrices (*Coates et al., 1997*) ou nitrate réductrices (*Wilson and Bouwer, 1997*). Jusqu'à présent et à notre connaissance, aucun résultat significatif n'a été rapporté concernant la biodégradation des HAPs en conditions anaérobies strictes méthanogènes. Les difficultés d'extraction rencontrées et la faible reproductibilité des méthodes d'analyse (erreurs supérieures à 20 %) ont pu toutefois être à l'origine de conclusions statistiquement erronées (*Kirk and Lester, 1990*).

De même, la biodégradation des PCBs a été largement étudiée sous différentes conditions d'oxydoréduction. Il a été montré que les PCBs les plus chlorés (6-,7-,8-PCBs) étaient dégradés sous conditions anaérobies strictes par déchlorination réductrice (*Abramowicz, 1990*). Inversement, des conditions d'aérobiose facilitent la dégradation des composés les moins chlorés (1-,2-PCBs) (*Abramowicz, 1990*). En dépit du fait que les voies de dégradation des PCBs soient relativement bien connues, leur potentiel de biodégradabilité reste à être déterminé lors du traitement biologique de boues contaminées.

Le travail présenté dans ce manuscrit porte sur l'étude et l'optimisation de la dégradation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques non substitués (HAPs) et halogénés (PCBs) par des écosystèmes de digestion anaérobie et aérobie lors du traitement biologique de boues urbaines contaminées. Cette étude a été conduite en vue d'évaluer, de caractériser et d'optimiser le potentiel biologique naturel de dégradation des HAPs/PCBs lors de la digestion anaérobie et aérobie de boues urbaines contaminées. Dans un premier temps, une étude bibliographique présentera les grandes filières de traitement et d'élimination des boues urbaines, ainsi que les connaissances actuelles sur la dégradation biologique des HAPs / PCBs et leur interaction avec l'environnement. Dans un deuxième temps, l'étude expérimentale sera présentée suivant quatre parties distinctes :

- L'analyse des PCBs ayant été déjà largement étudiée et optimisée, une chaîne d'analyse de 14 HAPs au sein d'une matrice boue sera à son tour optimisée et validée afin de fournir des résultats fiables et reproductibles lors du suivi ultérieur de réacteurs de digestion à

l'échelle du laboratoire. Les principaux objectifs furent donc d'obtenir une reproductibilité d'analyse maximale (< 2 %) à partir d'échantillons de faibles volumes (200-300 ml) présentant de faibles concentrations en HAPs (quelque $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$).

- Deuxièmement, le potentiel naturel d'élimination des HAPs et des PCBs par des écosystèmes aérobies et anaérobies méthanogènes, sera mis en évidence à l'aide de réacteurs biologiques infiniment mélangés fonctionnant en mode continu.

- Suite aux résultats obtenus, les procédés de digestion aérobie et anaérobie seront alors optimisés afin d'améliorer la diffusion et la bioaccessibilité de ces composés organiques. A ce stade de l'étude, les HAPs seront utilisés comme modèle d'étude. Pour cela, plusieurs paramètres opératoires seront étudiés comme la température, l'addition de surfactants ou de métabolites favorisant leur diffusion au sein de la matrice boue.

- Enfin, la dégradation des HAPs sous conditions anaérobies méthanogènes, encore très peu connue, sera en partie caractérisée à l'aide de molécules marquées radioactives (^{14}C) et par l'identification des espèces microbiennes méthanogènes en présence.

Chapitre A

La gestion des boues urbaines

Afin de replacer les travaux de ce manuscrit dans leur cadre d'étude, nous entamons la présentation du contexte général par une synthèse bibliographique portant sur la gestion des boues en France et dans le monde.

Dans ce chapitre, les principales filières d'élimination et de traitement des boues urbaines seront présentées. Les cas de la digestion anaérobie et aérobie des boues urbaines seront décrits plus en détails, ces deux procédés étant utilisés ultérieurement au cours de notre étude.

Enfin, la problématique de la présence de composés traces organiques dans les boues sera abordée dans le cadre d'une élimination des boues par épandage agricole.

A1. Définition et caractéristiques des boues urbaines

Sous-produit de la filière de traitement des eaux, les boues d'épuration sont communément définies comme étant les sédiments résiduels issus du traitement des eaux résiduelles urbaines, outre les refus de dégrillage, les graisses et les sables. Les caractéristiques des boues urbaines dépendent fortement de la nature et de la composition de l'effluent traité ainsi que des procédés de traitement utilisés. Le terme générique de « boues urbaines » regroupe donc un ensemble non uniforme de produits qui se différencient par leur nature, leur composition et leurs propriétés physico-chimiques. Néanmoins, en fonction de la filière de traitement, il est possible de distinguer quatre grandes catégories de boues urbaines (Chassande et al., 2000) :

- ◆ Les boues primaires, qui sont produites par simple décantation des matières en suspension en tête de station d'épuration. De nature fortement organique, les boues primaires sont très fermentescibles et présentent de forts risques de nuisances olfactives. Suite aux progrès technologiques, elles tendent peu à peu à disparaître, les matières en suspension étant directement traitées au sein de la station.

- ◆ Les boues secondaires (ou boues activées) qui correspondent à la biomasse en excès issues du traitement biologique (purge en sortie des bassins d'aération). Elles sont récupérées après décantation en sortie de station d'épuration. Moins réactives que les boues primaires, les boues secondaires sont essentiellement composées de bactéries épuratrices floculantes.

- ◆ Les boues mixtes, qui correspondent au mélange de boues primaires et de boues secondaires. Hautement fermentescibles, elles sont principalement utilisées dans le cas d'une stabilisation biologique des boues par digestion anaérobie, aérobie ou par compostage. Leur composition diffère en fonction des flux de production en boues primaires et en boues secondaires.

- ◆ Les boues physico-chimiques, qui sont issues du traitement physico-chimique de l'eau par addition d'un agent floculant (sels de Fer ou d'Aluminium). Les procédés physico-chimiques d'épuration sont souvent mis en place pour pallier le sous dimensionnement des bassins d'épuration biologique (cas de stations balnéaires ou touristiques aux variations

saisonniers importantes). Ces procédés servent principalement à capter la plus grande partie des matières en suspension dans les eaux brutes par simple décantation (plus de 90% des MES éliminées).

Quelle que soit leur origine, les boues urbaines sont constituées d'un squelette minéral et d'une fraction organique intimement liés pour former un complexe particulaire. La proportion relative en éléments minéraux fins détermine la texture de la matrice solide alors que sa composition en matière organique lui confère une certaine structure. La structure et la porosité des boues sont particulièrement importantes car elles influencent fortement la pénétration et la circulation de l'eau à l'intérieur de la phase solide, conférant ainsi aux boues leur valeur agronomique (capacité de rétention de l'eau et biodisponibilité des éléments fertilisants) (Miège, 2000). La fraction en matière organique totale des boues, estimée par les matières volatiles, est le plus souvent prédominante (voir **Tableau A1**). Cette fraction organique est principalement composée de gros polymères (cellulose, lignine), de macromolécules (résidus de tissus organiques animaux ou végétaux), de biomolécules (acides aminés, sucres et triglycérides), d'une fraction humique (acides humiques, acides fulviques) et d'une fraction lipidique (Miège, 2000).

Tableau A1 : Composition moyenne en matières sèches (MS) et matières volatiles (MV) des boues d'épuration urbaines (d'après Agences de l'eau, 1994).

<i>Type de boues</i>		<i>Production de boues</i> (en g _{MS} / hab. / jour)	<i>Teneur en MS</i> (en %)	<i>Rapport MV/MS</i> (en %)
<i>Boues Primaires</i>	Fraîches	50 à 60	5	50 à 70
	Digérées	30 à 40	5 à 6	30 à 60
<i>Boues secondaires</i> (station faible charge)	Fraîches	40 à 50	2 à 3	60 à 70
	Digérées aérobies	30 à 40	2 à 3	60 à 70
<i>Boues mixtes</i> (station moyenne et forte charge)	Fraîches	80 à 85	4 à 5	60 à 70
	Digérées anaérobies	55 à 60	4 à 6	45 à 60
	Digérées aérobies	60 à 70	3 à 4	50 à 65
<i>Boues physico-chimiques</i>	Décantation statique	100 à 150	4 à 6	40 à 65
	Décantation lamellaire	100 à 150	1 à 2	40 à 65
	Aérofloitation	100 à 150	5 à 6	40 à 65

A2. Les filières d'élimination des boues urbaines

L'utilisation généralisée de traitements biologiques performants au sein des stations d'épuration des eaux résiduaires urbaines a conduit à une production toujours croissante en boues: actuellement, près de 900 000 tonnes de matières sèches par an sont produites en France et près de 9 millions de tonnes de matières sèches par an en Europe et aux USA. Caractérisées par un volume important (plus de 95 % d'eau) et par une composition nuisible pour l'environnement (nuisances olfactives, présence de métaux lourds, de micro-organismes pathogènes, d'éléments traces organiques,...), les boues issues du traitement des eaux usées posent actuellement de réels problèmes environnementaux et économiques pour les collectivités locales. Néanmoins, plusieurs filières d'élimination sont actuellement proposées aux producteurs de boues urbaines (*d'après Mathevon, 1999*) :

◆ La mise en décharge : Suite à la loi du 13 Juillet 1992 relative à l'élimination des déchets, la mise en décharge ne sera autorisée que pour les déchets ultimes à compter du 1^{er} Juillet 2002. Cette voie d'élimination des boues urbaines par stockage est donc vouée à totalement disparaître à très court terme.

◆ L'incinération : Deux grands types d'incinération sont possibles : soit l'incinération spécifique où les boues sont incinérées seules, les conditions dépendant fortement de la nature de la boue (siccité, pouvoir calorifique,...) ; soit la co-incinération avec des ordures ménagères qui est moins dépendante de la composition des boues. Dans les deux cas, l'avantage est d'offrir au producteur de boues une certaine souplesse de gestion (peu de stockage, un seul intermédiaire,...). Cependant, l'incorporation de boues dans les incinérateurs conduit à une augmentation significative des coûts d'entretien et des coûts d'élimination des mâchefers (mise en décharge de classe I). D'un point de vue environnemental, les principaux risques de l'incinération sont liés aux rejets des incinérateurs qui peuvent produire, sous certaines conditions, divers micropolluants organiques toxiques comme les HAPs, PCBs, dioxines et furannes (*Mastral et al., 1999 ; Vierle et al., 1999 ; Wikström et al., 1999*).

◆ La valorisation agricole : Ce procédé consiste à épandre des boues préalablement stabilisées et déshydratées sur des sols à vocation agricole. Le principal avantage de cette filière consiste en l'apport au sol d'éléments fertilisants contenus dans les boues, dont la matière organique (40 à 80 %), l'azote (1 à 8 %) et le phosphore (2 à 7 %). Toutefois,

l'épandage des boues est soumis à la concurrence d'autres sous-produits de l'agriculture : les déjections animales et les sous-produits de l'industrie agro-alimentaire. Actuellement, les boues ne représentent que 1,7 % des 291 millions de tonnes de sous-produits épandus (94,5% de déjections animales). Par comparaison, les engrais traditionnels de synthèse représentent plus de 300 millions de tonnes chaque année (OTV, 1997). Le marché est donc potentiellement prêt à accepter les flux croissants en boues urbaines. En effet, à ce jour, si l'ensemble des boues produites étaient épandues, elles ne représenteraient qu'entre 2 et 3 % de la surface agricole utile (S.A.U.) (Wiert et al., 1999).

Cependant, d'autres éléments entrant dans la composition des boues restent particulièrement indésirables, comme les micro-organismes pathogènes, les micropolluants organiques et les éléments traces métalliques. Les teneurs en ces composés sont donc rigoureusement contrôlées et soumises à des normes très restrictives. Les principaux objectifs du durcissement des normes liées à l'épandage des boues sont de sécuriser et de pérenniser cette filière qui se trouve être la plus écologique et, le plus souvent, la moins onéreuse (Brunet, 1998). En France, plus de 60 % des boues urbaines sont actuellement éliminées par épandage agricole (voir **Figure A1**) (OTV, 1997). En effet, la valorisation agricole des boues reste la filière la plus prisée au regard des décisions politiques et des contextes économiques locaux (Wiert et al., 1999). Au niveau européen, l'ensemble des pays de l'espace Euro souhaiterait également pérenniser cette filière d'élimination des boues (Wiert et al., 1999). Ainsi, avec le développement des procédés de traitement par méthanisation et/ou compostage, la qualité globale des boues s'est améliorée et certains pays utilisent désormais la revalorisation agricole à hauteur de 50 à 70 % des boues produites (comme la France, le Danemark, la Belgique Wallonne) (voir **Tableau A2**). D'autres sont plus en retrait (20 %) mais pratiquent une politique volontariste vis à vis de l'épandage agricole (comme l'Italie, le Portugal, la Grèce). Au regard du contexte et de l'acceptation sociale des boues, la pérennisation de ce débouché passe donc par l'imposition de normes de qualité au sein de la filière entière, avec la production de boues de qualité (maîtrise des rejets), la réalisation d'études préalables (vérification de l'innocuité, de l'intérêt agronomique) et la garantie de la transparence et de la traçabilité (effectuer des bilans agronomiques réguliers) (Brunet, 1998). Suite à la loi du 8 Décembre 1997, trois grands principes de base sont à respecter : 1- Innocuité des boues (aucun effet sur l'homme ou les animaux). 2- Intérêt agronomique (attention aux besoins du sol et aux surplus). 3- Interdiction des épandages non contrôlés. Le producteur de boues est

donc contraint de suivre un cahier des charges très rigoureux avec le suivi de la qualité des boues, l'analyse des principaux polluants et la plus grande transparence vis à vis de l'agriculteur et du consommateur.

Tableau A2: Productions annuelles de boues urbaines et filières d'élimination dans différents pays d'Europe et aux Etats-Unis (d'après Wiart et al., 1999).

Pays	Production de boues (10 ³ T _{MS} par an)	Filières d'élimination (en %)			
		Décharge	Epandage	Incinération	Autres
Allemagne	2 700	48	40	11	1
Autriche	200	32	22	33	13
Belgique (Flandre)	45	60	20	20	0
Belgique (Wallonne)	15	10	90	0	0
Danemark	200	13	67	20	0
Espagne	703	25	46	5	24
Finlande	150	38	31	0	31
France	850	25	60	15	0
Grèce	60	90	10	0	0
Irlande	43	42	12	0	46
Italie	800	80	18	1	0
Luxembourg	7	30	70	0	0
Pays-Bas	350	48	4	24	24
Portugal	25	29	11	0	60
Royaume-Uni	1 100	8	46	8	38
Suède	240	35	35	0	30
Suisse	210	0	45	55	0
Europe	7 700	38	39	11	12
Etats-Unis	8 000	19	55	17	9

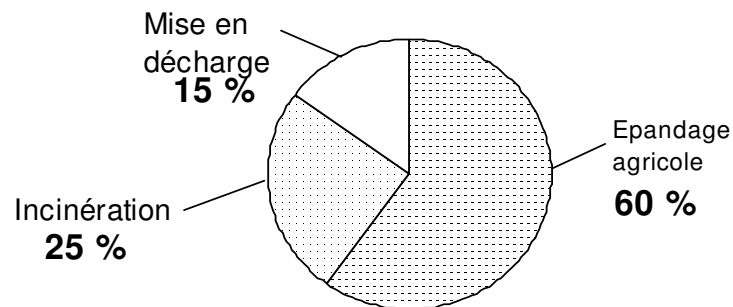


Figure A1 : Distribution en France du devenir des boues issues de stations d'épuration urbaines (d'après Wiart et al,1999).

A3. Les filières de traitement des boues urbaines

A3-1 Généralités sur les filières de traitement

Quelle que soit la filière d'élimination des boues urbaines, il est nécessaire de les traiter au sein même de la station afin de réduire leur teneur en eau, donc leur volume et le coût de traitement, et de réduire leur pouvoir fermentescible pour limiter les nuisances olfactives. Si le choix de la valorisation agricole des boues par épandage est retenu, d'autres objectifs s'ajoutent aux précédents dont l'hygiénisation des boues par destruction des micro-organismes pathogènes, ainsi que la réduction de certains composés toxiques (respect des concentrations limites en certains micropolluants métalliques, organiques) (Chassande et al., 2001). Pour cela, de nombreux types de traitement sont possibles lors de la conception d'une filière de traitement des boues comportant les grandes étapes suivantes (voir **Figure A2**) :

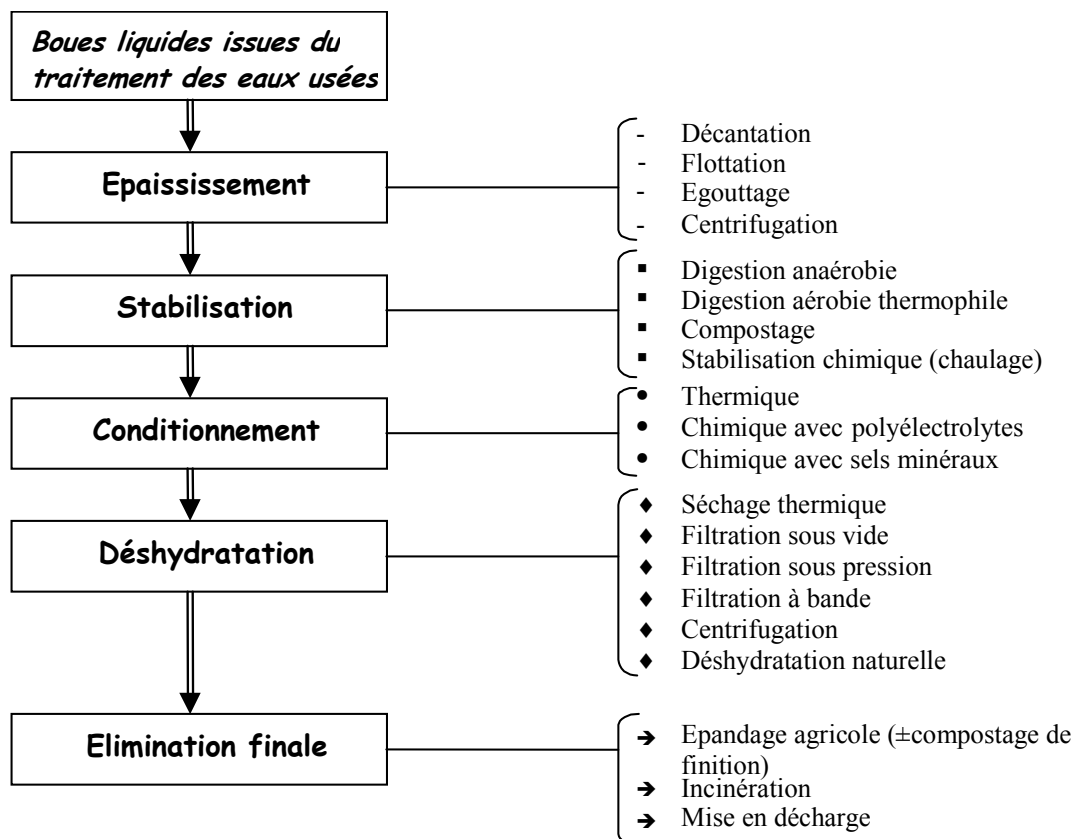


Figure A2 : Principales étapes retrouvées dans les filières de traitement des boues d'épuration urbaines (d'après Agences de l'eau, 1994 ; Environnement Magazine, 1999 ; Clicquot de Mencque, 1999).

◆ L'épaississement correspond à une première étape de réduction du volume de l'effluent à traiter. Quelle que soit la technique retenue (épaississement statique gravitaire, flottation, égouttage, centrifugation), cette étape permet la concentration des boues soit en tête de station (boues primaires), soit en sortie de traitement (boues secondaires ou activées / boues physico-chimiques). Afin de faciliter les étapes ultérieures de stabilisation, l'épaississement des boues peut être suivi d'une désintégration chimique (ozonation) ou mécanique (broyeur à billes, Homogénéisateur Haute Pression,...) (Muller et Pelletier, 1998 ; OTV, 1997).

◆ La stabilisation correspond à l'étape clé de la filière de traitement des boues. Elle permet de réduire significativement leur pouvoir fermentescible. Les différents procédés correspondent, entre autres, à la digestion anaérobie mésophile et thermophile, la digestion aérobie thermophile, le compostage, le chaulage, la stabilisation aux nitrites et le séchage (OTV, 1997). La stabilisation chimique (chaulage) est souvent un choix onéreux en exploitation et reste la moins satisfaisante d'un point de vue écologique. Le procédé de compostage peut être mis en œuvre pour stabiliser et hygiéniser directement les boues épaissies ou pour finaliser le traitement des boues avant épandage en complétant, par exemple, un procédé de digestion anaérobie.

◆ Le conditionnement est une étape facultative en fonction de la nature et de la composition des boues. Soit chimique (ajout de minéraux (sels de fer, chaux) ou de polymères cationiques), soit thermique, elle permet de préparer les boues "stabilisées" à l'étape de déshydratation mécanique par filtration ou centrifugation.

◆ L'étape de déshydratation finalise le traitement en réduisant au maximum le volume des boues (par centrifugation, filtration sur filtre à bandes, sur filtre à plateaux). L'eau récupérée est alors recyclée en tête de station pour traitement. A noter que la déshydratation "naturelle" consiste soit en des lits de séchage (boues étalées en fines couches), soit en des sacs filtrants, soit en des tamis d'égouttage.

◆ L'élimination finale correspond aux choix proposés au producteur de boues en terme d'élimination des boues produites. Dans le cas de l'épandage, une étape de compostage des boues est parfois nécessaire pour finaliser le traitement. En effet, procédé aérobie thermophile (45-70°C), le compostage réduit la matière organique fermentescible à un stade avancé et permet de détruire les germes pathogènes. Le compost ainsi produit (solide,

compact et riche en matières organiques) peut être provisoirement stocké puis épandu à l'aide d'épandeurs à fumier.

Outre la nature et la composition des boues, d'autres facteurs sont également à prendre en compte dans le choix des procédés à mettre en œuvre pour le traitement des boues, comme les caractéristiques des solides (matières minérales, sèches, volatiles), les teneurs en composés azotés, phosphorés, ainsi que le pH et la teneur en acides gras volatils. L'état physique des boues est également à prendre en compte (teneur en eau, viscosité, plasticité, comportement sous agitation). Le choix d'une filière de traitement de boues fraîches dépendra donc fortement de la nature et de la composition moyenne des boues, mais aussi de conditions locales (décisions politiques, contraintes administratives,...) et économiques (espaces disponibles, coût du traitement de l'eau,...). Dans un contexte où la valorisation agricole par épandage serait favorisée, toutes sortes de boues (traitées ou non) peuvent être épandues : les boues liquides se travaillant comme le lisier, les boues pâteuses plus difficiles à stocker vu leur pouvoir fermentescible élevé, les boues chaulées fréquemment utilisées (30 % du total en France), les boues compostées et les boues séchées qui demande de grosses dépenses de maintenance et d'investissement mais qui reste rentable pour des tonnages élevés (*Chassande et al., 2000*). Toutefois, afin de fiabiliser l'épandage agricole des boues urbaines, il est souvent préférable de les stabiliser pour éviter les nuisances olfactives lors du stockage, en réduisant leur pouvoir fermentescible et, d'une manière plus générale, leurs teneurs en matières organiques. Pour cela, plusieurs procédés de stabilisation peuvent être mis en œuvre comme, entre autres, la digestion anaérobie (mésophile ou thermophile) et la digestion aérobie (thermophile ou par aération prolongée). A noter que, dans le cadre de cette étude, il sera uniquement abordé l'influence de ces deux principaux types de procédés.

A3-2. La digestion anaérobie des boues urbaines

Par comparaison avec les autres procédés de stabilisation, la digestion anaérobie de boues urbaines présente comme principaux avantages de posséder une bonne efficacité de transformation de la matière organique (40 à 50 %), de produire une énergie valorisable (biogaz), de posséder de faibles rendements de production de biomasse et de ne nécessiter que de faibles besoins en énergie par rapport aux procédés aérobies. Elle permet également

d'obtenir une réduction significative, mais souvent insuffisante, des micro-organismes pathogènes (Elissalde et al., 1994). En dépit de la grande fragilité des écosystèmes méthanogènes et d'un investissement relativement important, la digestion anaérobie reste un procédé intéressant et performant de stabilisation de boues mixtes urbaines (mélange de boues primaires et secondaires). Dans le cas d'une finalisation de la stabilité des boues, une étape de compostage complète fréquemment une pré-digestion anaérobie (avec ou sans étape de déshydratation) (Mustin, 1987).

A3-2-1. Principes généraux de la digestion anaérobie

La digestion anaérobie consiste en une fermentation de boues épaissies (3 à 5 % de siccité) sous conditions anaérobies strictes. Le processus de digestion anaérobie fait appel à l'activité de nombreux micro-organismes pour transformer la matière organique brute en biogaz. Le méthane ainsi produit peut être récupéré, stocké et valorisé par combustion (chaudière produisant soit une source de chaleur, soit de l'électricité). L'énergie produite peut alors être utilisée pour le fonctionnement de la station (chauffage des locaux, des installations,...).

Les différentes étapes de la digestion anaérobie sont regroupées en trois grandes phases (voir **Figure A3**) :

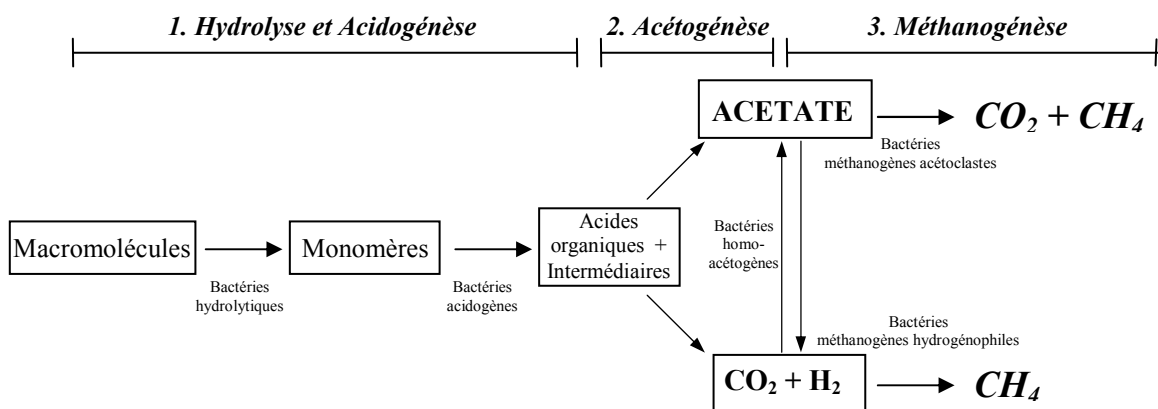


Figure A3: Voies de dégradation de la matière organique sous conditions anaérobies méthanogènes (d'après Zeikus, 1982).

◆ Une phase d'hydrolyse des macromolécules et macro-polymères et d'acidogénèse.

Au cours de cette première étape, les molécules organiques complexes (protéines, lipides, polysaccharides,...) sont transformées en molécules plus simples (acides aminés, sucres simples,...) par des bactéries hydrolytiques produisant des enzymes extracellulaires (Bitton, 1994). Les substrats solubilisés sont alors métabolisés pour produire, entre autres des acides gras volatils (acétate, propionate, butyrate,...), des alcools et des cétones (éthanol, glycérol, méthanol, acétone). Les bactéries réalisant cette transformation sont dites acidogènes et fermentatives (*Clostridium* sp., *Bacillus* sp.,...)

◆ Une phase d'acétogénèse. Cette seconde étape correspond à la transformation des acides gras volatils et des intermédiaires alcools et cétones en acétate et en gaz de fermentation ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$), par des bactéries acétogènes. Certains micro-organismes, ou bactéries homoacétogènes, utilisent les différents acides gras et le gaz produit pour synthétiser de l'acétate. L'acétate est donc le composé produit en majorité (Bitton, 1994). A noter que certaines bactéries acétogènes, comme *Syntrobacter* sp., ou *Syntrophomonas* sp., qui produisent de l'acétate, de l' H_2 et du CO_2 à partir d'acides gras volatils, vivent en symbiose avec les méthanogènes, leur croissance nécessitant une faible pression partielle en H_2 (substrat utilisé pour la méthanogénèse) (Bitton, 1994).

◆ Une phase finale de gazéification (ou méthanogénèse). Au cours de cette étape, la source en acétate, produit précédemment, conduit à la production de biogaz ($\text{CO}_2 + \text{CH}_4$) par des bactéries méthanogènes **acétoclastes**. Les acétoclastes ont le taux de croissance le plus lent de l'écosystème méthanogène (de quelques jours). Les méthanogènes acétoclastes sont principalement représentés par deux genres d'archaebactéries : les *Methanosarcina* sp., dominant et les plus diverses vis à vis de leur substrat, et les *Methanotherix* sp. ou *Methanosaeta* sp. qui ne dégradent que l'acétate (Bitton, 1994 ; Garcia, 1990). En parallèle, le biogaz produit lors de la phase acidogène ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$) conduit à la production simple de méthane par des bactéries méthanogènes **hydrogénophiles**.

Ainsi, les différentes étapes de la digestion anaérobie sont réalisées par des bactéries anaérobies facultatives (*Bacillus* sp., *Streptococcus* sp.,...) ou anaérobies strictes (*Propionobacterium* sp., *Clostridium* sp., *Micrococcus* sp.,...) et notamment, par les bactéries méthanogènes très sensibles aux polluants toxiques et aux moindres traces d'oxygène dans le milieu (*Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter* sp., *Methanococcus* sp., *Methanothermus* sp., *Methanomicrobium* sp.,...) (Malik et al., 1989). D'un point de vue physiologique, la digestion

sous conditions anaérobies est caractérisée par un pH opérationnel compris entre 6,8 et 7,8 maximum (Agences de l'eau, 1994) avec un optimum entre 7 et 7,5 (Ross et al., 1992). Habituellement, la réduction de la matière organique est de l'ordre de 45 % à 50 % (Agences de l'eau, 1994) et d'environ 60 % pour les matières en suspension (Ross et al., 1992). Afin d'obtenir de bons rendements en méthane, la concentration en acides gras volatils doit être inférieure à environ 2-3 g/l : la présence d'acides gras volatils inhibe en effet la fermentation méthanique, le plus toxique étant l'acide propionique (C₃) et le moins toxique, l'acide acétique (C₂) (Malik et al., 1989). Véritable indicateur d'une bonne digestion anaérobie, le taux de méthane doit atteindre environ 70% du biogaz produit (CO₂ + CH₄). Le digesteur produit alors environ 400 à 500 ml de biogaz par gramme de matière organique introduite. Plus précisément, 1g de DCO_t (Demande Chimique en Oxygène totale caractérisant la matière organique) produit entre 200 et 400ml de CH₄ (Arundel, 2000 ; Malik et al., 1989). Enfin, les bactéries méthanogènes étant les plus lentes et les plus sensibles aux variations environnementales du digesteur, elles règlent la vitesse globale de la digestion. En cas de problème (surcharge d'alimentation, saut de température, saut de pH,...), la réponse du système se traduit immédiatement par une accumulation des acides gras volatils dans le milieu et une inhibition de la méthanogénèse.

A3-2-2. Paramètres influençant la digestion anaérobie

Plusieurs facteurs possèdent une influence significative sur la production de biogaz et doivent être étroitement contrôlés (d'après Agences de l'eau, 1994) :

- ◆ La présence d'oxygène inhibe fortement la fermentation méthanique. Les bactéries méthanogènes étant anaérobies strictes, il est donc indispensable de limiter la présence d'air au sein du digesteur (enceinte close et étanche).

- ◆ La nature de la boue est également un paramètre important à prendre en compte notamment la concentration en matières en suspension, le type de boue (primaire, secondaire, mixte, physico-chimique) et les teneurs en éléments toxiques comme les métaux lourds. A l'inverse des boues primaires qui constituent un substrat particulièrement réactif et fermentescible, la digestion de boues activées (secondaires) seules ne semble pas être indiquée pour alimenter des digesteurs anaérobies. En effet, ces boues sont déjà bien stabilisées, surtout si l'âge de boues est important dans les bassins d'aération. La quantité de biogaz produit serait alors trop faible avec un risque de diminution significative du rendement

de digestion et d'arrêt du digesteur. Les boues secondaires peuvent donc être soit directement séchées, soit mélangées aux boues primaires pour être stabilisées et hygiénisées.

◆ Les apports en nutriments doivent être de l'ordre d'un rapport C : N : P (Carbone : Azote : Phosphore) de 700 : 5 : 1 (Bitton, 1994). Il peut même être recommandé un rapport de 25-30 : 1 (C : N) (Bitton, 1994). Par ailleurs, Stronach *et al.* (1986) recommande un rapport pratique DCO : N d'environ 400 : 1.

◆ La température possède également une grande influence sur le rendement en biogaz du digesteur méthanogène (voir **Figure A4**). En effet, les bactéries méthanogènes sont très sensibles à la température (Bitton, 1994). Il existe trois types de fermentation méthanique : soit cryophile (<15°C), soit mésophile (15-55°C), soit thermophile (55-70°C). Une variation de quelques degrés seulement (2-3°C) est suffisante pour perturber significativement les performances du digesteur (Ross *et al.*, 1992). Pour la méthanogénèse mésophile, l'optimum est d'environ 35°C (Bitton, 1994) et une hausse de la température de quelques degrés augmente les vitesses de dégradation globale des polluants organiques mais ne permet pas d'améliorer la biodégradabilité de l'effluent (Veeken *et Hamelers*, 1999).

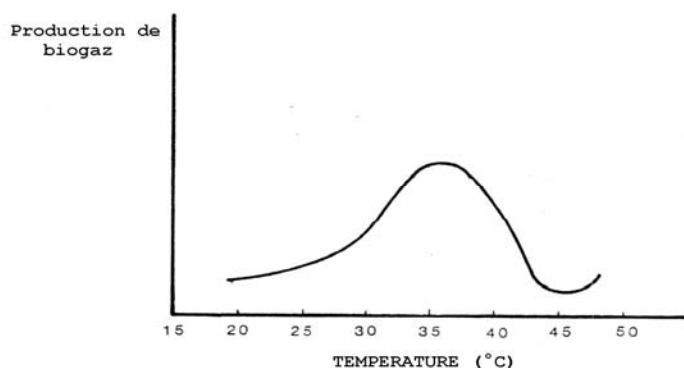


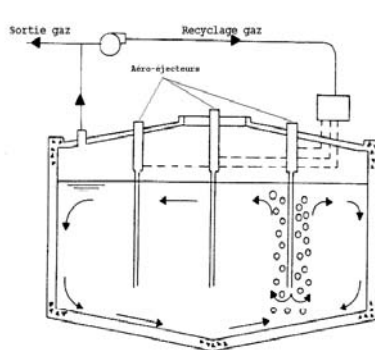
Figure A4 : Effet de la température sur la production de biogaz en fermentation méthanique mésophile (d'après Mustin, 1987).

◆ La charge appliquée au système et le temps de séjour dans le digesteur doivent également être adaptés à la nature du substrat (voir **Tableau A3**). En effet, toute surcharge du digesteur entraîne une surproduction d'acides gras volatils, eux-mêmes inhibiteurs de la méthanogénèse. Les performances du digesteur dépendent donc d'un équilibre entre synthèse et dégradation des acides gras volatils. De plus, les méthanogènes sont particulièrement sensibles au temps de séjour, car leur temps de doublement est relativement long : de 3-5 jours à 35°C jusqu'à plus de 50 jours à 10°C (Bitton, 1994). En cultures libres, le temps de séjour hydraulique peut être fixé entre 10 et 60 jours, le plus fréquent étant entre 25 et 35 jours (Bitton, 1994).

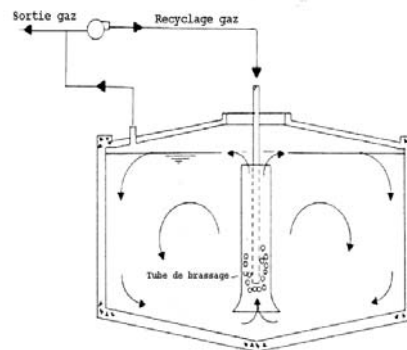
Tableau A3 : Temps de séjour appliqués en fonction des caractéristiques de fermentation méthanique (MV= Matières Volatiles) (d'après Agences de l'eau, 1994).

Type de digestion	Digesteur primaire		Digesteur secondaire
	Charge appliquée (en $\text{kg}_{\text{MV}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$)	Temps de séjour (en jours)	Temps de séjour (en jours)
Digestion à faible charge (25°C)	0,8	37	-
Digestion à moyenne charge (35°C)	1,2	25	-
Digestion à forte charge (35°C)	3 à 4	10	2 à 4

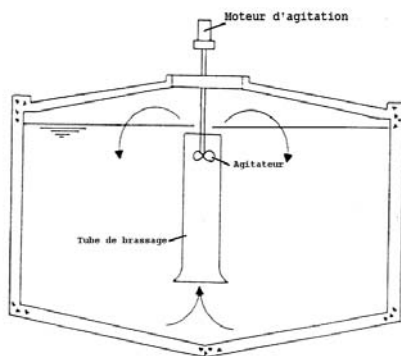
◆ Le système d'agitation doit être assez performant pour assurer suffisamment de contacts entre les bactéries et leurs substrats, garder la température uniforme dans le digesteur et libérer les gaz produits qui pourront resservir à l'agitation. En effet, il est préférable d'utiliser une agitation fluïdique, moins coûteuse et plus efficace qu'une agitation mécanique (voir **Figure A5**). La puissance minimale conseillée est de l'ordre de 5 à 10 W par m^3 de réacteur (Ross et al., 1992).



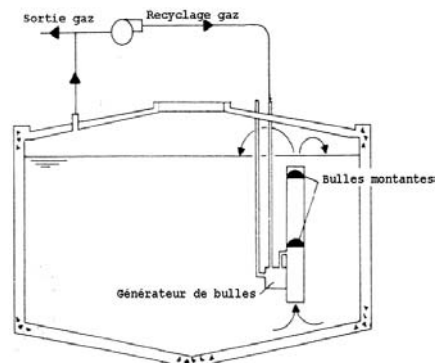
5a. Agitation fluïdique par aéro-éjecteur de biogaz



5b. Agitation fluïdique par injection de biogaz dans un tube de brassage



5c. Agitation mécanique "classique"



5d. Agitation fluïdique à l'aide d'un "revolver à bulle"

Figure A5(abcd) : Techniques d'agitation pour digesteurs anaérobies (d'après Ross et al., 1992)

◆ Enfin, le comportement du digesteur anaérobie doit se rapprocher le plus possible d'un réacteur fonctionnant en continu (chemostat) en évitant les alimentations saccadées (dû à la fragilité des écosystèmes méthanogènes).

A3-2-3. Configurations technologiques de digesteurs anaérobies industriels

Deux types de réacteurs existent en fonction de la charge appliquée au digesteur. A faible charge (voir **Tableau A3**), un seul réacteur anaérobie est suffisant pour réaliser la digestion et l'épaississement (voir **Figure A6**). En effet, le réacteur est naturellement divisé en trois zones (Bitton, 1994 ; Malik et al., 1989) :

- Une couche flottante ou chapeau.
- Une couche intermédiaire où la concentration en matières volatiles est faible (lieu de la digestion anaérobie proprement dite).
- Une couche inférieure d'épaississement des boues (niveau de soutirage vers la déshydratation finale)

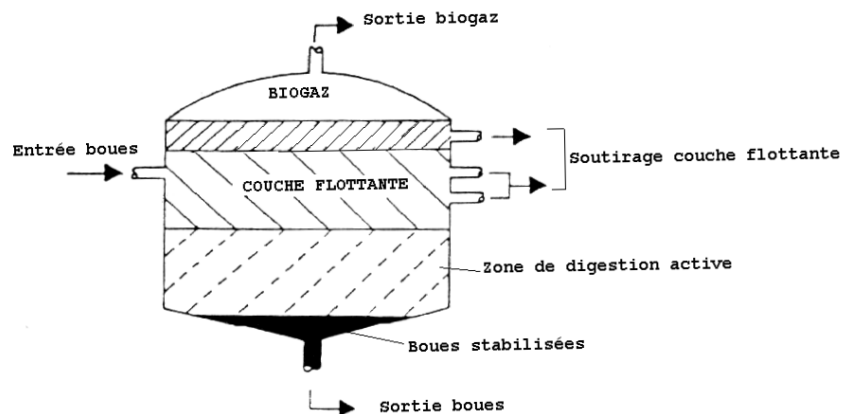


Figure A6 : Représentation schématique d'un digesteur anaérobie fonctionnant à faible charge en alimentation discontinue (d'après Ross et al., 1992).

Le second type de réacteur s'applique pour les moyennes et fortes charges. Dans ce cas, deux réacteurs sont couplés : le premier est utilisé pour la fermentation proprement dite, le second pour achever la fermentation (temps de séjour de quelques jours), mais surtout pour épaissir les boues (voir **Figure A7**) (Bitton, 1994).

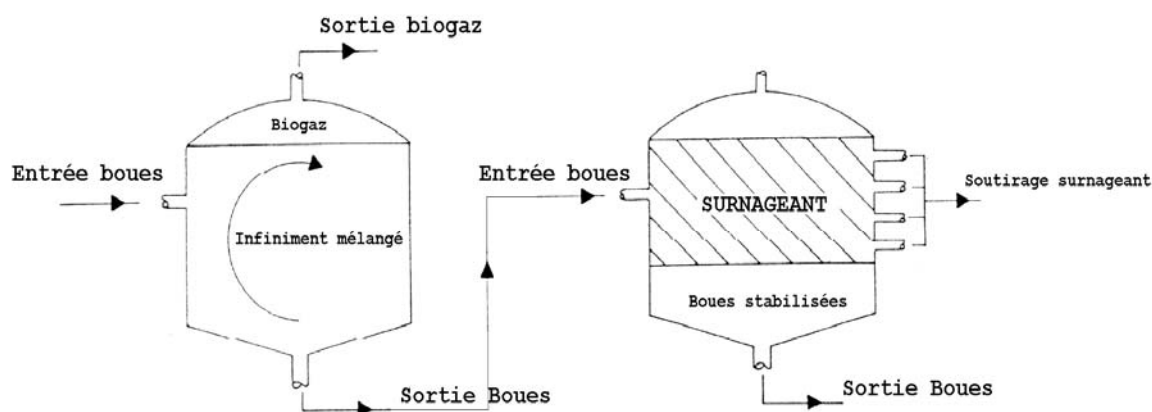


Figure A7 : Représentation schématique d'un couple de digesteurs anaérobies fonctionnant à moyenne et forte charge en alimentation continue (d'après Ross *et al.*, 1992).

A3-2-4. Avantages – Inconvénients de la digestion anaérobie :

Les principaux avantages de la digestion anaérobie sont (Agences de l'eau, 1994 ; Bitton, 1994 ; Ross *et al.*, 1992) :

- la transformation de la matière organique en biogaz, c'est à dire en une énergie noble et stockable (chauffage des digesteurs, des locaux voire même alimentation du procédé de séchage,...),
- un faible rendement de production de boues (par rapport aux rendements en conditions aérobies) avec 20 à 150 kg de biomasse produite par tonne de DCO dégradée, contre 400 à 600 kg pour la digestion aérobie (Bitton, 1994),
- des boues bien stabilisées (aucune odeur, chute de la matière organique de plus de 50 %),
- une demande en énergie plus faible qu'en digestion aérobie et pas d'apport en oxygène,
- des concentrations importantes dans les boues digérées en azote ammoniacale (NH_4^+) et en ions phosphates (PO_4^{3-}) dues à une lyse de la matière organique (intérêt agronomique).

En contrepartie, les principaux inconvénients de cette voie de stabilisation se caractérisent par :

- un coût d'investissement important,
- une chute du pouvoir calorifique de la boue (en vue de son incinération),

- un temps de digestion lent et de mise en équilibre du procédé long (Bitton, 1994),
- un procédé plus sensible aux variations d'environnement dû à une microflore méthanogène fragile. Les changements environnementaux, comme les pollutions aiguës et brutales en polluants organiques ou métalliques, déterminent les limites de flexibilité du procédé (Bauer et Capone, 1985 ; Bitton, 1994),
- l'eau récupérée en sortie de digesteur possède de hautes teneurs en Azote, Phosphore et en matière organique soluble (dû à la liquéfaction des macro-composés), d'où un recyclage obligatoire de l'eau en tête de station d'épuration.

A3-3. La digestion aérobie des boues urbaines

La digestion aérobie des boues urbaines poursuit les mêmes objectifs que la digestion anaérobie, c'est à dire la réduction du pouvoir fermentescible, de la teneur en micro-organismes pathogènes et du volume des boues. Ainsi, le produit obtenu, ou boues stabilisées, doit présenter des caractéristiques biologiquement inertes (Tran et Tyagi, 1990). D'une grande complexité en micro-organismes et en voies métaboliques différentes, les écosystèmes des boues de réacteurs aérobies présentent une activité protéolytique intense. Entre autres, il a été montré que certaines souches de *Bacillus sp.* produiraient activement des enzymes extracellulaires participant à la protéolyse, comme le lysozyme (Bomio et al., 1989).

A3-3-1. Paramètres influençant la digestion aérobie :

La mise en œuvre d'un procédé de digestion aérobie consiste à aérer la boue pendant une période prolongée où les micro-organismes aérobies dégradent, pour leur propre métabolisme, les matières organiques libres ou emprisonnées dans la biomasse bactérienne. Pour cela, certains paramètres influant sur le métabolisme bactérien sont à contrôler afin d'obtenir des performances de stabilisation optimales. L'un des paramètres principaux est le pH qui doit être compris entre 7 et 8. Toutefois, la flore aérobie reste moins sensible aux brusques variations de pH que les écosystèmes anaérobies méthanogènes (Degremont, 1989). Comme tout processus biologique, la digestion aérobie est également fortement influencée par la température, les temps de stabilisation se réduisant sensiblement avec l'accroissement des températures. Par exemple, pour un procédé d'aération prolongée, le temps de séjour hydraulique en bassin d'aération doit être au minimum de 10 jours à 20°C et de 14 jours à

12°C (Agence de l'eau, 1994). A l'extrême, des températures thermophiles (> 55°C) conduisent à des temps de séjour très faibles de 1 ou 2 jours, et sont nettement favorables à une bonne réduction des micro-organismes pathogènes (hygiénisation des boues) (Ellisalde et al., 1994). Dans des conditions réelles d'aération, c'est à dire généralement limitantes, la température thermophile optimale de dégradation et d'hygiénisation se situerait autour de 55-60°C pour un pH optimal proche de la neutralité (Hasegawa et Katsura, 1999; Mason et al., 1987).

L'obtention d'une bonne stabilisation des boues dépend également de la charge appliquée au système, charge généralement exprimée en masse de matières sèches volatiles (MV) introduites par unité de volume et par jour. Généralement, des charges de 1,5 - 2 kg_{MV}.m⁻³.j⁻¹ (boues secondaires) jusqu'à 3 - 4 kg_{MV}.m⁻³.j⁻¹ (boues mixtes fraîches) sont appliquées aux procédés de digestion aérobie. Les charges traitées par ce type de réacteur sont donc significativement plus importantes que dans le cas de digesteurs anaérobies mésophiles où la charge ne peut excéder 1 à 1,5 kg_{MV}.m⁻³.j⁻¹ (la charge volumique appliquée étant limitée par l'inhibition de la méthanogénèse par les micro-organismes acétogènes et la production d'acétate). Il a par ailleurs été montré que certains réacteurs aérobies pouvaient traiter des charges allant jusqu'à 8 kg_{MV}.m⁻³.j⁻¹ pour des taux de réduction de près de 30 % (Tran et Tyagi, 1990). De plus, les taux moyens de réduction des matières organiques varient également en fonction de la durée de stabilisation (temps de séjour dans le digesteur), de la température et de la nature de la boue. Généralement, les taux de réduction de la matière organique atteignent, sous conditions aérobies, entre 20 à 35 % et sont significativement plus faibles qu'en conditions anaérobies (de l'ordre de 50 %) (Agence de l'eau, 1994; Degremont, 1989).

Ainsi, la digestion aérobie thermophile constitue un procédé fortement hygiénisant, pouvant traiter de fortes charges mais possède des efficacités relativement moyennes de transformation de la matière organique. Une possibilité envisageable serait de réduire au maximum le rendement de production de biomasse donc de boues au cours du traitement (fabrication de biomasse à partir de la matière organique oxydée) (Mason et al., 1992). Pour cela, la stabilisation aérobie peut donc être plutôt utilisée comme prétraitement pour une réduction rapide et satisfaisante des micro-organismes pathogènes et d'une partie de la matière organique, suivie par une digestion anaérobie mésophile de finition (réduction ultime des matières organiques volatiles et production de méthane) (Cheubarn et Pagilla, 1999). Dans le cas d'un prétraitement aérobie thermophile (températures supérieures à 60°C), des temps de séjour inférieurs à une journée sont alors suffisants pour atteindre de bonnes performances

d'hygiénisation (Degremont, 1989). Les boues ainsi hygiénisées peuvent alors être stabilisées par un traitement anaérobie de finition de seulement quelques jours. En effet, un prétraitement aérobie des boues permet d'obtenir dans les digesteurs anaérobies des rendements de dégradation en matières organiques plus importants, de produire ainsi plus de biogaz et donc de présenter des concentrations plus faibles en DCO résiduelle en sortie de digesteur (Pagilla et al., 1996). Enfin, un prétraitement aérobie permet également de rendre le procédé de digestion anaérobie plus stable en produisant des boues d'une qualité relativement égale (les écosystèmes aérobies étant moins vulnérables aux variations brusques en composition des boues) (Ward et al., 1998).

Concernant la mise en œuvre de digesteurs aérobies, celle-ci est relativement simple, l'agitation étant majoritairement assurée par le système d'aération. Les différents systèmes d'aération utilisés correspondent soit à des diffuseurs immergés à grosses ou moyennes bulles, soit à des aérateurs de surface (favorisant le mélange fluide). La stabilisation aérobie nécessite donc une consommation élevée en énergie notamment pour l'aération et le mélange du digesteur (puissance minimum de 30 Watts par m³ de réacteur) (Agence de l'eau, 1994). La consommation énergétique peut alors atteindre des valeurs entre 5 et 10 fois plus élevées que dans le cas de la digestion anaérobie mésophile (Degremont, 1989).

A3-3-2. Avantages – Inconvénients de la digestion aérobie :

Les principaux avantages de la digestion aérobie sont (d'après Agences de l'eau, 1994 ; Degremont, 1989) :

- une forte réduction des micro-organismes pathogènes (procédé thermophile recommandé pour l'hygiénisation des boues),
- des charges appliquées relativement élevées par rapport aux systèmes anaérobies (jusqu'à 8 kg_{MV}.m⁻³.j⁻¹),
- des boues bien stabilisées (peu d'odeur, chute de la matière organique de près de 30%),
- une plus faible sensibilité que les procédés anaérobies envers les variations brusques d'environnement (changement de composition des boues urbaines).

En contrepartie, les principaux inconvénients de cette voie de stabilisation se caractérisent par :

- une demande en énergie élevée, essentiellement pour les procédés thermophiles (chauffage des réacteurs, aération, mélange,...),
- des rendements élevés de production de biomasse donc un faible pouvoir réducteur du volume de boues,
- des taux moyens de réduction des matières sèches volatiles moins importants (30%) que les digesteurs anaérobies (50%).

A4. Les composés traces organiques dans les boues urbaines

Quel que soit le procédé (anaérobie ou aérobie) de traitement des boues, la présence de composés traces organiques dans les boues stabilisées reste particulièrement problématique, notamment en cas d'épandage agricole. En effet, d'un point de vue environnemental, le principal risque lié à la valorisation agricole de boues urbaines se situe au niveau de l'accumulation de composés toxiques dans les sols suite à l'épandage répété de boues contaminées, même pour de très faibles concentrations. Ce type de pollution, dite chronique, est plus difficile à repérer qu'une pollution aiguë où la dissémination d'un composé toxique à concentration élevée provoque des perturbations immédiates sur l'homme ou sur son environnement. Les premières prises de conscience des risques liés à l'utilisation de certains composés organiques toxiques sont étroitement liées à plusieurs accidents industriels, dont en 1976 à Seveso (forte pollution de sols aux dioxines), en 1984 à Bhopal en Inde (plus de 2500 morts par contamination au méthylisocyanate), et en 1992 à Times Beach (conséquences dramatiques suite à une contamination aux dioxines). Ces accidents, et beaucoup d'autres, ont provoqué un vif intérêt pour l'étude de la toxicité de certaines substances organiques toxiques, comme le benzène, les pesticides, les dioxines, etc... C'est notamment à la fin des années 70 que les micropolluants ont particulièrement attiré l'attention dans l'usage des boues. En effet, avec l'utilisation d'engrais de synthèse à grande échelle et de l'intensification de l'agriculture, de nombreux pesticides ont été utilisés, parfois en grosses quantités, pour protéger les cultures. Ainsi, de nombreuses molécules comme les HAPs, PCBs, PCDD (polychlorodibenzodioxines), PCDF (polychlorodibenzofurannes) et autres pesticides (aldrine, dieldrine, endrine) ont été longuement étudié vis à vis de leur influence potentielle

sur l'environnement. Actuellement, de nouvelles molécules comme les détergents et leurs dérivés (nonylphénols, alkylbenzenesulfonate linéaire) sont également en cours d'étude (Feix et al., 1995).

Parmi les molécules organiques susceptibles d'induire des effets toxiques sur l'homme et son environnement, seulement quelques unes sont à ce jour soumises à la réglementation européenne pour l'épandage de boues urbaines. C'est notamment le cas de deux grandes familles de micropolluants organiques potentiellement toxiques à faibles concentrations: les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) et les PolyChloroBiphényles (PCBs) (voir **Tableau A4**). En général, le cheminement de ces composés, de leur environnement contaminé jusqu'à la station, se fait suivant 3 processus distincts :

- Le lessivage par les pluies récupère non seulement les produits des gaz d'échappement et de l'usure des pneumatiques sur l'asphalte, mais aussi les produits disséminés dans certains sols industriels contaminés. Les micropolluants sont alors acheminés à la station d'épuration par les eaux de ruissellement.
- Certaines industries peuvent libérer des HAPs dans l'atmosphère. Cette pollution retombe alors sous forme de pluies diffuses et est récupérée par les réseaux d'assainissement.
- Parfois, la source peut être directement localisée au niveau d'industries raccordées au réseau unitaire déversant leurs eaux usées chargées en micropolluants organiques.

Tableau A4 : Concentrations maximales en micropolluants organiques autorisées dans les boues avant élimination par épandage agricole (arrêté du 08 Janvier 1998).

	PCB totaux (n°28-52-101-118-138-153-180)	HAPs		
		Fluoranthène	Benzo(b)- fluoranthène	Benzo(a)- Pyrène
Teneurs limites (en mg.kg _{MS} ⁻¹)	0,8	5	2,5	2

Outre leur maintien dans les sols et dans l'environnement en général, de nombreuses études sur site montrent une certaine persistance et une concentration de ces micropolluants organiques au cours du traitement biologique des boues en station, d'où un risque élevé de contamination des sols par épandage (*sources confidentielles*). Ces résultats sont toutefois à prendre avec précaution, car les pertes en eau sont rarement contrôlées à l'échelle industrielle, les bilans de matières pouvant alors être déficients. Il peut même être observé une

augmentation significative de la concentration en HAPs au cours du procédé due à de fortes pertes en eau (Lazzari et al., 1999). Ces pertes doivent donc être maîtrisées ou quantifiées avant de conclure sur le véritable potentiel de dégradation de ces installations. Néanmoins, il apparaît que les HAPs et les PCBs semblent persister dans leur ensemble au cours du traitement de stabilisation des boues. Certaines boues contaminées peuvent alors présenter des teneurs en HAPs totaux (pour les 16 HAPs de la liste prioritaire EPA) jusqu'à $125 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ au Royaume-Uni, $953 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ au Canada et $1015 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ aux USA, et en PCBs totaux (pour les 7 PCBs d'intérêt) jusqu'à $3,4 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ en Allemagne (Feix et al., 1995). De moindre mesure en France, les concentrations maximales dans les boues restent significatives avec environ $15 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ pour les 3 HAPs d'intérêt et $1,8 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ pour les 7 PCBs (Feix et al., 1995).

Concernant le transfert entre les plantes et les animaux, voir l'homme, le plus grand danger d'épandre des boues contaminées sur des sols agricoles se situe essentiellement au niveau du transfert par ingestion directe chez les animaux si l'épandage de boues à lieu sur des pâturages, les herbes et fourrages tendant à adsorber les micropolluants organiques fortement et à long terme (Smith et al., 2001). Au niveau des plantes agricoles, les voies majeures de contamination se situent plus spécifiquement au niveau des feuilles par contact avec des particules atmosphériques contaminées, notamment pour les HAPs (Kipopoulou et al., 1999). Ce mode de contamination semble plus favorable que par les racines qui vont plutôt adsorber, et non assimiler, les micropolluants sur leurs parois cellulaires (Henner et al., 1997). Cependant, il est difficile d'estimer la part qui puisse être transférée dans les plantes par une mesure directe car leur incorporation par les racines s'effectue principalement à partir de formes transformées non identifiables et donc non quantifiables, mais de toxicité bien réelle (Goodin et al., 1995 ; Juhasz et Naidu, 2000). De plus, dans certaines zones fortement industrialisées, des flux de contaminations en HAPs ont été rapportés dans des végétaux cultivés sur sols contaminés, comme la carotte, la laitue, le chou, l'endive (Kipopoulou et al., 1999). Dans de tels milieux contaminés, le transfert dans les tissus végétaux peut alors être significatif avec près d'un dixième des contaminants qui peuvent être transférés des sols à la plante (Niederer et al., 1995). Enfin, au regard des demi-vies relativement longues de ces composés dans l'environnement (de quelques mois à quelques années), et de leur effet dose à long terme (accumulation dans la chaîne alimentaire), l'impact potentiel sur l'homme de la dissémination de ces micropolluants sur des sols agricoles impose que ce type de contamination doit être traité à la source et notamment lors du traitement des boues avant épandage.

Chapitre B

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs)

Dans ce chapitre, une présentation générale des HAPs (définition, sources, toxicité, réglementation) permettra, dans un premier temps, de mieux comprendre pourquoi la présence de ces polluants même à des concentrations traces dans les boues urbaines est problématique.

Particulièrement difficile à mettre en oeuvre, les diverses techniques d'analyse des HAPs (et des PCBs) seront alors décrites en détails, ainsi que les contraintes qui leur sont associées.

Enfin, différents aspects de la dégradation des HAPs seront abordés. Non seulement les voies de dégradation biologique aérobie et anaérobie seront décrites en détail, mais seront également abordés les aspects et les limitations physico-chimiques de cette dégradation. Suite à la présentation des techniques connues de bioremédiation et de bioaugmentation, un paragraphe portant sur les aspects écotoxicologiques des systèmes avant et après traitement viendra clore ce chapitre.

B1. Présentation générale des HAPs

B1-1. Définition et caractéristiques

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) sont des molécules organiques comportant plusieurs noyaux benzéniques non substitués et condensés linéairement ou en amas (voir **Figure B1**). Ce sont des molécules planes qui se rapprochent d'une structure en feuillet de graphite pour les hauts poids moléculaires. Exception faite du Naphtalène, les HAPs sont des composés peu volatils qui se présentent à l'état pur sous forme de solide ou de liquide plus ou moins visqueux (Miège et al., 1999). La condensation de plusieurs noyaux benzéniques (de 2 à 10) implique qu'il existe une liaison commune entre chaque cycle et que le rapport H/C de la molécule diminue avec le poids moléculaire pour tendre vers zéro. Les HAPs sont donc des molécules neutres et très réduites, ce qui leur confère des propriétés hautement hydrophobes qui croissent avec le nombre de cycles benzéniques. En effet, les coefficients de partage octanol/eau (K_{ow}) fournis dans la littérature sont relativement importants, avec un $\log K_{ow}$ supérieur à 3 contre environ 1,5 pour des composés plus hydrophiles comme les phénols. Ces valeurs traduisent non seulement une faible solubilisation des HAPs dans l'eau et une forte solubilité dans de nombreux solvants organiques, mais également une forte affinité pour les constituants organiques, d'où un risque élevé de bioaccumulation dans les graisses animales (voir **Tableau B1**).

B1-2. Sources en HAPs

Relativement ubiquistes dans l'environnement, les HAPs peuvent être naturellement synthétisés par certains micro-organismes ou végétaux lors de la formation de l'humus (Henner et al., 1997 ; Vergé-Leviel, 2001). Ils restent cependant majoritairement formés lors de la combustion incomplète de la matière organique (hydrocarbures, sources carbonées diverses). Les principales sources de contamination de l'environnement par les HAPs se situent donc au niveau des rejets des industries de transformation par combustion du pétrole et du charbon, comme les cokeries, lors de la liquéfaction du charbon, de la fabrication de goudrons, etc... Plus généralement, les HAPs peuvent être produits par toutes les sources de pyrolyse envisageables, dont les gaz d'échappement, les chauffages domestiques au fuel ou au bois, les incinérateurs, les feux de forêts, la fumée de cigarette et dans certains produits alimentaires

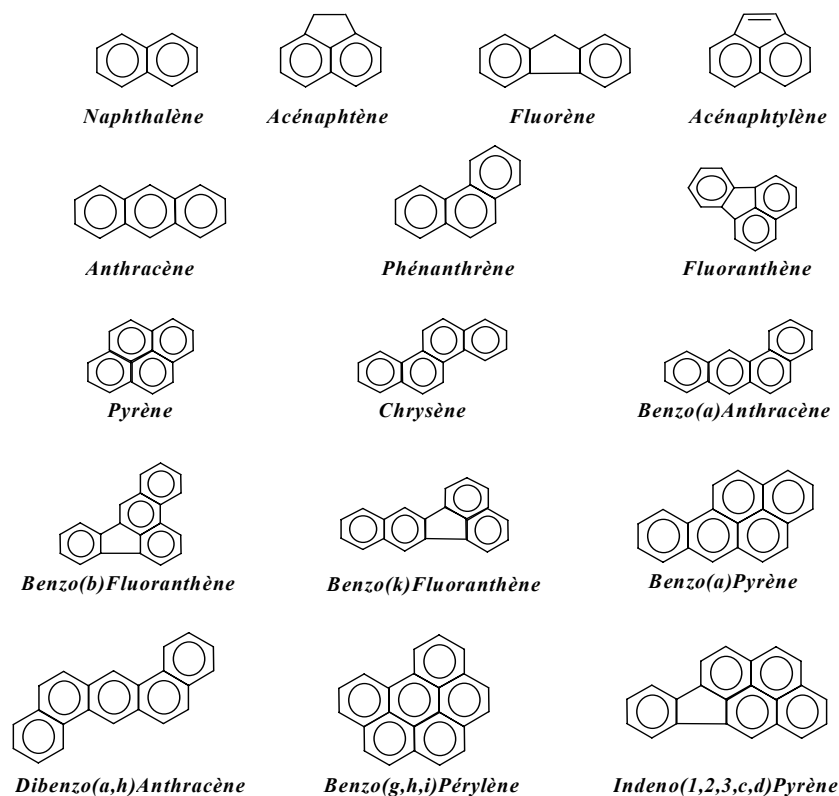


Figure B1 : Formules chimiques des 16 HAPs considérés comme prioritaires par l'EPA.

Tableau B1 : Propriétés physico-chimiques des HAPs (d'après Mercier, 1998).

COMPOSES	Solubilité dans l'eau à 25°C (en mg.l ⁻¹)	Poids Moléculaire	Point d'ébullition (°C)	Coefficient de partage octanol/eau (log Kow)
Naphtalène	31,7	128	218	3,37
Fluorène	1,68	166	298	4,18
Phénanthrène	1,0	178	338	4,46
Anthracène	0,045	178	340	4,5
Fluoranthène	0,206	202	384	4,9
Pyrène	0,132	202	396	4,88
Benzo(a)anthracène	0,0094	228	438	5,63
Chrysène	0,0018	228	441	5,63
Benzo(b)fluoranthène	0,0015	252	487	6,04
Benzo(k)fluoranthène	0,0080	252	481	6,21
Benzo(a)pyrène	0,0016	252	496	6,06
Dibenzo(ah)anthracène	0,0050	278	498	6,86
Benzo(ghi)pérylène	0,0007	276	500	6,78
Indeno(123cd)pyrène	0,0002	276	505	6,58

fumés (poissons, viandes,...) (Arzayus et al., 2001 ; Dickhut et al., 2000 ; Feix et al., 1995 ; Garcia-Falcon et al., 1996 ; Vierle et al., 1999 ; Wikström et al., 1999).

L'une des sources principales en HAPs est le rejet des moteurs à explosion qui participent à la pollution généralisée des sols en zones urbaines et industrielles (Kipopoulou et al., 1999 ; Koeleman et al., 1999 ; Rachdawong et al., 1998 ; Trapido, 1999). Les fourneaux domestiques sont également particulièrement propices à la contamination de l'air ambiant par les HAPs de haut poids moléculaire (Oanh et al., 2000 ; Wornat et al., 2001). De plus, la production d'HAPs par combustion est fortement favorisée sous hautes températures et faible aération, notamment dans le cas de combustion en incinérateurs (Mastral et al., 1999 ; Mastral et al., 2000 ; Mastral et al., 2001 ; Vierle et al., 1999 ; Wang et al., 2001). Le seul HAP synthétisé industriellement est le Naphtalène. Il est largement utilisé dans l'industrie des colorants ou comme composant de produits de traitement des bois ou comme antimitose domestique. Ainsi, la multitude des sources de contamination en HAPs permet d'expliquer qu'ils puissent être aussi bien retrouvés dans les poussières atmosphériques (rejets industriels et gaz d'échappement) que dans les sols (retombées atmosphériques), les sédiments, les eaux de ruissellement (lessivage de l'asphalte par les pluies) et les boues (Feix et al., 1995 ; Juhasz et Naidu, 2000).

B1-3. Toxicité des HAPs

Les principaux risques d'exposition pour l'homme se situent donc au niveau de l'inhalation régulière de particules contaminées ou lors de l'ingestion d'aliments comme les produits alimentaires grillés ou fumés (jusqu'à près de 80 µg d'HAPs par kg de poisson fumé) (Feix et al., 1995). L'ensemble des personnes travaillant dans l'industrie de traitement du bois ou devant des fourneaux en locaux confinés ou utilisant du goudron et de l'asphalte sont particulièrement exposées aux HAPs avec un risque accru de cancer des poumons, de l'œsophage et de la peau (Boffetta et al., 1997 ; Partanen et Boffetta, 1994 ; Wornat et al., 2001).

Les propriétés mutagènes des HAPs sont connues depuis les années 30, notamment pour le Benzo(a)pyrène (Cook et al., 1933). Cependant, les mécanismes d'induction de tumeurs par les HAPs n'ont été élucidés qu'à partir des années 70 (Sutherland et al., 1998). Afin de posséder un effet mutagène effectif, une activation métabolique des HAPs est nécessaire. En effet, la molécule mère doit être préalablement transformée dans l'organisme humain par des enzymes de type monooxygénases comme le cytochrome P-450 (voir **Figure B2**). Les HAPs

transformés (HAPs diol-époxyde) sont alors particulièrement réactifs avec l'ADN, l'ARN et les protéines cellulaires, créant ainsi de nombreuses mutations irréversibles et induisant, par conséquent, la formation de tumeur. L'organisme humain possède toutefois des capacités d'adaptation en réponse à ces agents mutagènes et une exposition chronique aux HAPs provoque à terme la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre les formes dérivés cancérogènes (Sutherland et al., 1995).

Sur l'ensemble des HAPs connus, le Benzo(a)pyrene est potentiellement le plus cancérogène. Les mécanismes d'action du Benzo(a)pyrene ont été largement étudiés dans l'organisme et sont désormais bien connus (voir **Figure B2**). D'autres HAPs sont également reconnus comme étant fortement génotoxiques et cancérogènes, comme le Fluoranthène, le Benzo(b)fluoranthène, le Benzo(k)fluoranthène, le Chrysène, le Benzo(ghi)pérylène et l'Indéno(123cd)Pyrène (Feix et al., 1995 ; Reeves et al., 2001). A l'inverse, le Naphtalène reste le seul HAP peu toxique et l'ingestion accidentelle d'une boule d'antimite domestique (soit environ 4 g de Naphtalène) n'engendre que des troubles sans gravité (Sutherland et al., 1995).

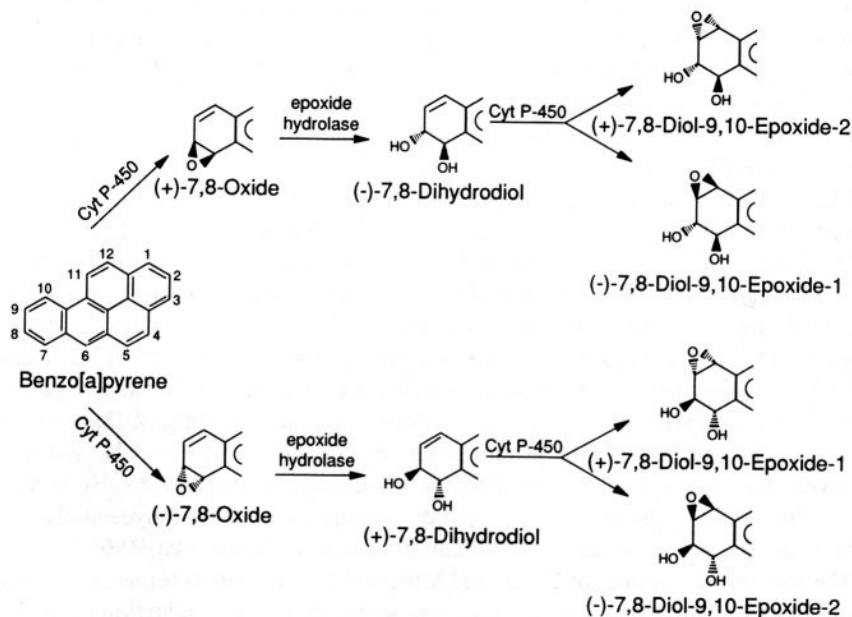


Figure B2 : Schéma d'activation métabolique du Benzo(a)pyrene dans une cellule d'organisme supérieur (Sutherland et al., 1995).

B1-3. Réglementation et teneurs en HAPs dans les boues

Compte tenu de leur faible solubilité dans l'eau (de quelques mg.l^{-1} à moins de $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$), de leur relative ubiquité dans l'environnement et d'une certaine facilité à s'adsorber fortement sur la matière organique, les HAPs se retrouvent majoritairement dans les boues de station d'épuration par simple sédimentation dans les décanteurs (Braidia et al., 2001; Ghosh et al., 2001; Feix et al., 1995). En effet, le taux d'épuration en HAPs par décantation au cours du traitement d'eaux usées contaminées est en moyenne supérieur à 95 %. Le piégeage des HAPs dans les boues se situe essentiellement au sein des décanteurs primaires qui présentent des facteurs de concentration de l'ordre de 25 à 150 (voir **Tableau B2**). Conséquence de cette concentration des HAPs dans les boues, leurs teneurs en zones urbaines atteignent en moyenne entre $0,01$ à $10 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ (en France) (Feix et al., 1995). En milieu industriel (traitement du bois), il est possible de mesurer des concentrations supérieures à $100 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ et certaines boues de zones fortement contaminées présentent des teneurs en HAPs totaux jusqu'à près de $1015 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ (USA) (Feix et al., 1995). De plus, sur une longue période d'étude (20 ans), Wild et al. (1990) ont montré une certaine persistance de la contamination en HAPs dans les boues d'une station d'épuration urbaine (UK), les teneurs variant entre 18 et $125 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ avec une moyenne totale de $50 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$.

Tableau B2 : Devenir des HAPs en station d'épuration des eaux usées (d'après Feix et al., 1995).

COMPOSES	Abattement dans les eaux usées (%)	Facteur de concentration dans les boues primaires	Facteur de concentration dans les boues secondaires
Naphthalène	96	25	1,4
Fluorène	98	100	1,0
Phénanthrène	97	76	1,7
Anthracène	97	140	3,0
Fluoranthène	95	110	8,7
Pyrène	94	130	4,4
Benzo(a)anthracène	98	140	5,0
Chrysène	97	150	7,0

Les boues urbaines représentent donc un point sensible de concentration des HAPs dans la filière d'épuration des eaux. Même si les concentrations en HAPs restent relativement faibles (de l'ordre du $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$), les caractéristiques de persistance dans l'environnement des HAPs (demi-vies dans les sols de quelques mois à plus de 9 ans (Cui, 1993)) ainsi que leur toxicité élevée à faibles concentrations font que les boues contaminées en HAPs peuvent présenter un caractère nuisible pour l'environnement en cas d'épandage agricole (voir **Tableau B3**).

Tableau B3 : Concentrations moyennes et maximales en HAPs mesurées dans les boues urbaines en France, réglementation en vigueur et $\frac{1}{2}$ vie moyenne dans les sols (d'après Feix et al., 1995).

COMPOSES	Concentration maximale (en $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$)	Concentration moyenne (en $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$)	Réglementation en vigueur (en $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$)	Demi-vie dans les sols (mois)
Naphtalène	6700	11	-	1 à 2
Fluorène	33	2	-	1 à 2
Phénanthrène	260	4,6	-	1 à 7
Anthracène	260	4,3	-	2 à 20
Fluoranthène	250	2,8	5	5 à 20
Pyrène	43	3,1	-	12 à 60
Benzo(a)anthracène	38	traces	-	12 à 36
Chrysène	38	1,8	-	12 à 36
Benzo(b)fluoranthène	60	2	2,5	12 à 24
Benzo(k)fluoranthène	9,5	1,8	-	24 à 72
Benzo(a)pyrène	25	4,2	2	2 à 20
Dibenzo(ah)anthracène	13	traces	-	12 à 24
Benzo(ghi)pérylène	9,2	0,73	-	12 à 110
Indeno(123cd)pyrène	8	1,3	-	12 à 24

Certes, l'apport par épandage de boues contaminées sur des sols agricoles ne constitue pas forcément la source principale en HAPs, ceux-ci pouvant provenir en grande partie des retombées atmosphériques. Mais l'apport en HAPs par les boues reste facilement quantifiable et contrôlable par l'imposition de concentrations maximales (Feix et al., 1995). Ainsi, d'un point de vue législatif, les normes applicables sont particulièrement drastiques et imposent des concentrations maximales relativement faibles. Parmi les quelques 74 isomères connus et isolés à ce jour, seulement 16 HAPs sont actuellement surveillés et réglementés par les instances européennes et par l'agence de protection de l'environnement américaine (Environmental Protection Agency ou EPA). La réglementation ne concerne pas pour l'instant certains HAPs méthylés ou mono-substitués (oxygène, chlore ou autre) qui peuvent pourtant présenter des propriétés hautement carcinogènes (Lagoy et Quirk, 1994). Ainsi, les 16 HAPs dits prioritaires et listés par l'EPA sont les suivants : le Naphtalène, l'Acénaphène, l'Acénaphylène, le Fluorène, le Phénanthrène, l'Anthracène, le Fluoranthène, le Pyrène, le Benzo(a)anthracène, le Chrysène, le Benzo(b)fluoranthène, le Benzo(k)fluoranthène, le Benzo(a)pyrène, le Dibenz(a,h)Anthracène, le Benzo(g,h,i)pérylène et l'Indeno(1,2,3-c,d)Pyrène.

En France, seulement trois HAPs sont actuellement soumis à réglementation pour les boues urbaines avant épandage (arrêté du 08 Janvier 1998 paru dans le Journal Officiel du 31 Janvier 1998) : le Fluoranthène ($< 5 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$), le Benzo(b)fluoranthène ($< 2,5 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$) et le Benzo(a)pyrène ($< 2 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$) (voir **Tableau B3**). Cependant, avec l'harmonisation de la législation européenne et la volonté politique d'obtenir une certaine pérennité de la filière de valorisation agricole des boues urbaines, ces normes vont vraisemblablement tendre à se renforcer. La prochaine étape de normalisation devrait aboutir à une concentration maximale de $6 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ pour la somme de 11 HAPs (Acénaphène, Phénanthrène, Fluorène, Fluoranthène, Pyrène, Benzo(b)fluoranthène, Benzo(j)Fluoranthène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(a)pyrène, Benzo(ghi)pérylène, Indeno(123-cd)Pyrène) (source en cours de validation par la commission européenne). Toutefois, afin qu'une telle législation puisse s'appliquer, il est nécessaire de posséder des méthodes fiables de détermination des concentrations en HAPs dans les boues.

B2. Méthodes d'analyse des HAPs :

Des propriétés hautement hydrophobes associées à de faibles concentrations dans l'environnement ainsi qu'à une certaine propension à interagir fortement avec les matières organiques, font que l'analyse des HAPs au sein d'une matrice solide (sédiments, sols, boues) se révèle être d'une grande complexité. La mise au point d'une chaîne analytique est d'autant plus difficile si la méthode d'analyse est utilisée ultérieurement lors d'études à l'échelle du laboratoire (fortes contraintes de fiabilité et de reproductibilité à partir de faibles volumes d'échantillons et pour de faibles concentrations en HAPs (de l'ordre du $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ ou de dizaine de $\mu\text{g.l}^{-1}$). Suite aux progrès techniques survenus dans le domaine de l'analyse, des méthodes ont récemment été mises au point dans différents laboratoires d'analyse agréés et autres agences gouvernementales internationales. Aux Etats-Unis, l'EPA (Environmental Protection Agency) propose depuis 1986 une méthode d'analyse des HAPs présents dans les eaux usées (méthode 8310) et, depuis 1996, deux protocoles d'extraction des HAPs à partir de matrices solides soit par extraction au Soxhlet (méthode 3540C), soit par extraction sous pression (méthode 3545). Cependant, ces méthodes utilisent des quantités relativement importantes d'échantillons (de 20 à 100 g) et les résultats obtenus ne fournissent en général qu'une valeur approchée des concentrations en HAPs, ce qui reste peu satisfaisant pour des études menées en laboratoire : citons pour exemple la méthode EPA-8310 pour l'analyse des HAPs à partir d'eaux contaminées qui fournit des teneurs en HAPs avec des erreurs relatives de reproductibilité comprises entre 21 et 44 %.

Au niveau européen, une prénorme sur l'analyse des HAPs propose une méthode suffisamment large pour choisir l'équipement et les paramètres opératoires tant au niveau de l'extraction des HAPs qu'au niveau de leur analyse (AFNOR, 001). Chaque expérimentateur possède ainsi de nombreux choix pour équiper sa chaîne analytique et pour optimiser son fonctionnement en fonction de ses propres besoins. En contrepartie, les erreurs d'analyse entre laboratoires, pourtant agréés, peuvent atteindre jusqu'à 300 % sur un même échantillon. De tels erreurs peuvent conduire à des interprétations erronées des phénomènes observés, voire même à l'acceptation de boues en épandage alors qu'elles sont considérées comme contaminées et impropres à l'épandage par d'autres laboratoires (voir **Figure B3**) (Acobas et al., 1997).

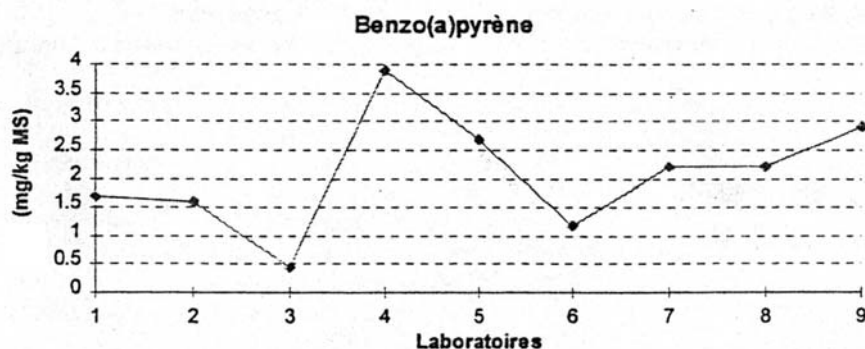


Figure B3 : Concentrations en Benzo(a)pyrène mesurées dans des boues urbaines contaminées et fournies par 9 laboratoires d'analyse agréés. La concentration maximale en Benzo(a)pyrène tolérée pour l'épandage agricole est de $2 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ (Acobas et al., 1997).

Ainsi, compte tenu de la diversité des techniques utilisables et des variations dans les résultats obtenus, il est important de passer en revue l'ensemble des méthodologies existantes afin de bien guider les choix, en fonction de ses propres contraintes, du matériel d'analyse et des paramètres à étudier lors de la mise en place d'une chaîne d'analyse. Cependant, malgré la grande diversité des techniques, il est nécessaire de prévoir les grandes étapes suivantes :

- 1- Le stockage et le traitement de l'échantillon à extraire.
- 2- L'extraction des HAPs de la matrice solide et/ou liquide.
- 3- La purification de l'extrait avec ou sans évaporation à sec pour le resuspendre dans un solvant compatible avec l'analyse.
- 4- L'analyse de l'extrait obtenu et la quantification des HAPs en présence.

Pour chaque étape, de nombreuses possibilités d'équipement peuvent être utilisées. L'ensemble des techniques couramment citées dans la littérature sont présentées ci-dessous. A noter que la plupart de ces techniques, généralement utilisées pour l'analyse des micropolluants, ne sont validées que dans le cas de sols ou de sédiments contaminés. Divers problèmes supplémentaires peuvent être apportés par l'analyse d'une matrice boue du fait de sa haute teneur en composés organiques, de sa nature fortement dépendante de l'origine des effluents traités et des faibles concentrations en composés traces organiques. En effet, les boues contiennent dans différentes proportions divers composants organiques qui peuvent interagir avec les HAPs, comme les lipides, les détergents, les substances humiques, etc... : c'est l'effet matrice (Miège et al., 1998). Ainsi, pour chaque type de boue, il pourra être nécessaire de vérifier et de réajuster les paramètres d'extraction et d'analyse (Heemken et al., 1997).

B2-1 Préparation et traitement des échantillons :

Le stockage des échantillons de boues doit se faire obligatoirement à froid (- 20°C) et à l'abri de la lumière pour éviter tout phénomène de photolyse (AFNOR, □001 ; Miège 1999). Une étape de séchage de l'échantillon est de plus nécessaire dans le cas de technique d'extraction sur phase solide utilisant un solvant organique non compatible avec l'eau. Certaines techniques d'extraction comme le Soxhlet ou l'extraction accélérée par solvant (ASE) sont en effet très sensibles à la présence d'eau dans l'échantillon, les rendements d'extraction chutant à moins de 50 % pour des échantillons d'une siccité de 60 % (Heemken et al., 1997). De plus, lors de l'étape de séchage, la température ne doit pas excéder 40°C afin de ne pas perdre les HAPs par volatilisation (AFNOR, □001). Sous ces conditions, le séchage thermique sous étuve et le séchage chimique par ajout de sulfate de sodium anhydre sont sensiblement équivalents et ne présentent pas de pertes particulières en HAPs (Berset et al., 1999). Par contre, la lyophilisation provoque des pertes significatives par volatilisation des plus petits HAPs, comme le Naphtalène (Miège et al., 1999; Perez et al., □001b). Suite au séchage et avant extraction des HAPs, la matrice solide (boue, sol, sédiment) doit être moulue et finement tamisée (de 0,1 à 3 mm) afin de favoriser la pénétration du solvant et faciliter l'homogénéisation de l'échantillon.

B2-2. Méthodes d'extraction des HAPs

B2-2-1. Extraction des HAPs d'une matrice liquide aqueuse

Afin de quantifier la présence d'HAPs dans une fraction liquide aqueuse (eaux de ruissellement, eaux urbaines,...), l'extraction sur phase solide (SPE) est la technique la plus utilisée, de par sa facilité de mise en oeuvre, sa rapidité d'analyse et son efficacité d'extraction. Elle permet en effet de concentrer spécifiquement ces composés présentant une faible solubilité dans l'eau (de l'ordre du $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour les plus gros HAPs).

En effet, le principe de la SPE est de piéger dans un premier temps les HAPs de l'échantillon aqueux par passage sur une colonne d'adsorption (souvent une colonne greffée en C_{18}). Les HAPs sont ensuite élués à l'aide d'un solvant très apolaire où ils sont parfaitement miscibles (comme l'hexane ou le toluène). L'avantage d'une telle technique est de fournir un extrait concentré avec peu de contaminants. Cependant, cette technique d'extraction reste peu performante au regard des faibles rendements d'extraction obtenus

(généralement entre 30 % et 80 %) et des fortes erreurs de reproductibilité (5 à 20 %), conséquences directes des faibles concentrations rencontrées dans les eaux et des limites de détection des appareils de quantification (*Fladung, 1995 ; Hagestuen, 1999 ; Madichie et al., 1999 ; Negro et Alpendurada, 1998*). A noter que, de par son principe, la SPE peut également être utilisée lors de la purification/concentration de l'échantillon après extraction, ou étape de « clean up ».

De nouvelles techniques plus performantes sont actuellement en cours de mise au point avec notamment l'utilisation de micro-colonnes d'élution où les HAPs sont détectés par interférence laser, technique permettant d'abaisser le seuil de détection (*DeBeer et al., 1999*), ou avec l'utilisation d'anticorps anti-HAPs beaucoup plus spécifiques que la chromatographie d'adsorption (*Perez et al., 1998*).

B2-2-2. Extraction des HAPs d'une matrice solide

Le principe de l'extraction des HAPs d'une matrice solide consiste en leur transfert de la phase organique où ils sont plus ou moins fortement adsorbés vers une phase liquide où ils seront parfaitement solubilisés et où leur quantification sera possible. Cette solubilisation se réalise à l'aide de solvants appropriés, le plus souvent : acétonitrile, dichlorométhane, toluène ou hexane. Les HAPs étant des composés semi-polaires, voire apolaires pour les plus gros poids moléculaires, ils ne peuvent donc être solubilisés de manière optimale qu'en présence de solvants organiques compatibles apolaires (*Miège, 2000*).

Afin de mieux comprendre le processus d'extraction, il a récemment été proposé un modèle cinétique divisant le phénomène en plusieurs grandes étapes, c'est à dire une première désorption des HAPs de la surface du noyau imperméable de la particule, puis leur diffusion dans la couche organique poreuse jusqu'à l'interface avec le solvant et enfin, leur solubilisation dans le solvant (voir **Figure B4**). Le rendement d'extraction peut donc être limité par l'une de ces trois étapes, c'est à dire soit la solubilisation (choix du solvant), soit la diffusion (finesse du tamisage agissant sur la surface d'échange totale), soit la désorption (nature des interactions HAPs-matrice). L'un des paramètres qui reste le moins accessible est la qualité des interactions entre HAPs à extraire et la matrice. En effet, les interactions entre particules organiques et HAPs peuvent être nombreuses et variées, soit de faible énergie comme des liaisons de nature hydrophobes ou de Van der Waals, les liaisons hydrogène ou de

transfert de charges (importants dans le cas des HAPs en raison de la forte délocalisation des électrons), soit de haute énergie comme les liaisons ioniques et, à l'extrême, les liaisons covalentes (Kästner *et al.*, 1999 ; Miège, 2000) (voir **Figure B5**). L'intensité des interactions entre composés organiques et HAPs dépendra essentiellement de la nature et de la quantité de matière organique contenue dans la matrice et du temps passé par les HAPs dans le milieu contaminé (Miège, 2000). Plus le temps de contact sera long, plus les liaisons seront complexes et gagneront en énergie. Les HAPs auront alors tendance à être fortement liés à des sites dits réactifs, souvent intraporeux jusqu'au plus profond de la matrice (Miège, 1999). Il est donc important que la technique d'extraction soit la plus drastique possible afin d'extraire un maximum d'HAPs. Pour cela, les méthodes d'extraction préconisées utilisent en général des solvants organiques sous haute température afin de dissocier la couche organique de diffusion et de faciliter la diffusion des HAPs dans la matrice. Les principales méthodes d'extraction sont les suivantes :

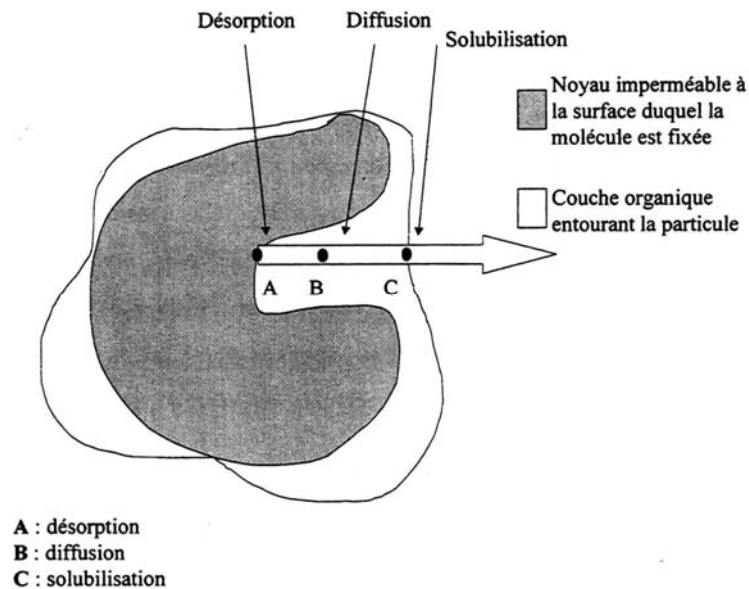


Figure B4 : Représentation du modèle cinétique d'extraction de Pawliszyn (*d'après Miège, 1999*).

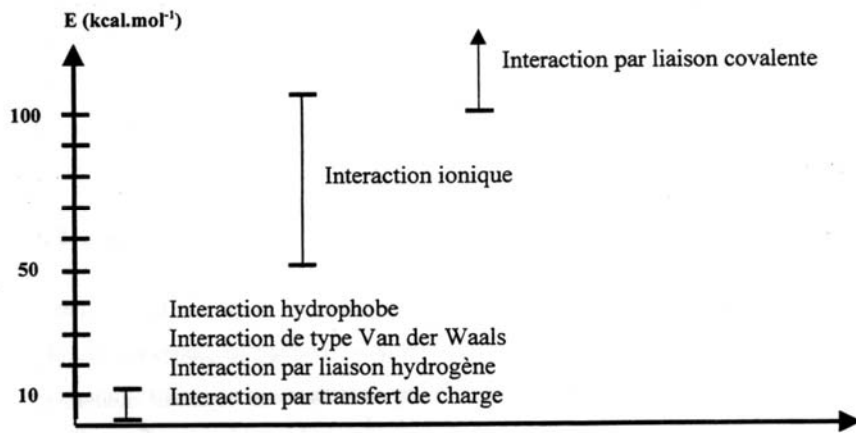


Figure B5 : Niveaux d'énergie des différentes interactions impliquées dans les liaisons HAP↔matrice solide organique (d'après Miège, 1999).

◆ **L'extraction sous agitation** est le procédé le plus simple et ne requiert que très peu d'investissement en matériel. Cette technique ne nécessite en effet que l'utilisation d'un solvant sous agitation. Un second solvant polaire peut être ajouté afin de favoriser l'extraction des HAPs par gonflage de la matrice solide. L'extraction pouvant s'effectuer successivement sur plusieurs cycles, le mélange solvant/analyte est ensuite récupéré par décantation et/ou centrifugation. Cette technique présente comme principaux inconvénients de fournir des rendements d'extraction peu reproductibles, de nécessiter un temps d'extraction relativement long (1 heure) et une grande consommation de solvant (50 à 200 ml.g_{MS}⁻¹) avec une étape d'évaporation/concentration de l'extrait obligatoire (risque de pertes des HAPs les plus légers par volatilisation) (Miège, 1999).

◆ **L'extraction par ultrasons** est une variante de l'extraction sous agitation, où le système d'agitation est remplacé par un bain à ultrasons sous faible puissance (5 W.cm⁻²). Le phénomène de cavitation créé par les ultrasons permet de dissocier les particules de l'échantillon et favorise la diffusion des HAPs dans le solvant. Toutefois, ce type de dissociation mécanique peut induire la formation de molécules risquant d'interagir avec les HAPs, notamment avec l'utilisation de solvants chlorés. L'extraction par ultrasons demande de grandes quantités de solvant (50 à 200 ml.g_{MS}⁻¹) et des temps d'extraction relativement longs (1 à 3 heures), 8 heures d'extraction permettant d'obtenir des performances de recouvrement entre 90 et 100 % (Guerin, 1999b ; Miège, 1999).

◆ **L'extraction assistée par micro-ondes (EM)** et l'extraction par micro-ondes focalisées (EMF) se pratiquent dans un solvant organique sous un champ de micro-ondes (2450 Mhz). La première technique se réalise en cellule fermée sous pression et la seconde en cellule ouverte avec focalisation des micro-ondes sur l'échantillon. Dans ce cas, les HAPs ne sont pas directement dégradés par les micro-ondes, mais peuvent réagir avec des produits secondaires en fonction de la nature de l'échantillon (Miège, 1999). L'intérêt dans l'utilisation de micro-ondes est essentiellement de favoriser la diffusion des HAPs par augmentation de la température en profondeur de l'échantillon. Le temps d'extraction est plus rapide que les méthodes précédentes (10 à 30 minutes). Cependant, le choix du solvant d'extraction est contraignant, celui-ci ne devant pas réagir avec les micro-ondes (solvant diélectrique) et doit permettre la solubilisation des HAPs. Les solvants classiquement utilisés, comme l'hexane et le toluène doivent alors être supplémentés avec au minimum 10 % d'un solvant plus polaire comme l'acétone ou le méthanol.

◆ **L'extraction par un fluide supercritique (SFE)** est une technique récente utilisant les propriétés physico-chimiques de fluides à l'état supercritique pour faciliter la désorption et la solubilisation des HAPs. En effet, sous certaines valeurs de température et de pression (pour le CO₂, le plus utilisé, respectivement 32°C et 74 bars), les fluides supercritiques possèdent une masse volumique proche des liquides (bon pouvoir solvant) et une viscosité proche des gaz ce qui favorise leur pénétration dans la matrice solide. De plus, les coefficients de diffusion des composés organiques dans ces fluides sont 10 à 100 fois plus élevés que dans le cas de liquides (Miège, 1999). Cette technique performante d'extraction ne requiert que peu de solvant (30 à 50 ml) et un temps d'extraction relativement court (10 à 40 min.) (Miège, 1998). Cependant, l'extraction par fluide supercritique reste peu sélective et demande obligatoirement une étape de purification avant analyse.

◆ **L'extraction à l'eau**, dans laquelle les HAPs sont pratiquement insolubles, est uniquement possible à l'état supercritique, sous haute température et haute pression. En effet, à l'état supercritique (Température > 374°C et Pression > 221 bars), l'eau présente une constante diélectrique proche du dichlorométhane (solvant apolaire) mais reste très corrosive (peu utilisable en pratique). En baissant la température à 250°C et la pression à 50 bars, l'eau approche les propriétés de l'éthanol ou du méthanol, tout en restant sous forme liquide, ce qui permet d'extraire bon nombre de composés organiques. Dans ce cas, la modification des paramètres pression/température permet de moduler le pouvoir solvant de l'eau et ainsi la

sélectivité de l'extraction, l'étape de purification de l'extrait obtenu n'étant donc plus nécessaire. De plus, cette technique ne demande qu'un temps d'extraction très court (20 min.) et ne requiert qu'une quantité de solvant limitée (15 ml) (McGowin, □001). L'étape de pré-séchage de l'échantillon peut également être évitée (Mc Gowin, □001). Toutefois, elle n'est que peu utilisée en pratique pour l'extraction des HAPs compte tenu de leur très faible polarité, surtout pour les plus gros poids moléculaire (Miège, 1999).

◆ **L'extraction au Soxhlet** est la technique la plus utilisée pour l'extraction des HAPs sur matrice solide. Cette méthode consiste en une série de cycles d'extraction par des vapeurs de solvant recondensées (système de réfrigération des vapeurs). Une fois l'échantillon placé dans une cartouche perméable au solvant, ce dernier est renouvelé à chaque cycle par siphonnage de la cartouche d'extraction suite à son trop-plein et est redistillé en continu par chauffage (voir **Figure B6**). De grandes quantités de solvant permettent de maintenir un gradient de concentration élevé entre le solvant et l'échantillon, favorisant ainsi la diffusion des HAPs. Les principaux désavantages de l'extraction au Soxhlet sont liés aux risques d'explosion avec l'utilisation de solvants à haute température, le temps d'extraction relativement long (entre 6 et 24 heures, voire 48 heures) et les grandes quantités de solvants consommées (entre 80 et 500 ml.g_{MS}⁻¹) (Guerin, 1999b). Malgré un coût d'appareillage peu élevé (verrerie), le coût d'analyse est important au regard de la consommation en solvant.

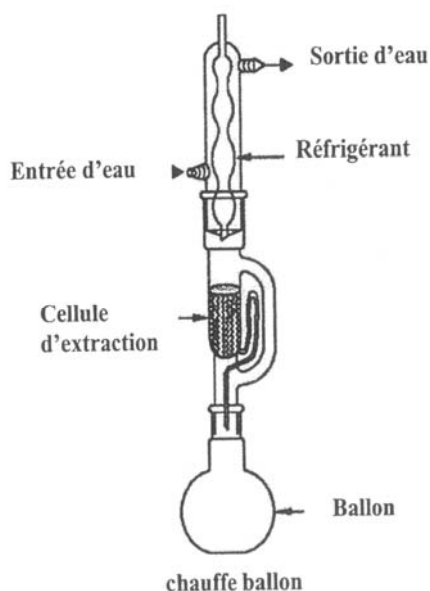


Figure B6 : Représentation schématique du système d'extraction au Soxhlet (Miège, 1999).

Une nouvelle technique automatisée, appelée Soxtec, permet de réaliser une série d'extraction en simultané plus rapide (environ 4 heures) en utilisant moins de solvant organique. Cette technique n'est toutefois pas encore couramment utilisée dans le cas de boues contaminées par des HAPs (Miège, 1999). Afin d'optimiser la méthode d'extraction des HAPs au Soxhlet, une multitude de conditions analytiques peuvent être envisagées au regard des nombreuses valeurs différentes de chaque paramètre, rencontrées dans la littérature (voir **Tableau B4**). Plusieurs paramètres à optimiser semblent néanmoins se distinguer comme le type de solvant utilisé, le temps d'extraction, la quantité d'échantillon utilisée et plus rarement précisée, la température d'extraction (souvent le solvant est porté à ébullition sans contrôle particulier).

Tableau B4 : Principaux paramètres retrouvés dans la littérature pour l'extraction au Soxhlet (' - - - ' = non communiqué).

Type de matrices	Quantité d'échantillon	Solvant utilisé	Temps d'extraction	Références
Boues	60 g	Hexane/Acétone (50/50)	6 h	AFNOR, 2001
Sols	50 g	Acétone	16 h	Eggen et al., 1998
Sols	20 g	Hexane/Acétone (50/50)	16 h	Goodin et al., 1995
Sols	10 g	DCM/Acétone (50/50)	48 h	Guerin, 1999b
Sédiment	3 g	Hexane/Acétone (50/50)	2,5 h	Heemken et al., 1997
Sédiments	10 g	Hexane/Acétone (51/49)	- - -	Hyötyläinen et al., 1999
Sols, Boues	10 g	Hexane/Acétone (50/50)	16 à 24 h	Joyce et al., 1998
Sols	- - -	Hexane	2,5 h	Kottler et Alexander, 2001
Sols	- - -	Benzène	5 h	Leduc et al., 1992
Boue	1 g	Dichlorométhane	6 h	Mangas et al., 1998
Sols	10 g	Dichlorométhane	6 h	Mangas et al., 1998
Sédiments	1,5 g	Toluène	24 h	Pettersen et al., 1999
Sols	10 g	Dichlorométhane	24 h	Saim et al., 1997
Boue	2 g	Dichlorométhane	6 h	Wild et al., 1993
Sols	10 g	Dichlorométhane	4 h	Wild et al., 1993
Sols, Boues	10 g	Hexane/Acétone (50/50) ou dichlorométhane	16 à 24 h	EPA méthode 3540C, 1996

♦ **L'extraction accélérée au solvant ou ASE (Accelerated Solvent Extraction)**

consiste en l'extraction des HAPs d'une matrice solide dans des conditions de forte pression et de haute température (supérieure au point d'ébullition des solvants). L'ASE étant une méthode développée depuis les années 1995 par la société DIONETM, encore peu d'études rapportent l'utilisation en routine de cette technique d'analyse (Richter et al., 1996) (voir **Tableau B5**).

Tableau B5 : Principaux paramètres retrouvés dans la littérature pour l'extraction accélérée par solvant (ASE). (DCM=dichlorométhane ; ' - - - ' = non communiqué)

Type de matrices	Quantité d'échantillon	Solvant utilisé	T° (°C)	Pression (bars)	Temps Statique	Références
Boues	1 g	Hexane/Acétone (50/50)	100	100	8 min.	AFNOR, 2001
Sols	20 g	Hexane/Acétone (50/50)	- - -	- - -	- - -	Gervaise et al., 1998
Sédiment	0,3 g	Hexane/Acétone (50/50)	100	140	5 min.	Heemken et al., 1997
Sols	- - -	Hexane/Acétone (50/50)	100	140	5 min.	Richter et al., 1995
Sédiments	- - -	Hexane/Acétone (50/50)	100	170	5 min.	Richter et al., 1996
Sols	7 g	DCM/ Acétone (50/50)	100	140	5 min.	Saim et al., 1997
Sols	7 g	Hexane /Acétone ou DCM/Acétone (50/50)	70 à 200	90 à 140	5 à 16 min.	Saim et al., 1998
Sédiments , sols, boues	- - -	DCM/Acétone (50/50)	100	140	5 min	Schantz et al., 1997
Sols, Boues	20 g	Hexane/Acétone (50/50)	100	100 à 140	5 min.	EPA méthode 3545

D'un point de vue méthodologique, le principe de l'extraction accélérée par solvant est de réaliser une extraction forcée des HAPs sous haute température, afin d'accélérer la diffusion des analytes au sein de la matrice, et sous haute pression afin de maintenir le solvant sous forme liquide (Huau et Compiano, 1996). La combinaison haute température - haute pression possède plusieurs types d'effets favorisant l'extraction des HAPs piégés au sein de la matrice solide (Richter et al., 1996) : le premier effet porte sur l'augmentation de la solubilité et du transfert de masse des solutés. En effet, l'utilisation de hautes températures aura tendance à augmenter significativement la solubilité des analytes dans le solvant et à augmenter également leur coefficient de diffusion (première loi de diffusion de Fick) (Schantz et al., 1997). L'introduction possible de solvant frais dans la cellule d'extraction, permet aussi de favoriser ce transfert de masse. Le second type d'effet concerne le déplacement de l'équilibre de surface où la forte pression force le solvant à pénétrer au sein de la matrice et la haute température tend à dissocier les interactions solutés-matrice causées par les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogène et autres attractions dipolaires entre analytes et sites actifs de la matrice. De par ses caractéristiques, l'ASE présente des conditions d'extraction relativement drastiques qui permettent un gain significatif de temps et de solvant. D'un point de vue technique, les principales étapes du processus d'extraction à l'ASE sont les suivantes :

- 1- Chargement de la cellule, introduction du solvant et mise sous pression.
- 2- Chauffage de l'échantillon et extraction statique.
- 3- Transfert de l'extrait vers le flacon de collecte et rinçage de l'échantillon avec du solvant frais.
- 4- Purge de la cellule et du système à l'azote (voir **Figure B7**).

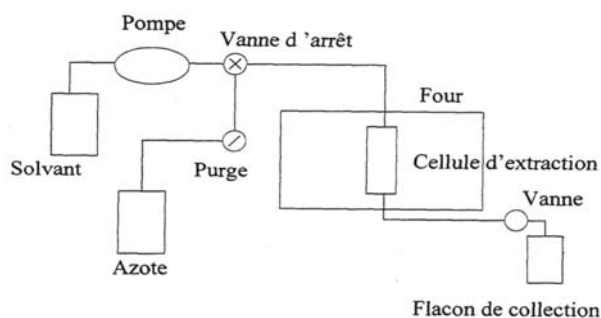


Figure B7 : Représentation schématique du système d'extraction accélérée par solvant ou ASE (Dionex, 1995).

Ces différentes étapes comprennent de nombreux paramètres susceptibles d'être optimisés comme la température d'extraction, le nombre de cycles d'extraction, le temps statique d'extraction, le mélange de solvant utilisé, la quantité d'échantillon, la quantité de solvant (% de remplissage) et le temps de purge (voir **Tableau B5**). Il est intéressant de noter que, pour la mise au point d'une méthode d'extraction à l'ASE, les solvants d'extraction peuvent être identiques à ceux utilisés lors de l'extraction au Soxhlet (Gervaise et al., 1998 ; Heemken et al., 1997). De son côté, le constructeur (Dionex, 1999) propose une méthode d'optimisation séquentielle vis à vis de l'ASE en faisant varier température, pression, nombre de cycles puis temps d'extraction statique. De récents résultats rapportent que, sur sols contaminés, aucune différence significative dans les performances d'extraction n'a été mesurée entre différents paramètres d'extraction (Saim et al., 1998). Cependant, en considérant l'ensemble de ces résultats, il semblerait que, pour quelques composés, la température d'extraction puisse quand même avoir un effet sur les rendements d'extraction totaux. Malgré la grande diversité des matrices utilisées (voir **Tableau B5**), peu de résultats concernent l'extraction des HAPs à l'ASE spécifiquement dans les boues urbaines (à des niveaux de concentrations faibles de l'ordre du $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$). Cette technique est pourtant particulièrement intéressante pour une utilisation en routine sur boues urbaines, car elle ne requiert qu'un temps d'extraction très court (20 minutes), qu'une faible quantité de solvant (20 ml) et l'automatisation sécurisée de l'extraction permet d'obtenir reproductibilité, sécurité et rapidité de l'extraction. En dépit d'un investissement important, le coût d'analyse en routine reste le

plus faible comparée aux autres techniques d'extraction (Dionex, 1995). De plus, l'ASE semblerait peu sensible à l'effet matrice de par les conditions drastiques utilisées, résultat démontré sur plusieurs échantillons de sols différents, mais restant à être vérifié dans le cas des boues (Gervaise et al., 1998). Toutefois, en raison de ces conditions d'extraction et de la faible sélectivité des solvants, une étape de purification des extraits reste le plus souvent nécessaire.

♦ **La comparaison des différentes méthodes d'extraction présentées ci-dessus** montre que chaque technique possède ces propres avantages et inconvénients et que le choix d'utiliser une méthode en routine peut dépendre de plusieurs critères propres à l'utilisation comme la sécurité, la rapidité d'extraction, le coût de l'analyse, les performances d'extraction, la fiabilité et la reproductibilité des analyses, etc... En ce qui concerne les performances d'extraction des HAPs, toutes ces méthodes, une fois optimisées, semblent donner des résultats similaires vis à vis de leurs rendements d'extraction (Berset et al., 1999 ; Heemken et al., 1997 ; Saim et al., 1997 ; Sun et al., 1998). Les plus petits HAPs comme le Naphtalène sont cependant le plus souvent perdus par évaporation lors de l'extraction, pour les techniques en cellule ouverte comme l'extraction au Soxhlet, ultrasons ou lors d'étape de changement de solvant par évaporation de l'échantillon (Guerin, 1999b). Deux méthodes se distinguent plus particulièrement pour une utilisation fréquente au sein d'un laboratoire : le Soxhlet qui reste la méthode classique d'extraction la plus couramment utilisée et qui sert de méthode de référence, et l'ASE qui permet une utilisation en routine de l'extraction des HAPs. Des résultats d'extraction sur sols contaminés ont montré que les performances d'extraction entre ASE et Soxhlet étaient relativement similaires entre eux et avec les autres techniques d'extraction, avec parfois même un certain gain d'extraction pour l'ASE pour les plus gros HAPs (Heemken et al., 1997, Saim et al., 1997, Richter et al., 1995, Gervaise et al., 1998, Schantz et al., 1997).

B2-3. Techniques de purification et de fractionnement des extraits (ou « clean up »).

Suivant l'extraction des solutés de la matrice solide et avant leur quantification, une étape de purification et/ou de concentration est parfois nécessaire pour éliminer les composés qui pourraient interférer par la suite avec l'analyse. Différents grands mécanismes de chromatographie peuvent alors être utilisés (d'après Miège, 1999) :

- ◆ la chromatographie d'adsorption où les composés interférants sont retenus sur une matrice adsorbante plus ou moins polaire (alumine, florasil, gel de silice), les HAPs étant non retenus et directement élués. Dans le cas de méthodes d'extraction en cellule fermée comme l'ASE ou la SFE, l'adsorbant polaire peu être ajouté dans la cellule d'extraction, retenant ainsi *in situ* les composés polaires non désirés.
- ◆ La chromatographie de partage ou de partage inversé permet de séparer les molécules d'intérêt en fonction de leur hydrophobicité. Très utilisée dans le cas des HAPs, soit le solvant est polaire et les HAPs sont retenus par la colonne greffée (généralement en C₁₈), soit le solvant est apolaire et les HAPs sont élués de la colonne (même principe que la SPE).
- ◆ La chromatographie de perméation où les macromolécules sont séparées en fonction de leur taille, permet de séparer lipides et HAPs.

B2-4. Techniques de séparation et de détection des HAPs.

La seconde grande étape d'une chaîne d'analyse des HAPs se situe au niveau de la quantification des HAPs dans les échantillons après extraction. Pour cela, deux grands types de couplage, colonne de séparation - détecteur de pics d'intérêt, existent :

B2-4-1. Analyse par GC-MS, GC-ECD ou GC-FID

Le premier type d'analyse consiste en une chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée soit à un spectromètre de masse (GC-MS), soit à un détecteur par capture d'électrons (GC-ECD), soit à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). La chromatographie en phase gazeuse est utilisée dans le cas de molécules volatiles ou semi-volatiles, comme les HAPs. Le détecteur le plus utilisé est le spectromètre de masse (MS) qui fournit une description complète des molécules et des isomères étudiés. Les seuils de détection, entre 10 et 80 pg, sont équivalents à ceux de la détection par fluorescence, technique considérée comme étant la plus sensible (*Castello et Gerbino, 1993*). Le spectromètre de masse permet, de plus, une quantification sur des gammes de concentrations plus larges que pour le fluorimètre qui sature plus rapidement (*Berset et al., 1999*). Cependant, la grande sensibilité de cette technique de détection fournit des chromatogrammes relativement complexes à interpréter où un grand nombre de molécules interférantes sont aussi identifiées. Une étape de purification et de fractionnement poussé peut alors être nécessaire. L'analyse et la quantification des molécules d'intérêt sont d'autant plus complexes que la matrice contient de nombreuses

molécules organiques différentes, comme dans le cas des boues. En contrepartie, la spectrométrie de masse permet de détecter les intermédiaires de réaction facilement identifiables à partir de bibliothèques de molécules ou en utilisant des molécules marquées avec un isotope ^{13}C (si elles sont auparavant extraites et séparées) (Castello et Gerbino, 1993 ; Richnow et al., 1998 ; Richnow et al., 2000 ; Zink et Lorber, 1995). Outre la spectrométrie de masse, la détection par ionisation de flamme s'effectue par mesure de la conductivité électrique des ions formés suite au passage de la molécule d'intérêt dans une flamme. Cette méthode est relativement universelle et la réponse est plus ou moins proportionnelle aux nombres de carbone du composé étudié (indépendance vis à vis du groupe chimique) (Miège, 1999). De même, la détection par capture d'électrons mesure un changement de conductivité électrique des molécules due à leur capture d'électrons libres. Ces deux modes de détection (FID et ECD) sont très utilisés pour l'analyse des HAPs mais restent relativement peu sélectifs et demandent un fractionnement rigoureux avant toute analyse (Miège, 1999).

B2-4-2. Analyse par RP-HPLC-Fluo ou RP-HPLC-PDA

Le second type d'analyse est basé sur le couplage de la chromatographie liquide à hautes performances en phase inverse (RP-HPLC) associé à un détecteur soit Fluorimétrique (FLUO), soit d'absorption UV à barrette de diodes (PDA). Depuis les années 1970, les analyses par HPLC ont permis d'obtenir de meilleurs résultats en terme de spécificité de séparation que les techniques utilisant une chromatographie gazeuse, notamment au niveau de matrices complexes comme les boues ou les sols (Wise et al., 1993). La technique d'analyse la plus utilisée est la chromatographie liquide en phase inverse (Reverse phase-HPLC ou RP-HPLC) où la phase stationnaire est moins polaire que le solvant, la séparation s'effectuant en fonction de l'hydrophobicité des analytes (Swadesh, 1997). La phase séparative de la colonne est généralement une matrice greffée en C_{18} (18 atomes de carbone) possédant les meilleures résolutions de pics (Hesselink et al., 1995). En fonction du mode de synthèse (richesse en silane et silanol lors de la réaction), la phase stationnaire peut être classée comme étant monomérique ou polymérique. Il s'avère que les phases polymériques sont les plus sélectives avec une meilleure séparation des pics d'isomères. D'une composition beaucoup plus aléatoire en terme de liaison support – C_{18} , les phases polymériques permettent également la séparation par encombrement stérique des isomères. En fonction du constructeur, un même type de colonne greffée en C_{18} peut présenter une différence de sélectivité vis à vis des HAPs. Wise et al. (1993) ont ainsi identifié expérimentalement les différentes sélectivités de plusieurs

colonnes et certaines d'entre elles sont particulièrement performantes pour la séparation des HAPs, comme la Bakerbond-C₁₈ Wide pore, Supelcosil LC-PAH, Vydac 201TP,... Outre le type de colonne utilisée, de nombreux autres paramètres peuvent être optimisés pour une meilleure séparation et détection des pics. Pour l'ensemble des colonnes utilisées, il ressort que la température de migration est l'un des facteurs d'analyse des plus importants à contrôler. Sa régulation est nécessaire afin d'éviter les variations du flux d'élution et une faible reproductibilité d'analyse (Swadesh, 1997). De plus, il a été montré que l'efficacité de séparation est inversement proportionnel à l'augmentation de la température d'élution (Hesselink et al., 1999 ; Wise et al., 1993). Des températures d'élution supérieures à 15°C conduisent très rapidement à une mauvaise séparation des pics d'intérêt (Ewen et al., 1993 ; Hesselink et al., 1999). De la même manière, l'allongement du gradient d'élution favoriserait la séparation des pics d'HAPs (Hesselink et al., 1999). Une élution isocratique des HAPs (pas de gradient) n'est pas recommandée du fait que ce type d'élution est fortement sensible face au changement de composition des échantillons (Swadesh, 1997). Enfin, la présence d'oxygène dissous dans les solvants d'analyse provoque non seulement, par la formation de bulles de gaz à l'intérieur de la colonne de séparation, des variations de débit donc une plus faible reproductibilité de l'analyse, mais inhibe également jusqu'à 20 fois la fluorescence des solutés d'intérêt (HAPs). Il est donc nécessaire de prévoir un procédé de dégazage des solvants. Afin d'éviter une rapide réabsorption d'oxygène, la fluorescence pouvant diminuer de moitié en moins de 10 heures sans dégazage, il est préférable de dégazer les solvants en mode continu (Garrigues et al., 1997). Dans ce cas, l'utilisation d'hélium est recommandée pour sa très faible solubilité dans la plupart des solvants et sa faible réactivité (Swadesh, 1997).

Suivant la séparation des HAPs par RP-HPLC, deux grands modes de détection sont possibles, soit par mesure de l'absorption des rayons ultraviolets (caractéristique des composés aromatiques), soit par mesure de la fluorescence émise après excitation des molécules d'HAPs. Pour le premier type de détection, une barrette de diodes (PDA ou PhotoDiodeArray) permet d'effectuer plusieurs mesures d'absorbance simultanément sur une large plage de longueurs d'onde. Il est ainsi possible d'obtenir un spectre d'absorption caractéristique de chaque molécule. Cette technique est essentiellement utilisée pour identifier les pics des chromatogrammes, mais elle peut être également utilisée pour quantifier les HAPs dans l'extrait obtenu (Touraud et al., 1998). Le second type de détection par fluorescence (Fluorimètre) possède une plus grande sensibilité. Il est donc plus approprié pour quantifier les HAPs en faible concentration dans un milieu complexe. De plus, la détection par

fluorescence est spécifique pour chaque HAP, un couple optimal de longueurs d'onde d'excitation et d'émission étant bien défini pour chaque molécule. La détection par fluorescence permet donc de s'affranchir, pour un extrait complexe, de la présence de molécules interférantes non fluorescentes. Ainsi, associé à la fluorimétrie pour la quantification des HAPs dans l'extrait, un PDA est fréquemment utilisé afin d'identifier les HAPs au sein d'un milieu complexe (*Wise et al., 1993*). Le détecteur fluorimétrique reste toutefois un appareil qu'il est nécessaire d'optimiser au regard des multiples combinaisons possibles et de la grande diversité généralement retrouvée dans la littérature, les longueurs d'onde optimales pouvant même dépendre du solvant utilisé (*Miller, 1999*) (voir **Tableau B6**).

En guise de conclusion concernant l'analyse des HAPs au sein d'une matrice complexe, encore peu d'études se focalisent sur les erreurs de reproductibilité que peuvent engendrer les multiples manipulations de l'échantillon (stockage, séchage, extraction, purification, analyse). Pourtant, la multiplication des étapes implique que la variabilité de l'analyse peut devenir très rapidement importante lors de mesure de faibles concentrations (cumul des erreurs). *Pino et al. (2000)* ont récemment montré que l'extraction assistée par micro-ondes couplée à une séparation par RP-HPLC et une détection par PDA pouvait présenter des erreurs de reproductibilité inférieures à 2 %, mais uniquement pour de fortes concentrations (de l'ordre du mg.l^{-1} à l'analyse). Dans le cas des techniques d'analyse d'HAPs dans des boues urbaines, *Perez et al. (2001b)* ont montré qu'une extraction aux ultrasons couplée à une GC-MS permettait d'obtenir des pourcentages de recouvrement corrects (de 60 % à 98 %), l'erreur de mesure étant encore trop importante : près de 10 % d'erreur de reproductibilité. De même, *Miège et al. (1998)* proposent une technique d'extraction par fluide supercritique et d'analyse par RP-HPLC et détection PDA ou par fluorimétrie. Cette méthode présente de bons pourcentages de recouvrement (70 % à 100 %), mais avec des erreurs de reproductibilité comprises entre 6 et 15 %. Or, l'étude de la biodégradation d'HAPs dans un réacteur de laboratoire n'autorise que peu d'erreur analytique, les performances de dégradation pouvant parfois être inférieures à l'erreur commise lors de l'analyse. Il semble donc nécessaire de développer une méthode qui puisse fournir des résultats fiables et reproductibles (erreur < 5 %) à partir de faibles volumes d'échantillon et pour de faibles concentrations en HAPs (de l'ordre du $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$, c'est à dire de l'ordre de quelques $\mu\text{g.l}^{-1}$ à l'analyse).

Tableau B6 : Principaux paramètres cités dans la littérature pour la séparation des HAPs par RP-HPLC, et pour leur détection par fluorimétrie. (ACN=Acétonitrile).

[HAP: N=N-Naphtalène, Fl=Fluoranthène, Ph=Phénanthrène, An=Anthracène, Flu=Fluoranthène, Py=Pyridine, B(a)A=Benzo(a)anthracène, Ch=Chrysène, B(b)F=Benzo(b)fluoranthène, B(k)F=Benzo(k)fluoranthène, B(a)P=Benzo(a)pyrène, DIB=Dibenz(a,h)anthracène, B(ghi)P=Benzo(ghi)perylène, In=Indeno(1,2,3-cd)pyrène] " - " : non communiqué

Solvant utilisé	Gradient linéaire	Dobit (ml/min)	PROGRAMME DE FLUORIMÉTRIE (excitation (nm) / émission (nm))													Références	
			Na	Fl	Ph	An	Flu	B	B(a)A	Ch	B(b)F	B(k)F	B(a)P	DIB	B(ghi)P		
ACN / Eau	isocratique	1	-	-	-	-	-	268 / 462	-	-	234 / 420	268 / 398	268 / 398	-	234 / 420	302 / 500	Afnor, 2001
ACN / Eau	25 min.	-	-	-	-	-	-	259 / 370	252 / 405	284 / 460	336 / 398	-	268 / 384	-	-	-	Aiken et al., 1998
ACN / Eau	35 min.	0,5	-	-	-	-	-	270 / 440	265 / 380	-	-	290 / 430	300 / 470	-	-	-	Castello et al., 1993
ACN / Eau	isocratique	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	284 / 404	-	-	-	Conte et al., 2001
ACN / Eau	5 min.	-	-	-	-	-	-	320 / 404	257 / 407	269 / 381	280 / 409	284 / 427	284 / 427	-	-	303 / 500	Falcon et al., 1996
Méthanol / Eau	16,5 min.	1	-	-	-	-	-	285 / 430	-	-	-	-	-	-	285 / 460	-	Garrigues et al., 1997
ACN / Eau	25 min.	0,5	280 / 330	250 / 370	250 / 405	280 / 450	270 / 390	265 / 380	-	290 / 430	290 / 410	290 / 430	300 / 500	-	-	-	Gramss et al., 1999
ACN / Eau	5 min.	2	-	-	-	-	260 / 430	285 / 385	-	305 / 405	-	-	-	300 / 455	-	-	Hesselink et al., 1995
Méthanol / Eau	isocratique	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	285 / 418	-	-	-	-	Kirk et al., 1990
ACN / Eau	25 min.	1	280 / 340	250 / 376	286 / 460	-	-	-	-	305 / 403	305 / 425	-	-	-	-	-	Kirso et al., 1998
ACN / Eau	5 min.	0,5	280 / 340	295 / 380	-	-	280 / 430	-	-	285 / 460	-	-	-	-	-	-	Mangas et al., 1998
ACN / Acétone	5 min.	-	-	-	-	-	280 / 450	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Miege et al., 1998
ACN / Eau	isocratique	0,6	265 / 304	254 / 348	251 / 402	285 / 441	275 / 374	287 / 388	267 / 363	254 / 437	304 / 411	285 / 406	287 / 395	281 / 409	295 / 496	-	Salicis et al., 1999
ACN / Eau	30 min.	2	280 / 340	249 / 362	250 / 400	285 / 450	333 / 390	285 / 385	260 / 360	295 / 425	286 / 405	286 / 405	300 / 500	-	-	-	Scilla et al., 1999
ACN / Eau	25 min.	0,5	-	-	-	-	280 / 388	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Wise et al., 1993
																	EPA méthode 8310, 1986

B3. La dégradation des HAPs

De par leur forte stabilité chimique, leur forte adsorption aux matières organiques et leur faible biodisponibilité, les HAPs sont des composés relativement réfractaires à toute dégradation par voie biologique et plus le nombre de cycles benzéniques est élevé, plus leur biodégradabilité est faible (Cerniglia, 1990; Fava et al., 1999; Guerin, 1999a; Mangas et al., 1998; Sutherland et al., 1995). Toutefois, une longue période de contamination d'un environnement naturel est souvent favorable à la sélection de micro-organismes performants qui peuvent soit participer au cométabolisme des HAPs, soit les utiliser comme seules sources de carbone et d'énergie (Kanaly et Harayama, 2000). Ainsi, de nombreux micro-organismes ont été isolés à partir de milieux fortement contaminés pour leurs propriétés de dégradation et de minéralisation des HAPs (Sutherland et al., 1995). Une rapide synthèse des nombreuses études traitant de ce sujet montre que les voies de dégradation sont d'une grande diversité et d'une grande complexité en fonction des micro-organismes impliqués et des conditions environnementales (aérobies, anaérobies). De plus, de nombreux autres facteurs, non biologiques, peuvent influencer, voire limiter, la biodégradation des HAPs dans un milieu complexe en fonction de la nature de la matrice (notion de biodisponibilité) et des conditions opératoires (risques de pertes non biologiques dites « abiotiques ») (Sutherland et al., 1995). Afin de mieux appréhender la problématique de l'étude de la biodégradation des HAPs, l'ensemble des mécanismes mis en jeu sont présentés ci-dessous.

B3-1. Mécanismes de dégradation des HAPs par voie biologique

B3-1-1. Biodégradation aérobie des HAPs

◆ Les voies métaboliques bactériennes :

Les mécanismes impliqués dans la biodégradation des HAPs par voie aérobie débutent le plus souvent par l'oxydation de l'un des cycles benzéniques par une dioxygénase, c'est à dire par la création de liaisons comportant un atome d'oxygène avec l'un des carbones du cycle. Cette attaque enzymatique conduit à la formation de *cis*-dihydrodiol-HAPs (fonctions alcools du même côté du cycle). Le cycle aromatique est ensuite ouvert par incorporation d'une autre molécule d'oxygène et peut alors être entièrement dégradé. De la même manière,

tous les cycles sont alors dissociés et dégradés les uns après les autres pour conduire à des intermédiaires à simple cycle, comme l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide phtalique ou le catéchol (Kanaly et Harayama, 2000; Kelley et al., 1993; Rehmann et al., 1998; Sutherland et al., 1995). Les principales souches bactériennes participant à la biodégradation des HAPs par ce mécanisme appartiennent généralement aux genres suivants: *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Mycobacterium* sp., *Flavobacterium* sp. (Aitken et al., 1998; Harayama, 1997; Fava et al., 1999; Kanaly et Harayama, 2000; Mueller et al., 1997; Zylstra et al., 1997).

Composé de deux cycles benzéniques, le Naphtalène est l'un des HAPs les plus simples et les plus facilement biodégradables. Sa dégradation par voie biologique a déjà été largement étudiée sous conditions aérobies et un nombre important de souches bactériennes utilisant le Naphtalène comme source unique de carbone et d'énergie ont pu être isolées. Ainsi, les voies métaboliques de dégradation du Naphtalène par des souches de *Pseudomonas* sp. ont été les premières voies étudiées et sont de nos jours parfaitement connues (Sutherland et al., 1995). Suite à l'oxydation de la molécule mère par une dioxygénase, la voie métabolique principale conduit à la production d'un intermédiaire de réaction à simple cycle : le salicylate (voir **Figure B8**). Des schémas similaires de dégradation du Naphtalène ont par la suite été observés chez d'autres espèces bactériennes comme *Burkholderia* sp., *Mycobacterium* sp., *Acinetobacter* sp et *Rhodococcus* sp. (Sutherland et al., 1995).

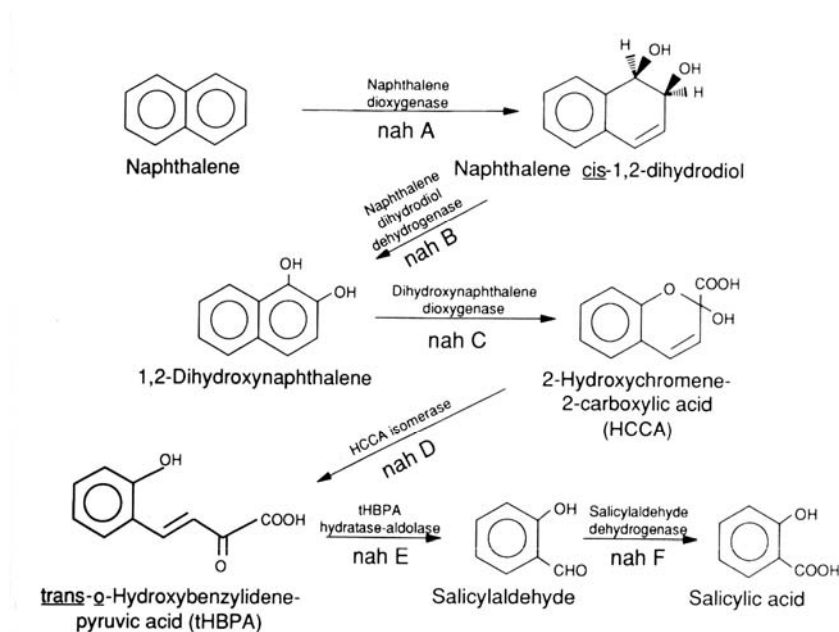


Figure B8 : Voie métabolique de dégradation du Naphtalène chez *Pseudomonas putida*. (d'après Sutherland et al., 1995).

Hormis le Naphtalène, certaines espèces du genre *Pseudomonas sp.* sont également capables de dégrader des HAPs de plus gros poids moléculaires, comme le Fluorène, l'Anthracène, le Phénanthrène, le Fluoranthène, et le Benzo(a)pyrène (Deziel et al., 1996 ; Fava et al., 1999 ; Resnick et Gibson, 1996 ; Sutherland et al., 1995). Les voies métaboliques alors mises en jeu sont similaires à celles du Naphtalène avec l'incorporation initiale d'une molécule de dioxygène par une dioxygénase suivie d'une dégradation en chaîne des cycles benzéniques (voir Figures B9 et B10).

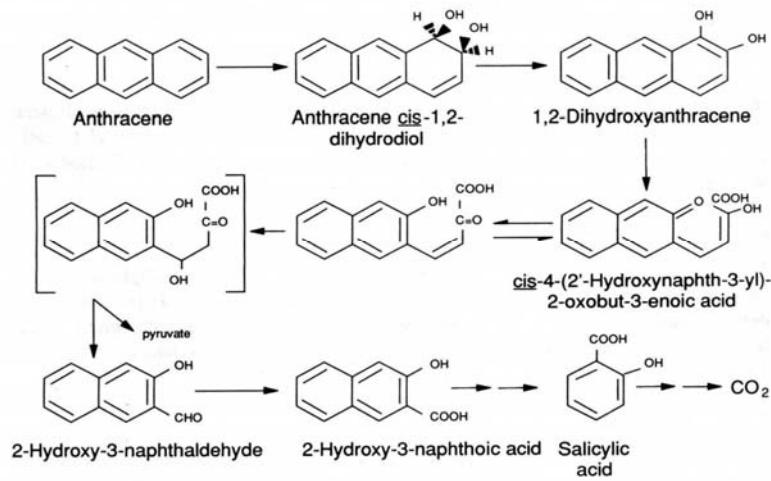


Figure B9 : Voie métabolique de dégradation de l'Anthracène chez *Pseudomonas aeruginosa*. (d'après Sutherland et al., 1995).

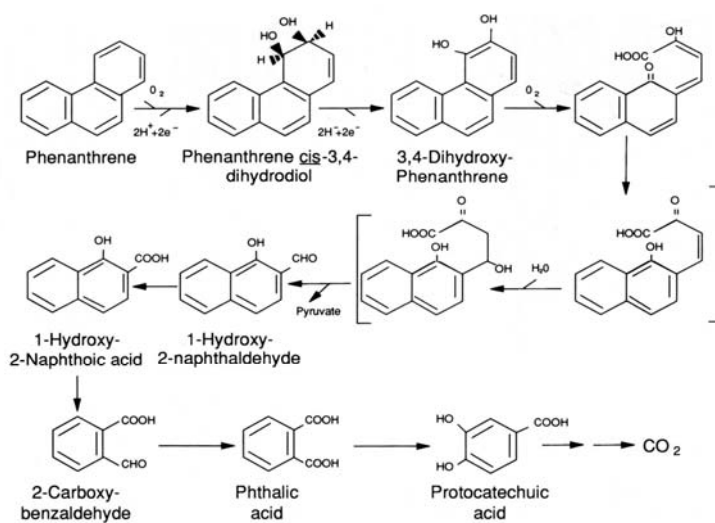


Figure B10 : Voie métabolique de dégradation du Phénanthrène chez *Pseudomonas sp.* (d'après Sutherland et al., 1995).

Alors que la minéralisation des HAPs est le plus souvent le résultat d'un cométabolisme par plusieurs micro-organismes, certaines espèces de *Pseudomonas* sp. et de *Rhodococcus* sp. sont capables de croître sur des milieux possédant comme seule source de carbone, le Fluoranthène, l'Anthracène, le Phénanthrène ou le Chrysène (Balashova et al., 1999 ; Deziel et al., 1996 ; Kanaly et Harayama, 2000 ; Romero et al., 1998 ; Sutherland et al., 1995). Boldrin et al. (1993) ont également isolé des souches possédant des spectres plus larges de dégradation en dégradant plusieurs HAPs, ces souches utilisant en effet un mélange de Phénanthrène, de Fluoranthène et de Pyrène comme seule source de carbone et d'énergie. De nombreux auteurs se sont plus particulièrement intéressés au cas de certaines espèces du genre *Mycobacterium* sp., qui sont également capables de minéraliser avec une grande efficacité les HAPs présents comme seule source de carbone et d'énergie (cas du Fluorène, du Phénanthrène, du Fluoranthène et du Pyrène) (Boldrin et al., 1993 ; Churchill et al., 1999 ; Guerin et al., 1988 ; Harayama, 1997 ; Kelley et al., 1993 ; Rehmann et al., 1998). Des souches de *Mycobacterium* PYR-1 ont notamment été isolées pour leurs propriétés performantes de dégradation d'HAPs comportant 3-,4-et 5 cycles benzéniques (Bogan et al., 2001 ; Kanaly et Harayama, 2000). Parfaitement adaptées à la dégradation des HAPs, certaines souches de *Mycobacterium* sp. montrent des caractéristiques physico-chimiques d'adsorption et d'adhérence aux surfaces hydrophobes particulièrement appropriées à la faible biodisponibilité des HAPs (Bastiaens et al., 2000).

Pour de plus gros HAPs comme le Benzo(a)anthracène et le Benzo(a)pyrène, seulement quelques espèces bactériennes des genres *Beijerinckia* sp., *Burkholderia* sp. et *Sphingomonas* sp. sont capables de les métaboliser, les produits de réaction n'étant pas encore identifiés (Bogan et al., 2001 ; Kanaly et Harayama, 2000). Le Benzo(a)pyrène peut également être dégradé par des espèces du genre *Pseudomonas* sp. (Sutherland et al., 1995). Dans tous les cas et quel que soit la voie de dégradation impliquée et les micro-organismes en présence, les produits finaux sont essentiellement des molécules simples à un cycle, comme le salicylate, le phtalate ou le catéchol qui peuvent elles-mêmes être dégradées et minéralisées par d'autres micro-organismes impliquant ainsi d'étroites relations entre les différentes espèces du consortium bactérien (symbiose, cométabolisme) (voir **Figures B9, B10 et B11**).

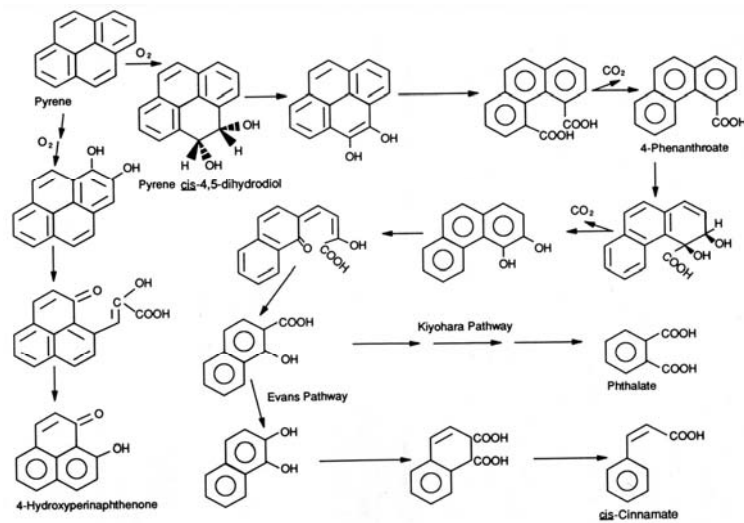


Figure B11 : Voies métaboliques de dégradation du Pyrène chez *Mycobacterium sp. PYR-1*. (d'après Sutherland et al., 1995).

◆ Métabolismes fongiques :

Certains champignons possèdent la propriété de dégrader les HAPs, mais cette fois-ci en créant deux liaisons alcools en *trans*, les fonctions alcool se répartissant de part et d'autre du cycle benzénique (en *cis* dans le cas de dioxygénases bactériennes (Resnick et Gibson, 1996)). Ces champignons, principalement des genres *Cunninghamella sp.*, *Penicillium sp.* ou *Aspergillus sp.*, produisent une enzyme particulière : la cytochrome P450 monooxygénase (Masaphy et al., 1996 ; Mercier, 1998 ; Pothuluri et al., 1999 ; Vergé-Leviel, 2001). Celle-ci transforme directement les HAPs par incorporation d'une molécule d'oxygène en formant un *trans*-dihydrodiol-HAP (voir **Figure B12**). La production de ces enzymes extracellulaires à l'action peu spécifique permet de transformer aussi bien les plus gros HAPs que les plus légers, les différences de potentiel de dégradation étant fonction des activités métaboliques bactériennes (Gramss et al. 1999). En effet, ces champignons ne se développent qu'en présence d'une source de carbone annexe et ne participent le plus souvent qu'à un cométabolisme des HAPs (Sutherland et al., 1995). Toutefois, Salicis et al. (1999) et Ravelet et al. (2000) ont récemment montré la capacité de certains Deutéromycètes des genres *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* et *Rhizopus sp.* d'utiliser le Fluoranthène et le Pyrène comme seule source de carbone et d'énergie.

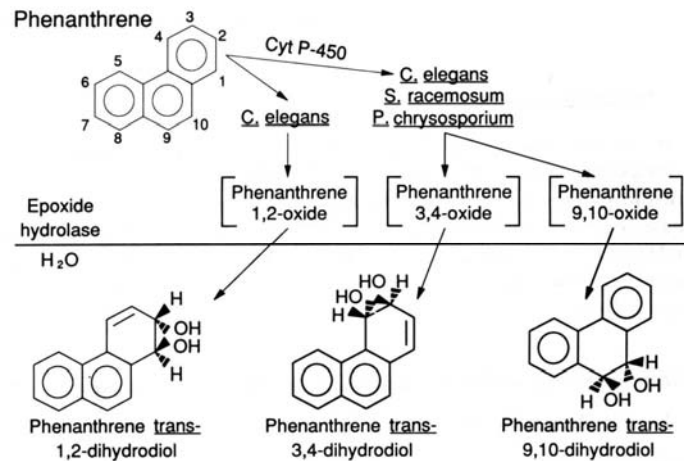


Figure B12 : Voie métabolique de dégradation du Phénanthrène par différentes espèces de champignons de la pourriture blanche (d'après Sutherland et al., 1995).

Une autre famille de champignons, dit "de la pourriture blanche" (white-rot fungi), participent également à la dégradation des HAPs en milieu naturel. Les principales espèces (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* et *Bjerkandera* sp.) possèdent la particularité de produire des enzymes, les lignine peroxydases, qui créent directement une double liaison entre un atome de carbone du cycle benzénique et un atome d'oxygène, le tout formant une quinone (Boyle et al., 1998 ; Harayama, 1997 ; Kotterman et al., 1998b ; Mercier, 1998 ; Rama-Mercier, 1998). Cette propriété de transformation des HAPs résulte du détournement du complexe enzymatique fongique servant à l'origine à dégrader les longues molécules de lignine, molécule ramifiée comportant de nombreux cycles aromatiques (Barr et Aust, 199□ ; Canet et al., □001). Inductibles, les lignine-péroxydases sont excrétées dans le milieu extracellulaire par ces champignons et participent avec une grande efficacité à la dégradation des HAPs (Barr et Aust, 199□ ; Boyle et al., 1998). A noter que d'autres champignons de la pourriture blanche (*Pycnoporus cinnabarinus*, *Bjerkandera adusta* et *Pleurotus ostreatus*) produisent une autre famille d'enzymes extracellulaires tout aussi performantes : les laccases (Mercier, 1998 ; Rama et al., 1998 ; Schützendübel et al., 1999). Sous l'action de l'ensemble de ces enzymes, la transformation initiale des HAPs augmente significativement leur biodégradabilité, l'attaque du cycle par les systèmes enzymatiques bactériens étant facilitée par la présence d'un groupe réactif (quinone) (Gramss et al., 1999 ; Kotterman et al., 1998a).

Enfin, il est intéressant de souligner que d'autres grandes familles de micro-organismes sont capables de transformer ou de dégrader les HAPs. Il a notamment été montré que certaines algues unicellulaires pouvaient métaboliser les plus petits HAPs (Naphtalène).

De même, Romero *et al.* (1998) ont isolé des souches de levure (*Rhodotorula glutinis*) utilisant le Phénanthrène comme seule source de carbone et d'énergie. Cependant, le rôle et l'implication de ces micro-organismes dans le catabolisme des HAPs au sein d'écosystèmes complexes restent encore mal connus (Kirso et Irha, 1998 ; Semple *et al.*, 1999).

◆ Caractéristiques génétiques de la biodégradation aérobie des HAPs :

D'un point de vue génétique, les gènes codant pour les enzymes de la voie de dégradation du Naphtalène sous conditions aérobies ont été largement étudiés. Leur organisation ainsi que leur régulation sont désormais bien connues (opéron *nah*). Une particularité intéressante de ce système réside en l'activation de l'opéron *nah* (*nah* A à D) par le produit principal du catabolisme du Naphtalène : l'acide salicylique (Chen et Aitken, 1999 ; Sutherland *et al.*, 1995) (voir **Figure B13**). A noter qu'il induit également les gènes participant à sa propre dégradation (gènes de l'opéron *nah* G à K).

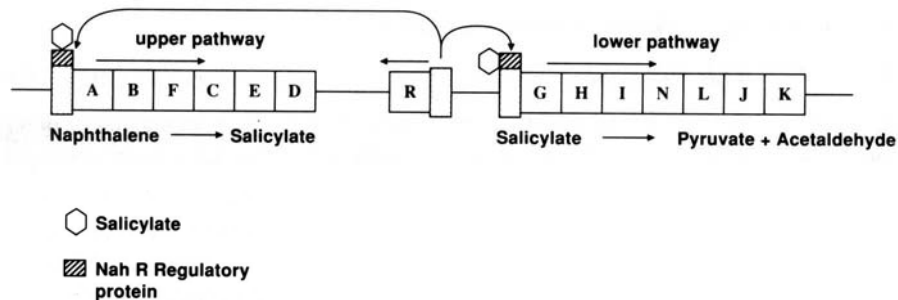


Figure B13 : Représentation schématique de l'organisation et de la régulation de l'opéron *nah* impliqué dans le catabolisme du Naphtalène (d'après Sutherland *et al.*, 1995).

Portés par un plasmide d'environ 100kb (dénommé NAH7), les gènes *nah* sont retrouvés dans de nombreux micro-organismes d'espèces différentes (*Pseudomonas* sp., *Comamonas* sp., *Rhodococcus* sp.) (Sutherland *et al.*, 1995). Les particularités de ces gènes sont de posséder une faible spécificité vis à vis des HAPs ainsi que d'être impliqués dans des voies de dégradation d'autres HAPs comme le Phénanthrène et l'Anthracène (Sanseverino *et al.*, 1999). De même, des études portant sur le métabolisme du Phénanthrène et de l'Anthracène ont montré la présence de plasmides proches de NAH7 dans des souches de *Pseudomonas* sp. et *Burkholderia* sp. (Balashova *et al.*, 1999 ; Sutherland *et al.*, 1995). Ainsi, les différents gènes *nah*,

impliqués dans la dégradation de divers HAPs et portés par des plasmides relativement proches, se différencient par des séquences proches mais distinctes dites *nah-like* (gènes *ndo*, *pah* et *dox*), ces différences pouvant expliquer la diversité des possibilités de dégradation (Lloyd-Jones et al., 1999). De plus, les gènes *nah* ou leurs dérivés peuvent se transmettre entre bactéries par l'intermédiaire du plasmide NAH7, ce qui expliquerait la diffusion de gènes de même origine dans de larges zones contaminées (Geiselbrecht et al., 1996 ; Geiselbrecht et al., 1998 ; Herrick et al., 1997 ; Whyte et al., 1997 ; Zylstra et al., 1997). Ces différents gènes résulteraient alors de l'évolution et de l'adaptation moléculaire (insertion, délétion, translocation, inversion,...) des souches bactériennes face aux différents HAPs et aux conditions environnementales (Hamann et al., 1999 ; Herrick et al., 1997). Citons pour exemple le cas de certaines souches psychrotrophes de *Pseudomonas* sp. qui sont un modèle d'adaptation au froid avec la présence de gènes très spécifiques (Whyte et al., 1997). De même, il a récemment été isolé un nouveau groupe de gènes (*phn*) possédant une faible homologie avec la famille des gènes de dégradation *nah-like*, mais codant pour des dioxygénases possédant une forte affinité pour les HAPs (Laurie et Lloyd-Jones, 1999).

Dans le but de prédire les performances d'un écosystème pour la biodégradation des HAPs, la détermination de la flore microbienne par son ADN permet seulement d'estimer les souches dégradantes présentes dans la population bactérienne, mais sous-estime l'activité générale au regard du nombre important de gènes distincts et des interactions possibles entre micro-organismes (Duteau et al., 1998 ; Hamann et al., 1999 ; Mueller et al., 1997). Néanmoins, de nouvelles technologies en microbiologie moléculaire permettent d'envisager le suivi spécifique de l'activité bactérienne de dégradation des HAPs en utilisant les ARNm des dioxygénases (ARNm de demi-vie courte, très sensibles et très spécifiques aux HAPs) (Wilson et al., 1999). En effet, cette enzyme retrouvée dans de nombreuses voies de dégradation et de structure connue (une réductase, une ferrédoxine et deux protéines Fer-Soufre) est formée non seulement de zones constantes mais aussi de zones hypervariables qui peuvent servir à identifier les différences et les préférences de substrats d'un écosystème (Geiselbrecht et al., 1998 ; Moser et Stahl, 2001).

B3-1-2. Biodégradation anaérobie des HAPs

Par comparaison avec les connaissances acquises au cours de ces dernières années sur la biodégradation des HAPs sous conditions aérobies, leur biodégradation sous conditions

anaérobies a été nettement moins étudiée. Longtemps considérée comme irréalisable, elle n'a été mise en évidence que vers la fin des années 80 avec la dégradation d'HAPs de faible poids moléculaire (Naphtalène et Acénaphène) sous conditions anaérobies dénitrifiantes (*Flyvbjerg et al., 1993 ; Mihelcic et Luthy, 1988b*). Particulièrement performante, près de 90 % des HAPs peuvent être minéralisés en CO₂ dans ces conditions (*Holliger et Zehnder, 1996*). Ainsi, les conditions de réduction des nitrates paraissent donc assez favorables à la dégradation des HAPs, mais restent moins performantes et moins rapides que les conditions d'aérobiose (*Mc Nally et al., 1999 ; Wilson et Bouwer, 1997*). Toutefois, les conditions dénitrifiantes sont particulièrement intéressantes à mettre en œuvre car elles possèdent l'avantage de réduire les pertes par volatilisation pour les plus petits HAPs (importantes en conditions d'aération), d'être plus faciles à extrapoler lors d'un changement d'échelle et d'être plus économiques qu'un procédé de dégradation aérobie (*Leduc et al., 1999*). D'un point de vue technologique, une alternance d'étapes dénitrifiantes et faiblement aérobies permettrait d'obtenir des rendements de dégradation plus importants que sous conditions dénitrifiantes seules sans nécessiter d'apport en oxygène trop important (*Wilson et Bouwer, 1997*).

Depuis, la dégradation d'HAPs a été observée en milieux encore plus réducteurs, sous des conditions sulfato-réductrices (voir **Figure B14**). En effet, plusieurs auteurs ont montré une biodégradation significative du Naphtalène, du Phénanthrène et du Fluoranthène dans le cas de sédiments marins contaminés (*Coates et al., 1996 ; Coates et al., 1997 ; Hayes et al., 1999 ; Rockne et Strand., 1998*).

Sous conditions encore plus réduites, il n'a pas été observé, à notre connaissance, de biodégradation des HAPs, ni sous conditions de réduction du fer ou du manganèse, ni sous conditions méthanogènes (*Kathikyan et Bhandari, 2001*). En effet, il n'a été observé qu'une dégradation non biologique des HAPs suite à des pertes par volatilisation ou par photolyse, sous des conditions de méthanogénèse (*Coates et al., 1997 ; Kirk et Lester, 1990 ; Mihelcic et Luthy, 1988a*). Cependant, les tests statistiques ayant conduit à ces conclusions furent vraisemblablement altérés par les fortes erreurs analytiques, de plus de 20 %, pouvant masquer une activité biologique faible mais existante (*Kirk et Lester, 1990*). De plus, la mise en œuvre d'un procédé en discontinu (batch) pour des expériences de méthanogénèse ne permet qu'une étude transitoire du phénomène (quelques jours au maximum). Or, quelles que soient les conditions opératoires, la biodégradation anaérobie des HAPs reste globalement plus longue et moins favorable qu'en conditions aérobies et les temps d'incubation doivent être

supérieures à 30 jours minimum pour pouvoir observer une variation significative pour de faibles concentrations (Kirk et Lester, 1990). Ainsi, la mise en évidence d'une activité méthanogène de dégradation des HAPs ne peut être réalisée que dans des conditions de fonctionnement en mode continu avec des temps de séjour relativement longs (de 20 à 40 jours).

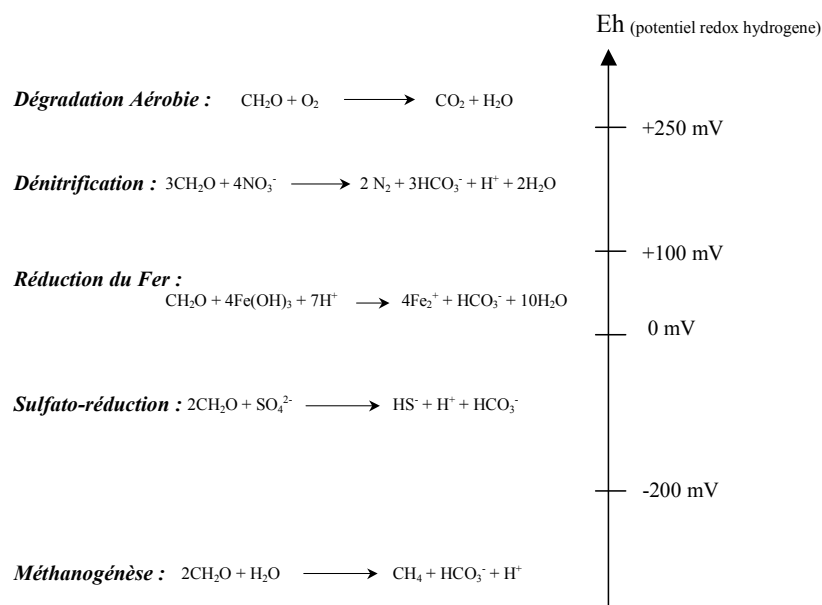


Figure B14 : Représentation schématique du potentiel redox hydrogène (Eh) pour différentes réactions consommant la matière organique (CH₂O).

Jusqu'à présent, les voies métaboliques complètes de dégradation sous conditions anaérobies restent indéterminées. Il semble peu probable qu'elles suivent les mêmes mécanismes que ceux retrouvés sous conditions aérobies (incorporation d'une molécule d'oxygène par une dioxygénase) (Kathikeyan et Bhandari, 2001). Toutefois, il fut proposé, dans un premier temps, une voie alternative qui débutait par l'incorporation d'une molécule de H₂ (hydrogénation) pour réduire le cycle benzénique et favoriser sa dégradation (Kathikeyan et Bhandari, 2001). Cependant, il s'est avéré que, suite à une étude portant sur la biodégradation du Naphtalène et du Phénanthrène sous conditions sulfato-réductrices, l'étape initiale de dégradation correspondait plus à l'incorporation d'un groupement chimique réactif par carboxylation ou par scission d'une molécule d'eau (hydroxylation) (Zhang et Young, 1997). Plus précisément, Zhang et al. (2000) ont montré que, sous conditions sulfato-réductrices, le Naphtalène était en fait carboxylé, puis que le cycle non substitué était à son tour réduit et qu'une séquence ultime de 5 étapes d'hydrogénation permettait d'obtenir un carboxylate, qui est dégradé jusqu'à minéralisation complète de la molécule (voir **Figure B15**). A ce jour, il

s'agit de l'unique hypothèse connue de voie métabolique de dégradation des HAPs sous conditions anaérobies strictes, pour un écosystème complexe.

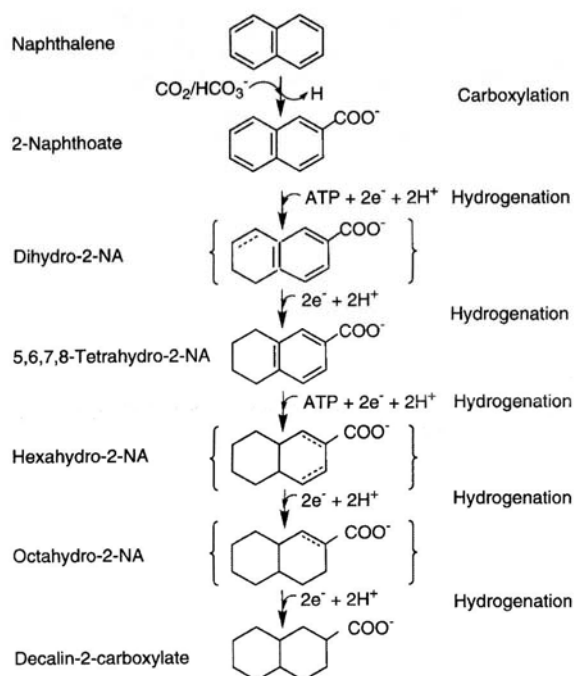


Figure B15 : Hypothèse de voie métabolique de dégradation du Naphtalène sous conditions anaérobies sulfato-réductrices (Zhang et al., 2000).

Il est intéressant de noter que, dans le cas de certaines molécules aromatiques à simple cycle comme le toluène ou pour certains hydrocarbures aliphatiques, il a été isolé des bactéries sulfato-réductrices susceptibles de dégrader ces composés par incorporation initiale de fumarate à l'aide d'une benzylsuccinate synthase (l'apport de groupements acides favorisant la dégradation ultérieure de la molécule) (Heider et al., 1999). Certaines voies du métabolisme bactérien peuvent donc être détournées pour faciliter la dégradation de ces molécules réfractaires. A noter que la formation de benzylsuccinate représente une réaction biochimique unique de par la formation de liaisons carbone-carbone spécifique, ce qui diffère des réactions classiques de carboxylation initiale de la molécule (Heider et al., 1999). Widdel et Rabus (2001) rapportent que, dans le cas du Naphtalène et du Phénanthrène, ces composés seraient soumis à une réaction initiale de carboxylation sous conditions sulfato-réductrices et mais que certains alkylnaphtalène seraient plus susceptibles de suivre une voie de dégradation similaire au toluène (incorporation de fumarate), ces voies n'étant, à ce jour, pas encore mis en évidence.

Ainsi, la capacité à dégrader les HAPs sous conditions anaérobies est relativement difficile à mettre en évidence et semble restreinte à des écosystèmes issus de milieux contaminés depuis de nombreuses années, comme dans le cas de sédiments marins (Coates *et al.*, 1996 ; Hayes *et al.*, 1999). Les performances globales de l'écosystème dépendent non seulement du temps de contamination plus ou moins long, mais également du degré de contamination permettant la sélection de micro-organismes performants (Hayes *et al.*, 1999). Cette difficulté à mettre en évidence la biodégradation des HAPs sous conditions anaérobies est la conséquence de la nature fortement réduite des HAPs avec une dégradation biologique qui devient thermodynamiquement de moins en moins favorable si les conditions d'oxydoréduction sont de plus en plus réduites (voir **Figure B14**). (Karthikeyan *et Bhandari*, 2001). Dans certains cas extrêmes de concentrations, les HAPs peuvent même inhiber significativement la méthanogénèse et la réduction des sulfates encore plus fortement (Kiene *et Capone*, 1984). Les bactéries anaérobies (méthanogènes et sulfato-réductrices) sont en effet particulièrement sensibles aux changements brusques d'environnement, et peuvent être facilement inhibées par une pollution brutale (Bauer *et al.*, 1985). Cependant, une longue sélection au sein d'un environnement naturellement contaminé permettrait quand même le couplage de la dégradation des HAPs avec d'autres voies du catabolisme bactérien, contribuant alors au cométabolisme des HAPs (Sharak Genthner *et al.*, 1997). Dans le cas où la dégradation par voie biologique des HAPs conduirait à la production d'intermédiaires aromatiques comportant un cycle unique (benzène, benzoate, phtalate, toluène,...), ces composés peuvent être minéralisés sous toutes les conditions anaérobies (Colberg *et Young*, 1995 ; Holliger *et Zehnder*, 1996).

B3-2. Aspects physico-chimiques de la dégradation des HAPs

B3-2-1. Interactions des HAPs avec la matrice solide (notion de biodisponibilité)

D'une manière générale, les HAPs de faibles poids moléculaires sont plus facilement dégradés que ceux de hauts poids moléculaires (Goodin *et Webber*, 1995 ; Mueller *et al.*, 1997 ; Potter *et al.*, 1999). Effectivement liée aux caractéristiques et aux capacités métaboliques des écosystèmes, leur biodégradabilité dans le milieu naturel dépend également de leur biodisponibilité vis à vis des micro-organismes susceptibles de les dégrader : les plus petits

HAPs étant les plus solubles, ils sont plus accessibles aux micro-organismes et donc plus facilement biodégradables (Straube et al., 1999 ; Wild et Jones, 1993). La biodisponibilité des HAPs aux micro-organismes est donc un facteur essentiel à prendre en compte lors de l'étude de leur biodégradation en milieu complexe. En effet, dans le cas de faibles concentrations en HAPs (quelques $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ ou quelques dizaines de $\mu\text{g.l}^{-1}$), les cinétiques de biodégradation sont le plus souvent limitées par des facteurs physico-chimiques liés au transfert de matière des HAPs vers les compartiments aqueux, et non par les performances intrinsèques de biodégradation de l'écosystème (Cuny et al., 1999 ; Lamoureux et al., 1999 ; Leduc et al., 1999 ; Limbert et Betts, 1994 ; Liu et al., 1995 ; Weigand et al., 1999 ; Yeom et Ghosh, 1998). Le transfert de masse possède alors d'autant plus d'influence que la contamination en HAPs est faible et que l'aire spécifique et la concentration en solides sont importantes (Bouwer et al., 1996 ; Johnson et al., 2001 ; Villholth, 1999).

En milieu aqueux, du fait de leurs propriétés hautement hydrophobes, les HAPs se regroupent d'eux-mêmes à l'intérieur de structures micellaires ou NAPL (Non Aqueous Phase Liquid), inaccessibles aux micro-organismes. La cinétique de biodégradation est alors limitée par la vitesse de diffusion des HAPs à l'interface de ces systèmes non aqueux (Stelmack et al., 1999). Dans des milieux plus complexes comme les sols ou les boues, les HAPs sont, de plus, fortement absorbés à l'intérieur même de la matrice solide, notamment les plus gros (Hughes et al., 1997 ; Zhang et al., 1995). Ils peuvent en effet être piégés à l'intérieur de nanopores constituant la structure de la matrice, en fonction de leur taille moléculaire et de leur caractère hydrophobe (Cornelissen et al., 1999a ; Kottler et Alexander, 2001 ; Northcott et Jones, 2001). La présence de sites spécifiques d'adsorption à l'intérieur de ces pores conduit également à la création de liaisons fortes avec les HAPs qui ne sont alors plus soumis à une loi de diffusion simple (Kohl et Rice, 1999). De plus, les HAPs possèdent une plus forte affinité pour les substances organiques que pour les substances minérales. Leur biodisponibilité dépend donc de la richesse de la matrice en composés organiques (Breedveld et Karlsen, 2000b ; Conte et al., 2001 ; Haitzer et al., 1999 ; Kopinke et al., 2001 ; Perminova et al., 1999). Cette forte affinité provoque une diminution de l'accessibilité des HAPs non seulement pour les micro-organismes, mais également pour les solvants d'extraction. Ainsi, en fonction de leurs interactions avec la matrice, les HAPs peuvent être si fortement absorbés que les méthodes d'extraction ne suffisent plus pour les extraire, ils se trouvent alors dans une fraction dite « non extractible », plus ou moins importante en fonction de la méthode utilisée (Kelsey et al., 1997). Les HAPs piégés dans cette zone non extractible sont alors peu sensibles au métabolisme de la plupart

des micro-organismes (Smith et al., 1999 ; Vergé-Leviel, 2001). A noter toutefois que certains micro-organismes particulièrement performants peuvent dégrader, en faible proportion, les HAPs dans cette fraction non-extractible (Eschenbach et al., 1998). De récentes études tentent de corréler les performances d'extraction et la notion de biodisponibilité des HAPs mais, au regard des nombreuses et complexes interactions, la limite biodisponibilité-fraction extractible restent encore difficile à appréhender (Breedveld et Karlsen, 2000b ; Kelsey et al., 1997).

Outre la nature de la matrice, la biodisponibilité des HAPs dépend également du temps de contamination du milieu (Johnson et al., 2001 ; Northcott et Jones, 2001). En effet, des HAPs ajoutés dans des sols déjà contaminés sont plus rapidement dégradés que les HAPs dits « anciens » vraisemblablement plus intimement liés à la matrice (Eggen et Majcherczyk, 1998). En moins de 30 jours de contact, entre 50 % et 75 % des HAPs ajoutés à un sol se lient fortement à la matrice jusqu'à ne plus pouvoir en être extraits (Kottler et Alexander, 2001). Pour des temps de contamination plus long (500 jours), jusqu'à 90 % des HAPs peuvent disparaître dans la fraction non-extractible (Northcott et Jones, 2001). S'ajoutant à l'effet du temps de contamination, l'activité biologique générale produit un certain nombre de métabolites pouvant réagir avec les HAPs et la matrice organique (Kästner et al., 1999 ; Smith et al., 1999). Dans ce cas, les HAPs se lient préférentiellement aux composés phénolés par des liaisons covalentes carbone-carbone pour former des macromolécules aux structures proches des substances humiques (Kästner et al., 1999).

B3-2-2. Effet de la température et pertes abiotiques.

L'effet de la température représente un facteur primordial concernant l'amélioration de la diffusion des HAPs en milieu complexe étant donné que la solubilité des composés, les coefficients de diffusion et les vitesses de diffusion au sein du support sont fortement liés à la température (Ghosh et al., 2001 ; Zhang et al., 1995). De même, les coefficients de partition carbone organique-eau (K_{oc}) indicateur de la partition des HAPs dans la matière organique sont très sensibles à la température (Krauss et Wilcke, 2001). Cependant, l'influence de ce paramètre augmente également significativement les pertes abiotiques par volatilisation pour les plus petits HAPs, celles-ci pouvant représenter la majorité des pertes pour les HAPs de moins de 4 cycles (Leduc et al., 1999 ; Vergé-Leviel, 2001 ; Wild et Jones, 1993). Ces pertes peuvent même devenir majoritaires (jusqu'à 90 %) pour des HAPs comportant 2 à 3 cycles benzéniques, dans le cas de bioremédiation ou de simple suivi en environnement naturel de sols contaminés (Hawthorne

et Grabanski, 2000 ; Smith et al., 2001). D'autres phénomènes non biologiques peuvent être à l'origine des pertes dans des milieux complexes, c'est notamment le cas de la photolyse, même pour de faibles intensités de lumière, ou des réactions d'estérification dues à la présence de radicaux libres dans le milieu (Bernstein et al., 1999 ; Kästner et al., 1999 ; Matsuzawa et al., 2001 ; Wang et al., 1999)

B3-2-3. Modélisation des limitations dues au transfert de matière.

Afin de modéliser et de mieux comprendre les nombreuses interactions mises en jeu lors de la biodégradation d'HAPs au sein de systèmes complexes, il est fréquemment admis comme hypothèses de départ que les micro-organismes utilisent leur substrat uniquement en phase aqueuse, que la présence de bactéries n'influence pas la solubilité des composés, que la vitesse de dissolution dépend du coefficient de transfert de masse et de l'aire spécifique des solides et que les HAPs sont les seuls facteurs limitants de la croissance bactérienne d'intérêt (Jahan et al., 1999). Quelques modifications peuvent être apportées comme la possibilité d'inhibition croisée en présence de plusieurs substrats, cette hypothèse expliquant avec une bonne précision les cinétiques de biodégradation en milieu aqueux (Jahan et al., 1999). Suivant ces hypothèses, la dégradation des HAPs en milieu solide peut également être représentée de manière fiable par le modèle du biofilm bactérien fixé autour d'une particule solide, son développement étant soumis à la désorption et à la diffusion lente des HAPs à l'interface du biofilm et de la matrice (Zhang et al., 1995). A l'intérieur de cette matrice solide, les modèles représentant au mieux les effets de sorption-désorption préconisent de prendre en compte non seulement la présence de sites non spécifiques qui seraient soumis à une loi de diffusion simple des HAPs (désorption linéaire, surtout pour des substances minérales), mais également la présence de sites spécifiques aux HAPs au sein des particules organiques (désorption non linéaire) (Conte et al., 2001 ; Laor et Rebhun, 2000). En effet, plus la concentration en HAPs est élevée, moins ils possèdent d'affinité pour les sites spécifiques et plus la diffusion est facilitée, et inversement pour les faibles concentrations. La présence de ces sites expliquent donc que les isothermes de désorption soient non linéaires, contrairement à une diffusion simple, surtout dans le cas de matrices chargées en composés organiques (Braida et al., 2001). Ainsi, l'utilisation de tels modèles montre qu'il existe une véritable compétition entre les différents polluants pour la saturation des sites actifs des particules, des contaminants fraîchement ajoutés pouvant perturber l'équilibre entre les HAPs et leur matrice (Cornelissen et al., 1999b).

B3-2-4. Effet des surfactants sur la biodisponibilité des HAPs.

Afin d'améliorer la diffusion des HAPs au sein d'une matrice solide, l'ajout de surfactants a été particulièrement étudié. Utilisés à l'origine pour solubiliser les graisses, les surfactants augmentent sensiblement la concentration en HAPs dans l'eau et favorisent leur diffusion et donc leur biodisponibilité en milieu aqueux (Bury et Miller, 1993 ; Grimberg et al., 1996 ; Volkering et al., 1995 ; Willumsen et Arvin, 1999 ; Yeom et Ghosh, 1998). De plus, avec l'utilisation de surfactants, les performances d'extraction des HAPs sont améliorées, diminuant ainsi la quantité d'HAPs de la fraction non-extractible (Sicilia et al., 1999). Les surfactants facilitent également la migration vers les sites d'action de certaines bactéries dégradantes hydrophobes des genres *Mycobacterium* sp. ou *Sphingomonas* sp. (Lahlou et al., 2000).

Concernant leur mode d'action, les surfactants forment des micelles pour des concentrations supérieures à leur CMC (concentration micellaire critique), à l'intérieur desquels les HAPs sont parfaitement solubles. La dégradation des HAPs est alors limitée en milieu aqueux par leur vitesse de diffusion vers les micelles puis dans l'eau, toutefois plus rapide que leur désorption simple du sol vers les compartiments aqueux (voir **Figure B16**) (Boochan et al., 1998 ; Chun et al., 2000 ; Grimberg et al., 1996 ; Paterson et al., 1999 ; Volkering et al., 1995).

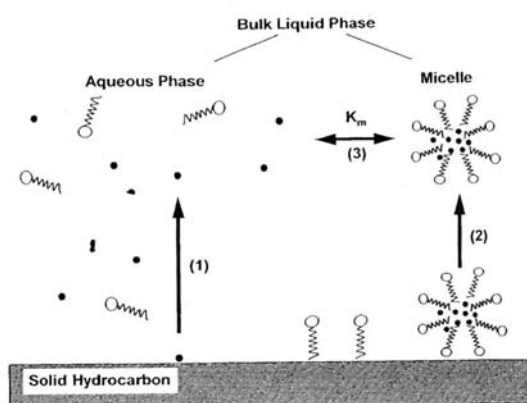


Figure B16: Modèle conceptuel de dissolution des HAPs en présence de surfactant (1) Dissolution simple du Phénanthrène dans la phase liquide, (2) Dissolution du Phénanthrène à l'intérieur des micelles et (3) Equilibre de partage entre la phase aqueuse et les micelles (d'après Grimberg et al., 1996).

Cependant, les résultats obtenus après ajout de surfactants restent imprévisibles, ceux-ci dépendant de nombreux facteurs comme la nature de la matrice, le type de surfactant, l'HAP étudié, les micro-organismes ou les voies métaboliques mises en jeu,... (Acquaviva *et al.*, 2001). L'ajout de surfactant peut donc posséder soit un effet positif, soit négatif, soit nul vis à vis de la biodégradation des HAPs (Liu *et al.*, 1995 ; Mueller *et al.*, 1997 ; Stelmack *et al.*, 1999). Thibault *et al.* (1996) ont même rapporté un effet bénéfique de l'ajout de surfactants pour des cultures *in vitro* et l'application sur sols a révélé une forte inhibition de la dégradation des HAPs. En dépit de ces informations contradictoires, différentes études montrent qu'en conditions de laboratoire, les surfactants anioniques (Dowfax 8390) et non-ioniques (Triton X100, Tergitol NP10, Tyloxapol, Brij35,...) affecteraient l'adhésion des micro-organismes aux micelles et inhiberaient leur croissance mais ne présenteraient pas de réelle toxicité, contrairement aux surfactants cationiques, plus toxiques mais possédant une plus grande efficacité de solubilisation des HAPs (Boonchan *et al.*, 1998 ; Dur *et al.*, 1999 ; Kanaly *et Harayama*, 2000 ; Liu *et al.*, 1995 ; Stelmack *et al.*, 1999). Ainsi, l'impact positif ou négatif sur la biodégradation des HAPs suite à l'ajout d'un surfactant est le résultat dynamique entre, d'une part, l'inhibition de la croissance des micro-organismes et d'autre part, la solubilisation des HAPs dans la phase aqueuse (Stelmack *et al.*, 1999). L'utilisation de surfactants synthétiques serait alors préférable, notamment les plus hydrophiles, plus favorables à la solubilisation et moins inhibiteurs (Tiehm, 1994). De plus, il semble nécessaire d'utiliser des surfactants faiblement biodégradables pour qu'ils puissent posséder une action significative sur la solubilisation des HAPs avant d'être minéralisés (Madsen *et Kristensen*, 1997)

Dans le milieu naturel, certains micro-organismes dégradant les HAPs produisent eux-mêmes leur biosurfactant ou leur bioémulsifiant pour favoriser l'accessibilité au substrat. En effet, certaines souches d'*Acinetobacter* sp. produisent des hétéropolysaccharides neutres (ou Emulsan) et des polysaccharides anioniques (ou Alasan) particulièrement performants pour solubiliser les HAPs (Barkay *et al.*, 1999 ; Foght *et al.*, 1989). De même, certaines espèces de *Pseudomonas*, bien connues pour leurs propriétés de dégradation des HAPs, produiraient d'elles-mêmes des biosurfactants à partir du métabolisme des HAPs pour permettre leur dissolution (Deziel *et al.*, 1996). Moins toxiques et plus biodégradables, il a donc été envisagé d'utiliser ces biosurfactants pour favoriser la dégradation des HAPs en milieu complexe (Kanaly *et Harayama*, 2000). Ainsi, actuellement en cours d'étude, l'action de rhamnolipides est particulièrement intéressante de par son action significative sur la dégradation des HAPs sans présenter d'inhibition particulière (Noordman *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 1997). De même, de

récentes études proposent d'utiliser des cyclodextrines, ces molécules cycliques permettant d'augmenter significativement la solubilité des HAPs dans l'eau sans présenter de toxicité reconnue (Wang et al., 1998).

B3-3. Techniques de bioremédiation et de bioaugmentation

B3-3-1. Bioremédiation de sols et de boues contaminés

La bioremédiation de sols contaminés a été largement étudiée au cours des dernières années. Dans la plupart des cas, il a été observé que le principal facteur limitant les performances de dégradation *in situ* n'est pas lié au potentiel microbiologique, mais bien à la biodisponibilité des HAPs vis à vis des micro-organismes compétents et aux paramètres physico-chimiques régissant la réaction (Bouwer et al., 1996 ; Hughes et al., 1997 ; Zhang et al., 1995). En effet, des expériences de biodégradation sur sites montrent que la pénétration et l'absence d'oxygène en profondeur dans les sols limite plus la biodégradation des HAPs que la présence de micro-organismes dégradants (Broholm et al., 2000 ; Broholm et Arvin, 2001). Une aération forcée des sols en profondeur permet alors d'améliorer significativement leur biodégradation (Sparrevik et Breedveld, 2000). Afin d'illustrer les potentialités de l'action biologique sur la bioremédiation des sols, il a été observé, en conditions de laboratoire, que l'activité biologique permet de décontaminer des sols contenant plus de $270 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ d'HAPs de 3 et 4 cycles, ce procédé n'étant pas encore utilisé à l'échelle industrielle (Woo et Park, 1999).

Dans le cas de boues contaminées, la dégradation des HAPs a été essentiellement étudiée lors de procédés de compostage (Joyce et al., 1998 ; Lazzari et al., 1999 ; Potter et al., 1999). Le compostage pour la digestion de boues mélangées à des sols contaminés montre une dégradation significative des HAPs de 2 à 4 cycles, mais pour des concentrations élevées (de l'ordre de 200 à $800 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$). En dessous de 70 à $100 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ (valeur limite vraisemblablement fonction de la nature de la matrice), il semble que la dégradation soit fortement ralentie par les aspects de transfert de masse et d'accessibilité aux micro-organismes (Potter et al., 1999). Ainsi, comme dans le cas de matrice de sols, le principal facteur limitant semble être plus lié à la biodisponibilité des HAPs, qu'au potentiel de dégradation des micro-organismes du compost (Joyce et al., 1998).

D'un point de vue technologique, différentes techniques de bioremédiation sont envisageables. Miller *et al.* (1998) proposent, pour la dépollution de milieux aqueux contaminés, d'utiliser les propriétés d'adsorption des HAPs en couplant un réacteur anaérobie de digestion avec un lit à charbon actif, ce dernier permettant de fixer la pollution qui n'aurait pas été dégradée en amont. Afin de dépolluer des sols et des sédiments riches en matières minérales, des techniques de séparation par lavage et criblage/fractionnement des particules organiques (plus contaminées en HAPs) sont actuellement en cours d'étude, les particules organiques pouvant être décontaminées au cours d'une seconde étape à l'aide de micro-organismes adaptés (Hakstege et van Geldermalsen, 1998 ; Stefess, 1998 ; Stinson *et al.*, 1999). Une autre technique dite de « land farming » consiste à épandre le milieu contaminé sur sols non cultivés mais possédant les micro-organismes dégradants. Ainsi, avec des systèmes d'aération performants, un mélange fréquent et l'ajout de nutriments aux sols, la dégradation des HAPs peut être réalisée tout au long de l'année (Henner *et al.*, 1997). Récemment, une méthode utilisant des enzymes purifiées de champignons de la pourriture blanche a été mise au point comme pré-traitement du Benzo(a)pyrène dans des sols contaminés (Rama *et al.*, 1998). L'addition de solvants facilement biodégradables (acétone, éthanol,...) ou d'eau à l'état supercritique, est également envisagée comme simple lavage de sols ou de sédiments contaminés, ou comme extraction primaire afin d'augmenter la biodisponibilité des HAPs de haut poids moléculaire avant traitement (Lagadec *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2001 ; Rulkens *et al.*, 1998).

Enfin, il est également envisageable d'utiliser les propriétés de cométabolisme entre les différents micro-organismes pour permettre la dégradation des polluants d'intérêt. En effet, il s'avère que les HAPs sont eux-mêmes activateurs de la biodégradation d'autres HAPs, comme le Pyrène par le Phénanthrène, le Fluoranthène par le Phénanthrène, le Fluoranthène et le Pyrène par le Naphtalène (Beckles *et al.*, 1998 ; Guha *et al.*, 1999 ; Hughes *et al.*, 1997). De même, la présence de Phénanthrène activerait la dégradation d'Anthracène, de Fluorène et de Pyrène dans des sédiments contaminés (Yuan *et al.*, 2001). Toutefois, l'amélioration de la dégradation des HAPs ne serait pas uniquement la conséquence d'un cométabolisme, mais proviendrait également d'un effet de compétition entre différents HAPs au niveau de leur adsorption sur les sites actifs de la matrice (Cornelissen *et al.*, 1999 ; White *et Pignatello.*, 1999).

B3-3-2. Techniques de bioaugmentation

Parfois, la persistance des HAPs dans l'environnement résulte de la faible activité ou de la faible quantité en bactéries autochtones capables de métaboliser les HAPs (Madsen et Kristensen, 1997 ; Straube et al., 1999). La bioaugmentation d'écosystèmes par des souches performantes est alors une technique qui s'avère efficace pour améliorer des performances de biodégradation des HAPs, le principal problème étant l'isolement de souches performantes, leur implantation et leur survie dans le milieu à traiter (Madsen et Kristensen, 1997 ; Straube et al., 1999). Les effets de la bioaugmentation sont particulièrement significatifs pour de fortes concentrations en HAPs, de l'ordre de $200 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$, permettant l'implantation et la survie des micro-organismes apportés (Guerin, 1999a). Parfois, l'ajout simple d'un milieu fortement contaminé permet d'apporter une source supplémentaire en micro-organismes capables de dégrader les contaminants (Smith et al., 1999). Cependant, le plus souvent, il est préférable de prendre certaines précautions, l'équilibre de l'écosystème indigène étant souvent très sensible aux variations environnementales. Le cas le plus favorable est lorsque l'addition de "spécialistes" ne perturbe pas les écosystèmes en place, la bioaugmentation servant alors uniquement d'accélérateur de réaction par rapport à la quantité de micro-organismes inoculés (Buitron et Capdeville, 1993 ; Kästner et al., 1998). Ainsi, un inoculum en micro-organismes adaptés sans sel et à pH 7 est préférable (Kästner et al., 1998). Afin d'augmenter le potentiel de dégradation des sols sans perturber la flore indigène, Pinto et Moore (2000) proposent également d'utiliser certains champignons du genre *Penicillium* sous leur forme sporulante, moins sensible au stress. Enfin, afin d'augmenter la quantité de micro-organismes dégradant, il est possible d'ajouter des substrats préférentiels, généralement des intermédiaires du métabolisme des HAPs, comme le salicylate ou le phtalate (Bogan et al., 2001). Il a également été observé que l'addition de nutriments azotés et phosphorés favorisait la dégradation des HAPs dans des sols contaminés, ces nutriments étant vraisemblablement en quantité suffisante dans les boues (Breedveld et Sparrevik, 2001a ; Liebeg et Cutright, 1999 ; Zaidi et Imam, 1999).

B-3-4. Aspects écotoxicologiques

Plusieurs méthodes de détection de la toxicité d'un polluant peuvent être mises en œuvre afin d'évaluer le risque lié à l'utilisation d'un milieu contaminé. Ces méthodes permettent de mesurer, sur un milieu donné, soit sa toxicité immédiate sur une bactérie

bioluminescente (test Microtox), soit son potentiel mutagène sur l'homme après activation des molécules mères par des enzymes extraites de foies de rats contaminés (test de Ames), soit son potentiel cancérigène par inhibition de la communication intercellulaire de gap-junction (GJIC) (Bispo *et al.*, 1999 ; Luster-Teasley *et al.*, 2000 ; Oanh *et al.*, 2000). L'ensemble de ces méthodes ne fournissent qu'une estimation de la toxicité d'un milieu contaminé par des HAPs, celle-ci dépendant fortement des nombreuses interactions entre les HAPs et leur environnement et notamment de leur biodisponibilité (Reeves *et al.*, 2001).

Ainsi, malgré que les traitements physico-chimiques par ozonation de milieux contaminés en HAPs soient particulièrement performants vis à vis de l'élimination des molécules mères, il apparaît que les HAPs oxydés produits sont potentiellement beaucoup plus mutagènes que les HAPs non substitués (Avramova *et al.*, 1999 ; Luster-Teasley *et al.*, 2000 ; Yao *et al.*, 1998 ; Zeng *et al.*, 2000). Par comparaison, après traitement par voie biologique de sols fortement contaminés (200 à 800 mg.kg_{MS}⁻¹), la toxicité immédiate diminue rapidement vis à vis des organismes supérieurs, la persistance de gros HAPs (plus de 5 cycles) conduisant toutefois à un niveau de mutagenèse basal sur les micro-organismes (test de Ames) (Potter *et al.*, 1999). De même, le traitement aérobie de sols et de sédiments contaminés permet de réduire de manière significative la toxicité du milieu traité (Renoux *et al.*, 1999). Ainsi, dans tous les cas, le traitement biologique de sols contaminés à plus de 1g.kg_{MS}⁻¹ d'HAPs permet de réduire significativement et rapidement toute forme de toxicité aiguë, mais peu de données sont encore disponibles sur les risques de bioaccumulation et sur la toxicité chronique de faibles quantités d'HAPs sur l'organisme humain (Sayles *et al.*, 1999).

Dans le cas des boues urbaines, Perez *et al.* (2001a) ont récemment proposé une méthode permettant de mesurer la toxicité des HAPs dans des boues contaminées, après leur extraction de la matrice. Cependant, au regard de la grande complexité de la composition des boues urbaines, de nombreuses molécules, extractibles ou non, peuvent présenter une toxicité apparente et il reste encore difficile d'évaluer la part due à la présence d'HAPs dans la toxicité totale des boues.

Chapitre C

Les PolyChloroBiphényles (PCBs)

Dans ce dernier chapitre de présentation du contexte bibliographique, les principales caractéristiques des PCBs seront dans un premier temps exposées.

Etant très proches de la famille des HAPs, l'analyse des PCBs ne sera abordée que succinctement, les techniques ayant déjà été décrites en détails dans le chapitre B.

Enfin, différents aspects de la dégradation des PCBs seront abordés, comme les voies biologiques récemment mise en évidence et les limitations physico-chimiques pour leur dégradation en milieux complexes (propriétés physico-chimiques proches de celles des HAPs).

C1. Présentation générale des PCBs

C1-2. Définition et caractéristiques des PCBs

La famille des polychlorobiphényles regroupe des composés aromatiques chlorés dont la structure mère est une molécule de biphényle comportant un nombre variable de substitutions chlorées (de 2 à 10) (voir **Figure C1**). Plus de 209 structures de PCBs sont théoriquement possibles mais seulement une centaine peuvent être synthétisées, conséquence de l'instabilité des isomères (Mohn et Tiedje, 1992 ; Robert Gan et al., 1994). Parmi l'ensemble des PCBs, seulement sept d'entre eux sont actuellement soumis à la réglementation au niveau des boues avant épandage : les PCBs n°28 (3 Cl) ; n°52 (4 Cl) ; n°101 et 118 (5 Cl) ; n°138 et 153 (6 Cl) ; n°180 (7 Cl). Actuellement, la concentration maximale autorisée dans les boues est de 0,8 mg.kg_{MS}⁻¹ pour la somme des 7 PCBs précédemment cités. De même que pour les HAPs, la norme tend à devenir plus sélective pour finalement aboutir à une concentration maximale de 0,2 mg.kg_{MS}⁻¹ pour chacun des 7 PCBs (AFNOR, 2001).

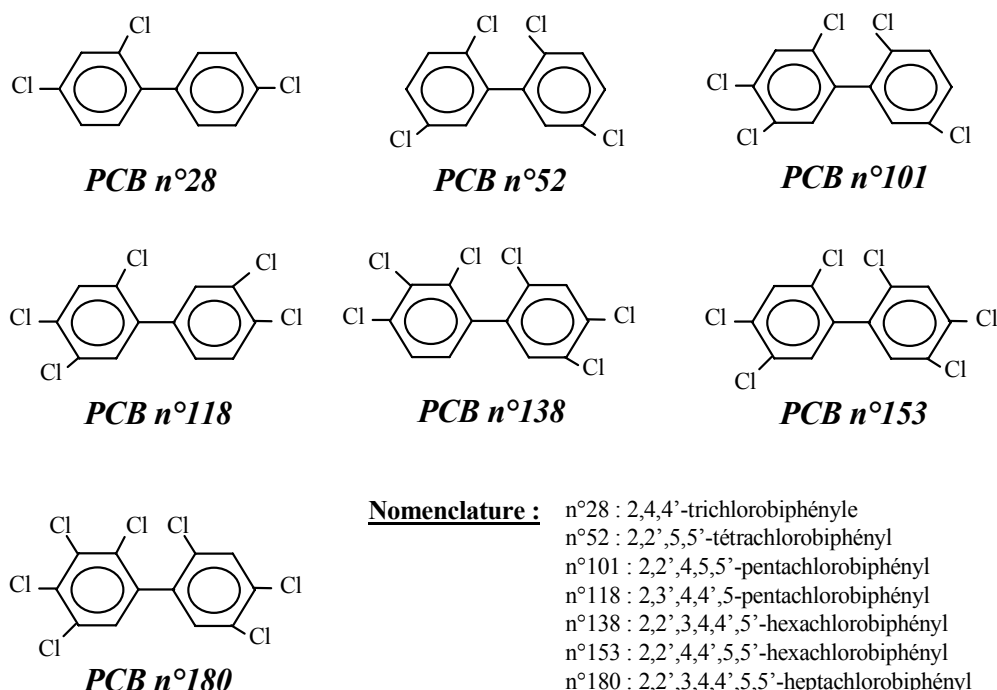


Figure C1 : Formules chimiques des 7 PCBs concernés par l'arrêté du 08 Janvier 1998 concernant l'épandage des boues urbaines.

De nature relativement lipophile et d'une faible solubilité dans l'eau (environ 0,054 mg.l⁻¹ à 25°C), les PCBs se retrouvent facilement concentrés dans les boues (voir **Tableau C1**). Comme dans le cas des HAPs, les concentrations moyennes retrouvées dans les boues restent relativement faibles (inférieures au mg.kg_{MS}⁻¹). De plus, les PCBs présentent des coefficients de partage octanol/eau (log K_{ow}), indicateur de leur hydrophobicité entre 5 et 8, respectivement, pour les plus légers et pour les plus lourds. Ainsi, plus le nombre de chlore est élevé, plus les PCBs seront hydrophobes.

Tableau C1 : Solubilités de différents PCBs dans l'eau et concentrations dans les boues urbaines en France (d'après *Feix et al., 1995*).

COMPOSES	Solubilité dans l'eau à 25°C (en mg.l ⁻¹)	Concentration maximale dans les boues (en mg.kg _{MS} ⁻¹)	Concentration moyenne dans les boues (en mg.kg _{MS} ⁻¹)
PCB n°28	0,054	0,017	0,007
PCB n°52		0,027	0,013
PCB n°101		0,19	0,044
PCB n°118		0,33	0,076
PCB n°138		0,43	0,099
PCB n°153		0,45	0,11
PCB n°180		0,32	0,066

C1-2. Sources et toxicité des PCBs

Contrairement aux HAPs, les PCBs sont des composés majoritairement synthétisés par l'homme et sont principalement utilisés pour leurs propriétés d'isolant thermique et pour leur grande stabilité chimique. Dans le milieu naturel, ils ne sont produits qu'en très faible quantité par certains écosystèmes marins, leur présence sur le milieu terrestre n'étant que la conséquence de l'activité humaine. Jusque dans les années 1970, les PCBs furent utilisés à l'échelle industrielle comme fluides isolants (transformateurs, condensateurs électriques), fluides hydrauliques, lubrifiants, plastifiants, pour la protection du bois et dans des peintures. Par la suite, il a été mis en évidence que les PCBs présentaient une grande toxicité, une exposition chronique induisant des effets cancérogènes et tératogènes sur l'organisme humain (*Feix et al., 1995 ; Miège et al., 1999*). De plus, les PCBs possèdent la particularité de s'accumuler préférentiellement dans les graisses animales, surtout au niveau du lait des mammifères. Leur dissémination présente donc un risque sanitaire non négligeable concernant l'accumulation de

ces composés au niveau de la chaîne alimentaire (*Feix et al., 1995*). Ainsi, depuis 1987, leur production commerciale est strictement interdite en France, en raison de leur présence inquiétante dans de nombreux compartiments de l'environnement (*Miège et al., 1999*).

Au niveau des réseaux d'assainissement, les deux sources principales en PCBs susceptibles de contaminer les boues issues de l'épuration des eaux urbaines sont les suivantes :

- ◆ Une source d'origine industrielle (traitement du bois, installations électriques,...) avec un lessivage des sols lors des pluies, ou lors de rejets accidentels dans le réseau d'assainissement (fuite de transformateur,...).

- ◆ Une source plus diffuse ayant pour origine des sols contaminés (terres, bitumes,...) avec une persistance à long terme (demi-vies de plusieurs années).

Leurs caractéristiques hydrophobes, du même ordre de grandeur que celles des HAPs, leur confèrent la propriété de s'adsorber fortement aux matières organiques et aux composés lipophiles. Ils ont donc tendance à se contrer facilement dans les boues de station d'épuration urbaines. Or, leur grande stabilité chimique leur confère également une certaine résistance à toute dégradation biologique. Les PCBs sont donc considérés comme étant des composés relativement persistants dans l'environnement naturel et pouvant avoir un impact chez l'homme via leur accumulation dans la chaîne alimentaire. Toutefois, comme dans le cas des HAPs, il semblerait que les PCBs ne soient pas directement absorbés par le système racinaire des plantes dans les sols contaminés (après épandage de boues contaminées par exemple), mais ils restent plus vraisemblablement fortement adsorbés sur la paroi cellulaire des racines. Le principal risque serait alors que ces composés entrent dans la chaîne alimentaire par le biais d'adsorption de sols ou de racines contaminées (*Robert Gan et al., 1994*). L'épandage de boues contenant certaines teneurs en PCBs est donc particulièrement surveillé depuis 1987.

Ainsi, et de même que pour les HAPs, la concentration en PCBs dans les boues urbaines est la conséquence directe de leur faible solubilité dans l'eau et de leur forte affinité pour les particules en suspension. Toutefois, la contamination en PCBs des boues urbaines possède souvent une origine locale due à une certaine activité industrielle, donc plus facile à confiner avec un suivi du réseau d'assainissement, alors que l'ubiquité des HAPs ne permet pas de traiter à la source ce type de pollution.

C2. Méthodes d'analyse des PCBs

De manière générale, les méthodes d'extraction des PCBs d'une matrice solide sont identiques à celles utilisées dans le cas des HAPs (cf. *Chapitre B2, Méthodes d'analyse des HAPs*). Les principales méthodes d'extraction sont donc : le Soxhlet (le plus utilisé), les ultrasons, les micro-ondes, l'extraction accélérée avec solvant (AS \square) et l'extraction avec fluide supercritique (SF \square). De par leurs propriétés physico-chimiques proches de celles des HAPs, les PCBs peuvent être extraits d'une matrice solide avec les mêmes solvants d'extraction, le plus utilisé étant un mélange d'hexane et d'acétone (*Miège et al., 1999*). Cependant, lors de l'extraction, certains composés soufrés contenus dans les échantillons de boues peuvent interférer au cours de l'analyse, il est donc préférable, dans le cas des PCBs, d'ajouter aux échantillons des copeaux de cuivre préalablement activés, copeaux complexant par réaction d'oxydoréduction les composés soufrés indésirables.

Concernant l'analyse des extraits obtenus, et contrairement aux HAPs, celle-ci est préférentiellement effectuée par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC- \square CD) ou à un spectromètre de masse (GC-MS), les PCBs étant des composés semi-volatiles. Cette dernière technique (GC-MS) donne des résultats plus difficiles à interpréter mais peut fournir des renseignements sur les intermédiaires de réaction lors du suivi de la biodégradation des PCBs. Alors que la détection des HAPs par fluorimétrie demande une réelle optimisation pour la détermination des longueurs d'onde d'excitation et d'émission spécifique à chaque molécule, la détection des PCBs ne demande que la reconnaissance des pics d'intérêt dans un milieu complexe. Toutefois, dû aux nombreuses molécules interférantes présentes dans les boues, les étapes de « clean up » et de fractionnement restent primordiales.

C3. La dégradation des PCBs

Comme dans le cas des HAPs, il existe deux grands modes de dégradation des PCBs, soit sous conditions aérobies, soit sous conditions anaérobies. De plus, les propriétés relativement lipophiles des PCBs et leur affinité vis à vis des matrices organiques conduisent à ce que ce soit plus vraisemblablement les aspects physico-chimiques liés au transfert de matière qui prédominent lors du processus de biodégradation dans des milieux solides complexes.

C3-1. Mécanismes de dégradation des PCBs par voie biologique

C3-1-1. Biodégradation aérobie des PCBs

□n dépit des propriétés réfractaires des PCBs vis à vis de leur dégradation biologique, celle-ci a été largement étudiée et de nombreux aspects de leur dégradation en conditions aérobies ont été déterminés avec certitude (métabolisme, aspects génétiques, physiologiques et détermination phylogénétique des micro-organismes intervenant dans cette biodégradation,...). Ainsi, de nombreuses espèces ont été isolées, certaines utilisant les PCBs comme source unique de carbone et d'énergie. Les espèces les plus fréquemment rencontrées font partie des genres *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Rhodococcus* sp., *Burkholderia* sp.,... (Abramowicz,1990 ; Chaudhry et Chapalamadugu,1991 ; Focht et al., 1996 ; Mukerjee-dhar et al.,1998). Pour la plupart de ces espèces, il a été observé que les PCBs les moins chlorés (1 à 3 atomes de chlore) sont généralement plus facilement biodégradables en conditions aérobies que les composés les plus chlorés (4 à 8 atomes de chlore) (Abramowicz,1990 ; Mohn et Tiedje.,1992). Plus précisément, toutes les espèces isolées sont capables de dégrader les composés les moins chlorés et seulement quelques rares espèces peuvent s'attaquer aux composés comportant plus de 4 atomes de chlore. Cette propriété commune aux micro-organismes d'un même écosystème conduit donc à la dégradation préférentielle des PCBs les moins substitués en milieu complexe (Abramowicz,1990 ; Mohn et Tiedje.,1992). De plus, la biodégradation des PCBs est plus difficile si les atomes de chlore sont branchés en *ortho* sur le cycle et est, au contraire, facilitée si l'un des cycles n'est pas substitué, l'attaque enzymatique se réalisant toujours sur le cycle le moins chloré (Commandeur et Parsons,1990 ; Furukawa,1994).

Le suivi du catabolisme de ces PCBs a permis de déterminer les grandes étapes les plus fréquemment rencontrées lors de leur dégradation (voir **Figure C2**). Comme dans le cas des HAPs, la voie métabolique de dégradation débute par l'action d'une dioxygénase qui crée des liaisons alcools entre un atome d'oxygène et un atome de carbone du cycle. L'enzyme la plus fréquemment retrouvée est la 2,3-dioxygénase (et rarement la 3,4-dioxygénase retrouvée uniquement chez des micro-organismes dégradant exceptionnellement les PCBs les plus substitués) (Abramowicz,1990 ; Furukawa,1994). Dans un schéma de dégradation complet, les micro-organismes vont accumuler peu à peu du chlorobenzoate ou du chlorocatéchol qui pourront alors être minéralisés par d'autres micro-organismes. □n effet,

rarement une seule espèce de micro-organisme peut minéraliser entièrement un PCB (nécessité de posséder une pyrocatéchase II pour métaboliser le catéchol par exemple) (Commandeur et al.,1996 ; Heider et Fuchs,1997).

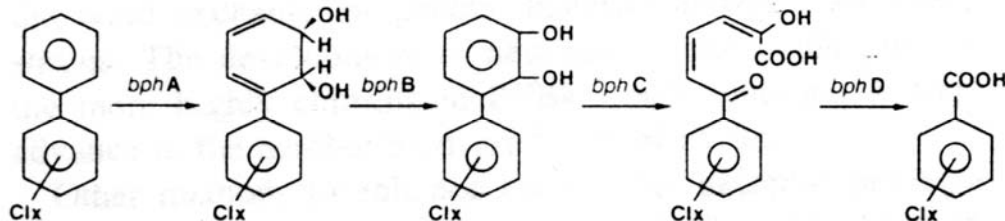


Figure C2 : Voie de dégradation du biphenyl et x-chlorobiphenyl chez *Pseudomonas* sp. LB400 (Abramowicz,1990). (*bphA* = 2,3-dioxygénase ; *bphB* = dihydrodiol dehydrogenase ; *bphC* = 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygénase ; *bphD* = 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoïque acide hydratase).

D'un point de vue génétique, les gènes codant pour les différentes enzymes sont les suivants (opéron *bph*) : *bph A*, *bph B*, *bphC* et *bphD*. Ces gènes, retrouvés dans de nombreuses espèces capables de dégrader les PCBs, possèdent une forte homologie entre eux. En effet, il semblerait que ces gènes, portés par un plasmide, puissent se transmettre entre bactéries et que leur évolution moléculaire puissent conduire à des affinités différentes pour chaque PCB, du monochlorobiphenyl à l'heptachlorobiphenyl (Mukerjee-Dhar et al.,1998 ; Chaudhry et Chapalamadugu,1991). D'un point de vue stéréochimique, les différences d'affinité pour les PCBs se traduisent par des schémas de dégradation d'isomères différents avec soit une préférence pour des atomes de chlore en *ortho*, soit en *para* (Mukerjee-Dhar et al.,1998). Les différences d'affinités de substrat peuvent également provenir de la multiplicité des gènes. Ainsi, le plasmide portant les gènes *bph* comporte de multiples répétitions de chaque gène, chaque copie étant plus ou moins activée en fonction du substrat disponible (Arai et al.,1998). De plus, la transmission entre bactéries de ces caractères, initialement portés par un plasmide, s'effectuerait également à l'aide d'un transposon identifié chez certaines bactéries du sol comme pouvant s'insérer dans le chromosome bactérien (Bedard et Quensen.,1995 ; Furukawa,1994). C'est ainsi qu'il a été retrouvé des gènes relativement proches pour leur séquence et dans leur organisation chez des espèces différentes comme *Pseudomonas* sp. et *Alcaligenes* sp. (Abramowicz,1990). De même que pour les HAPs, le transfert des gènes de dégradation *bph* permet d'expliquer également la présence d'activité de dégradation des PCBs un peu partout dans l'environnement (Focht et al., 1996). De plus, au fil des générations et des

mutations, il semblerait que le gène codant pour la 2,3-dioxygénase provienne d'un ancêtre commun à d'autres voies de dégradation comme celles du toluène, du benzène et du naphthalène (Furukawa,1994). D'un point de vue régulation de l'opéron *bph*, et de même que pour les voies métaboliques de dégradation du naphthalène activées par le salicylate, l'opéron *bph* est activé en présence d'un intermédiaire dans le milieu réactionnel : le biphényl (Abramowicz,1990). A contrario, l'accumulation de certains intermédiaires peut inhiber la dégradation des PCBs, comme le benzoate (Layton et al.,1998), voire même de trop fortes concentrations en biphényl (Mohn et al.,1997).

A noter que certains champignons possèdent également le potentiel métabolique pour dégrader les PCBs. Ils présentent notamment la propriété de dégrader les PCBs les plus lourds à de très faibles concentrations (jusqu'à près de 250 $\mu\text{g.kg}_{\text{MS}}^{-1}$). En fait, les enzymes impliquées dans ce type de dégradation, chez *Aspergillus* sp. ou *Phanerochaete* sp., sont similaires à celles mises en œuvre pour la dégradation de certaines lignines et autres composés lignocellulosiques et retrouvées dans la dégradation d'autres composés aromatiques comme les HAPs (Abramowicz,1990 ; Beaudette et al., 1998).

C3-1-2. Biodégradation anaérobie des PCBs :

Récemment, il a été observé que certains micro-organismes issus de sédiments marins et de lits de rivières possédaient la capacité de dégrader les PCBs les plus chlorés. En effet, sous conditions anaérobies, les PCBs fortement substitués sont plus facilement biodégradables que les PCBs les moins chlorés. La dégradation des trichlorobiphényles (3-PCB) aux pentachlorobiphényles (5-PCB) voir même de certains octachlorobiphényles (8-PCB) conduit alors à la formation de di- ou trichlorobiphényles plus difficilement dégradables. Néanmoins, les micro-organismes d'un écosystème anaérobie sont généralement capables de minéraliser entièrement les plus gros PCBs, les intermédiaires de réaction comme le chlorobenzoate pouvant être facilement métabolisés sous conditions anaérobies. Cependant, les vitesses de dégradation le long de la chaîne métabolique du PCB au CO_2 sont de plus en plus lentes. Ainsi, environ 90% de 3-,4-,5-PCBs donnent des 1-,2-PCBs, le reste étant minéralisé. Pour les PCBs les plus chlorés (6-,7-,8-PCBs) l'efficacité de dégradation peut atteindre des taux supérieurs à 30% (Abramowicz,1990). D'un point de vue écologique, la dégradation des PCBs sous anaérobiose stricte correspond plus vraisemblablement à l'action

combinée d'un consortium bactérien dégradant des substrats complexes et des PCBs (possibilité d'un cométabolisme mettant en jeu plusieurs micro-organismes et plusieurs substrats), aucun micro-organisme n'ayant pu être isolé sur culture pur de PCBs et un PCB pur ne pouvant être dégradé seul (Arai et al.,1998).

Plus précisément, la dégradation anaérobie des PCBs se réalise par déchloration réductrice où un chlore porté par la molécule de biphenyl est substitué par un atome d'hydrogène, la liaison chlore correspondant en fait à l'accepteur final d'électron (voir **Figure C3**).

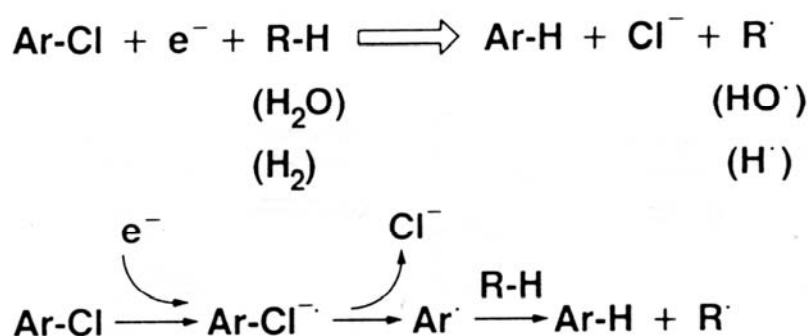


Figure C3: Mécanisme proposé de déchloration réductrice sous conditions anaérobies (Abramowicz,1990).

Concernant la stéréochimie des étapes de déchloration réductrice, les voies métaboliques de dégradation possèdent une certaine préférence pour les PCBs substitués en *meta* et en *para*, réduisant ainsi la toxicité du milieu de manière significative (les PCBs en *meta* et *para* étant les plus toxiques) (Abramowicz,1990). Cependant, ces préférences stéréochimiques dépendent des conditions de dégradation, l'affinité d'un écosystème vis à vis de certains substrats peut en effet varier : en conditions sulfato-réductrices, les PCBs en *ortho* sont plus facilement dégradés, alors qu'en conditions méthanogènes, les PCBs en *para* sont préférentiellement dégradés (Hartkamp-Commandeur,1996).

Dans un milieu complexe, comme dans le cas des HAPs, les performances de dégradation d'un écosystème dépendent fortement du degré d'exposition aux PCBs. Plus la contamination du milieu aura été importante dans le temps, plus l'activité sera significative, la vitesse de dégradation étant plus rapide sur les PCBs les plus chlorés si l'inoculum bactérien a été acclimaté depuis de nombreuses années (Hartkamp-Commandeur et al.,1996). Cependant, il

peut exister une activité de dégradation de base significative sans que l'écosystème ait connu de longues contaminations antérieures (*Wu et al.,1996*). Par exemple, dans le cas du traitement anaérobie de boues urbaines, la propriété de détoxification des PCBs par biodégradation est largement présente, même si l'inoculum bactérien n'a pas subi de contamination à long terme en PCBs. Toutefois, ce genre de dégradation est fortement accélérée dans le cas d'un inoculum acclimaté aux PCBs depuis de longues années. Le temps d'adaptation globale de l'écosystème microbien varie entre 15 et 40 jours pour des PCBs de 3 à 5 atomes de chlore (essais réalisés en cultures discontinues) (*Chang et al.,1999*). Dans ce cas, la flore méthanogène est indispensable pour réaliser la déchloration réductrice des PCBs (*Chang et al.,1999*).

C3-2. Aspects physico-chimiques de la biodégradation des PCBs

Comme dans le cas des HAPs, la difficulté de dégradation des PCBs les plus substitués proviendrait plus vraisemblablement de leur faible biodisponibilité que de la présence de micro-organismes potentiellement aptes à les dégrader (*Robert Gan et al.,1994*). En effet, de par leur nature plutôt lipophile et leurs faibles concentrations, les PCBs possèdent une certaine tendance à se lier à la matrice organique contenue dans les sols, les boues et les sédiments. Les aspects de transfert de masse et de biodisponibilité du substrat sont donc primordiaux lors de la biodégradation des PCBs en milieu complexe. Ainsi, l'ajout de sédiments, augmentant la surface d'adsorption disponible, possède un effet négatif sur la biodégradation, dû à la baisse de la biodisponibilité des PCBs (*Hartkamp-Commandeur,1996*). De même, la vitesse de dégradation diminue significativement si la concentration en solides dans les boues augmente (*Chang et al.,1999*). Les modèles et les paramètres régissant le transfert des PCBs dans une matrice solide étant identiques à ceux retrouvés pour les HAPs, l'un des paramètres pouvant améliorer la biodisponibilité des PCBs est l'élévation de température. La température possède également un effet activateur sur le cométabolisme des PCBs en présence de biphényle (*Mohn et al.,1997*). Toutefois, les pertes abiotiques par volatilisation peuvent, dans le cas des PCBs, être particulièrement importantes, ces composés étant considérés comme semi-volatiles à volatiles (*Miège et al., 1999*).

Les PCBs possèdent donc des propriétés physico-chimiques proches de celles des HAPs, le principal facteur limitant la biodégradation des PCBs étant donc leur biodisponibilité. Ainsi, l'ensemble des techniques utilisées pour l'amélioration des

performances de dégradation d'un écosystème sur les HAPs peuvent être également utilisées, comme l'addition de surfactants, de solvants, ... (cf. Chapitre B3. La dégradation des HAPs).

C3-3. Techniques de bioremédiation et de bioaugmentation

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour la bioremédiation de sites contaminés par des PCBs. Récemment, Anid *et al.*, (1991) ont montré l'efficacité d'un procédé séquentiel anaérobie/aérobie pour dégrader à plus de 80 % un mélange synthétique riche en PCBs (Aroclor 1242) et en présence de biphényl. L'inoculum utilisée fut un sédiment de rivière contaminée acceptant comme activateur cométabolique le biphényl. Sur eaux usées, il a également été montré l'efficacité du couplage d'un procédé anaérobie acidogène et d'un procédé aérobie pour la dégradation du biphényl avec une performance d'élimination supérieure à 97 % (Ng *et al.*, 1999). En comparaison, le procédé de compostage ne présente qu'une biodégradation limitée (3 %) de ce même mélange de PCB (Aroclor 1242) (Brunner *et al.*, 1985). Les aspects physico-chimiques pourraient, en effet, fortement limiter la biodégradation de ces composés lors de processus de fermentation à l'état solide.

Afin d'améliorer les performances d'élimination des PCBs dans les sols, de nombreuses voies sont en cours d'étude avec pour objectif d'augmenter la biodisponibilité de ces composés en milieu complexe. Pour cela, comme dans le cas des HAPs, l'utilisation de surfactants, de cométabolites comme le biphényl ou l'introduction de souches pures dans des systèmes contaminés ont été envisagés (Lajoie *et al.*, 1994 ; Shi *et al.*, 1998). D'autres procédés physico-chimiques sont également proposés pour oxyder les PCBs comme l'utilisation d'UV (Shi *et al.*, 1998), de H₂O₂ (Koyama *et al.*, 1994) ou du couple UV-TiO₂ (Wang *et Hong*, 1999), le risque étant, comme pour les HAPs, de former des intermédiaires plus toxiques que les molécules mères.

Enfin, concernant les possibilités de bioaugmentation, Adriaens et Focht (1990) ont montré la possibilité d'introduire des souches pures dans des systèmes contaminés. En effet, l'ensemencement d'une souche d'*Acinetobacter sp.* dans un procédé à biofilm aérobie permettrait d'obtenir près de 99 % d'élimination du dichlorobiphényl.

En conclusion de cette présentation du contexte bibliographique, il est intéressant de souligner la complexité des interactions et des phénomènes impliqués dans la biodégradation des CTOs dans un environnement naturel. Néanmoins, les données retrouvées dans la littérature montre qu'il existe, d'une part, un réel potentiel microbiologique de dégradation de ces composés sous conditions aérobies et anaérobies, ceci pour des systèmes simples de laboratoire (culture pure), ou pour des écosystèmes fortement contaminés comme dans le cas de sols et de sédiments (consortium de biodégradation). D'autre part, il est fréquemment observé la forte influence des propriétés hydrophobes de ces composés et de leurs nombreuses interactions avec leur matrice. En effet, fortement adsorbés aux particules organiques, les CTOs sont le plus souvent peu biodisponibles dans leur environnement naturel vis à vis des micro-organismes susceptibles de les dégrader.

Dans le cadre de cette étude, les boues urbaines ont été choisies notamment pour leur importance environnementale (point de concentration des CTOs dans les filières de traitement des eaux), mais également pour les possibilités offertes par les procédés de stabilisation biologique pour dégrader ces composés. De par leur nature très organique, les boues constituent de plus un modèle d'étude relativement distinct des sols et des sédiments car elles peuvent présenter des propriétés d'adsorption particulièrement fortes des CTOs en raison de leur forte affinité pour la matière organique. Par ailleurs, il fut utilisé des boues naturellement contaminées en CTOs (de l'ordre de quelques $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$) afin d'estimer au plus près l'influence des interactions entre le substrat et la matrice solide sur le potentiel biologique de dégradation de ces composés. Encore peu étudiée dans le cas des boues urbaines, la biodégradation de ce type de composés lors de procédés de traitement requiert de plus une certaine vigilance vis à vis de deux points majeurs : L'un consiste en la fiabilité analytique, qui est relativement important au regard des faibles concentrations rencontrées dans l'environnement (quelques $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$) et des difficultés d'extraction de ces molécules du sein de leur matrice. L'autre point consiste en ce que les pertes mesurées en ces composés dans des systèmes de dégradation puissent parfois être le résultat de phénomènes non biologiques, dits abiotiques. Ainsi, il est le plus souvent nécessaire d'estimer la part de ces pertes afin de pouvoir montrer des pertes réelles dues à l'activité biologique.

Chapitre D

Matériel et Méthodes

Dans ce chapitre, l'ensemble des matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail seront présentés. Dans un premier temps, le dispositif expérimental (réacteurs et solutions), ainsi que le matériel biologique utilisé seront décrits dans le détail.

Ensuite, seront exposées les différentes méthodes d'analyse utilisées, aussi bien pour le suivi « classique » de réacteurs biologiques de digestion de boues (biogaz, DCO, MS, MV), que pour le suivi des HAPs et PCBs lors de ce procédé.

Par la suite, une technique de biologie moléculaire permettant la caractérisation d'un écosystème méthanogène d'archaebactéries sera décrite.

Suivra alors le dispositif expérimental et les méthodes d'analyse utilisées pour la réalisation d'expérimentation comportant des radioéléments (C^{14}).

Enfin, il sera présenté les différentes méthodes d'analyse des résultats utilisés au cours de ce travail, avec notamment les tests statistiques mis en oeuvre ainsi que la méthode de calcul des performances d'élimination en HAPs et PCBs des réacteurs de digestion.

D1. Dispositif expérimental

D1-1. Réacteurs de digestion anaérobie

L'ensemble des réacteurs de digestion anaérobie mis en oeuvre au cours de l'étude utilise un procédé continu en cellules libres proche d'un réacteur infiniment mélangé (RIM), simulant ainsi les conditions de fonctionnement des digesteurs industriels. Ces bioréacteurs présentent un volume utile de 5 litres (voir **Figure D1** et **Photo D1**). La mise en oeuvre du système continu est réalisée par une série alternée de soutirage en boues digérées et d'alimentation en boues mixtes fraîches, à l'aide de pompes péristaltiques fonctionnant à une fréquence de 4 fois par jour. Ce mode de fonctionnement a été préalablement validé pour représenter fidèlement le comportement en chemostat de réacteurs présentant de longs temps de séjour (supérieurs à 10 jours). Par ailleurs, le réservoir d'alimentation en boues fraîches (1,5 l) est réfrigéré (4°C) afin d'éviter une dégradation du substrat entre deux changements de stock en boues fraîches (une fois par semaine). De même, les gaz de sortie des réacteurs sont réfrigérés (4°C) pour limiter les pertes en eau dans le réacteur. Le biogaz est collecté en sortie de réfrigérant et le volume produit est mesuré à l'aide d'un système de colonne à bulles renversée. Véritable indicateur des conditions de méthanogénèse, la composition du biogaz est déterminée périodiquement (une fois par semaine).

Concernant les variables opératoires, la température des réacteurs est régulée à l'aide d'un bain-marie et a été initialement fixée à 35°C (base de comparaison). La consigne température est vérifiée par mesure directe au sein du réacteur. D'autre part, le pH (non régulé) reste relativement constant pour l'ensemble des réacteurs anaérobies, avec environ $7,7 \pm 0,2$ unités pH. Suffisamment puissant pour créer des conditions de mélange proches d'un réacteur infiniment mélangé, le système d'agitation des réacteurs anaérobies est de type magnétique (250 rpm). Le temps de séjour hydraulique de base est initialement fixé à 40 jours, ce qui représente le temps de séjour maximum applicable pour un digesteur industriel (les HAPs et PCBs nécessitant de longs temps de dégradation).

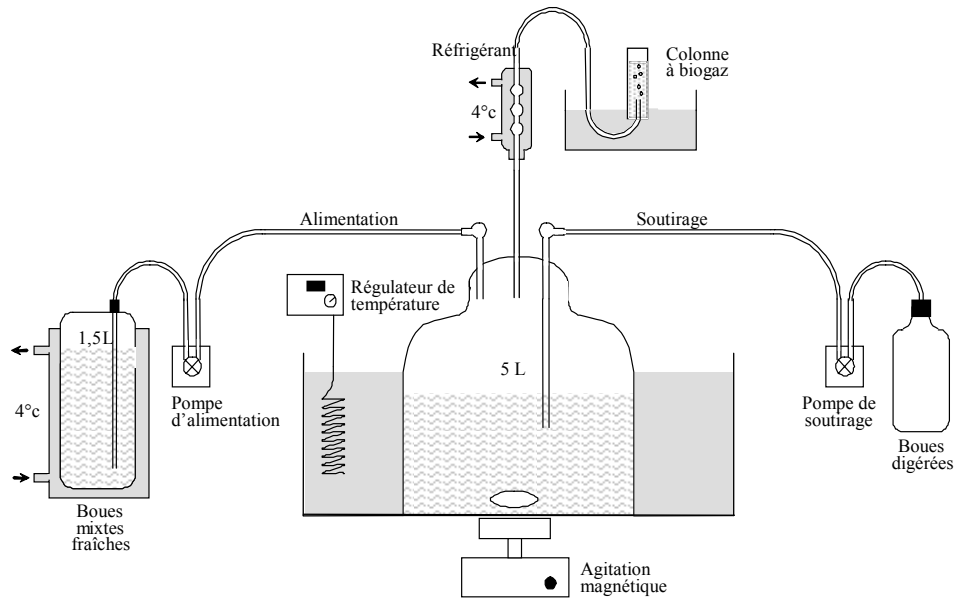


Figure D1 : Représentation schématique des réacteurs anaérobies de digestion

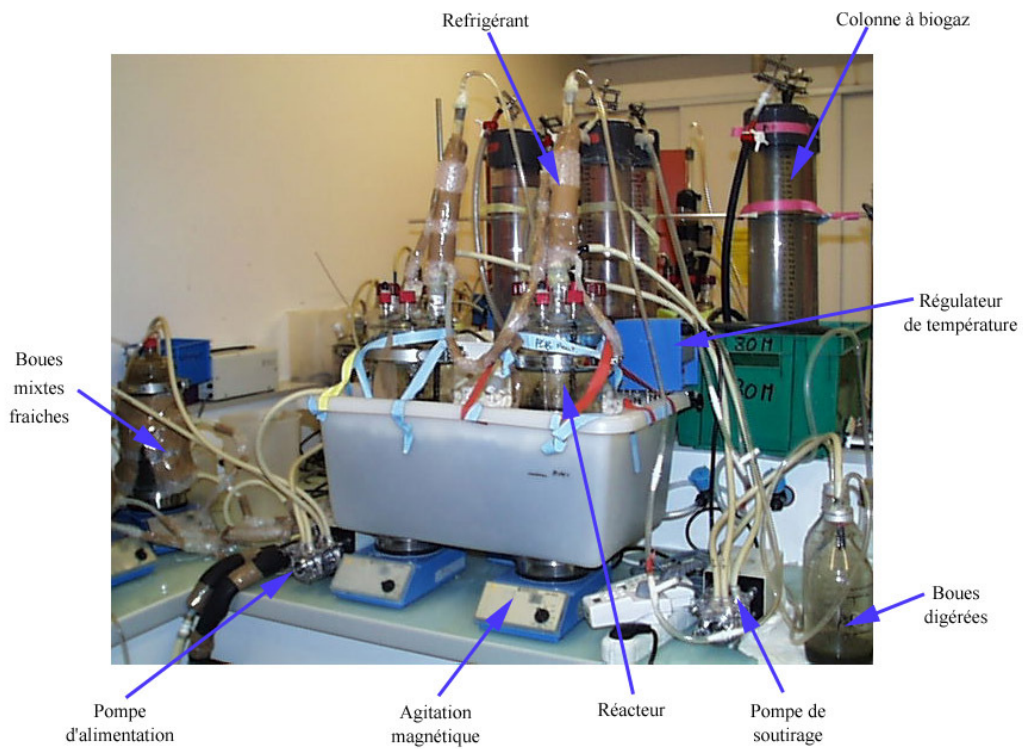


Photo D1 : Photographie des réacteurs anaérobies de digestion

Tableau D1 : Variables opératoires et caractéristiques des réacteurs anaérobies (Stock 1 et Stock 2 correspondent à des stock de boues fraîches, ou substrat, issues de la station contaminées par des HAPs, les concentrations en HAPs entre les deux stock étant significativement différentes).

NOM usuel	Temps de séjour hydraulique (jours)		Température (°C)	Substrat	Inoculum	Adjuvant		HAPs		Témoin NaNO ₃ 100 mM
	40	35				Nature	Concentration (g/l)	Stock 1	Stock 2	
ADA	40	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	---	✓	-	-
T35	40	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	---	✓	-	✓
ADA45	40	45	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	---	✓	-	-
T45	40	45	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	---	✓	-	✓
ADA55	40	55	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	---	✓	-	-
T55	40	55	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	---	✓	-	✓
NADA	40	35	Boues fraîches	0% Adapté	---	---	---	✓	-	-
NADA 4+	40	35	Boues fraîches	4 % Adapté	---	---	---	✓	-	-
NADA 10+	40	35	Boues fraîches	90 % Adapté	---	---	---	✓	-	-
ADABio	20	35	Boues fraîches	100 % Adapté + Sédiments	---	---	---	-	✓	-
ADA20	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	---	✓	-	-
ADAKem	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	KEMAZUR™	0,5 g/l	✓	-	-
BADA	20	35	Boues fraîches broyées	100% Adapté	---	---	---	✓	-	-
ADASter	20	35	Boues fraîches stérilisées UV	100% Adapté	---	---	---	-	✓	-
ADACH ₄	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	BromoEthane Sulfonate (BES)	1 g/l	-	✓	-
ADAMet	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	METHANOL	7,9 g/l	-	✓	-
ADATylox	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	TYLOXAPOL	1 g/l	-	✓	-
ADATergi	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	TERGITOL-NP10	1 g/l	-	✓	-
ADABrij	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	BRJL-35	1 g/l	-	✓	-
ADAPCB	40	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	---	-	-	✓
TPCB	40	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	---	-	-	✓

Pour information, les différents paramètres étudiés ainsi que la dénomination des réacteurs biologiques mis en œuvre sont présentés dans le **Tableau D1**. Les réacteurs témoins correspondent à des réacteurs supplémentés avec de l'azide de sodium, inactivateur de l'activité biologique (NaN_3 , 100 mM). A noter également que le BromoEthaneSulfonate (ou BES) est utilisé comme inhibiteur spécifique de la méthanogénèse. La concentration d'utilisation à 1 g.l^{-1} a été préalablement déterminée à partir de données bibliographiques (Freedman et Gossett, 1989 ; le Van et al., 1998 ; Pulliam Holoman et al., 1998). Le KemazurTM est un mélange tensioactif limitant la formation de mousse (composé synthétisé industriellement à la formulation confidentielle). Le Tyloxapol, le Tergitol NP10 et le Brij35 sont des surfactants anioniques fréquemment utilisés pour solubiliser les HAPs et autres composés hydrophobes.

D1-2. Réacteurs de digestion aérobie

Les réacteurs aérobies mis en oeuvre correspondent également à des procédés continus en cellules libres proches de réacteurs infiniment mélangés, simulant ainsi les conditions de fonctionnement des digesteurs industriels. Ces bioréacteurs aérobies possèdent un volume utile de 4 litres. Ils fonctionnent en mode continu par alimentation et soutirage alternés 4 fois par jour (voir **Figure D2** et **Photo D2**). Le réservoir d'alimentation (1,5 l) ainsi que les gaz de sortie sont réfrigérés (4°C). Afin de limiter les pertes hydriques, l'air entrant est saturé en eau à l'aide d'une colonne à bulles (5 litres d'eau nanopure). La quantité d'air totale fournie au système à l'aide d'un diffuseur est d'environ 0,3 VVM (Volume d'air par Volume de réacteur par Minute), quantité suffisante pour obtenir des concentrations en oxygène dissous supérieures à 7 mg.l^{-1} . L'apparition de mousse sous ces conditions opératoires a nécessité l'addition en continu d'un composé tensioactif jouant le rôle d'antimousse : le KemazurTM, ajouté à une concentration moyenne de $0,5 \text{ g.l}^{-1}$.

Par comparaison avec les réacteurs anaérobies, la température est régulée à l'aide d'une résistance chauffante directement implantée dans le réacteur et d'une sonde reliée à un régulateur PID (voir **Figure D2**). La température est initialement fixée à 35°C . Le pH (non régulé) reste également relativement constant pour l'ensemble des réacteurs aérobies, à environ $7,2 \pm 0,2$ unités pH. Le temps de séjour hydraulique de base, de 20 jours, représente le temps de séjour maximum pour un digesteur aérobie industriel.

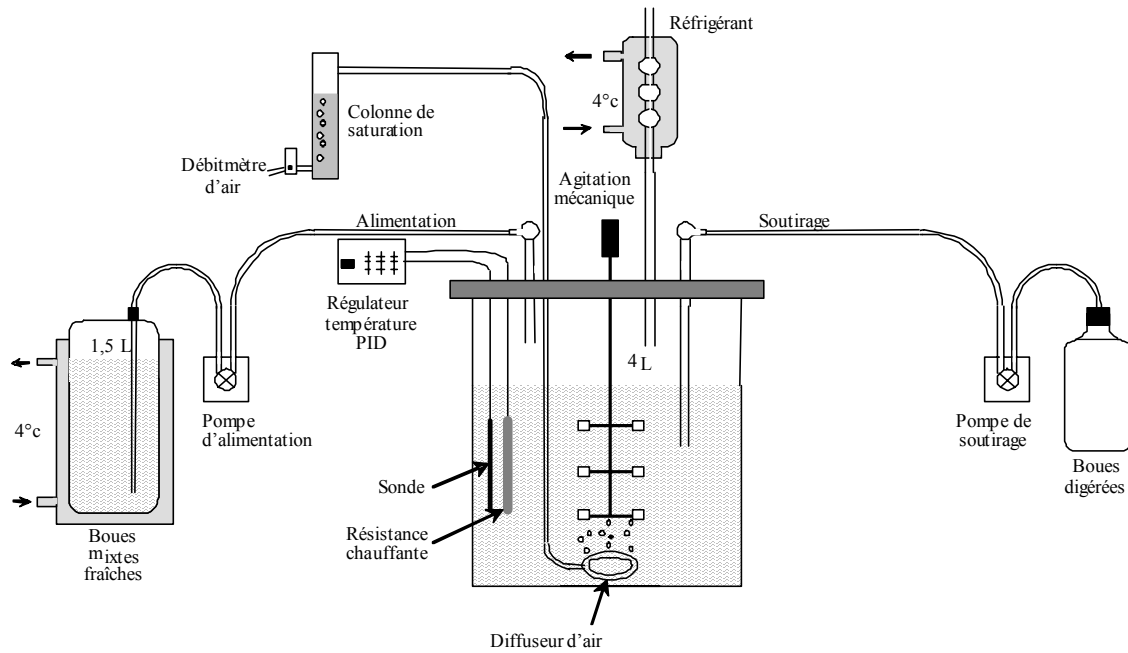


Figure D2 : Représentation schématique des réacteurs aérobies de digestion de boues urbaines.

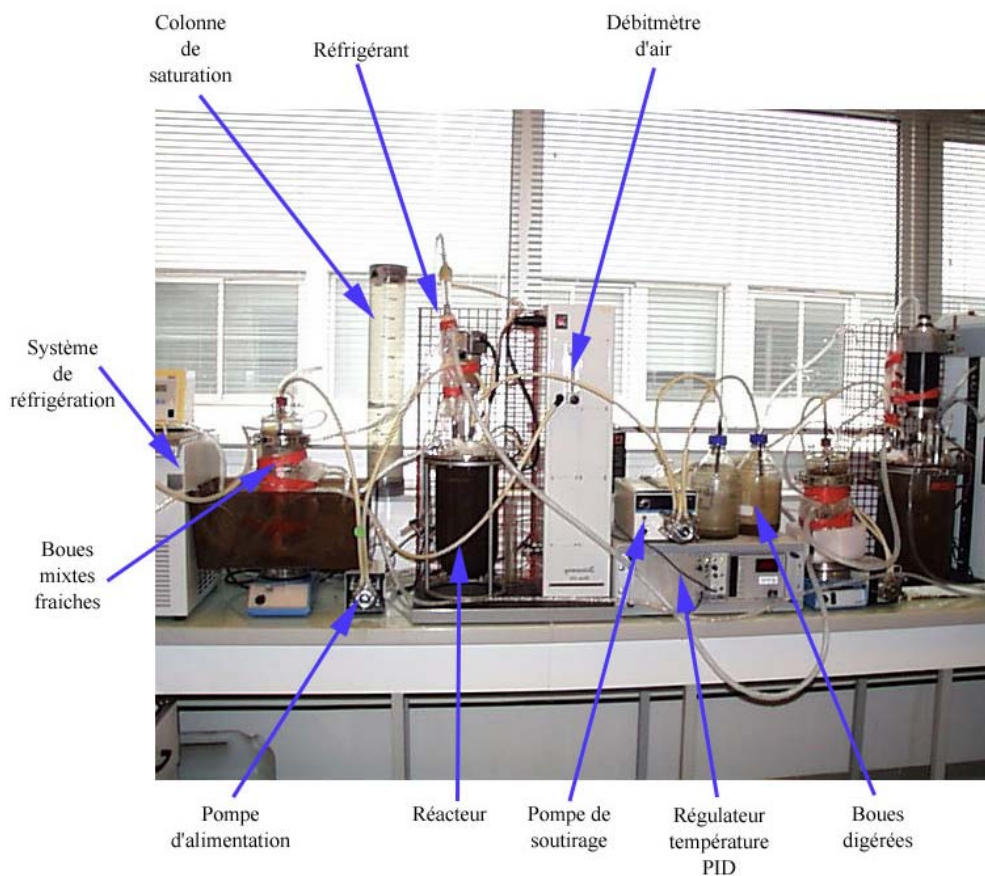


Photo D2 : Photographie de réacteurs aérobies de digestion de boues urbaines.

Tableau D2 : Variables opératoires et caractéristiques des réacteurs aérobies. (Stock 1 et Stock 2 correspondent à des stock de boues fraîches, ou substrat, issues de la station contaminées par des HAPs, les concentrations en HAPs entre les deux stock étant significativement différentes).

NOM usuel	Temps de séjour hydraulique (jours)	Température (°C)	Substrat	Inoculum	Adjuvant		HAPs		Ténacité NaN_3 100 mM
					Nature	Concentration (g/l)	Stock 1	Stock 2	
Aéro	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	✓	-	-
Taéro	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	✓	-	✓
Aéro45	20	45	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	✓	-	-
Taéro45	20	45	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	✓	-	✓
Aéro55	20	55	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	✓	-	-
Taéro55	20	55	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	✓	-	✓
AéroMet	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	METHANOL	7,9 g/l	-	✓	-
AéroTylox	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	TYLOXAPOL	1 g/l	-	✓	-
AéroTergi	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	TERGITOL-NP10	1 g/l	-	✓	-
AéroBrij	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	BRIJ-35	1 g/l	-	✓	-
AéroPCB	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	-	-	✓
TaéroPCB	20	35	Boues fraîches	100% Adapté	---	---	-	-	✓

Les différents paramètres étudiés ainsi que la dénomination des réacteurs biologiques aérobies mis en œuvre sont présentés dans le **Tableau D2**. De même que pour les réacteurs anaérobies, les réacteurs témoins correspondent à des réacteurs biologiques supplémentés avec de l'azide de sodium, inactivateur de l'activité biologique (NaN_3 , 100 mM).

D1-3. Matériel et solutions standards

D1-3-1. Solvants et verrerie

La verrerie et le matériel utilisés sont préalablement lavés à l'aide d'un mélange Acétonitrile/Acétone (50:50) afin d'éliminer toutes contaminations en HAPs résiduels. Les solvants utilisés pour le rinçage de la verrerie, pour l'extraction des échantillons de boues et lors de l'analyse par HPLC sont d'une pureté supérieure à 99,8 % pour l'Acétonitrile (J.T.Baker 9017), 99,5 % pour l'Acétone (J.T.Baker 8002), 95 % pour l'Hexane (J.T.Baker 8044), 99,8% pour le Méthanol (J.T.Baker 8492) et 99,5 % pour le Toluène (J.T.Baker 8077). L'eau utilisée est de qualité nanopure (résistivité de $18,0 \pm 0,1 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$).

Les surfactants utilisés correspondent à des solutions de synthèse, pures à plus de 99% pour le Tergitol NP10 (Sigma[®]), le Tyloxapol (Acros Organics[®]) et le Brij35 (Acros Organics[®]). L'azide de sodium (NaN_3) ainsi que l'acide salicylique ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$) sont fournis par Riedel de Haën[®] (pureté minimum de 99%). Enfin, le BromoEthaneSulfonate, ou BES, est fourni par FLUKA Chemica[®].

D1-3-2. Préparation des solutions standards d'HAPs et de boues contaminées

◆ Solutions standards diluées (SSD) utilisées pour l'analyse des HAPs :

Une solution standard étalon (Ultra Scientific[®] PM612-1 PAH Mixture) est utilisée afin de réaliser, par dilutions successives, une courbe de calibration pour l'analyse de l'ensemble de 14 HAPs (voir liste ci-dessous). Les concentrations minimales et maximales de cette courbe sont déterminées en fonction des objectifs de répétabilité et de reproductibilité de la chaîne analytique (respectivement 2% et 5%). Les dilutions sont réalisées dans de l'acétonitrile, puis sont aliquotées dans des fioles d'analyse closes (1 ml), protégées de la lumière et sont stockées à -20°C . Chaque aliquot correspond à une analyse unique utilisée

soit pour le calcul de la courbe de calibration de l'appareil, soit pour la vérification de l'étalonnage avant une série d'analyse. Ainsi, les solutions standard diluées (ou SSD) permettent la réalisation de courbes de calibration, en échelle logarithmique, pour chaque HAP, ces courbes étant comprises entre 100 µg.l⁻¹ et 10 mg.l⁻¹ (Naphtalène), entre 20 et 2000 µg.l⁻¹ (Fluorène, Fluoranthène, Benzo(b)fluoranthène, Dibenzo(ah)Anthracène, Benzo(ghi)pérylène) et entre 10 et 1000 µg.l⁻¹ (Phénanthrène, Anthracène, Pyrène, Benzo(a)Anthracène, Chrysène, Benzo(k)Fluoranthène, Benzo(a)Pyrène, Indeno(123cd)Pyrène).

◆ Stock de boues contaminées et boues certifiées :

Le mélange en boues mixtes urbaines (ou Substrat), utilisé pour alimenter en continu les bioréacteurs, correspond à un prélèvement (stock d'environ 800 litres) d'une station présentant une contamination dite "naturelle " depuis quelques années, soit en HAPs soit en PCBs. A noter qu'au cours de l'étude de mise en évidence et d'optimisation de l'élimination des HAPs, deux lots distincts de boues fraîches (de même origine mais de concentrations différentes) ont été successivement utilisés, le premier lors de la mise en évidence et des premières phases d'optimisation de la dégradation des HAPs et le second pour la seconde phase d'optimisation et de caractérisation de la digestion anaérobie (voir **Tableau D3** ; cf **Chapitres F et G**).

Tableau D3 : Concentrations moyennes (en mg.kg_{MS}⁻¹) en HAPs et PCBs mesurées dans les différents lots de boues mixtes fraîches contaminées utilisées comme Substrat au cours de l'étude. (l'erreur présentée est le résultat de la non-homogénéité du lot total de boues et non de l'analyse seule)

[HAPs : Fluo=Fluorène, Phé=Phénanthrène, Anth=Anthracène, Fluor=Fluoranthène, Pyr=Pyrène, B(a)A=Benzo(a)Anthracène, Chrys=chrysène, B(b)F=Benzo(b)Fluoranthène, B(k)F=Benzo(k)Fluoranthène, B(a)P=Benzo(a)Pyrène, DB=Dibenzo(ah)Anthracène, B(ghi)P=Benzo(ghi)Pérylène, Ind=Indeno(123cd)Pyrène.]

HAPs :	Fluo	Phé	Anth	Fluor	Pyr	B(a)A	Chrys	B(b)F	B(k)F	B(a)P	DB	B(ghi)P	Ind	Somme
Boues HAPs <i>Stock 1</i> (+/- 13,1 % max.)	0,54	3,83	0,99	10,31	10,4	3,5	4,16	4,47	2,29	3,94	0,71	2,62	3,68	51,45
Boues HAPs <i>Stock 2</i> (+/- 4,8 % max.)	0,22	1,26	0,19	2,03	2,59	0,86	1,08	1,12	0,63	1,51	0,16	0,59	1,27	13,51
PCBs	n°28	n°52	n°101	n°118	n°138	n°153	n°180	Somme						
Boues PCBs (+/- 11,5 % max.)	< 0,01	0,020	0,217	0,184	0,429	0,477	0,308	1,71						

D'autre part, un stock de boues séchées a été utilisé lors de l'optimisation des conditions d'extraction des HAPs d'une matrice boue naturellement contaminée en HAPs (standard interne au laboratoire). Ce stock a été préparé à partir d'un échantillon de boues mixtes préalablement digérées dans des conditions anaérobies méthanogènes (35°C). Ce stock de boues fut obtenu par centrifugation (25 min., 20000 g), puis séchage du culot à l'abri de la lumière (48 h, 40°C) et tamisage sur une grille de 2 mm. L'échantillon de boues fut alors stockés à -20°C, à l'abri de la lumière.

Suite à l'optimisation des méthodes d'extraction sur ce matériel interne au laboratoire, l'utilisation de boues certifiées (CRM088-PAH in dried sewage sludge-Promochem) a permis de confirmer la validité de la méthode choisie par comparaison avec les concentrations fournies par un ensemble de 11 laboratoires internationaux agréés (Commission of the European Community). L'estimation des concentrations en HAPs est pour le Pyrène (2,16 ±0,09 mg.kg_{MS}⁻¹), le Benzo(a)Anthracène (0,93 ±0,09 mg.kg_{MS}⁻¹), le Benzo(a)Pyrène (0,91 ±0,09 mg.kg_{MS}⁻¹), le Benzo(b)Fluoranthène (1,17 ±0,08 mg.kg_{MS}⁻¹), le Benzo(k)Fluoranthène (0,57 ±0,05 mg.kg_{MS}⁻¹), l'Indeno(123cd)Pyrène (0,81 ±0,06 mg.kg_{MS}⁻¹).

D2. Matériel biologique

D2-1. Ecosystèmes de digestion anaérobie

Deux grands types d'inoculum anaérobie ont été utilisés, soit adapté, soit non-adapté à une contamination en HAPs. L'inoculum adapté aux HAPs correspond à un digestat méthanogène de boues urbaines prélevé en sortie d'un digesteur anaérobie mésophile d'une station contaminée en HAPs depuis quelques années (teneurs supérieures aux normes). Par comparaison, l'inoculum non adapté provient d'une station n'ayant jamais connu de contamination significative en HAPs (Béziers (34-Hérault). A noter que l'essai de bioaugmentation a été réalisé par addition à 10% en poids secs de sédiments fortement contaminés en HAPs.

Pour l'ensemble des réacteurs, les conditions anaérobies de départ ont été obtenues par dégazage de l'inoculum à l'azote (15 min.).

D2-2. Ecosystèmes de digestion aérobie

Dans le cas des réacteurs aérobies, l'inoculum adapté correspond à un prélèvement du surplus en boues activées (boues secondaires) issues du traitement des eaux usées, d'une station contaminée en HAPs depuis quelques années (origine identique à l'inoculum anaérobie). De même, l'écosystème non adapté de digestion aérobie correspond à des boues activées prélevées dans une station non contaminée (Béziers, Hérault).

D3. Méthodes analytiques

D3-1. Mesures classiques de suivi de réacteurs de digestion

Lors des différentes études, un prélèvement de 350 ml en boues mixtes fraîches (substrat) est effectué à chaque changement d'alimentation (une fois par semaine). Pour la caractérisation de l'état du bioréacteur, les prélèvements sont effectués en sortie de réacteur par récupération du volume de soutirage au cours des 3 jours précédent les analyses afin d'obtenir une quantité minimale d'échantillon d'environ 350 ml (les calculs porteront ainsi sur une moyenne de 3 jours pour la détermination des concentrations de sortie de réacteur).

Après homogénéisation du prélèvement, la détermination de la teneur en **matières sèches totales** est réalisée par séchage (24 heures, 105 °C) de 20 ml d'échantillon (moyenne sur 3 mesures). La teneur des matières minérales (et par différence la teneur des **matières organiques volatiles**) est déterminée par combustion (12 heures à 550°C) (*d'après Clesceri et al, 1985*).

La teneur en **Azote organique** (protéines, peptides, acides aminés,...) et ammoniacal est déterminée selon la méthode Kjeldhal (*d'après Clesceri et al, 1985*). Cette analyse ne prend pas en compte l'azote des ions nitrites et des ions nitrates, toutefois une analyse par chromatographie ionique montre des concentrations négligeables en nitrites et nitrates pour les différents échantillons (<15 mg.l⁻¹). La méthode d'analyse de l'azote total correspond à une minéralisation totale de l'échantillon à chaud et en milieu acide (H₂SO₄ + catalyseur Kjeldhal), transformant ainsi l'azote organique en ammoniacque. Après alcalinisation par

addition de soude, l'ammonium est distillé, recueilli dans une solution acide et dosé par titration à l'acide chlorhydrique (0,1 N).

La mesure de la concentration en **Phosphore total** correspond à une minéralisation en milieu sulfurique d'un mélange échantillon-acide nitro-perchlorique (*d'après Clesceri et al, 1985*). L'acide phosphorique est alors transformé en acide phosphomolibdique qui est lui-même réduit par l'acide 1-amino-2-naphtol-4-sulfonique, la mesure s'effectuant par colorimétrie (à 660 nm).

La teneur en **Demande Chimique en Oxygène (DCO)** s'effectue par l'oxydation totale de la matière organique par un excès de bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) en milieu acide (H_2SO_4) et à chaud. L'excès d'oxydant est ensuite titré par une solution réductrice de sel de Mohr (sulfate de fer et d'ammonium $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$, 0,25 N) (*d'après Clesceri et al, 1985*).

Les **Acides Gras Volatils** (ou AGV) sont dosés par chromatographie en phase gazeuse sous un gradient de température piloté par un appareil CHROMPACK CP900 équipé d'un détecteur à ionisation de flammes. Les conditions opératoires sont : colonne de migration Econocap FFAP (Altech[®]) ; gradient de température du four de 90°C à 130°C ; température de l'injecteur 250°C, température du détecteur : 275 °C, pression du gaz vecteur (azote) : 335 kPa, pression d'hydrogène 150 kPa ; pression d'air : 150 kPa. Un volume de 0,2 µl d'un mélange (50/50 vol/vol) de l'échantillon et de l'étalon interne (acide éthyl-butyrique à 1 g.l⁻¹) est injecté et les résultats obtenus sont traités par un logiciel informatique Chromcard.

La détermination de la concentration en **méthanol** des échantillons de boues a été réalisée suivant le protocole décrit par Laplace (1992). Le méthanol est dosé par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un appareil INTERSMAT IGC 121 DFL équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Les conditions opératoires sont les suivantes : Colonne Carbowax B/ 5% Carbowax 20 M avec une température du four de 85°C, de l'injecteur de 150°C et du détecteur de 150°C. La pression du gaz vecteur (azote) est de 1,8 bars. L'échantillon injecté (2µl) est constitué d'un volume égal d'échantillon de boues centrifugées et d'un étalon interne (Ethanol à 2 g.l⁻¹).

L'analyse de gaz (CO_2 , O_2 , H_2 , N_2 et CH_4) est réalisée par chromatographie en phase gazeuse par injection d'1 ml du biogaz produit. La séparation des différents gaz de fermentation est réalisée sur deux colonnes montées en série : le CO_2 est séparé sur une

colonne Hayesep Q et l'O₂, le H₂, le N₂ et le CH₄ sont séparés sur un tamis moléculaire de 5 Å. Le gaz vecteur est de l'argon (300 kPa). La température du four est de 30°C et la température de l'injecteur est fixée à 100°C. La détection est effectuée à l'aide d'un catharomètre (principe du pont Wheatston) dont l'intensité est initialement fixée à 90mA. L'intégration des pics est réalisée à l'aide d'un intégrateur de type Shimadzu® GC8A. La calibration de l'appareil est préalablement réalisée avec un mélange de gaz contenant CO₂, O₂, H₂, N₂ et CH₄ en concentrations connues, respectivement (en volume) 25 %, 2 %, 5 %, 10 % et 58 %.

D3-2. Méthode d'analyse des HAPs et PCBs

L'analyse des HAPs et PCBs est réalisée en plusieurs phases (voir **Figure D3**). Suite aux analyses précédentes, l'échantillon restant (environ 300 ml) est centrifugé (25 min., 20000g) afin d'obtenir une fraction liquide (phase aqueuse) et une fraction solide (phase boue). Avant analyse, la phase aqueuse est stockée à -20°C. La phase solide est préalablement dissociée à l'aide de billes de verre, puis séchée (60 heures, 40°C) dans une étuve ventilée, broyée, tamisée (tamis de 2 mm) et enfin stockée à -20°C à l'abri de la lumière.

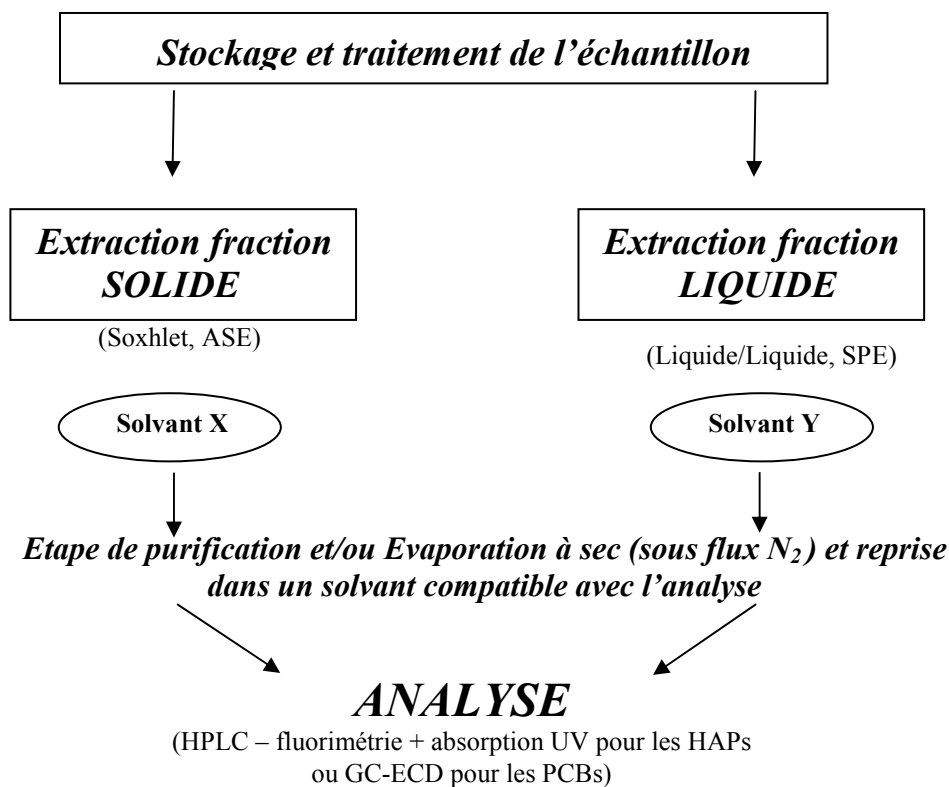


Figure D3 : Schéma de principe d'une chaîne d'analyse des HAPs et PCBs présents dans des boues urbaines contaminées.

Les HAPs et PCBs sont alors extraits et analysés dans chaque phase de l'échantillon (voir **Figure D3**). L'extraction de ces composés de la phase aqueuse est effectuée par extraction liquide/liquide (contact de solvants non miscibles) ou par extraction sur phase solide-colonne (SPE). L'extraction des HAPs et PCBs de la fraction solide (boues sèches) est réalisée soit par la méthode classique du Soxhlet, soit par extraction accélérée au solvant (ou ASE).

D3-2-1. Extraction Liquide/Liquide des HAPs de la fraction liquide

Les micropolluants organiques peuvent être extraits de la fraction liquide à l'aide d'une extraction liquide/liquide classique. Suivant le protocole soumis par la pré-norme AFNOR (2001), l'extraction liquide/liquide des HAPs et PCBs d'un liquide aqueux est réalisée en ampoule à décanter par addition d'un solvant apolaire non miscible à l'eau (Hexane 100%). L'extraction s'effectue par addition de 65 ml d'Hexane dans l'ampoule à décanter contenant 200 ml d'échantillon aqueux. Après agitation (10 min.) et décantation (30 min.), la fraction hexane est récupérée. L'extraction est répétée trois fois, soit, au total, près de 1 volume d'Hexane par volume d'échantillon. Après soutirage de la fraction aqueuse, l'ampoule est rincée avec 20 ml d'Hexane. L'échantillon obtenu est séché durant 2 heures à – 20 °C afin d'éliminer l'eau résiduelle. La fraction Hexane est alors récupérée puis évaporée sous vide à 40°C (rotavapor Büchi) jusqu'à environ 5 ml. L'évaporation est complétée jusqu'à obtenir un résidu sec sous courant d'azote à sec. Le résidu est repris dans 2 ml d'Acétonitrile (extrait ensuite analysé par la chaîne HPLC-fluorimètre).

D3-2-2. Extraction sur phase solide (SPE) des HAPs / PCBs de la fraction liquide

L'extraction des HAPs et PCBs de la phase aqueuse est effectuée sur colonne d'affinité (SUPELLEAN ENVI-18 (SupelcoTM) de 6 ml). La colonne (0,5 g de silice greffée C₁₈) est conditionnée par imprégnation goutte à goutte de 6 ml d'un mélange Toluène : Méthanol (50 :50) (2 fois), puis 6 ml de méthanol (3 fois) et enfin 6 ml d'eau ultrapure (3 fois). Ensuite, l'échantillon (environ 200 ml) est passé (3 fois) goutte à goutte sans assécher la colonne entre chaque passage. Enfin, la colonne est séchée sous vide (10 min.) et les HAPs et les PCBs sont élués de la colonne avec 2 ml d'un mélange Toluène/Méthanol (50:50) (2 fois). Ce mélange, avant passage dans la colonne, est utilisé pour le rinçage de la verrerie ayant contenu l'échantillon aqueux. L'extrait ainsi obtenu est alors évaporé à sec sous courant

d'azote et le résidu est repris dans 1,56 g (2 ml) d'Acétonitrile pour les HAPs ou dans 1,32 g (2 ml) d'Hexane pour les PCBs.

D3-2-3. Extraction au Soxhlet des HAPs de la fraction solide

La méthode d'extraction au Soxhlet des HAPs d'une matrice boue prend en compte les recommandations de la pré-norme AFNOR (2001) qui préconise, entre autres, d'utiliser un mélange Hexane/Acétone (50 :50). Les paramètres d'extraction sont : une quantité (maximale au regard du type de Soxhlet utilisé) de 120 ml d'Hexane/Acétone (50 :50), un temps d'extraction de 8 heures, une température d'environ 200°C, 0,5 g de boues sèches (conditions identiques à l'ASE), 1 g d'alumine (pour la purification des composés polaires) et 1,5 g d'hydromatrix (pour la dispersion et le séchage). Les rendements d'extraction sont calculés à partir des concentrations maximales obtenues à l'ASE sur l'échantillon de boues mixtes sèches contaminées en HAPs (soit 0,87 mg.kg_{MS}⁻¹ Fluorène ; 6,92 mg.kg_{MS}⁻¹ Phénanthrène ; 1,6 mg.kg_{MS}⁻¹ Anthracène ; 14,97 mg.kg_{MS}⁻¹ Fluoranthène ; 13,59 mg.kg_{MS}⁻¹ Pyrène ; 5,27 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(a)anthracène ; 6,82 mg.kg_{MS}⁻¹ Chrysène ; 6,21 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(b)fluoranthène ; 3,07 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(k)fluoranthène ; 5,69 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(a)pyrène ; 0,98 mg.kg_{MS}⁻¹ Dibenzo(ah)anthracène ; 3,74 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(ghi)pérylène ; 5,28 mg.kg_{MS}⁻¹ Indeno(123cd)pyrène).

L'extrait obtenu est évaporé jusqu'à 5 ml sous vide à 40°C (Rotavapor Büchi). L'extrait est ensuite purifié sur colonne (Supelco LC-SI 6ml). Pour cela, la colonne est conditionnée avec 5 ml d'Hexane puis séchée. Ensuite l'échantillon est élué avec 2 ml (en 2 fois) d'Hexane. L'extrait récupéré est évaporé à sec sous courant d'azote et le résidu est repris avec un volume déterminé par pesée d'Acétonitrile (2 ou 5 ml).

D3-2-4. Extraction à l'ASE (Accelerated Solvent Extraction) des HAPs / PCBs de la fraction solide

L'extraction des HAPs et PCBs de la phase solide (boues sèches) est effectuée sur un système ASE (Dionex ASE200). Le solvant d'extraction correspond à un mélange préparé manuellement d'Hexane/Acétone (50:50). Les paramètres d'extraction (température, pression, temps statique d'extraction,...) peuvent être modifiés à l'aide du logiciel incorporé à l'ASE 200 (Moduleware v.3.01 Bios 30.0). Après optimisation, ces paramètres sont les suivants :

Température = 120°C, Pression = 100 bars, 2 cycles, Temps statique = 5 minutes, Flush = 60 %, Temps de purge = 60 secondes.

La préparation des cellules d'extraction consiste en une série d'étapes : au fond de la cellule, un filtre en fibre de verre (diamètre 19 mm – Whatmann®) est déposé afin d'empêcher l'encrassement du système ASE par les impuretés de l'échantillon ; puis 1 g d'alumine (A1522-SIGMA) tassée est ajoutée afin de purifier l'extrait en retenant les composés les plus polaires et, ensuite, 1,5 g d'hydromatrix (dispersant - asséchant) (Hydromatrix-CéliteA158 VARIAN) est ajoutée et est mélangée à 0,5g de boues sèches.

Après extraction, l'extrait est évaporé à sec sous un courant d'azote. Le résidu obtenu est repris dans un volume connu d'Acétonitrile (1,56g (2 ml) ou 3,9g (5 ml)) déterminé par pesée, puis agité (10 minutes). Dans le cas des PCBs, l'extrait est repris dans 3,3 g (5 ml) d'Hexane. Après un temps de diffusion (30 minutes) à l'abri de la lumière, l'échantillon est aliquoté dans les fioles d'analyse HPLC et est soit immédiatement analysé dans le cas des HAPs, soit stocké à -20°C dans le cas des PCBs.

D3-2-5. Analyse des HAPs par RP-HPLC – Fluorimétrie / PDA

La chaîne d'analyse comprend un passeur d'échantillon (Waters 717 plus Autosampler), un dégazeur pour solvants (Waters InLineDegasser), un système de pompes péristaltiques (Waters 600 Controller), un détecteur à barrette de photodiodes (PDA) et un détecteur fluorimétrique JASCO FP-1520 programmable en fonction du temps d'analyse (longueurs d'onde d'excitation et d'émission comprise entre 220 et 700 nm). La liaison de la chaîne à un système informatique, par le biais du logiciel Millennium³² (version 3.05.01), permet non seulement de piloter et d'automatiser l'ensemble de la chaîne analytique (excepté le fluorimètre JASCO FP-1520), mais également d'acquérir, de stocker et de traiter (intégration informatisée des pics d'élution) l'ensemble des données recueillies par le détecteur.

La colonne greffée en C₁₈ utilisée en chromatographie liquide à hautes performances en phase inverse (Bakerbond™ PAH 16-Plus) est maintenue à température constante (25°C) à l'aide d'un bain chauffant. Le système à pompes péristaltiques (Waters 600) permet le mélange graduel de solvants en fonction du temps d'analyse afin d'obtenir un gradient

d'élution linéaire de 30 minutes pour un débit de 0,3 ml/min (d'un mélange d'Eau/Acétonitrile 40/60 (v/v) à un mélange Eau/Acétonitrile 0/100 (v/v)) (Temps d'analyse de 95 minutes). L'installation en tête d'une pré-colonne de sauvegarde (BakerbondTM 7128-01) permet la préservation de la colonne de séparation.

L'étalonnage du détecteur avec les solutions standard diluées (Ultra Scientific PM-612-1 PAH Mixture) est effectué tous les 100 échantillons (erreur de reproductibilité par rapport à la courbe d'étalonnage inférieure à 2%) et une seule injection de 20µl est suffisante (erreur de répétabilité inférieure à 1%). Le programme du fluorimètre en fonction des HAPs détectés est le suivant : 280/330 (Naphthalène), 266/312 (Fluorène), 250/370 (Phénanthrène), 250/400 (Anthracène), 280/430 (Fluoranthène), 260/410 (Pyrène), 280/430 (Benzo(a)anthracène), 268/384 (Chrysène), 234/420 (Benzo(b)fluoranthène), 270/400 (Benzo(k)fluoranthène, Benzo(a)pyrène), 300/407 (Dibenzo(ah)anthracène, Benzo(ghi)pérylène) et 300/500 (Indeno(123cd)pyrène).

D3-2-6. Analyse des PCBs par GC-ECD

◆ Purification des extraits :

Le soufre interfère fréquemment avec l'analyse des PCBs. Il peut être éliminé des échantillons de la manière suivante (avant purification) : l'échantillon est évaporé partiellement au rotavapor (1 ml). Des copeaux de cuivre réduit sont ajoutés et laissés en contact au moins 15 min. Quelques millilitres d'hexane sont alors ajoutés (de 2 à 5 ml) et l'échantillon est laissé en contact durant 30 minutes. L'extrait exempt de soufre est alors récupéré par filtration (récupération des copeaux de cuivre) et est ensuite purifié sur colonne de florisil.

La préparation d'une colonne de verre contenant du florisil est préconisée pour la purification d'échantillons issus de boues de station d'épuration contaminées en PCBs. Cet adsorbant permet notamment d'obtenir des extraits purifiés pour la recherche de résidus PCBs ou HAPs dans les boues. Ainsi, le florisil (60/100 mesh) est préalablement séché (16 heures à 130°C) et activé par ajout de 2ml d'eau pour 100g de florisil (agitation 4 heures). La colonne de purification est alors remplie (après rinçage à l'hexane) de florisil activé (5g), puis de Sodium anhydre Na₂SO₄ (5mm). La colonne est alors conditionnée dans l'hexane (remplir la

colonne). L'extrait à purifier est ensuite déposé en tête de l'adsorbant. L'extrait purifié est élué par passage d'hexane (5 fois le volume de la colonne).

♦ Analyse des PCBs par GC-ECD :

Après extraction et purification, les échantillons sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur un appareil muni d'un détecteur à capture d'électrons (VARIAN3400, passeur automatique VARIAN 8200, injecteur split/splitless à 300°C Varian 1077 en mode splitless, colonne capillaire DB-530m x 0,25 mm x 0,25 µm). Le volume d'extrait injecté est de 1,5 µl et le gaz vecteur est de l'hélium. La température est programmée comme suit : 70°C pendant 1 min., un gradient de 18°C.min⁻¹ jusqu'à 280°C, puis 250°C pendant 5 min., gradient de 5°C.min⁻¹ jusqu'à 280°C et 280°C pendant 20 min (Temps total d'analyse de 42 min.). La limite de détection de la méthode est de 0,1 µg.kg_{MS}⁻¹. L'étalonnage de l'appareil est effectué chaque semaine par l'injection d'une gamme de solutions étalons de 2 à 50 µg.l⁻¹ et par ajout dans l'échantillon d'un étalon interne (PCB202 à 50µg.l⁻¹).

D4. Méthode de caractérisation moléculaire des archaea méthanogènes de digesteurs anaérobies

L'identification des principales espèces d'*archaea* méthanogènes est réalisée à partir de leur empreinte génétique ribosomale : l'ADNr 16S. L'ensemble des étapes réalisées est présenté sur la **Figure D4**. Dans un premier temps, les échantillons d'intérêt sont, après extraction et amplification de l'ADN 16S, analysés par SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) (Delbès, 2000). Cette technique permet de séparer et de détecter chaque séquence correspondant à chaque espèce bactérienne. Afin d'identifier les espèces en présence, les fragments d'ADN sont clonés et isolés pour être ultérieurement détectés un à un. Après sélection, les pics d'intérêt sont séquencés, chaque pic représentant un ADN16S et, par extension, une espèce d'*archaea*.

D4-1. Conservation des échantillons

Au cours du suivi du réacteur, plusieurs prélèvements de biomasse (10 mL) ont été effectués dans le but de caractériser la communauté bactérienne. Après centrifugation (7000 rpm, 10 min), le culot est repris dans 1 mL de guanidine thiocyanate (4 M Tris-HCl, pH7,5) et 150 µL de N-Lauroyl-sarcosine à 10 %. Des aliquots (500 µl) de l'échantillon sont conservés à -20 °C.

D4-2. Extraction- Purification de l'ADN total

La lyse cellulaire de l'échantillon est réalisée par chauffage (70°C, 1h) puis par action mécanique de micro-billes de zirconium dans un vibro-broyeur (10 min.). Les inhibiteurs de PCR (acides humiques) sont éliminés par précipitation suite à l'ajout de PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) et lavage des billes au TENP (TrisHCl-EDTA-NaCl-PVPP). L'ADN est ensuite précipité à l'isopropanol, puis purifié sur microcolonne Quiagen® (kit QIAamp). L'ADN ainsi extrait est conservé à -20°C. La qualité et la quantité d'ADN sont alors estimées par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7 % en présence de bromure d'éthidium (BET) permettant la visualisation de l'ADN sous UV.

D4-3. Amplification de la région V3 de l'ADNr 16S

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode qui permet d'amplifier *in vitro* un fragment d'ADN grâce à des amorces spécifiques, une polymérase et des désoxynucléotides (dNTPs). Chaque cycle de température permet l'amplification du brin d'ADN par dénaturation de l'ADN puis hybridation des amorces et enfin copie du brin (élongation). Dans le cas de la caractérisation moléculaire de population *archaea*, le fragment total d'ADN ribosomique 16S est, dans un premier temps, amplifié à l'aide d'une enzyme thermostable de réplication la *redTaq* polymérase (Stratagene®) (amorces PCR w2-w17, voir **Tableau D4**). Dans un deuxième temps, un fragment de cet ADN (d'environ 200 pb) correspondant à la région variable V3 de l'ADNr 16S est amplifié (amorces PCR w34-w36). Les amorces étant spécifiques des ADNr 16S *d'archaea*, la solution obtenue contient différents fragments d'ADN correspondant à chaque espèce *d'archaea*. A noter que l'amorce w34 est marquée à l'extrémité 5' à l'aide d'un fluorophore servant à la détection du fragment lors de l'analyse SSCP.

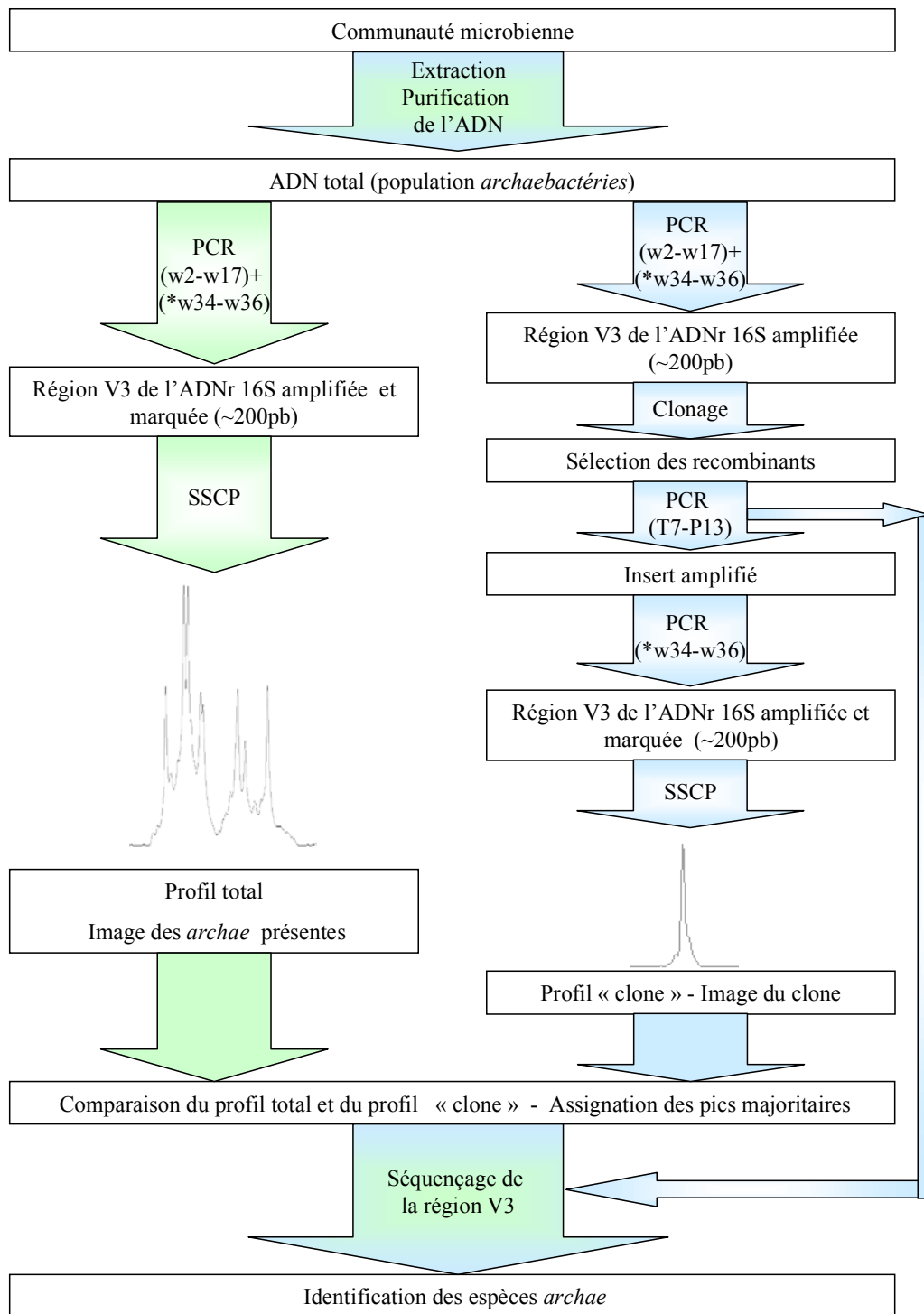


Figure D4 : Les différentes étapes de l'identification des espèces d'*archaea*.
 (* :fluorophore)

Tableau D4 : Séquence des amorces utilisées. (*Tet* : fluorescéine phosphoramidite).

<i>Amorce</i>	<i>Séquence</i>
w2	GNTACCTTGTTACGACTT
w17	ATTCYGGTTGATCCYGSCRG
w34	<i>Tet</i> -TTACCGCGCTGCTGGCAC
w36	TCCAGGCCCTACGGGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
P13	GACCATGGATTACGCCAA

L'enzyme utilisée pour la réaction de PCR (amplification de la région V3) est la polymérase thermostable *Pfu TurboDNA Polymerase* (Stratagene®), présentant de faibles taux d'erreur et produisant des amplifiats à « bouts francs ». La préparation du mélange réactionnel de la PCR suit les recommandations du fournisseur Stratagene®. Les paramètres de la PCR sont indiqués dans le **Tableau D5**.

Tableau D5: Paramètres des PCR effectuées sur le thermocycler 9700 (GenAmp thermocycler PE-Applied Biosystems).

Etape	PCR avant SSCP		PCR		PCR	
	avec <i>Pfu Turbo</i> (w34-w36)		avec <i>redTaq</i> (w2-w17)		avec <i>redTaq</i> (T7-P13)	
	<i>Température</i>	<i>Durée</i>	<i>Température</i>	<i>Durée</i>	<i>Température</i>	<i>Durée</i>
Dénaturation initiale	94°C	2 min.	94°C	10 min.	94°C	2 min.
Dénaturation	94°C 51°C 72°C	30 sec.	94°C 55°C 72°C	1 min.	94°C 50°C 72°C	1 min.
Hybridation						
Elongation						
Elongation finale	72°C	10 min.	72°C	10 min.	72°C	10 min.
Nombre total de cycle	30		30		30	

D4-4. Principe de la SSCP

La SSCP (single strand conformation polymorphism) est une technique qui permet de séparer en fonction de leur structure secondaire des fragments d'ADN de même taille mais de séquence différente. Appliquée à la région V3 de l'ADNr 16S, elle permet d'obtenir une empreinte moléculaire des écosystèmes microbiens. Elle est basée sur l'identification de chaque espèce d'*archaea* par séparation des différentes structures moléculaires secondaires de l'ADNr 16S. Après extraction de l'ADN total, et amplification de la région variable V3 (voir **Figure D4**), la SSCP permet ainsi de séparer les molécules simples brins en fonction de leur conformation spatiale, donc de leur séquence. La flore microbienne est alors représentée par un profil où chaque pic correspond à une séquence et donc à une espèce.

Avant analyse, les fragments d'ADNr 16S, mélangés à de la formamide (Applera[®]) et à un étalon interne (400 HD-rox, Applera[®]), sont dénaturés par chauffage (5 min. à 95°C) puis refroidis rapidement (10 min. dans l'eau glacée). Au cours de la migration, les molécules simples brins prennent une conformation secondaire stable par appariement au niveau de zones de séquences complémentaires. Les différentes molécules sont alors séparées par électrophorèse capillaire et détectées grâce au marquage de l'amorce w34 (détection du fluorochrome après excitation au laser). L'électrophorèse se réalise dans un séquenceur automatique Abi Prims 310 (Applied Biosystems[®]) et le logiciel GeneScan 3.1 permet de stocker et d'analyser les profils obtenus. Un protocole détaillé de la méthode est donné par Delbès (2000).

D4-5. Clonage de la région V3 dans *E.coli*

Afin d'assigner une espèce bactérienne à chaque pic majoritaire du profil SSCP sélectionné, un clonage est effectué dans un plasmide d'*E.coli* (3957 kb) comportant un site multiple de clonage (polylinker), un gène de sélection (kanamycine) et un gène non viable en cas de non insertion (gène *ccdB* dit gène « killer »). Les cellules compétentes TOP10 *E.Coli* sont ensuite transformées en suivant le protocole de clonage du kit TopoTA cloning kit (Invitrogen[®]). L'ADN cloné est la partie variable V3 de l'ADNr 16S amplifiée par PCR avec les amorces w34 et w36.

Le plasmide comportant un gène de résistance à la kanamycine, les clones sont purifiés par stries sur milieu solide LB (Luria Broth Agar) + Kanamycine (25 mg.ml⁻¹). Les

cellules transformées par un plasmide sans insert restent non viables suite à l'expression du gène « killer » *ccdB*. Une PCR sur colonie (polymérase *redTaq*, Sigma®) avec les amorces T7-P13 permet alors d'amplifier un fragment unique du plasmide d'environ 400kb (insert + site multiple de clonage) (voir **Tableau D4** et **Tableau D5**). Une seconde PCR sur le produit obtenu, avec les amorces w34-w36 et la polymérase *Pfu turbo* (Stratagene®), est effectuée amplifiant ainsi l'ADNr 16S de chaque clone (voir **Tableau D4** et **Tableau D5**). Les produits de PCR sont ensuite analysés par SSCP et comparés au profil total. Cette étape d'analyse des clones par SSCP permet un criblage précis des pics majoritaires, afin de ne séquencer que les clones co-migrant avec ces pics dans le profil complexe.

D4-6. Identification des clones

D4-6-1. Quantification – Purification des inserts

Les produits de PCR T7-P13 sont quantifiés par dépôt sur gel d'agarose à 2%. Les amplifiats (approximativement 20 ng d'ADN) sont ensuite purifiés avant la réaction de séquence afin d'éliminer les amorces non incorporées et les fragments d'ADN simples brins. Pour cela, un traitement enzymatique par l'Exonucléase I (USB) et la Shrimp Alcaline Phosphatase (SAP - USB) est effectué pendant 15 min. à 37°C. Les enzymes sont ensuite inactivées par élévation de la température (80°C pendant 15 min.).

D4-6-2. Séquençage des inserts

Le kit de séquence Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem®) est utilisé avec l'amorce P13. Ce kit contient une polymérase *AmpliTaq*, des dNTPs et des ddNTP marqués (termineurs d'élongation). Le mélange réactionnel et les conditions de réaction suivent les recommandations fournies avec le kit. Les produits d'extension sont alors purifiés par précipitation de l'ADN à l'éthanol-acétate (3M) pour éliminer notamment les ddNTP présents en excès.

Les échantillons ainsi purifiés sont déposés sur gel dénaturant de polyacrylamide-urée (Lon Ranger, Tebu®) permettant la séparation des molécules d'ADN à une base près. Les molécules marquées sont détectées par un laser dans le séquenceur automatique ABI 373 (Applied Biosystems®) (17 heures, 2500 V, 40 mA, 42W).

D4-6-3. Analyse des séquences

Les séquences obtenues sont alors comparées entre elles et avec les séquences présentes dans les bases de données internationales (Genbank) grâce au logiciel BLAST afin d'identifier et de positionner phylogénétiquement la séquence d'ADN_r 16S cloné (construction d'un arbre phylogénétique).

D5. Méthode de suivi de radioéléments (¹⁴C-Benzo(a)pyrène)

D5-1. Dispositif expérimental

D5-1-1. Bioréacteurs anaérobies

Les réacteurs anaérobies utilisés possèdent un volume utile de 1 litre (voir **Figure D5**). Chaque expérience de suivi de la molécule marquée radioactivement (¹⁴C) comprend un réacteur biologique et un réacteur témoin, ce dernier étant stérilisé par ajout d'azide de sodium (100 mM) et permettant ainsi de quantifier les pertes abiotiques. Ainsi, deux réacteurs fonctionnant en mode continu sont mis en œuvre dans le but d'étudier la biodégradation du ¹⁴C-Benzo(a)pyrène. Dans le cas du réacteur témoin, l'alimentation et le soutirage des boues des réacteurs sont réalisés manuellement et quotidiennement tout au long de l'expérience. Le temps de séjour hydraulique des réacteurs est de 40 ± 2 jours.

Pour les deux essais, la température est régulée et fixée à 35°C, la régulation de température s'effectuant à l'aide d'un bain marie à recirculation (réacteur à double enveloppe). Le biogaz produit est réfrigéré afin de limiter les pertes en eau. Après passage dans deux pièges successifs à CO₂ (NaOH 10 N), le gaz restant (méthane) est collecté à l'intérieur d'une colonne renversée (mesure du volume produit).

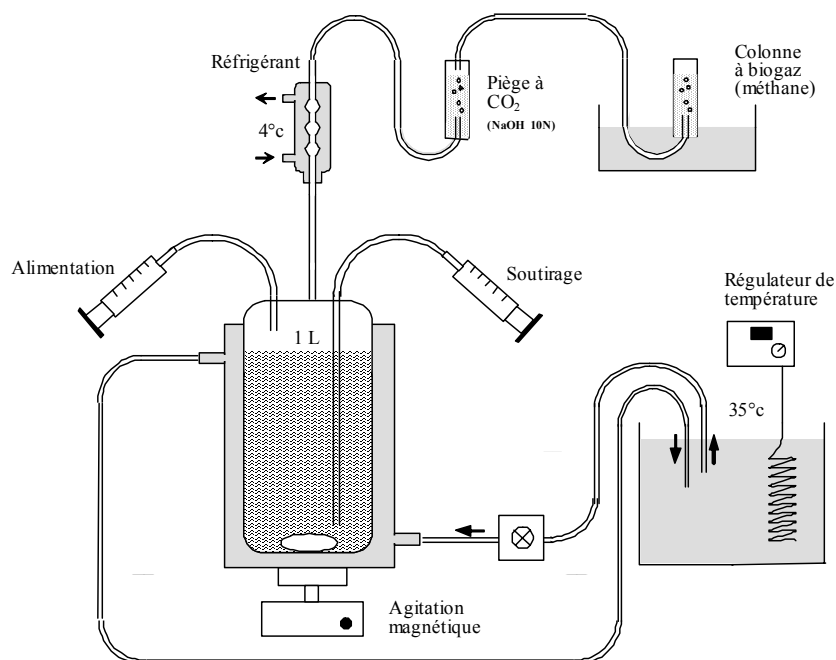


Figure D5 : Représentation schématique d'un réacteur anaérobie de digestion utilisé avec des radioéléments.

D5-1-2. Inoculum anaérobie

Les réacteurs sont inoculés avec des boues digérées issus de réacteurs anaérobies mésophiles (35°C). Les digestats anaérobies (inoculum) ne sont pas initialement marqués avec un HAP radioactif.

Avant introduction de l'inoculum dans le réacteur, un prélèvement de 350 ml est effectué afin de réaliser les mesures de suivi classique et des HAPs à l'instant initial. Le réacteur est alors dégazé durant 15 min. par bullage à l'azote. Un prélèvement de 350 ml est également effectué après 3 à 4 temps de séjour hydraulique, soit après 120 à 160 jours de fermentation (temps final t_f).

D5-2. Préparation du substrat supplémenté en ¹⁴C-Benzo(a)pyrène

Les préparations des boues fraîches marquées (ou substrat) sont réalisées extemporanément au moment de l'inoculation des réacteurs. Un prélèvement de 350 ml est

effectué avant et après contamination avec l'HAP marqué (t_0). La molécule utilisée est le ^{14}C -Benzo(a)pyrène (marqué en C_3) d'activité spécifique $26,6 \text{ mCi}\cdot\text{mmol}^{-1}$ (Sigma[®]).

Dans le cas de deux réacteurs fonctionnant en mode continu (biologique et témoin), le substrat en boues fraîches de l'ensemble de l'expérience (soit 4 litres par réacteur) est préparé par addition de 10 ml d'une solution diluée de ^{14}C -Benzo(a)pyrène ($24\cdot 10^6 \text{ dpm}\cdot\text{ml}^{-1}$) afin d'obtenir un substrat marqué à environ $6000 \text{ dpm}\cdot\text{ml}^{-1}$. Après ajout de l'azide de sodium à 100 mM (pour le cas du réacteur témoin), le substrat est aliquoté en fioles de 400 ml et est stocké à -20°C jusqu'à utilisation lors de l'alimentation du réacteur.

D5-3. Analyse des échantillons marqués ^{14}C

Afin de déterminer la quantité totale de radioactivité contenue dans les boues, chaque prélèvement de boues digérées ou de substrat est immédiatement analysé en suivant le Protocole A décrit ci-dessous.

Dans le cas des prélèvements de boues au temps initial (t_0) et au temps final (t_f), la radioactivité est mesurée au cours des différentes étapes de l'analyse des HAPs : Après centrifugation, la radioactivité du surnageant (1 ml) est mesurée suivant le protocole A. Après extraction à l'ASE, l'extrait obtenu (dans l'Hexane/Acétone 50/50) est analysé suivant le Protocole B. Après séparation de la molécule d'intérêt par RP-HPLC (et récupération du pic en sortie), la radioactivité est mesurée suivant le protocole B. Enfin la fraction de la radioactivité non extraite à l'ASE est obtenue par broyage (broyeur à billes pour tissus animaux) du mélange boue-hydrmatrix-alumine restant après extraction et la radioactivité totale de l'échantillon broyé est déterminée suivant le Protocole C.

Enfin, au temps final, la radioactivité contenue dans les pièges à CO_2 (NaOH 10N) est déterminée suivant le Protocole D.

- ◆ **Protocole A** : 1 ml d'échantillon est mélangé avec 10 ml d'un produit à fort pouvoir lytique : le Biofluor (Packard[®]). Après lyse de l'échantillon (24 heures), 10 ml de liquide scintillant Ready Protein+ (Beckman[®]) sont ajoutés. Après agitation, l'analyse est réalisée après 24 heures de contact.

- ◆ **Protocole B :** 1 ml d'échantillon est mélangé avec 10 ml de liquide scintillant d'Ultima Gold (Packard®). Après agitation, l'analyse est réalisée après 24 heures de contact.
- ◆ **Protocole C :** 1 ml d'échantillon est brûlé dans un oxidizer Packard 306. Le CO₂ produit est piégé dans du Carbosorb (Packard®) auquel sont ajoutés 10 ml de liquide scintillant Permafluor (Packard®). Après agitation, l'analyse est réalisée immédiatement.
- ◆ **Protocole D :** 10 ml de liquide scintillant Hionic (Packard®) sont ajoutés à 1 ml d'échantillon. Après agitation, l'analyse est réalisée après 24 heures de contact.

Quel que soit le protocole utilisé, l'échantillon est finalement analysé dans un compteur à scintillation (Liquid Scintillation Analyzer Tricarb 2100TR, Packard instruments®).

D6. Méthodes d'analyse des résultats

D6-1. Plans d'expérience (mise au point de l'extraction à l'ASE)

Afin d'étudier les différents paramètres de l'ASE, trois plans d'expériences distincts sont réalisés avec pour objectif principal l'optimisation de l'extraction (reproductibilité et efficacité d'extraction) et, dans un second temps, dans un souci d'économie de solvant, d'une réduction de la quantité d'échantillon consommé et du raccourcissement du temps d'analyse.

Ainsi, un premier plan d'expérience permet d'étudier l'influence de quatre paramètres considérés comme pouvant influencer significativement l'efficacité d'extraction, avec un niveau bas et un niveau haut pour chacun : la température (100 - 120 °C), le nombre de cycles (2 - 3), le temps statique d'extraction (5 min. - 8 min.) et le rapport du mélange d'extraction Hexane/Acétone (50 : 50 - 25 : 75). La pression est définitivement fixée à 100 bars (maximum recommandé par le constructeur dans le cas de boues sèches). La réalisation de ce premier plan d'expérience nécessite l'extraction de près de 48 échantillons (plan d'expériences à 4 facteurs, soit 16 essais avec 3 répétitions par essai pour les études

statistiques). Afin de réduire le nombre d'essai, un demi-plan d'expérience est, dans un premier temps, réalisé en étudiant l'influence des facteurs deux à deux par rapport à leur niveau bas et haut. En cas d'interactions significatives, le plan d'expérience sera complété au nombre total d'essais afin de déterminer le ou les facteurs ayant une influence sur l'extraction des HAPs.

Le second plan d'expérience concerne le taux de remplissage de la cellule d'extraction par le solvant (pourcentage de flush 60 % ou 90 %), afin de limiter les quantités de solvant utilisées, et le temps de purge de la cellule à l'azote, afin de réduire le temps d'analyse (60 ou 100 sec.).

Enfin, le troisième et dernier plan d'expérience permet d'étudier l'influence de la quantité de boue sèche à introduire dans la cellule (soit 1 g soit 0,5 g) afin de réduire la quantité d'échantillon à analyser.

D6-2. Tests statistiques

Pour chaque HAP, les résultats obtenus pour chaque essai d'un plan d'expérience sont comparés entre eux statistiquement à l'aide d'une analyse multiple de variance ou ANOVA à un facteur (le facteur étant la méthode d'extraction). Pour cela, chaque essai correspond à trois répétitions d'un même échantillon et l'ensemble des répétitions est considéré comme une moyenne d'extraction (efficacité d'extraction de l'HAP considéré), toutes les moyennes étant comparées globalement entre elles pour l'ensemble des essais (*selon Tomassone et al., 1993*). Une analyse de variance pour l'ensemble des essais d'un plan d'expérience est alors réalisée ainsi qu'une ANOVA à un facteur pour chaque HAP. Enfin, dans le cas du second et du troisième plan d'expérience, les moyennes des résultats d'extractions sont également comparées à l'aide d'une analyse de variances multiples (ANOVA à un facteur).

D'autre part, lors de la comparaison des performances d'extraction entre le Soxhlet et l'ASE, les résultats (concentrations pour chaque HAP) sont simplement comparés deux à deux à l'aide d'un test t suivant une loi de Student en supposant l'égalité des variances (*Tomassone et al., 1993*). Pour chaque test statistique (ANOVA et test t), les hypothèses de normalité et d'indépendance des observations (répétitions) sont préalablement posées. L'hypothèse nulle H_0 à 5 % (p valeur de l'ANOVA $< 0,05$ ou t valeur du test de Student $<$

8,610) considère que les moyennes (ou variances) sont identiques et qu'il n'existe aucune différence significative entre les extractions testées.

D6-3. Méthodes de calcul des performances des réacteurs de digestion

Les boues mixtes possédant de fortes variations en matières sèches et en CTO (de l'ordre de 20 %), l'étude de l'état d'équilibre à obtenir (conditions de réacteurs en continu) est rendue particulièrement complexe (variations en sortie). Ainsi, un bilan de matière est effectué en entrée et en sortie de réacteur afin de déterminer la concentration en CTO ou en matières sèches totales attendues en sortie de réacteur, pour tout instant t et de comparer avec les concentrations mesurées.

Le bilan de matière utilisé correspond à un bilan sur une enceinte fermée possédant un flux entrant et un flux sortant de matière, ainsi qu'un terme de production/consommation (R_{bio}) correspondant à l'activité biologique : V est le volume constant du réacteur, Q le débit en entrée/sortie et C les concentrations en entrée pour le substrat x (pour x substrats à différentes concentrations) (C_{ex}) et en sortie (C_s) de réacteur.

$$\text{Equation A : } V \frac{dC_s}{dt} = QC_{ex} - QC_s + R_{bio}$$

Après réarrangement (suppression du terme d'activité biologique R_{bio}) et intégration (en prenant comme $t=0$ l'instant où le substrat d'alimentation x est changée de concentration C_{ex} , donc pour $t=0$, $C_e=C_{ex}$ et $C_s=C_{s0}$ (concentration estimée pour ce $t=0$)), on obtient :

$$\text{Equation B : } C_s = \frac{C_{s0} - C_{ex}(1 - e^{(t/\tau)})}{e^{(t/\tau)}} \quad (\tau \text{ étant le temps de séjour hydraulique} = V/Q)$$

L'équation ainsi obtenue permet d'exprimer, à tout instant t, la concentration attendue en sortie d'un réacteur parfaitement stérile ($R_{bio} = 0$), infiniment mélangé et fonctionnant en continu. Par comparaison avec les sorties mesurées des réacteurs, les pertes abiotiques (réacteurs témoins) ou dues à l'activité biologique peuvent alors être quantifiées.

Chapitre E

Optimisation et validation d'une chaîne d'analyse de 14 HAPs présents dans des boues urbaines contaminées

Ce premier chapitre présente les résultats obtenus au cours de la mise au point d'une méthode d'analyse de 14 HAPs présents dans des boues urbaines naturellement contaminées. Le principal objectif fut d'obtenir une méthode reproductible et fiable à partir d'un faible volume d'échantillon (300-500 ml) et pour de faibles concentrations en HAPs (quelques $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$) et ce afin d'étudier ultérieurement le devenir de ces 14 HAPs au cours de la digestion de boues à l'échelle du laboratoire (la méthode d'analyse des PCBs étant déjà optimisée et validée).

Suite à l'optimisation de l'analyse des HAPs par RP-HPLC-fluorimétrie les méthodes d'extraction de ces composés de la fraction liquide aqueuse par SPE ou de la fraction solide à l'ASE seront à leur tour mises au point.

Suite aux résultats précédemment obtenus la fiabilité de la méthode globale d'analyse sera testée par comparaison avec la méthode d'extraction de référence au Soxhlet et par la détermination du recouvrement total en HAPs.

Enfin la méthode proposée sera définitivement validée à l'aide de boues certifiées.

Toute étude portant sur la biodégradation de composés traces organiques dans des boues urbaines demande des méthodes d'analyse présentant une bonne reproductibilité et une certaine fiabilité d'analyse, alors que ces composés sont faiblement concentrés (de l'ordre du $\mu\text{g.l}^{-1}$) et interagissent fortement avec les matières organiques des boues. En effet, lors d'expériences cinétiques, une faible reproductibilité d'analyse peut rapidement conduire à des interprétations statistiquement erronées d'un phénomène. La mise au point d'une méthode d'analyse répondant à ce type de contraintes a donc été envisagée pour permettre l'étude ultérieure de la biodégradation de ces composés traces organiques à l'échelle d'expériences de laboratoire.

Deux étapes sont à distinguer pour la mise au point de l'analyse de composés traces organiques : (1) l'extraction de ces composés et (2) leur quantification. Dans le cas des PCBs, les méthodes quantitatives d'analyse sont relativement bien connues et des méthodes déjà optimisées sont proposées, notamment celles utilisant une séparation par chromatographie en phase gazeuse et une détection par capture d'électrons ou GC-ECD (Miège *et al.* □ 1999 ; Miège □ 2000). Par comparaison, l'analyse quantitative des HAPs reste encore à être normalisée au regard des nombreux paramètres retrouvés dans la littérature pour leur séparation par RP-HPLC et leur détection par fluorimétrie (*cf Chapitre B-Tableau B* □). Il est toutefois à noter que, dans les deux cas, il est fréquemment rapporté des conditions d'extraction similaires sur matrices solides (AFNOR □ 2001 ; Miège □ 2000). Ainsi, sachant que la méthode d'analyse quantitative par GC-ECD utilisée pour le suivi des PCBs a préalablement été optimisée au sein du laboratoire d'analyse des sols de l'INRA (Arras), la présente étude s'est donc focalisée sur la mise au point de l'analyse de 14 HAPs présents dans des boues contaminées.

E1. Optimisation de la chaîne d'analyse de 14 HAPs par RP-HPLC et fluorimétrie

La mise au point d'une chaîne d'analyse de 14 HAPs dans les boues demande dans un premier temps d'obtenir des mesures reproductibles et fiables au niveau de l'étape finale de la chaîne, c'est à dire leur analyse par RP-HPLC couplée au détecteur fluorimétrique et au détecteur à barrette de diodes. En effet, afin d'optimiser l'extraction des HAPs d'une matrice

solide ou liquide, il est nécessaire que l'analyse finale des extraits obtenus présente des erreurs minimales de répétabilité et de reproductibilité (voir les définitions ci-dessous). Les erreurs maximales tolérables ont donc été fixées à 2 %.

L'erreur de répétabilité correspond à l'erreur commise par la technique d'injection, la détection et l'intégration des pics, ceci pour plusieurs injections d'un même échantillon. Une erreur de répétabilité minimale permettra de limiter le nombre d'injections, donc le temps total d'analyse. L'erreur analytique de reproductibilité est quant à elle définie comme étant l'erreur de positionnement vis à vis de l'étalonnage du détecteur. Elle est le résultat de la comparaison entre la réponse de l'injection d'un standard d'analyse par rapport à la courbe d'étalonnage de l'appareil fluorimétrique. Cette erreur résulte notamment de la dérive des appareils de chromatographie (encrassement de la colonne d'analyse et du détecteur) et des problèmes liés à la conservation des solutions étalons. Une erreur de reproductibilité minimale permettra d'obtenir des résultats fiables au niveau de la détermination des concentrations en HAPs.

E1-1. Détermination des conditions d'élution

Parmi l'ensemble des paramètres susceptibles d'être optimisés pour la séparation des HAPs par RP-HPLC, la température possède un effet particulièrement significatif sur la spécificité de séparation de ces composés (*Wise et al.* □ *1993* ; *Hesselink et al.* □ *1999*). En effet, il a été montré que la température de migration doit être la plus faible possible pour obtenir une meilleure efficacité de séparation des pics d'élution (*Hesselink et al.* □ *1999*). Au cours de cette étude, l'utilisation d'un bain-marie pour la régulation de la température ne permet d'abaisser la température opérationnelle qu'à un minimum de 25°C. Afin de ne pas se placer à la limite inférieure de régulation, des essais à 30 °C et 35°C ont été réalisés. Toutefois, ces essais fournissent des résultats peu exploitables, les pics étant peu séparés les uns des autres. La température minimale de 25°C fut donc retenue afin d'obtenir une séparation suffisante des pics d'élution des HAPs.

Concernant les paramètres de migration en RP-HPLC, la méthode d'élution la plus utilisée est l'utilisation d'un gradient linéaire d'un mélange de solvants Acétonitrile / eau, passant de 60 % à 100 % d'Acétonitrile (*cf* **Chapitre B2-Tableau B6**). Partant de chromatogrammes peu exploitables, l'allongement du temps de montée du gradient de 5 minutes à 30 minutes, ainsi que la diminution du débit d'élution de 0,5 ml.min⁻¹ à 0,3 ml.min⁻¹ ont finalement permis d'obtenir des chromatogrammes possédant des pics d'élution bien séparés et facilement identifiables quelle que soit l'origine de l'échantillon (solution standard ou extrait de boues contaminées) (voir **Figure E1**).

E1-2. Identification des pics d'élution

Les analyses recueillies par un détecteur à barrette de diodes (ou PDA - PhotoDiodeArray) permettent de confirmer qualitativement la présence d'un HAP dans un mélange donné. En effet, ce détecteur fournit un spectre d'absorption UV de larges longueurs d'onde (de 195 nm à 400 nm) des composés séparés par RP-HPLC. Chaque spectre peut alors être comparé aux spectres retrouvés dans la littérature (voir **Figure E2** et **Annexe I** pour l'ensemble des HAPs). Ainsi, chaque composé correspondant à un pic d'élution et à un spectre donné, tous les HAPs ont pu être identifiés et leur ordre d'élution de la colonne de RP-HPLC a également été déterminé. Cependant, la sensibilité minimale de ce type d'analyse d'environ 50 µg.l⁻¹ ne permet pas de quantifier de manière fiable les HAPs en faibles concentrations (cas des extraits de boues). Dans ce cas, l'ordre d'élution étant déterminé, il est préférable d'utiliser un détecteur fluorimétrique qui permet de quantifier et de détecter spécifiquement les HAPs, même faiblement concentrés (jusqu'à 0,1 µg.l⁻¹) (*Castello et Gerbino* □ *1993*).

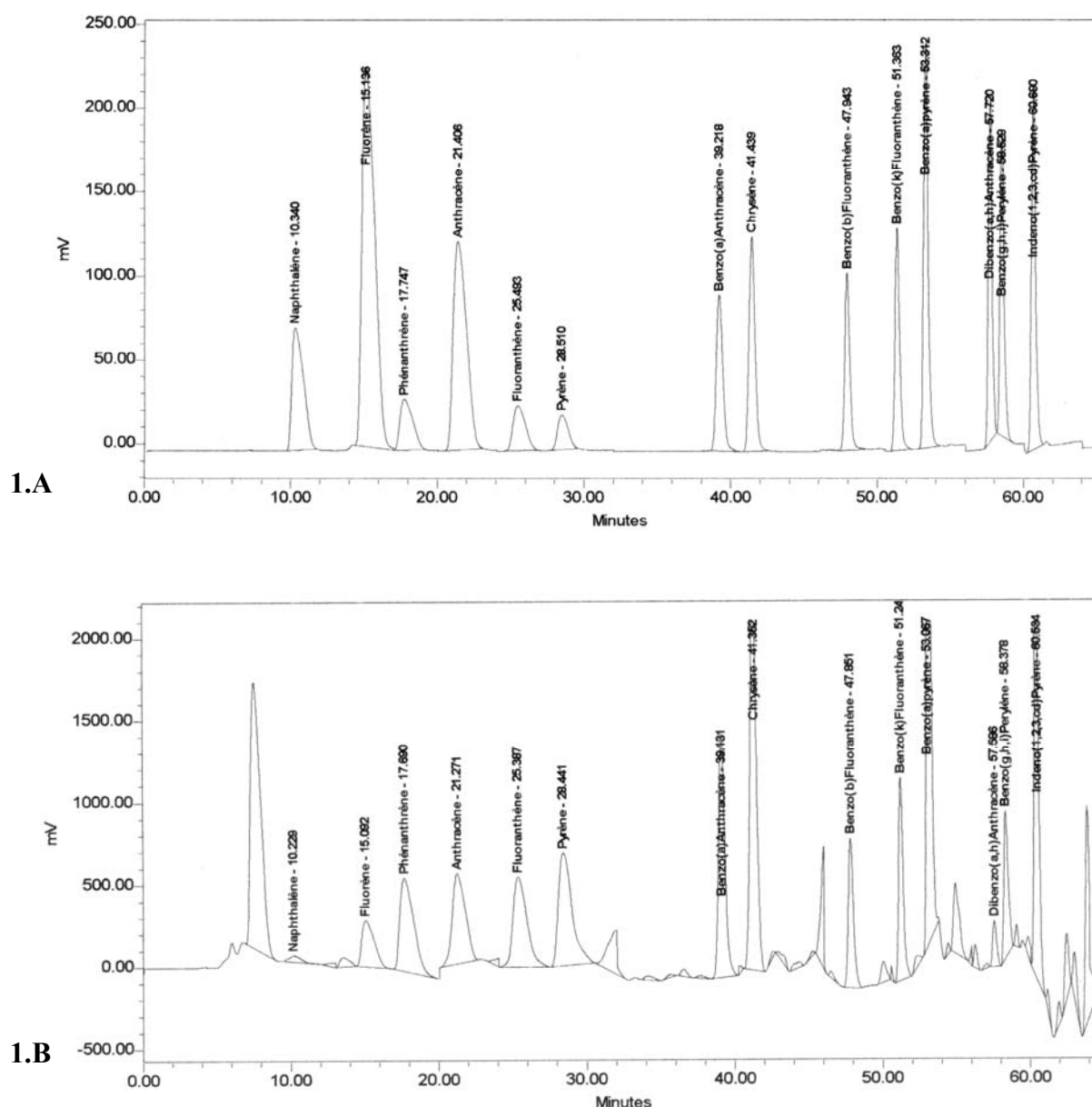


Figure E1 : Chromatogrammes d'élution pour : **(1.A)** une solution standard en HAPs [100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Naphthalène), 20 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Fluorène, Fluoranthène, Benzo(b)fluoranthène, Dibenzo(ah)anthracène, Benzo(ghi)pérylène) et 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Phénanthrène, Anthracène, Pyrène, Benzo(a)anthracène, Chrysène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(a)pyrène, Indéno(123cd)pyrène] **(1.B)** un extrait de boues mixtes urbaines contaminées (extraction à l'ASE).

[Les conditions d'élution sont les suivantes : injection 20 μl , gradient 30 min., débit 0,3 ml.min^{-1} . La température de migration est de 25°C pour un gradient de 60 % ACN – 40 % Eau à 100 % ACN. Le programme du fluorimètre est le suivant : 0 min. 280/330 ; 13 min. 266/312 ; 17 min. 250/370 ; 20 min. 250/400 ; 24 min. 280/430 ; 27,5 min. 260/410 ; 32 min. 280/430 ; 40,2 min. 268/384 ; 46 min. 234/420 ; 50,5 min. 270/400 ; 56 min. 300/407 ; 60 min. 300/500].

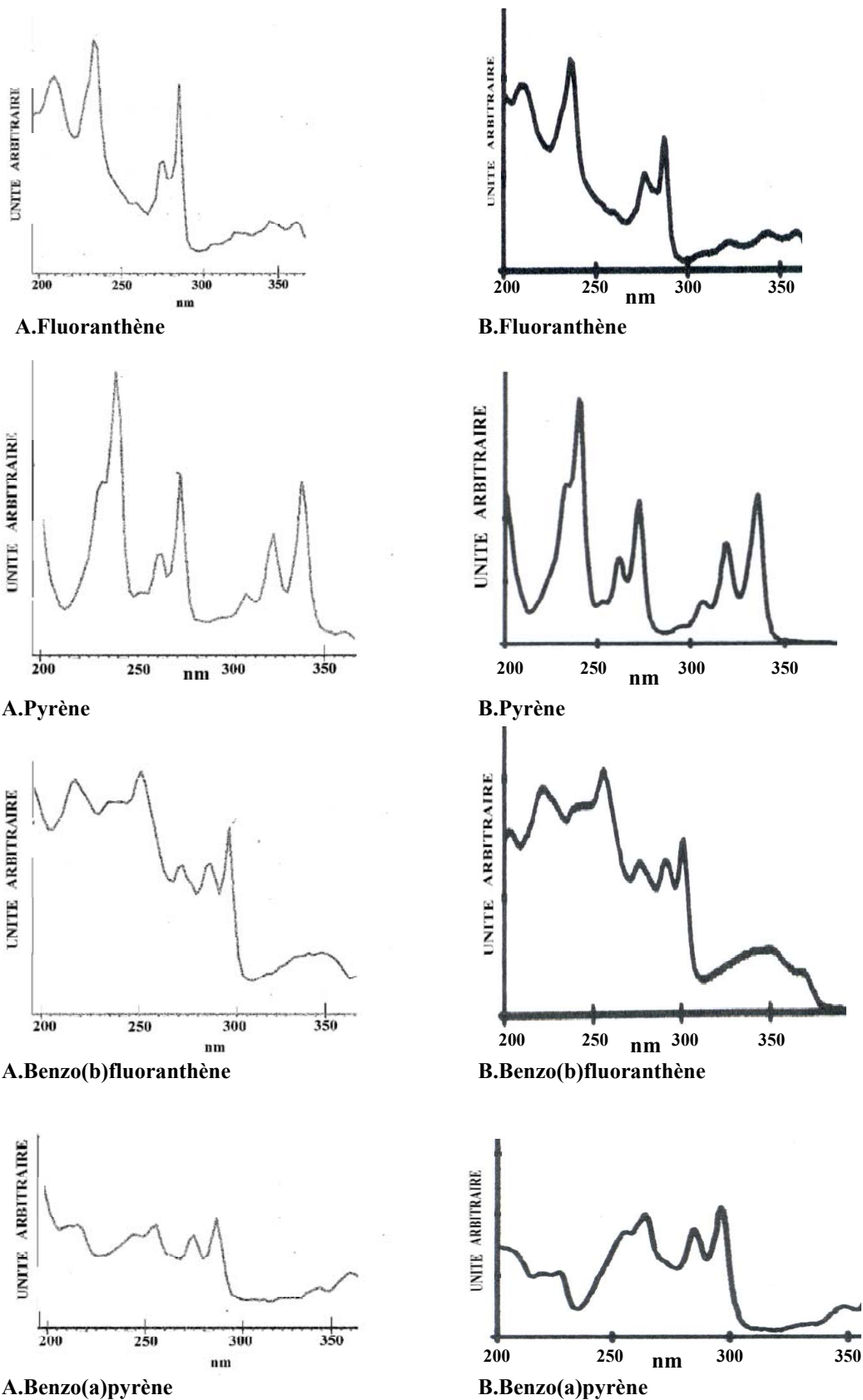


Figure E2 : Comparaison de 4 spectres d'adsorption UV d'HAPs en milieu complexe (longueurs d'onde de 200 à 400 nm) donné par l'analyse au détecteur à barrette de diodes – série **A**-, par rapport aux spectres fournis dans la littérature – série **B** - (Miège □ 2000 ; Touraud et al. □ 1998).

E1-3. Optimisation de la détection fluorimétrique

Suite à la séparation des HAPs par RP-HPLC, la détection fluorimétrique a été optimisée afin d'obtenir une erreur de répétabilité d'analyse inférieure à 2 %, après trois injections d'un même échantillon. Il s'avère que cette mise au point est rendue particulièrement complexe par le nombre élevé de longueurs d'onde à tester (*cf* **Chapitre B2-Tableau B6**). Sur l'ensemble des valeurs de longueurs d'onde retrouvées dans la littérature, quelques-unes ont été testées et, en fonction de la répétabilité mesurée et de la réponse du détecteur (aire maximale recherchée), des couples de longueurs d'onde ont été choisis pour la forte répétabilité du signal (voir **Tableau E1**). En effet, certaines valeurs d'excitation/émission ont permis d'obtenir des erreurs moyennes de répétabilité inférieures à 1 %, pour un nombre significatif d'échantillons et quelle que soit sa nature (échantillons standards ou extraits de boues sèches). A noter que la répétabilité maximal du signal n'a pas été forcément obtenue pour une réponse d'aire maximale du pic, mais plus par rapport à une meilleure stabilité du signal. L'analyse ainsi optimisée des HAPs par RP-HPLC-fluorimétrie permet donc d'obtenir des mesures fiables à partir d'une seule injection, l'analyse étant hautement répétable, ce qui permet un certain gain de temps d'analyse (95 minutes par injection). De plus, les erreurs de reproductibilité entre la réponse d'un échantillon standard et la courbe de calibration se trouvent être le plus souvent inférieures à 2 %. A noter enfin que, pour préserver les performances de répétabilité et de reproductibilité de l'analyse, il est nécessaire que l'étalonnage du fluorimètre soit effectué approximativement tous les 100 échantillons et que la pré-colonne de sauvegarde soit changée tous les 200 échantillons (encrassement progressif de la colonne).

En conclusion, les résultats obtenus après optimisation correspondent aux objectifs préalablement fixés (erreurs < 2%) et ce, pour de faibles concentrations en HAPs jusqu'à un seuil de 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Pour information, le seuil de détection du fluorimètre peut être estimé à environ 1-1,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$). En effet, les limites de la courbe d'étalonnage obtenues sont les suivantes (limites déterminées pour des erreurs importantes de répétabilité, supérieures à 2%, erreur qui augmente significativement pour une réponse trop faible ou une saturation du détecteur) : entre 250 et 10 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Naphtalène), 10 et 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Fluorène, Anthracène, Benzo(a)anthracène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(a)pyrène, Benzo(ghi)pérylène, Indeno(123cd)pyrène) et entre 25 et 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Phénanthrène, Fluoranthène, Pyrène, Benzo(b)fluoranthène Dibenzo(ah)anthracène).

Tableau E1 : Récapitulatif des erreurs de répétabilité et de reproductibilité de l'analyse HPLC couplé à un fluorimètre en fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission testées au cours de l'optimisation de la chaîne d'analyse. L'étude porte sur la moyenne de trois injections d'un standard de concentrations en HAPs connus.

(500µg.l⁻¹ Naphtalène, 100µg.l⁻¹ Fluorène, Fluoranthène, Benzo(b)fluoranthène, Dibenzo(ah)anthracène, Benzo(ghi)pérylène, 50µg.l⁻¹ Phénanthrène, Anthracène, Pyrène, Benzo(a)anthracène, Chrysène, Indeno(123cd)pyrène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(a)pyrène. Conditions de migration HPLC : injection 20µl, gradient de 30 min. de ACN60%-Eau 40% à ACN 100%, débit 0,3 ml.min⁻¹, temps d'analyse 95 min. Température=25°C.)

	Essais longueurs d'onde		Longueurs d'onde finales				
	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (en nm)	Erreur répétabilité	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (en nm)	Erreur répétabilité		Erreur reproductibilité	Erreur répétabilité sur boues
		Moyenne (>2 rép.) (en %)		Moyenne (>25 rép.) (en %)	rsd (%)	Moyenne (>10 rép.) (en %)	Moyenne (> 4 rép.) (en %)
Naphtalène	272 / 334	4,7	280 / 330	0,7	1,4	1,3	0,4
Fluorène	----	----	266 / 312	0,4	1,5	1,5	0,4
Phénanthrène	295 / 380	4,1	250 / 370	0,7	1,6	1,2	0,4
Anthracène	----	----	250 / 400	0,4	1,3	1,1	0,8
Fluoranthène	260 / 430	Réponse faible	280 / 430	0,6	1,5	0,8	0,6
	365 / 460	Réponse faible					
Pyrène	236/394	4,7	260 / 410	1,1	1,9	0,95	0,7
	320 / 404	2,8					
	270 / 394	Réponse faible					
	280 / 430	Réponse faible					
Benzo(a)anthracène	268 384	4,4	280 / 430	0,5	1,6	0,8	0,5
Chrysène	----	----	268 / 384	0,6	1,3	1,1	0,1
Benzo(b)fluoranthène	292 / 460	7,5	234 / 420	0,4	1,9	0,6	0,2
Benzo(k)fluoranthène	292 / 460	11,3	270 / 400	0,6	1,6	0,8	0,8
+	292 / 430	5,3					
Benzo(a)pyrène	300 / 430	4,2					
Dibenzo(ah)anthracène	285 / 460	2,8	300 / 407	0,5	0,9	1	0,8
+	300 / 500	Réponse faible					
Benzo(ghi)pérylène	285 / 400	Réponse faible					
Indeno(123cd)pyrène	285 / 460	2,3	300 / 500	0,8	2	0,6	0,4

L'analyse des HAPs par RP-HPLC/ fluorimétrie ayant été optimisée, les méthodes d'extraction des HAPs d'une phase solide et d'une phase liquide ont donc été à leur tour mises au point, l'objectif principal étant de fournir une extractabilité maximale à partir d'un faible volume d'échantillon et avec une erreur de reproductibilité totale inférieure à 5 % entre deux extractions d'un même échantillon. La minimisation de cette erreur permettra en effet de limiter le nombre d'extractions à effectuer sur un même prélèvement.

E2. Optimisation de l'extraction des HAPs d'un échantillon de boues

L'optimisation de l'extraction des HAPs à partir d'un échantillon de boues contaminées fut réalisée en deux étapes distinctes, après centrifugation de l'échantillon : l'une portant sur les HAPs présents dans la fraction liquide et l'autre dans la fraction solide (après séchage).

E2-1. Optimisation de l'extraction des HAPs de la fraction liquide

E2-1-1. Extraction liquide / liquide :

La norme AFNOR portant sur l'analyse des HAPs préconise l'utilisation d'une extraction liquide-liquide des HAPs contenus dans une phase aqueuse (AFNOR □ 2001). Les pourcentages de recouvrement (calculés à partir d'ajout d'une solution standard de concentrations connues en HAPs dans de l'eau) sont dans ce cas particulièrement élevés. En effet, les performances de recouvrement sont supérieures à 80 % pour tous les HAPs, à l'exception du Naphtalène où la technique d'extraction au solvant semble peu appropriée vu son faible coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{ow}$ de 3,4) (voir **Tableau E2**). Cependant, les essais effectués sur des surnageants de boues contaminées n'ont pu aboutir du fait de la présence de mousse lors de l'extraction (contact du solvant avec l'échantillon). En dépit d'un changement de pH ($\text{pH} < 2$ ou > 10), de l'addition de surfactants ou d'une diminution de la quantité de solvant (100 ml), aucun essai n'a permis de compléter l'extraction des HAPs sur les échantillons réels. L'extraction liquide/liquide ne semble donc pas adaptée à l'extraction des HAPs à partir de la fraction liquide aqueuses des boues.

E2-1-2. Extraction sur phase solide SPE (colonne Supelco ENVI-18)

Une seconde technique d'extraction des HAPs d'une phase liquide a alors été testée : l'extraction sur colonne d'affinité, ou SPE (Solid Phase Extraction). Par comparaison avec les performances de recouvrement obtenues par extraction liquide/liquide (moyenne de 90 %), les extractions sur liquide aqueux supplémenté avec un échantillon standard possèdent des rendements relativement faibles en suivant le protocole fourni par le constructeur SupelcoTM

(moyenne de 37 %) (voir **Tableau E2 – 1 passage**). De plus, dans tous les cas, l'extraction sur colonne SPE ne permet pas d'estimer les concentrations en Naphtalène dans l'échantillon aqueux. Afin d'optimiser l'efficacité de recouvrement, l'augmentation du nombre de passages sur la colonne d'extraction (3 passages) permet d'améliorer significativement l'efficacité d'extraction avec une moyenne d'environ 75 %. Plusieurs passages successifs favoriseraient donc la rétention des HAPs sur la colonne. Toutefois, trois HAPs possèdent des pourcentages de recouvrement encore de l'ordre de 30 %, le Chrysène, le Dibenzo(ah)anthracène et le Benzo(ghi)pérylène. Afin de favoriser la solubilisation de ces HAPs dans la solution aqueuse, de l'Acétonitrile et du méthanol ont été ajoutés à l'échantillon. Cet ajout semble posséder un effet bénéfique à partir de 10 % de méthanol ou 25 % d'Acétonitrile. Mais, avec l'ajout de solvant, l'extraction est bloquée lors du passage d'un surnageant d'échantillon de boues centrifugées, la présence de solvant formant une émulsion comme dans le cas de l'extraction liquide/liquide. De plus, l'ajout d'Acétonitrile à 1 et 5 % ne permet de récupérer qu'une faible fraction des plus petits HAPs (qui sont par ailleurs plus particulièrement concernés par ce type d'extraction puisque plus solubles dans l'eau) (voir **Tableau E2**). L'ajout de solvants avant extraction ne paraît donc pas intéressant dans ce cas. A noter enfin que le changement du mélange de conditionnement et d'élution de Toluène/Méthanol (10/1) en Hexane/Acétone (10/1) améliore le pourcentage de recouvrement du Chrysène mais reste défavorable pour les plus petits HAPs spécialement pour le Fluorène (1,9 %) (voir **Tableau E2**).

Ainsi, le choix de trois passages sur la colonne d'extraction est finalement retenu, sans ajout de solvant d'extraction et avec un mélange d'élution Toluène/Méthanol (10/1). Toutefois, le pourcentage de recouvrement n'étant pas total pour tous les HAPs, ces valeurs d'efficacité de recouvrement seront alors utilisées pour estimer les concentrations en HAPs de la fraction liquide des échantillons de boues, à l'exception du Naphtalène. Plusieurs extractions restent toutefois nécessaires au regard de la faible reproductibilité de l'analyse (erreur maximale de reproductibilité d'environ 20 % entre deux extractions du même échantillon).

Tableau E2 : Pourcentages de recouvrement (en %) par extraction liquide/liquide et sur phase solide (SPE) d'une solution aqueuse standard (200 ml) de concentrations connues en HAPs, préparée afin d'obtenir une concentration en sortie d'HPLC d'environ 500 µg.l⁻¹ (Fluorène, Fluoranthène, Benzo(b)fluoranthène, Dibenzo(ah)anthracène, Benzo(ghi)perylène) et 0,5 mg/l (Chrysène, Phénanthrène, Anthracène, Pyrène, Benzo(e)anthracène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(a)pyrène, Indeno(123cd)pyrène).

	Extraction liquide/liquide (en %)	Extraction sur colonne SPE (2 extractions) (en %)						3 passages Elution Hexane/Acétone
		1 passage	3 passages Moyenne	Erreur (rsd)	1% ACN	5% ACN	25% ACN	
Naphtalène	11	-	-	-	-	-	-	-
Fluorène	90	5	74,7	2,3	45,7	2,5	20	1,9
Phénanthrène	150	29	91,8	8,2	68,43	16,1	51,4	29,6
Anthracène	95,8	26,2	89,6	8,5	67,2	16,4	55,4	26,5
Fluoranthène	95,9	57,3	101,5	11,2	87,4	48,3	75,5	76,6
Pyrène	102	57,6	101,9	11,0	86,4	55	76	77,9
Benzo(a)-Anthracène	90,9	56,6	96,4	17,6	90,3	75,8	83,2	86,9
Chrysène	88	51,5	35,6	20,8	88,2	37,6	79,8	83,3
Benzo(b)-Fluoranthène	88,8	48,2	93,3	20,2	90	75,9	77,9	87,4
Benzo(k)-fluoranthène	86,6	45,1	84,5	23,1	83,2	74	76,4	79,3
Benzo(a)-pyrène	89	44,6	70,8	14,0	83,9	70,5	77,9	73,9
Dibenzo(ah)-Anthracène	81,3	34,1	27,3	7,5	31,5	62,9	72,2	45,6
Benzo(ghi)-perylène	85,3	33,8	33,3	4,3	41,2	68,4	76,2	42,8
Indeno(123cd)-pyrène	86,7	35,8	74,9	19,0	75,8	75,3	74,8	68,6
Problème analytique Avec la fraction liquide	OUI	NON	NON	----	NON	NON	OUI	OUI

E2-2. Optimisation de l'extraction des HAPs de la fraction solide

E2-2-1. Optimisation de l'extraction à l'ASE

L'extraction des HAPs d'une phase solide par une extraction accélérée par solvant (ASE) comporte de nombreux paramètres susceptibles d'influencer les performances d'extraction comme la pression, la température, la quantité de solvant (ou taux de remplissage), la nature du solvant (la proportion d'hexane dans un mélange Hexane/Acétone), le temps d'extraction (ou temps statique), le nombre de cycles, la quantité d'échantillon et le temps de purge en fin d'extraction (séchage de la cellule à l'azote). Parmi l'ensemble de ces paramètres, la pression d'extraction est, dès le départ, fixée à 100 bars, limite supérieure recommandée par le constructeur dans le cas d'échantillons de boues pour éviter toute détérioration de l'appareil ASETM 200. Afin d'étudier l'ensemble des autres paramètres, plusieurs plans d'expériences successifs ont été réalisés en fonction des objectifs recherchés et de l'importance suspectée des paramètres.

Dans un premier plan d'expériences, l'influence des paramètres les plus susceptibles d'influencer les performances d'extraction a été étudiée, notamment la température, le nombre de cycles, le temps statique et le rapport d'hexane dans un mélange Hexane/Acétone. Ce premier plan est plus précisément un demi-plan d'expériences où les interactions entre facteurs sont étudiées deux à deux. Dans le cas d'une interaction significative entre les combinaisons de facteurs, le plan devra être achevé. Or, un test multiple de variances (ANOVA) à un facteur a montré que, suite à la vérification de l'égalité des variances et pour chaque HAP, les concentrations obtenues pour tous les essais ne présentent pas de différences significatives entre elles, pour les quatre paramètres étudiés (voir **Tableau E3 - plan d'expériences n°1**). Il est donc possible de fixer arbitrairement les paramètres d'extraction à une température de 120°C, 2 cycles, 5 minutes de temps statique et avec un mélange Hexane/Acétone (25 : 75). Les paramètres de l'essai 2 sont en effet choisis au regard des plus faibles erreurs de reproductibilité, entre 5 % et 12 %, et du gain de temps d'analyse par rapport aux essais comportant 3 cycles et un temps statique d'extraction de 8 minutes. A noter que les concentrations en Naphtalène n'ont pu être déterminées avec cette technique d'extraction. En effet, vu son faible poids moléculaire et sa forte volatilité, il semble que ce composé soit perdu par volatilisation soit lors de l'étape de séchage des boues, soit lors de l'étape d'évaporation à sec de l'échantillon avant analyse.

Tableau E3: Concentrations, erreurs de reproductibilité et tests statistiques pour chaque HAPs en fonction des différents paramètres testés lors de 3 plans d'expériences réalisés au cours de l'optimisation de l'extraction accélérée par solvants (ASE) sur boues mixtes urbaines (3 lots différents). A noter que les plans 1 et 2 sont réalisés avec un temps de purge de 100 secondes et un taux de remplissage de 60%. Le plan 1 utilise 1 g de boues sèches par extraction.

Paramètres d'extraction	Essai 1		Essai 2		Essai 3		Essai 4		Essai 5		Essai 6		Essai 7		Essai 8		Valeur de la variable F (ANOVA 1 Facteur) H ₀ vérifié à 95 % et F < 2,66
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	
Température	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	
Nombre de cycles	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Temps statique	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	8 min.	8 min.	8 min.	8 min.	8 min.	8 min.	8 min.	8 min.	
Hexane/Acétone	50:50	25:75	50:50	25:75	50:50	25:75	50:50	25:75	50:50	25:75	50:50	25:75	50:50	25:75	50:50	25:75	
Moyenne (µg/l)	169,3	174	5	144,1	14,3	194,7	9,1	162	19,3	171	17,6	167,2	23,7	144,7	23,5	1,03	
RSD (%)	18,2	18,2	582,9	13,7	489	11,2	552	4,8	477,9	6,4	473,2	4,5	473,5	17	449,2	13,4	1,66
Fluorène	92,9	11,7	108,7	11,1	91,4	15	107,1	1,2	93,2	14,8	93,3	13	98,9	28,5	89,7	16,8	0,71
Phénanthrène	683,2	13	729,8	8,4	620	15,7	730,2	5,6	639,5	17,9	628	18,3	649,9	32	603,5	19	0,53
Anthracène	723,6	15,2	814,7	6,7	685,7	13,7	824,4	5,9	723,3	17,1	709,7	15,6	721,4	26,9	673,5	17,6	0,70
Fluoranthène	192,7	15,8	214,1	5,4	180,8	12,9	222,1	8,7	187,1	17,6	190,8	17,6	189,8	25,9	181,8	19	0,69
Benzo(a)anthracène	305,8	16,3	335,7	7,3	276,8	14,7	342,6	9,3	285,4	21,8	288,2	23,5	284,7	24,7	272,7	16,9	0,73
Benzo(k)fluoranthène	131,4	13,7	145	7,6	120,4	14,2	145,8	7,7	126,9	19,5	129,3	22,7	122,8	22,4	117,7	16,4	0,78
Benzo(a)pyrène	255,1	17,3	278	7,5	226,5	13,9	283,2	10,3	242,4	22,3	252,8	26,4	235,1	25,1	229	17,5	0,66
Dibenzo(a,h)anthracène	44,8	14,9	51,2	7,4	40,3	15,4	48,6	3	43,4	23,7	43,3	21,8	42,1	24,4	41,2	18,7	0,76
Benzo(g,h,i)perylene	154,1	17,9	180,1	12,9	144,4	15,9	174	7	149,8	20,7	147,4	17	140,9	26,8	142,6	12	0,99

Plan d'expériences n°1 (3 extractions par essai)

Paramètres d'extraction	Essai 1'		Essai 2'		Essai 3'		Valeur de la variable F (ANOVA 1 Facteur) H ₀ vérifié à 95 % si F < 0,65
	120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	
Température	120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	
Nombre de cycles	2	2	2	2	2	2	
Temps statique	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	
Poids de boue	1 g	1 g	1 g	1 g	0,5 g	0,5 g	
Hexane/Acétone	25:75	50:50	50:50	50:50	50:50	50:50	
Moyenne (µg/l)	165,5	1,2	154,9	3,1	174,9	0,3	10,77
RSD (%)	5,3	49,3	10,6	40,9	14,5	4,78	
Fluorène	77,5	3,8	86,5	12	85,1	5	2,49
Phénanthrène	425,9	4,5	359	8,8	396,1	7,9	3,12
Anthracène	567,8	2,6	480,7	7,8	470,1	10,7	3,17
Fluoranthène	128,3	5,6	112,4	10,3	128,9	7,9	1,35
Benzo(a)anthracène	208,2	2,9	175,7	8,8	210,5	5,8	4,01
Benzo(k)fluoranthène	83,6	4,6	71,7	10,3	83,3	6,9	2,02
Benzo(a)pyrène	171,1	4,7	141,6	11,3	167,4	8,3	2,25
Dibenzo(a,h)anthracène	36,7	8,6	28	7,9	32,5	4,3	5,02
Benzo(g,h,i)perylene	132,7	4,1	96,1	8,5	122,2	7,3	9,15

Plan d'expériences n°2 (2 extractions par essai)

Paramètres d'extraction	Essai 1''		Essai 2''		Essai 3''		Essai 4''		Valeur de la variable F (ANOVA à 1 Facteur) H ₀ vérifié à 95 % si F < 4,07
	120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	
Température	120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	
Nombre de cycles	2	2	2	2	2	2	2	2	
Temps statique	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.	
Poids de boue	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	
Hexane/Acétone	50:50	60%	50:50	60%	50:50	60%	50:50	90%	
Taux de remplissage	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	90%	
Temps de purge	60 sec.	60 sec.	60 sec.	60 sec.	60 sec.	60 sec.	60 sec.	100 sec.	
Moyenne (µg/l)	304,4	14,2	319,3	7	327,9	13,6	333	16,3	0,26
RSD (%)	127,9	10,4	122,2	6,4	120	11,9	121,8	10,5	0,23
Fluorène	130,7	18,4	136,1	6,8	130	20,2	125	11,1	0,18
Phénanthrène	647,1	18,3	659,8	9,1	637,3	17	626,2	15	0,06
Anthracène	875,4	14,7	901,2	7,2	880,1	14,6	874	16,4	0,03
Fluoranthène	194,3	15,7	208,4	12,6	212	20,2	198,1	21,1	0,15
Benzo(a)anthracène	312,5	19,3	327,5	13,7	323,1	20,6	307,2	18,8	0,08
Benzo(k)fluoranthène	112,3	20,1	116,9	17,7	119,4	21,4	115	21,7	0,05
Benzo(a)pyrène	217,8	15,7	223,9	16,3	222,5	13,8	212,3	28,4	0,05
Dibenzo(a,h)anthracène	54,4	23,7	56,37	17,5	55,5	25,6	52	20,6	0,07
Benzo(g,h,i)perylene	192,1	25,7	198	16,5	186,7	21,7	177,2	18,4	0,14

Plan d'expériences n°3 (3 extractions par essai)

En utilisant les paramètres fixés précédemment, un second plan d'expériences est réalisé afin d'étudier l'influence d'un mélange compatible avec l'extraction des PCBs, généralement de l'Hexane/Acétone (50/50) et afin de limiter la quantité d'échantillon utilisée (voir **Tableau E3 - plan n°2**). De même que pour le premier plan d'expérience, un test statistique ANOVA de comparaison de moyennes a permis de mettre en évidence la « non-influence » des paramètres étudiés. En effet, les résultats obtenus confirment non seulement que l'influence du mélange de solvant est négligeable, mais également qu'il est possible de réduire la quantité d'échantillon de boues nécessaire de 1 g à 0,5 g par extraction. Tous les essais étant équivalents, la méthode retenue (essai 3') permet d'utiliser une quantité réduite d'échantillon (0,5 g) et un mélange d'extraction compatible avec l'extraction des PCBs (Hexane/Acétone 50/50). Ainsi, à partir de faibles volumes d'échantillons de boues mixtes urbaines (200-300 ml), la quantité de boues sèches correspondante (environ 2 à 3 g) permettra d'effectuer au minimum 3 extractions sur un même échantillon. A noter cependant que, parmi l'ensemble des HAPs étudiés, la valeur du facteur F (ANOVA) n'est significativement au dessus de la valeur seuil que pour le Fluorène, indiquant une différence significative entre les trois essais (voir **Tableau E3 -plan d'expériences n°2**). Or, les quantités de Fluorène retrouvées pour les essais 1' et 3' restent similaires, l'essai 2' fournissant des concentrations plus faibles en Fluorène et étant la cause de la non homogénéité des moyennes.

Enfin, le troisième et dernier plan d'expérience porte sur deux paramètres vraisemblablement d'influence plus faible que les précédents (d'après les données du constructeur) : le taux de remplissage de la cellule d'extraction (quantité de solvant) et le temps de séchage de la cellule à l'azote. Partant de la méthode précédemment retenue, les valeurs de ces deux paramètres sont fixées à 60 % ou 90 % (taux de remplissage) et à 60 sec. ou 100 sec. (temps de séchage). Comme pour les autres plans d'expériences, ces deux paramètres ne présentent pas d'influence significative sur l'extraction globale des HAPs d'une matrice boue (voir **Tableau E3 – plan d'expériences n°3**). Les paramètres d'extraction des HAPs à l'ASE sont donc finalement choisis dans un souci d'économie de solvant (taux à 60 %) et de temps d'analyse (séchage de 60 sec.) (essai 1'').

Suite au 3 plans d'expérience, les paramètres d'extraction définitifs sont donc les suivants : température de 120 °C, 2 cycles, 5 minutes de temps statique, 0,5 g d'échantillon de boues sèches, un mélange d'Hexane/Acétone (50/50), un taux de remplissage de 60 % et un temps de purge de 60 secondes.

En conclusion, aucun des paramètres étudiés lors de la réalisation des différents plans d'expériences ne possède d'influence statistiquement significative sur l'extraction des HAPs. Leur extraction d'une matrice solide à l'ASE semble donc particulièrement robuste quels que soient les paramètres utilisés, les conditions initiales d'extraction étant relativement drastiques. Vraisemblablement peu sensible à un effet matrice, de nombreuses études ont montré que l'extraction des HAPs à l'ASE dans les sols ou les sédiments présentaient des performances d'extraction similaires quels que soient les paramètres utilisés, confirmant ainsi nos résultats obtenus sur une matrice boue (Richter *et al.* □199□; Saim *et al.* □1998).

Cependant, il est important de souligner que, malgré l'automatisation de la technique d'extraction et en dépit de la forte reproductibilité de l'analyse par RP-HPLC/fluorimétrie, les erreurs de reproductibilité calculées lors des différents plans d'expériences restent relativement importantes en atteignant des valeurs comprises entre 10 et 26 % (exemple de l'essai 1' utilisant les paramètres d'extraction finaux). Ce niveau d'erreur reste trop élevé pour pouvoir envisager des suivis de biodégradabilité des HAPs à l'échelle d'expérimentation de laboratoire. Pour cela, l'étape d'évaporation à sec, moins contrôlée, entre l'extraction de ces composés et leur reprise dans un solvant compatible avec l'analyse, fut également optimisée afin d'améliorer la reproductibilité de l'analyse.

E2-2-2. Optimisation de la reprise de l'échantillon après extraction

Entre l'extraction et l'analyse par HPLC de l'extrait obtenu, il est nécessaire d'évaporer à sec l'échantillon afin de resuspendre les HAPs extraits par un mélange d'Hexane/Acétone (50/50), dans un solvant compatible avec la RP-HPLC, c'est à dire dans de l'Acétonitrile. Cette étape de reprise du résidu peut devenir relativement importante notamment au niveau de la reproductibilité des analyses (les risques de pertes étant maximales à ce niveau du fait du risque d'évaporation des plus petits HAPs ou de leur perte lors de leur récupération au niveau du flacon).

Plusieurs paramètres ont donc été testés, dont la quantité d'Acétonitrile utilisée lors de la reprise de l'échantillon sec, l'agitation du flacon (1 min.) et le temps de diffusion à l'abri de la lumière (30 min.) (voir **Tableau E4**). Les pourcentages de recouvrement sont calculés par rapport au maximum mesuré pour l'essai E. Les pertes dues à la reprise de l'échantillon sont estimées en apportant une nouvelle quantité d'Acétonitrile (1 ml) après la première

recupération du résidu. Il apparaît alors que la quantité d'Acétonitrile initialement apportée pour resuspendre le résidu sec influence significativement le pourcentage de recouvrement en limitant les pertes. Les performances optimales d'extraction et de reprise du résidu sec correspondent donc à une reprise dans 5 ml d'Acétonitrile couplée à une étape d'agitation-diffusion à l'abri de la lumière, avant analyse par RP-HPLC/fluorimétrie. A noter que la quantité d'Acétonitrile à ajouter reste toutefois limitée à 5 ml afin de ne pas trop diluer les échantillons (limite de détection du fluorimètre).

Tableau E4 : Efficacités de recouvrement obtenues lors de l'extraction de boues sèches à l'ASE en fonction des paramètres de reprise après évaporation à sec. (3 extractions). Les pourcentages de pertes sont déterminés à l'aide d'une seconde reprise dans un volume (1 ml) d'Acétonitrile. Les concentrations maximales de référence obtenues à l'ASE (Essai E) sont : 0,87 mg.kg_{MS}⁻¹ Fluorène ; 6,92 mg.kg_{MS}⁻¹ Phénanthrène ; 1,6 mg.kg_{MS}⁻¹ Anthracène ; 14,97 mg.kg_{MS}⁻¹ Fluoranthène ; 13,59 mg.kg_{MS}⁻¹ Pyrène ; 5,27 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(a)anthracène ; 6,82 mg.kg_{MS}⁻¹ Chrysène ; 6,21 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(b)fluoranthène ; 3,07 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(k)fluoranthène ; 5,69 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(a)pyrène ; 0,98 mg.kg_{MS}⁻¹ Dibenzo(ah)anthracène ; 3,74 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(ghi)pyrène ; 5,28 mg.kg_{MS}⁻¹ Indeno(123cd)pyrène.

	Paramètres de reprise		Performances de reprise		
	Quantité d'Acétonitrile	Agitation – Diffusion (1min.)-(30 min.)	Pourcentage de recouvrement moyen	Erreur de reproductibilité moyenne	Pourcentage de pertes moyen
Essai A	2 ml	non	68 %	9,3 %	12,2 %
Essai B	2 ml	non	74 %	6,5 %	12 %
Essai C	5 ml	non	92 %	8,4 %	2,2 %
Essai D	2 ml	oui	75 %	3,2 %	9,3 %
Essai E	5 ml	oui	100 %	3,8 %	1,6 %

Cette étape de reprise du résidu sec fut donc particulièrement importante à optimiser au regard de la diminution significative de l'erreur de reproductibilité qui, partant de 10 à 26%, a été réduite pour le dernier essai à une moyenne inférieure à 4 % pour deux extractions tout HAP confondu. Contrairement à l'optimisation de l'étape d'extraction où les paramètres de l'ASE n'influaient pas significativement sur les performances d'extraction, la reprise du résidu sec constitue une étape majeure de l'optimisation d'une chaîne analytique, notamment au niveau de la reproductibilité analytique. A ce stade, les objectifs de reproductibilité ayant été atteints (erreur < 5%), il peut être envisagé de réaliser des études de suivi de dégradabilité des HAPs, à l'échelle du laboratoire, la reproductibilité de l'analyse se confirmant à long terme. Deux extractions sont alors suffisantes pour obtenir une concentration en HAPs à près de 5 %. Toutefois, la fiabilité des concentrations fournies par cette méthode reste encore à être validée par comparaison avec d'autres techniques d'extraction de référence, détermination des pourcentages de recouvrement et validation sur un matériel certifié.

E3. Validation de la fiabilité de la méthode analytique proposée

E3-1. Comparaison avec la méthode de référence d'extraction au Soxhlet

Afin de comparer les méthodes d'extraction au Soxhlet et à l'ASE des 13 HAPs d'intérêt au sein d'échantillons de boues, il a été nécessaire dans un premier temps d'optimiser l'extraction au Soxhlet. En effet, comme pour l'extraction d'HAPs à l'ASE à partir d'une matrice solide, une multitude de paramètres différents sont utilisés dans la littérature pour l'extraction au Soxhlet (*cf* **Chapitre B2 - Tableau B4**). Afin de comparer ces deux méthodes, les conditions d'extraction au Soxhlet de départ ont été fixées pour être les plus proches possibles de celles de l'ASE tout en respectant les recommandations de la norme AFNOR (2001), soit : un même mélange de solvant Hexane/Acétone (50/50), une même quantité de boues (0,5 g), un ajout d'alumine et d'hydromatrix dans l'échantillon, avec un temps moyen d'extraction de 8 heures. Les efficacités de recouvrement alors obtenues, calculées par rapport aux concentrations maximales d'extraction mesurées avec l'ASE, diminuent en fonction du poids moléculaire croissant des HAPs, avec une moyenne de 50 % pour l'ensemble des HAPs (voir **Tableau E5-essai 1**). Cependant, certaines conditions de l'ASE ne semblent pas être compatibles avec l'extraction au Soxhlet, notamment la température d'extraction à environ 100°C et l'ajout d'alumine pour la purification et d'hydromatrix comme dispersant. En effet, un abaissement de la température d'extraction aux alentours du point d'ébullition du mélange (à 50°C) ainsi que la suppression et le remplacement de ces deux composés par une purification sur colonne (Supelco LC-SI) améliorent significativement l'efficacité de recouvrement en obtenant une moyenne d'environ 78,3% (voir **Tableau E5-essai 2**). De plus, la reprise après évaporation à sec dans 5 ml d'Acétonitrile permet d'obtenir une moyenne proche de 87,2% (voir **Tableau E5-essai 3**). Enfin, l'allongement du temps d'extraction à 16 heures conduit à un rendement final moyen de près de 96 % pour l'ensemble des HAPs : un test statistique de Student de comparaison simple de moyennes confirme que les deux méthodes ne donnent pas des résultats significativement différents, l'hypothèse (H_0) d'égalité des moyennes étant confirmée à 95 %.

L'extraction au Soxhlet se caractérise donc par des efficacités d'extraction relativement identiques à celles retrouvées pour l'extraction à l'ASE. Ce résultat est en accord

et complète les nombreuses études portant sur d'autres matrices comme les sols ou les sédiments qui rapportent des efficacités d'extraction similaires pour ces deux méthodes (Heemken et al. □1997 □Siam et al. □1998 □Richter et al. □1995 □Gervaise et al. □1998 □Schantz et al. □1997). La méthode précédemment proposée est donc suffisamment fiable pour remplacer la technique d'extraction de référence au Soxhlet. De plus, l'erreur de reproductibilité de la méthode au Soxhlet (moyenne de 7,5%) reste relativement plus importante qu'avec l'ASE (moyenne inférieure à 4%). Ainsi, présentant un temps d'analyse plus court (20 min au lieu de 16 heures), une quantité de solvant réduite (20 ml au lieu de 120 ml) ainsi que des risques plus faibles liés à la manipulation (automatisation et sécurité) tout en fournissant des résultats similaires et plus reproductibles, l'ASE reste la méthode privilégiée à utiliser pour l'extraction intensive d'échantillons de boues mixtes urbaines dans le cadre d'études à l'échelle du laboratoire.

Tableau E5 : Efficacité de recouvrement de l'extraction au Soxhlet en fonction des paramètres d'extraction (Température, composés d'extraction, temps d'analyse et reprise dans l'Acétonitrile après évaporation à sec). Le mélange de solvant utilisé est de l'Hexane/Acétone (50 :50). Les concentrations de référence obtenues à l'ASE sont : 0,87 mg.kg_{MS}⁻¹ Fluorène ; 6,92 mg.kg_{MS}⁻¹ Phénanthrène ; 1,6 mg.kg_{MS}⁻¹ Anthracène ; 14,97 mg.kg_{MS}⁻¹ Fluoranthène ; 13,59 mg.kg_{MS}⁻¹ Pyrène ; 5,27 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(a)anthracène ; 6,82 mg.kg_{MS}⁻¹ Chrysène ; 6,21 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(b)fluoranthène ; 3,07 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(k)fluoranthène ; 5,69 mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(a)pyrène ; 0,98 mg.kg_{MS}⁻¹ Dibenzo(ah)anthracène ; mg.kg_{MS}⁻¹ Benzo(ghi)pérylène ; 5,28 mg.kg_{MS}⁻¹ Indeno(123cd)pyrène.

Paramètres d'extraction		Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4		Valeur de la variable t (ASE-Soxhlet) H ₀ vérifié à 95 % si t < 3,182
		Température Alumine + Hydromatrix Temps d'analyse Reprise Acétonitrile	100 °C oui 8 h 2 ml	50 °C non 8 h 2 ml	50 °C non 8 h 5 ml	50 °C non 16 h 5 ml	
Recouvrement en HAPs par rapport à l'ASE (en %)	Fluorène	76,4	102	83,1	102	4,7	1,280
	Phénanthrène	62,6	87	100,5	99,6	8,4	0,948
	Anthracène	57,5	78	89,2	90	9,1	0,779
	Fluoranthène	54,5	80,5	85,6	106	9,5	1,507
	Pyrène	49,7	65	72,5	102	9,1	0,772
	Benzo(a) Anthracène	51,3	82,5	82,9	90,5	6,4	0,690
	Chrysène	47,7	69	84,7	94,7	8,9	0,905
	Benzo(b) fluoranthène	45,5	81,7	84,6	92,4	8,5	0,753
	Benzo(k) fluoranthène	48,6	84,5	86	93,8	9,8	0,623
	Benzo(a) pyrène	41,8	50,6	76,7	91,8	4,4	1,724
	Dibenzo(ah) anthracène	43,3	96,3	76,8	94	4,4	1,239
	Benzo(ghi) pérylène	36,8	79	84,7	86,3	4,5	1,528
	Indeno(123cd) pyrène	38,5	61,6	88,6	103	9,8	2,304
	Moyenne		50,3	78,3	87,2	96	7,5

E3-2. Validation de la méthode à l'aide de boues certifiées

Suite à la comparaison avec une méthode de référence comme le Soxhlet, il est nécessaire de valider la fiabilité des analyses fournies avec l'utilisation d'un matériel de référence comme les boues certifiées. Ces boues, conditionnées sous une forme pré-séchée et pré-tamisée, permettent de déterminer le positionnement de la méthode proposée par rapport à des concentrations moyennes certifiées. Les concentrations moyennes en six HAPs dans ces boues ont en effet préalablement été déterminées par 11 laboratoires d'analyse agréés utilisant des techniques d'extraction et d'analyse différentes.

Les valeurs de concentrations obtenues à partir de la méthode optimisée (ASE et RP-HPLC/fluorimétrie) montrent que cette chaîne analytique fournit des concentrations proches des moyennes calculées par les 11 laboratoires agréés (voir **Tableau E6**). L'erreur maximale commise est d'environ 20 % pour le plus petit HAP mesuré, le Pyrène. Suivant le poids moléculaire croissant des HAPs, les concentrations mesurées sous-estiment légèrement la moyenne d'environ 10 %. Ainsi, outre sa haute reproductibilité, cette méthode se révèle être d'une grande fiabilité et en accord avec les valeurs certifiées des laboratoires agréés.

Tableau E6 : Détermination des concentrations en HAPs à l'ASE et par analyse HPLC-fluorimétrie sur boues certifiées et comparaison avec les données fournies par une moyenne de 11 laboratoires internationaux agréés (concentrations moyennes mesurées sur deux extractions).

	Concentrations certifiées		Concentrations estimées à l'ASE-HPLC-Fluo		Différence entre les moyennes
	Mini - Moyenne - Max (en mg.kg _{MS} ⁻¹)	rsd (%)	Moyenne (en mg.kg _{MS} ⁻¹)	rsd (%)	
<i>Pyrène</i>	1,76 - 2,16 - 2,70	4,2	2,604	4,9	+ 20,5 %
<i>Benzo(a)anthracène</i>	0,65 - 0,93 - 1,14	9,7	0,931	4,2	+ 0,1 %
<i>Benzo(b)fluoranthène</i>	0,99 - 1,17 - 1,39	7,7	1,169	4,5	- 0,1 %
<i>Benzo(k)fluoranthène</i>	0,41 - 0,57 - 0,71	8,8	0,52	4,8	- 8,8 %
<i>Benzo(a)pyrène</i>	0,62 - 0,91 - 1,22	9,9	0,803	4,2	- 11,8 %
<i>Indeno(123cd)pyrène</i>	0,57 - 0,81 - 0,98	7,4	0,719	4,7	- 11,2 %

E3-2. Influence de l'étape de séchage des boues et performances de recouvrement de la méthode proposée

L'optimisation de la méthode d'extraction, sa comparaison avec la méthode au Soxhlet, ainsi que sa validation à l'aide de boues certifiées n'ont pu être réalisées qu'à partir d'échantillons de boues séchées, afin de s'affranchir des étapes précédentes pouvant apporter un biais analytique. Ainsi, avant tout calcul des pourcentages de recouvrement de la méthode proposée, il fut important d'estimer la fiabilité de la première étape de l'analyse, c'est à dire lors du séchage de la fraction solide. En effet, la méthode proposée est constituée d'une succession de phases pour obtenir un échantillon de boues séchées à partir d'un prélèvement de boues liquides : centrifugation de la boue liquide, séparation et dissociation du culot à l'aide de billes de verre, séchage à l'étuve à 40°C durant 72 heures et tamisage de la boue sèche. Différentes techniques de séchage retrouvées dans la littérature ont donc été comparées avec cette technique, notamment (voir **Tableau E7**) : (i) une technique qui consiste à sécher directement, sans centrifugation, les boues liquides dans un étuve à 80°C durant 12 heures (Miège □ 2000). (ii) une seconde technique qui consiste à respecter les recommandations des normes en vigueur en laissant sécher les boues à 40°C jusqu'à ce que la siccité de l'échantillon soit suffisante (environ 12 jours) (AFNOR □ 2001). A noter qu'un essai avec ajout d'azide de sodium a également été réalisé afin de limiter la biodégradation des HAPs au cours du séchage.

Tableau E7 : Estimation des pertes en HAPs dues à la méthode de séchage.

	Centrifugation, séchage 72 heures à 40 °C (méthode proposée – base de référence)		Séchage de boues liquides 80 °C - 24 h	Séchage boues liquides (40 °C, 12 jours)	
	Concentration	rsd		Sans azide	Avec azide
			pertes relatives		pertes relatives
Fluorène	22,4	0,6%	-27,5%	-59,6%	-61,0%
Phénanthrène	193,7	1,7%	-3,9%	-16,4%	-4,9%
Anthracène	24,8	1,7%	-8,0%	-13,6%	-10,2%
Fluoranthène	295,6	1,4%	-7,2%	-2,8%	4,4%
Pyrène	185,2	2,2%	2,8%	-2,7%	5,3%
Benzo(a) Anthracène	119,3	2,6%	-6,8%	1,8%	3,3%
Chrysène	155,0	0,7%	-4,5%	4,3%	12,2%
Benzo(b) fluoranthène	125,1	0,9%	-2,4%	-2,2%	6,7%
Benzo(k) fluoranthène	77,7	1,0%	-8,1%	0,9%	10,3%
Benzo(a) pyrène	143,2	0,6%	-21,7%	-0,5%	16,1%
Dibenzo(ah) anthracène	22,7	0,3%	2,3%	-1,5%	5,6%
Benzo(ghi) pérylène	104,3	0,2%	-7,7%	-2,2%	5,2%
Indeno(123cd) pyrène	107,8	0,9%	-6,2%	-5,3%	0,3%

Au regard des résultats obtenus, il s'avère que la méthode de séchage est particulièrement importante. En effet, pour des températures plus élevées que 40°C, on peut observer des pertes significatives (à partir de 5%) pour de nombreux HAPs et plus particulièrement pour les plus petits, comme le Fluorène. Un séchage à 80°C ne semble donc pas approprié pour l'analyse de ces composés. De même, un séchage durant 12 jours à 40°C introduit un certain biais avec des pertes relativement importantes, jusqu'à 60% pour le Fluorène, et près de 15 % pour le phénanthrène et l'anthracène. Cependant les plus gros HAPs semblent moins affectés par ce type de séchage qu'à 80°C. Une solution envisagée fut d'ajouter de l'azide de sodium afin de stopper toute activité biologique possible au cours de cette longue étape de séchage de 12 jours. Cependant, malgré l'ajout d'azide de sodium, les pertes en Fluorène restent de l'ordre de 60 % et cet ajout induit une erreur analytique plus importante (de l'ordre de 10 % à 15%). La méthode de séchage proposée semble donc la plus appropriée pour l'analyse des HAPs. A noter que les méthodes de séchage des boues par lyophilisation, non testée au cours de cette étude, peut présenter des pertes par volatilisation des plus petits HAPs (majoritaire pour le Naphtalène) (Perez et al. □2001b).

Enfin, afin de valider définitivement la fiabilité de la méthode utilisée dans son ensemble (de la boue liquide à la quantification des HAPs par RP-HPLC-fluorimétrie), il fut nécessaire de déterminer les pourcentages de recouvrement de la méthode proposée. Pour cela, un échantillon de boues contaminées fut dopé à l'aide d'une concentration connue en HAPs. La réaction d'incorporation dans une zone non extractible pouvant être relativement rapide, l'échantillon fut immédiatement centrifugé (temps de contact limité pour éviter l'incorporation des HAPs dans une fraction non extractible). Après analyse, les performances de recouvrement obtenues sont proches des quantités ajoutées avec des valeurs proches de 100 % de recouvrement pour l'ensemble des HAPs (voir **Tableau E8**). Ainsi malgré l'ensemble des étapes nécessaires à l'analyse (centrifugation, séchage, tamisage, extraction à l'ASE, reprise du résidu sec et analyse par RP-HPLC-fluorimétrie), les performances de recouvrement de l'ensemble des HAPs restent donc satisfaisantes (aux erreurs analytiques près).

Tableau E8 : Performances de recouvrement de la méthode proposée préalablement optimisée (ajout d'environ 55,5 µg.l⁻¹ au final à l'échantillon).

Composés	S non dopée (µg.l ⁻¹)	RSD (%)	S dopée (µg.l ⁻¹)	RSD (%)	Recouvrement (%)	Pertes (%)
Fluorène	11,14	1,9%	60,43	1,7%	90,8%	-9,2%
Phénanthrène	104,56	2,9%	163,33	0,4%	102,1%	2,1%
Anthracène	27,15	2,9%	83,67	0,7%	101,3%	1,3%
Fluoranthène	273,2	2,3%	331,97	0,7%	101,0%	1,0%
Pyrène	299,37	2,8%	360,29	0,0%	101,5%	1,5%
Benzo(a)anthracène	109,87	1,8%	171,02	1,3%	103,5%	3,5%
Chrysène	115,77	1,9%	163,69	0,2%	95,6%	-4,4%
Benzo(b)fluoranthène	141,52	1,7%	196,8	0,0%	99,9%	-0,1%
Benzo(k)fluoranthène	84,7	1,8%	139,85	0,9%	99,8%	-0,2%
Benzo(a)pyrène	135,02	2,9%	189,05	1,0%	99,3%	-0,7%
Dibenzo(ah)anthracène	27,68	2,6%	87,78	1,7%	105,6%	5,6%
Benzo(ghi)pérylène	89,12	4,7%	147,95	1,3%	102,4%	2,4%
Indeno(123cd)pyrène	152,64	2,6%	207,82	0,2%	99,9%	-0,1%

En conclusion, la méthode proposée fournit des valeurs fiables et reproductibles à moins de 5 % pour 13 des 14 HAPs étudiés et présents au sein de boues naturellement contaminées et ce, à partir de faibles volumes d'échantillon initial (200 à 300 ml). Dans son ensemble, cette méthode semble donc particulièrement appropriée pour l'analyse des HAPs dans le cadre d'études portant sur leur biodégradation au cours de la digestion de boues à l'échelle d'expérimentations de laboratoire.

A noter qu'à plus long terme, il a été observé que, malgré une utilisation prolongée et intensive de la chaîne analytique (plus de 80 échantillons de boues mixtes urbaines analysés), celle-ci se montre d'une grande robustesse avec des erreurs de reproductibilité ne dépassant pas 2 % en moyenne, soit, respectivement, 2% Fluorène; 1,9% Phénanthrène; 1,9% Anthracène; 1,6% Fluoranthène; 1,9% Pyrène; 1,7% Benzo(a)anthracène; 1,8% Chrysène; 1,5% Benzo(b)fluoranthène; 1,3% Benzo(k)fluoranthène; 1,7% Benzo(a)pyrène; 1,8% Dibenzo(ah)anthracène; 1,7% Benzo(ghi)pérylène et 1,95% Indeno(123cd)pyrène (erreurs calculées sur deux extractions d'un même échantillon en moyenne).

Chapitre F

Mise en évidence du potentiel naturel d'élimination des HAPs et PCBs lors de la digestion anaérobie et aérobie de boues urbaines contaminées

Utilisant la méthode analytique optimisée et validée dans le Chapitre E, il sera mis en évidence dans ce chapitre le potentiel naturel d'élimination des HAPs et des PCBs par des écosystèmes anaérobies et aérobies, au cours de la digestion mésophile de boues urbaines naturellement contaminées. Pour cela, des réacteurs biologiques fonctionnant en mode continu ont été mis en œuvre pour simuler au plus près les conditions opératoires des digesteurs industriels. Tenant compte des fortes variations expérimentales dues à la faible homogénéité intrinsèque en HAPs/PCBs des boues à traiter, une méthode de calcul basée sur un bilan de matière en entrée et en sortie de réacteur a été utilisée pour exprimer avec le plus de précision possible les performances d'élimination de ces composés au cours des différents procédés de traitement.

Ainsi, dans ce chapitre, la méthode de calcul utilisée sera dans un premier temps explicitée pour le cas des matières sèches totales et d'un composé en particulier (le Fluoranthène). Après confirmation de sa validité, cette méthode sera étendue au calcul des performances d'élimination de l'ensemble des HAPs et PCBs au cours de la digestion mésophile anaérobie et aérobie de boues urbaines naturellement contaminées.

F1. Présentation de la méthode de calcul des performances d'élimination

Afin de déterminer les performances d'élimination des HAPs ou des PCBs au sein des différents réacteurs étudiés, il a été nécessaire de déterminer avec précision les concentrations en entrée et en sortie de chaque réacteur et pour chaque composé. Pour cela, dans un premier temps, un bilan de matière traditionnel de comparaison ENTREE - SORTIE a été utilisé lorsque l'état d'équilibre fut atteint, c'est à dire après environ 3 à 4 temps de séjour hydraulique. Les pertes du bilan correspondaient alors soit aux pertes abiotiques, soit aux pertes dues à l'activité biologique. Pour établir ce bilan, il a été nécessaire de prendre en compte la concentration totale en HAPs ou en PCBs (en $\mu\text{g.l}^{-1}$). Celle-ci correspond à une quantité, par unité de volume de boues, extraite de la fraction liquide aqueuse (déterminée par extraction sur phase solide SPE) et de la fraction de la matrice solide (déterminée par extraction à l'ASE). Or, après extraction de ces composés de la matrice solide, les résultats obtenus sont exprimés en quantité de CTO rapportée à une quantité de matière sèche, soit en général en $\text{mg}_{\text{CTO}}.\text{kg}_{\text{MS}}^{-1}$. La concentration mesurée des boues en matières sèches totales (MS) doit donc être également prise en compte. Cependant, due aux propriétés de floculation des boues mixtes et à leur faible homogénéité, les concentrations en MS en entrée de procédé, ou Substrat, sont grandement variables entre les différents aliquots utilisés (de 25 à 50 g.l^{-1} , moyenne de $32 \pm 7 \text{ g.l}^{-1}$) (voir **Figure F1.A**). Il est donc peu envisageable de calculer des rendements d'élimination à partir de valeurs comportant plus de 20 % de variation sur les matières sèches totales en entrée, de tels variations pouvant conduire à des conclusions statistiquement erronées vis à vis des pertes en CTO. Afin de résoudre ce problème, il a été déterminé, en fonction des variations de concentrations en entrée de réacteur et du temps de séjour hydraulique, la concentration théorique attendue à tout instant t en sortie d'un réacteur supposé parfaitement stérile ne présentant ni pertes abiotiques, ni pertes biologiques (*cf Chapitre D6. Méthodes d'analyse des résultats*). Par comparaison avec les concentrations réelles mesurées en sortie des réacteurs étudiés (témoin et biologique), les pertes abiotiques et biologiques ont ainsi pu être évaluées.

Afin d'illustrer la démarche entreprise par cette méthode pour l'analyse des résultats de chaque réacteur et pour chaque composé étudié, les cas du calcul des performances de réduction des matières sèches totales, ainsi que des performances d'élimination en CTO (exemple d'un HAP : le Fluoranthène) sont présentées ci-dessous.

F1-1. Estimation des performances de réduction en Matières Sèches (exemple de réacteurs anaérobies mésophiles de digestion de boues)

Dans un premier temps, il est posé comme hypothèse de départ que, dans le cas des matières sèches, les pertes abiotiques peuvent être globalement négligées. En effet, il n'existe pas de phénomène prédominant de volatilisation ou de photolyse de la matière organique. Sous cette hypothèse, les concentrations attendues en sortie d'un réacteur théorique infiniment mélangé et parfaitement stérile doivent correspondre, aux erreurs expérimentales près, à la sortie mesurée d'un réacteur témoin stérilisé chimiquement à l'azide de sodium (50 mM) (voir **Figure F1.C**). Or, durant les 50 premiers jours de fermentation (**point A**), il apparaît que la courbe théorique tend à s'éloigner des mesures réelles avec un rapport entre les deux courbes tendant vers un pourcentage de réduction des MS de près de 30 % (voir **Figure F1.C**). Ce résultat montre que, jusqu'à 50 jours, la stérilisation du réacteur témoin n'était pas suffisante et, donc, qu'une concentration en azide de sodium de 50 mM était trop faible pour inhiber totalement l'activité biologique dans le cas de boues urbaines. Suite à ces observations, la concentration en azide de sodium fut augmentée à 100 mM et la courbe théorique recalculée ($t=0$ pour le point A). Suite à ce changement de concentration en azide de sodium, les concentrations attendues et réelles en MS convergent alors vers une même valeur, donc vers aucune différence significative (réduction moyenne de $1,2 \pm 3,7$ %). Ainsi, cette méthode de calcul est donc validée pour la détermination, avec précision et à tout instant t , de la concentration attendue en sortie d'un réacteur théorique témoin sans activité biologique ni pertes abiotiques.

Suivant le même raisonnement, les performances de réduction des MS des réacteurs biologiques ont pu être estimées en calculant l'évolution de la concentration attendue en sortie de chaque réacteur en fonction du temps et en comparant cette concentration théorique aux mesures réelles (voir **Figure F1.E**). Un pourcentage moyen de réduction des MS ($49,6 \pm 4,2$ %) fut alors déterminé après obtention d'un état stable du réacteur, c'est à dire après 3 à 4 temps de séjour en moyenne, soit entre 120 et 160 jours (voir **Figure F1.D et E**).

L'utilisation de cette méthode de calcul a donc permis d'exprimer des performances d'élimination avec une incertitude de 3 à 5 % alors qu'un calcul traditionnel de comparaison simple Entrée-Sortie à l'état d'équilibre, fournirait un résultat avec près de 50 à 60 % d'erreur (accumulation des erreurs de mesure et des fluctuations en entrée et en sortie de réacteur).

Cette méthode de calcul étant en partie validée, elle fut alors appliquée à l'étude de la disparition abiotique et d'origine biologique des HAPs et PCBs.

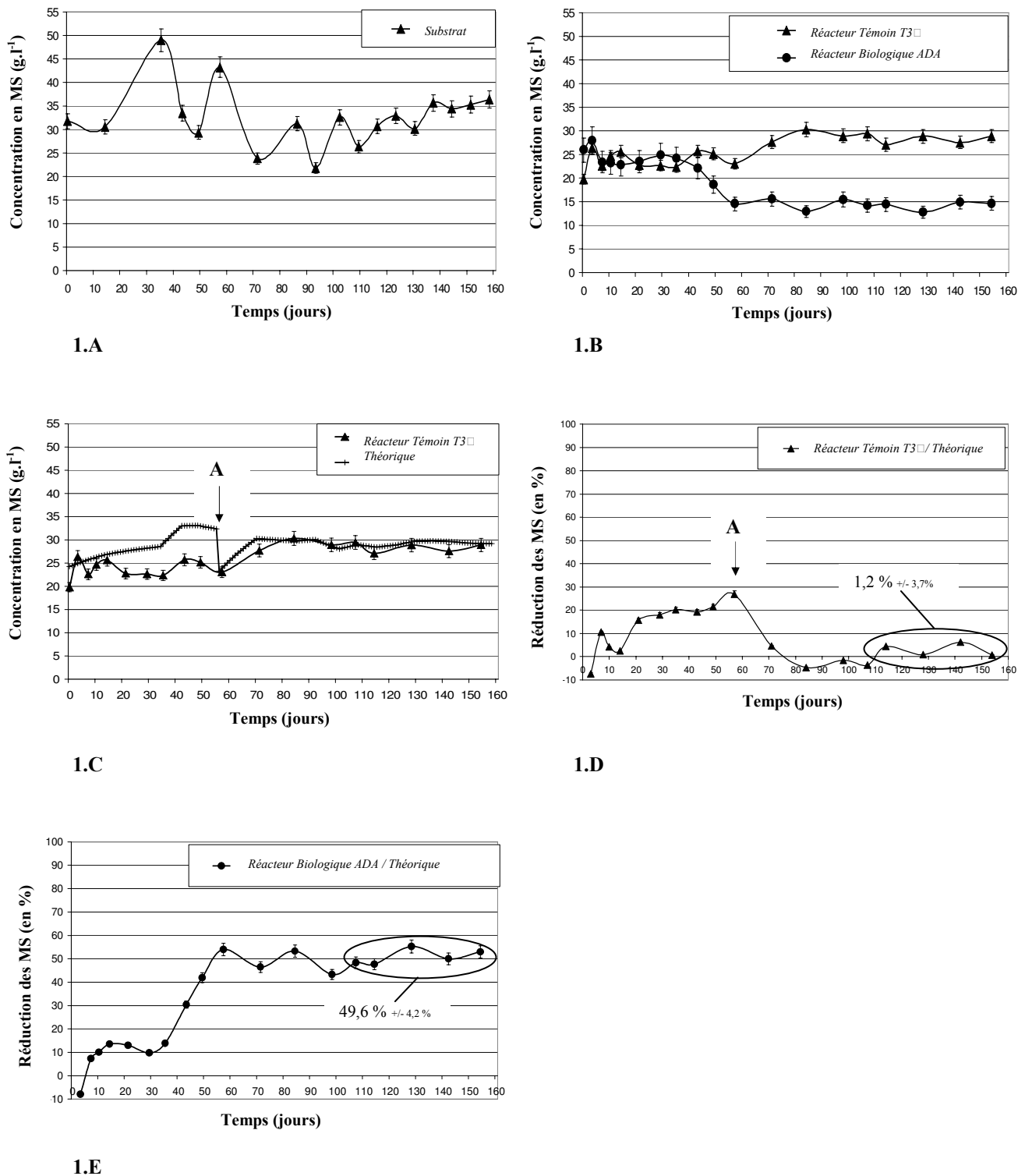


Figure F1.(ABCDE) : Concentrations en Matières Sèches (MS) dans le cas du Substrat (1.A), des réacteurs anaérobies mésophiles témoin T35 et biologique ADA (1.B), de la concentration théorique calculée (1.C) et des pourcentages de réduction des MS, pour le témoin (1.D) et pour le réacteur ADA (1.E) au cours du temps de stabilisation. (Le point A correspond au changement de concentration en azide de sodium pour le réacteur témoin CR de 50 mM à 100 mM.)

F1-2. Cas des Composés Traces Organiques : exemple du Fluoranthène

L'étude de la disparition des CTO au cours de la digestion de boues mixtes naturellement contaminées passe également par un bilan en entrée et en sortie de réacteur et, donc, par la détermination des concentrations totales en HAPs/PCBs (en $\mu\text{g.l}^{-1}$). Cette quantité de CTO est comprise dans deux fractions distinctes, l'une liquide (extraction de la phase liquide par SPE) et l'autre solide (extraction des boues sèches à l'ASE).

Concernant les HAPs de la fraction liquide, les concentrations mesurées sont souvent relativement faibles (parfois non détectables) et ne correspondent qu'à une fraction négligeable des HAPs totaux. A titre d'exemple, les concentrations en HAPs de la fraction liquide dans le réacteur témoin T35 sont indiquées dans le **Tableau F1**, échantillon où les concentrations mesurées sur la fraction solide sont, en proportion, les plus importantes (*cf* **Chapitre E – Tableau E2**). Pour les échantillons de boues en sortie des réacteurs biologiques, les concentrations en HAPs de la fraction liquide sont en général inférieures au seuil de détection. Les quantités en HAPs retrouvées dans la fraction liquide peuvent donc être globalement négligées par rapport aux concentrations en HAPs de la matrice solide. De la même manière, les PCBs de la fraction liquide sont dans tous les cas en concentrations non détectables et peuvent être également négligés. L'étude de la disparition de ces deux familles de composés et l'établissement des différents bilans de matière porteront donc uniquement sur les résultats obtenus par extraction des CTOs de la phase solide.

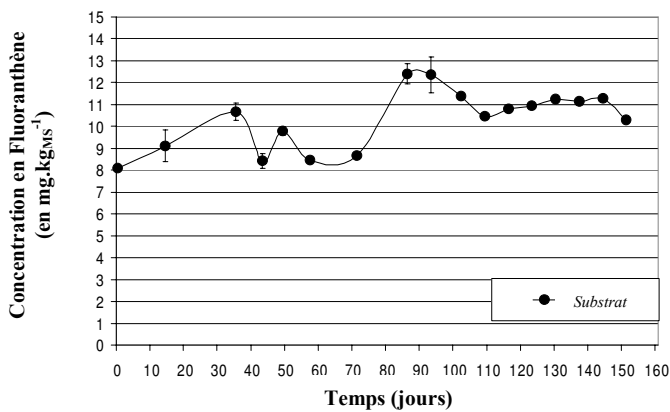
Tableau F1 : Concentrations en HAPs mesurées dans la phase liquide aqueuse et comparaison avec les concentrations retrouvées dans la phase solide pour le réacteur témoin T35.

HAPs :	Fluo	Phé	Anth	Fluor	Pyr	B(a)A	Chrys	B(b)F	B(k)F	B(a)P	DB	B(ghi)P	Ind
Concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	0,1	1,1	0,3	2,7	2,4	0,9	1,2	0,5	0,2	0,4	ND	0,2	0,1
Proportion par rapport à la phase solide (en %)	0,6%	0,9%	0,9%	0,8%	0,7%	0,8%	0,9%	0,3%	0,3%	0,3%	ND	0,2%	0,1%

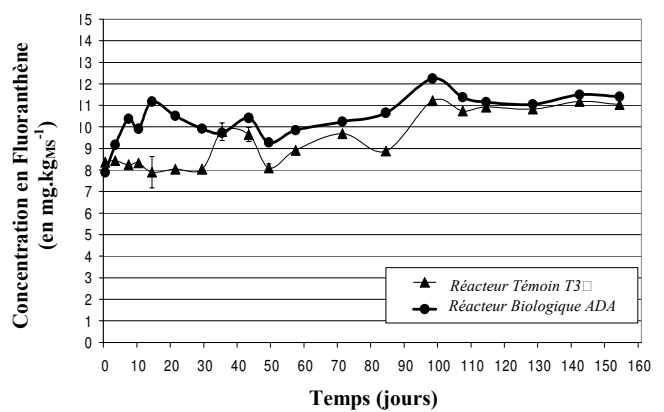
Ainsi, tous les HAPs se retrouvent majoritairement piégés dans la fraction solide des boues et l'évaluation des performances de chaque réacteur passe donc par la détermination des concentrations en HAPs dans la phase solide et donc des concentrations en matières sèches (bilans de matière en HAPs par unité de volume de boues). Afin de présenter la méthode de calcul utilisée pour l'estimation des performances d'élimination des CTO (comme pour le cas des matières sèches totales), l'exemple du Fluoranthène est présenté ci-dessous.

Une première estimation des concentrations brutes en Fluoranthène au sein de la matrice solide montre que pour le substrat et pour les sorties de réacteur, elles tendent toutes globalement vers une valeur de $11,2 \pm 0,4 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ (voir **Figure F2.A** et **F2.B**). Or, comme il a été précédemment montré, les réacteurs possèdent différentes performances de réduction des matières sèches totales (pour le réacteur témoin T35, $1,2 \pm 3,7 \%$, et pour le réacteur ADA, $49,6 \pm 4,2 \%$). Ainsi, dans le cas d'une réduction significative des MS et pour une concentration brute en Fluoranthène similaire dans le substrat et en sortie de réacteur, il peut en être conclu qu'environ 50 % du Fluoranthène est éliminé au cours du procédé de digestion (ici digestion anaérobie mésophile). Afin de quantifier de manière plus précise les performances d'élimination du procédé, la concentration totale en Fluoranthène (en $\mu\text{g.l}^{-1}$) est calculée comme étant le produit de la concentration en MS (g.l^{-1}) et de la concentration en HAPs dans la matière sèche (en $\mu\text{g.g}_{\text{MS}}^{-1}$) (voir **Figure F2.C** et **F2.D**). La concentration attendue en sortie d'un réacteur théorique parfaitement stérile et infiniment mélangé a été alors calculée et comparée aux mesures obtenues dans le cas des réacteur témoin T35 (voir **Figure F2.E**) et biologique ADA (voir **Figure F2.F**). Dans le cas du Fluoranthène, il n'existe aucune différence significative entre le réacteur témoin T35 à l'état d'équilibre et la concentration attendue théorique (moyenne de $0,1 \pm 7,4 \%$). Ce résultat montre donc que, pour ce composé, les pertes abiotiques sont négligeables au cours du processus de digestion anaérobie mésophile. Par comparaison, dans le cas du réacteur biologique ADA, une part significative du Fluoranthène est éliminée au cours du traitement jusqu'à près de 50 % ($48,2 \pm 6,7 \%$). Ainsi, malgré une concentration brute en Fluoranthène relativement constante et égale dans les boues sèches en entrée et en sortie de procédé, les performances de réduction des MS et le fait que les HAPs ne se retrouvent pas solubilisés dans le milieu aqueux font que les performances d'élimination du Fluoranthène sont du même ordre de grandeur que le taux de réduction des MS, soit environ 50 %.

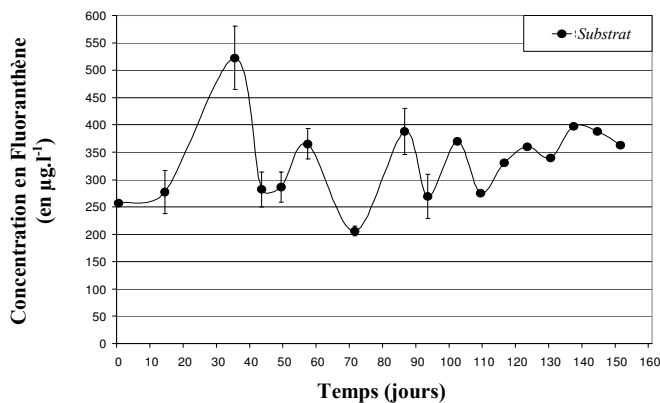
A partir de ces résultats, la méthode de calcul est définitivement validée et peut être utilisée pour l'estimation avec une grande précision des pertes abiotiques et biologiques en CTO au cours des procédés de digestion. Elle peut donc être appliquée à l'ensemble des HAPs et pour tous les réacteurs et conditions opératoires étudiées.



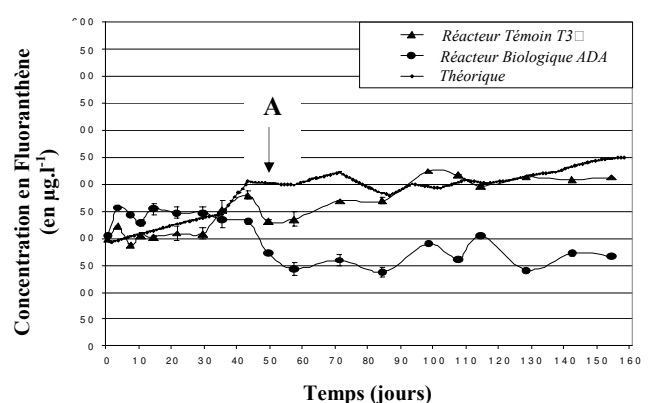
2.A



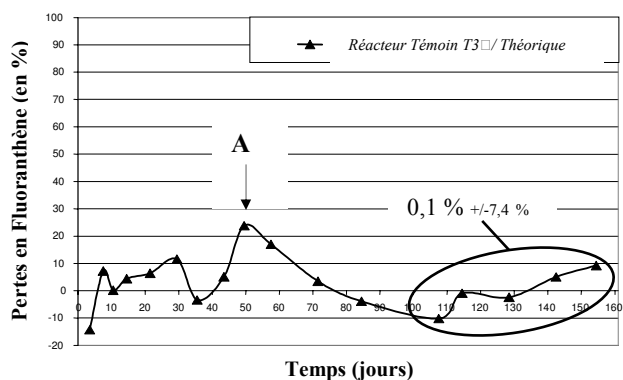
2.B



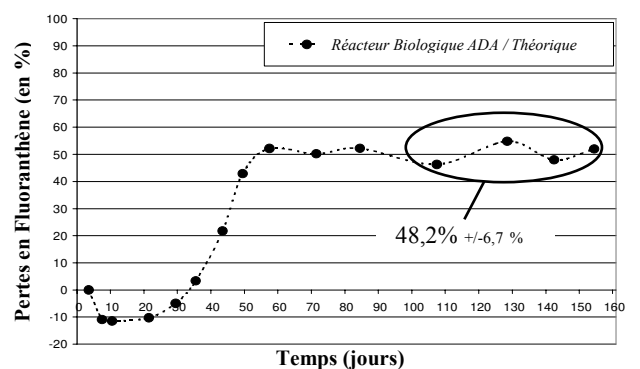
2.C



2.D



2.E



2.F

Figures F2.(ABCDE) : Concentrations brutes et totales en Fluoranthène dans le cas du Substrat (2.A et 2.C), des réacteurs témoin T35, biologiques ADA et théorique (2.B et 2.D) et des performances d'élimination du Fluoranthène (en %) pour le réacteur témoin (2.E) et pour le réacteur ADA (2.F). (Le point A correspond au changement de concentration en azide de sodium pour le réacteur témoin CR de 50 mM à 100 mM.)

F2. Mise en évidence du potentiel d'élimination de 13 HAPs au cours de la digestion de boues contaminées

Suivant la même méthode de calcul que celle présentée ci-dessus pour le cas du Fluoranthène, les performances globales d'élimination de 13 HAPs ont été déterminées lors d'une première série d'expériences afin de mettre en évidence le potentiel naturel d'élimination de ces composés par des écosystèmes acclimatés anaérobies et aérobies dans des conditions dites "standards" de digestion : réacteurs mésophiles à 35°C avec un temps de séjour hydraulique de 40 jours sous conditions anaérobies méthanogènes et de 20 jours sous conditions aérobies.

F2-1. Potentiel d'élimination des HAPs sous conditions anaérobies mésophiles méthanogènes

F2-1-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion

Afin de confirmer les conditions de méthanogénèse du réacteur ADA, le flux de production et la composition du biogaz furent déterminés. Les rendements en biogaz furent d'environ $430 \pm 43 \text{ ml.gMSdégradée}^{-1}$ (ou $307 \pm 17 \text{ ml.gDCOdégradée}^{-1}$). Le taux de méthane du biogaz produit fut d'environ $74,8 \pm 0,1 \%$, le reste étant du dioxyde de carbone. Cette valeur, normalement comprise entre 70 et 75 %, reste hautement caractéristique de bonnes conditions de méthanogénèse (Arundel, 2000). En effet, un tel niveau d'activité méthanogène des bactéries ne peut se produire que pour de très faibles potentiels redox-hydrogène inférieurs à $-250/-300 \text{ mV}$. A ce niveau, seulement l'activité des bactéries sulfato-réductrices peuvent entrer en compétition avec les bactéries méthanogènes (Oude Elferink et al., 1994). Or, la présence d'ions sulfate n'a pu être détectée dans le substrat, ne permettant qu'une activité négligeable de ces bactéries (concentrations inférieures à 5 mg.l^{-1}).

D'autre part, les Acides Gras Volatils, substrats inhibiteurs de la méthanogénèse, restent en quantité négligeable dans le milieu ($<0,05 \text{ g.l}^{-1}$), indiquant le bon aboutissement de la dégradation de la matière carbonée. Ainsi, le réacteur ADA a essentiellement été conduit sous des conditions de méthanogénèse. Dans le cas du réacteur témoin T35, la production de biogaz fut négligeable et la composition de la boue n'a pas évolué, indiquant une bonne stérilisation du milieu.

Particulièrement performant vis à vis de la dégradation de la pollution carbonée, le réacteur ADA a présenté des taux de réduction en matières sèches de $49,6 \pm 4,2$ % et en matières organiques de $65,5 \pm 7,4$ %, le rapport MO / MS passant de 63 % dans le substrat à 46 % dans le digestat. De plus, près de 51 % de la DCO est dégradée au cours du procédé à l'équilibre. Alors que les recommandations pour la digestion de boues préconisent un rapport Carbone_{organique} : Azote : Phosphore d'environ 100 : 3 : 0,6 (Bitton, 1994), le digestat présente des caractéristiques de dégradation d'environ 100 : 14,3 : 4,4 indiquant une faible limitation par les nutriments azotés et phosphorés (forte richesse de la boue digérée en ces composés).

F2-1-2. Performances d'élimination des HAPs sous conditions méthanogènes

Dans un premier temps, afin de conclure ultérieurement à une dégradation biologique de ces composés, les pertes abiotiques dues à la simple mise en œuvre du procédé ont été estimées. Ces pertes en HAPs sont principalement dues à des phénomènes de volatilisation, de photolyse ou de combinaison chimique avec la matière organique. Pour cela, un réacteur témoin (réacteur T35) stérilisé chimiquement a été mis en œuvre. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure F3**. Au cours de ce procédé, les pertes abiotiques estimées sont principalement limitées aux HAPs de faible poids moléculaire comme le Fluorène (2 cycles), le Phénanthrène et l'Anthracène (3 cycles) (voir **Figure F3**). Pour les HAPs de plus haut poids moléculaire, les pertes abiotiques peuvent être globalement négligées avec autant d'HAPs en sortie qu'en entrée de réacteur (bilan de matière bouclé).

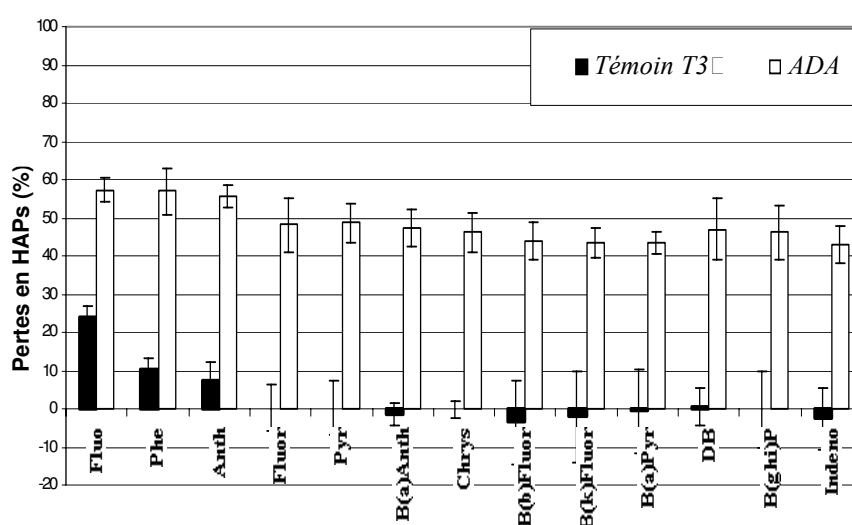


Figure F3: Pertes abiotiques (réacteur témoin T35) et biologiques (réacteur ADA) en HAPs sous conditions anaérobies strictes en fonction du nombre croissant de cycles benzéniques.

Les pertes abiotiques dues au procédé sont donc plus liées au poids moléculaire des HAPs et finalement à leur propriétés physico-chimiques, qu'à leur concentration pourtant très variable, de 15 à 340 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (voir **Tableau F2**). En effet, ces pertes ne concernent principalement que les HAPs les plus légers qui possèdent les plus faibles températures d'ébullition, de point de fusion et qui sont donc plus sensibles aux phénomènes de volatilisation. Ces composés présentent également une plus grande solubilité dans l'eau (~ 1 à 2 mg.l^{-1}) et peuvent plus facilement participer à l'interface de la matrice solide aux diverses réactions aqueuses non spécifiques de transformation et de combinaison chimique avec la matière organique, réactions récemment observées dans le cas de sols contaminés (Richnow *et al.*,1998).

Confirmant nos résultats, Wild *et al.* (1993) ont également montré que les pertes abiotiques en HAPs dans les sols ne sont significatives que pour des HAPs possédant moins de 4 cycles benzéniques, c'est à dire jusqu'au Fluoranthène. Au cours d'une autre étude, sous des conditions de méthanogénèse en réacteur discontinu, Kirk et Lester (1990) avaient rapporté que les plus gros HAPs dont l'Indeno(123cd)pyrène disparaissaient également de manière non biologique. Par comparaison avec nos résultats acquis sous conditions méthanogènes continus, il semble que les conclusions de Kirk et Lester (1990) soient vraisemblablement dues soit aux fortes erreurs analytiques de l'étude (+ de 20%), soit au procédé en lui-même (adsorption des plus gros HAPs sur les éléments du réacteur).

Tableau F2 : Concentrations moyennes en HAPs dans le substrat (boues fraîches) et pour les réacteurs anaérobies en pseudo-équilibre témoin T35 et biologique ADA. (erreur maximale de 5 % sur un même échantillon).

HAPs :		Fluo	Phé	Anth	Fluor	Pyr	B(a)A	Chrys	B(b)F	B(k)F	B(a)P	DB	B(ghi)P	Ind
Substrat	($\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$)	0,54	3,83	0,99	10,31	10,4	3,5	4,16	4,47	2,29	3,94	0,71	2,62	3,68
	($\mu\text{g.l}^{-1}$)	17,6	124	30,5	332	337	113	135	144	73,8	128	23,2	85,2	119
Réacteur Témoin T35	($\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$)	0,40	3,43	0,89	10,9	10,9	3,8	4,44	5,01	2,54	4,34	0,73	2,74	4,24
	($\mu\text{g.l}^{-1}$)	11,5	97,6	25,4	312	309	108	126	142	71,9	123	20,8	77,8	120
Réacteur Biologique ADA	($\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$)	0,50	3,49	0,92	11,3	11,1	3,96	4,71	5,29	2,72	4,54	0,8	3	4,46
	($\mu\text{g.l}^{-1}$)	7,4	52,1	13,8	172	163	58,4	69,4	78	40,1	67,2	11,9	44,2	65,9

Par comparaison, les performances d'élimination de l'ensemble des HAPs sous conditions méthanogènes (réacteur ADA) furent de l'ordre de 50 % pour tous les composés (voir **Figure F3**). Les pertes abiotiques liés au procédé étant strictement limitées aux plus petits HAPs et de proportion plus faible, il a donc été mis en évidence à travers ses résultats et pour la première fois sous conditions anaérobies méthanogènes, une élimination significative suite à une action biologique des 13 HAPs étudiés. Ce processus d'élimination biologique par l'écosystème méthanogène est, dans ce cas, indépendant de leur poids moléculaire et de leur concentration respective (voir **Tableau F2**). En effet, exceptions faites du Fluorène, du Phénanthrène et de l'Anthracène qui présentent des pertes abiotiques significatives, un test statistique de comparaison multiple de moyenne (ANOVA) montre qu'il n'existe aucune différence significative entre les performances d'élimination des autres HAPs, avec une moyenne totale de l'ordre de $45,7 \pm 2,1$ % (test F de $2,02 < F_{\text{critique}}$ de 2,4 à 5%).

Or, dans le cas du réacteur ADA, le taux de réduction des solides au cours du traitement est également de l'ordre de 50 %. Afin de s'affranchir de ce taux d'abattement en matière sèche, il peut être intéressant de rapporter les performances d'élimination de chaque HAPs sur le taux de réduction des solides : le facteur calculé est alors appelé facteur d'efficacité du procédé de traitement (sans unité) (voir **Figure F4**). Les normes concernant les concentrations brutes en HAPs, il est intéressant de déterminer si le procédé tend à diminuer les concentrations brutes en HAP (facteur > 1) ou à les augmenter (facteur < 1). Dans le cas de ADA, le facteur d'efficacité reste proche de 1 pour l'ensemble des HAPs (test F de $2,06 < F_{\text{critique}}$ de 2,22 à 5%).

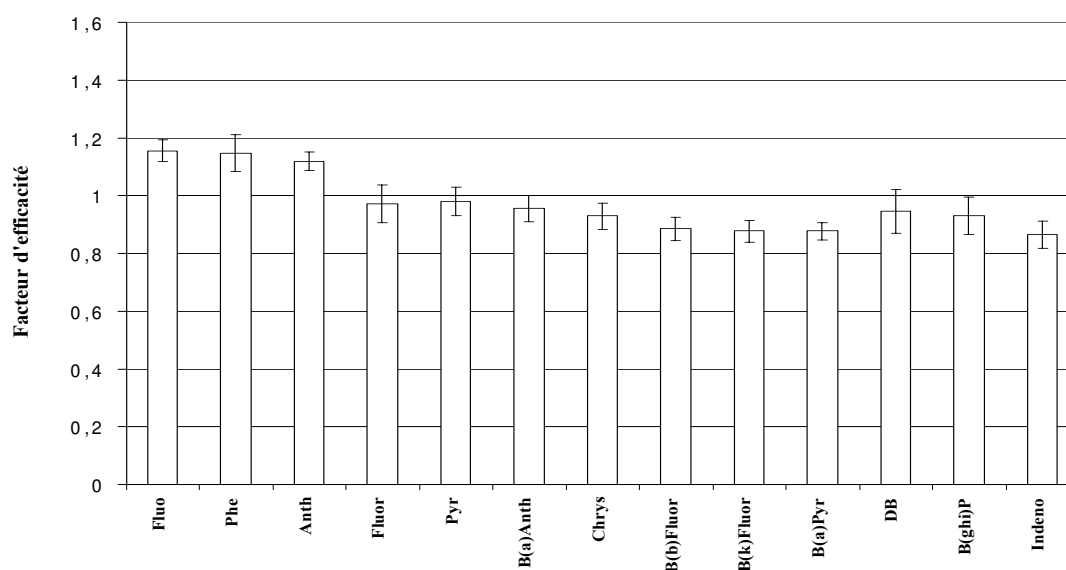


Figure F4: Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs pour le réacteur ADA en fonction du nombre croissant de cycles benzéniques.

Ce facteur d'efficacité indique donc non seulement que les concentrations brutes en HAPs (en $\text{mg}_{\text{HAP}}.\text{kg}_{\text{MS}}^{-1}$) restent relativement constantes entre l'entrée et la sortie du réacteur biologique (voir **Tableau F2**), mais aussi que leur élimination sous ces conditions semble étroitement liée, voire limitée, par la réduction des matières sèches. La consommation de la matière organique au cours du traitement pourrait en effet rendre les HAPs piégés dans la matrice plus biodisponibles à leur dégradation, en posant l'hypothèse la plus souvent retenue de diffusion simple de ces composés de la matrice solide puis de leur dégradation uniquement en milieu aqueux. A noter toutefois que, même en milieu stérile, les HAPs ne sont retrouvés qu'en quantité négligeable dans la fraction liquide, quantité bien inférieure à leur solubilité dans l'eau (notamment pour les plus petits). De plus, leur disparition est totalement indépendante de leur concentration dans le milieu. La diffusion de ces composés au sein de la matrice solide n'est donc pas totalement dépendante d'une simple loi de diffusion comme la loi de Fick où la diffusion est régit par le gradient de concentration du composé. Il semble plus que, dans le cas des boues (à hautes teneurs en matières organiques), ces composés soient adsorbés de manière forte sur des sites spécifiques et que leur libération suite à l'action hydrolytique de l'écosystème permette leur élimination par voie biologique (loi de diffusion non linéaire et faiblement dépendante de la concentration des composés).

En conclusion de cette étude, une élimination significative des 13 HAPs étudiés a été observée pour la première fois sous conditions méthanogènes et il semble qu'elle soit fortement limitée par le taux de réduction en matières sèches. Cependant, à ce stade, il ne peut être définitivement conclu en une réelle biodégradation des HAPs au regard de ces seuls résultats. En effet, il est possible que la disparition des HAPs puisse être le résultat de plusieurs phénomènes indépendants d'une biodégradation spécifique de ces composés, comme une simple transformation non spécifique due à la présence de radicaux libres produits par l'activité biologique régnant dans le réacteur, ou leur incorporation au sein d'une fraction non extractible, la disparition apparente des HAPs résultant alors simplement d'une limitation analytique.

F2-2.Potentiel d'élimination des HAPs sous conditions aérobies mésophiles

Généralement peu utilisée au niveau industriel ou peu dissociée du traitement d'aération prolongée, la digestion aérobie mésophile des boues urbaines est particulièrement

intéressante dans le cas du devenir des HAPs. En effet, même si leur biodégradation a largement été étudiée sous conditions aérobies et dans le cas de nombreuses souches de laboratoire (schémas de dégradation établis, souches identifiées et isolées,...), elle n'a pas encore été déterminée, à notre connaissance, lors de la digestion de boues faiblement contaminées par des HAPs (de l'ordre de quelques $\text{mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$). Dans le cadre de cette étude et pour comparer les performances d'élimination entre des écosystèmes anaérobies et aérobies adaptés aux HAPs, leur devenir a été étudié au sein de réacteurs aérobies mésophiles.

F2-2-1. Caractérisation des conditions aérobies de digestion

Tout au long de cette étude, les conditions aérobies de digestion furent vérifiées périodiquement par mesure du taux d'oxygène au sein même des réacteurs aérobies témoin Taéro ou biologique Aéro. Ainsi, tout au long de l'expérience, les réacteurs Taéro et Aéro ont fonctionné sous bonnes conditions d'aération et sous saturation d'oxygène dans le milieu (environ $7,5 \text{ mg.l}^{-1}$).

Les performances de dégradation globales furent plus faibles que dans le cas de réacteurs anaérobies avec une réduction en MS d'environ $38,1 \pm 3,3 \%$, en MO de $44,7 \pm 3,4 \%$ et en DCO de $52,8 \%$. La comparaison de ces performances entre digesteurs anaérobies et aérobies mésophiles montrent l'influence du rendement en biomasse, plus élevé sous conditions aérobies ($0,4 - 0,6 \text{ g.g}_{\text{DCOdegradée}}^{-1}$ contre $0,02 - 0,15 \text{ g.g}_{\text{DCOdeg}}^{-1}$ en anaérobiose) (Bitton, 1994). A noter enfin que le rapport $C_{\text{organique}} : \text{Azote} : \text{Phosphore}$ fut d'environ $100 : 8 : 2$ dans le réacteur, certes moins favorable qu'en anaérobiose mais suffisant pour ne pas limiter la réaction par manque en nutriments azotés et phosphorés.

F2-2-2. Performances d'élimination des HAPs sous conditions aérobies

Dans un premier temps, les pertes abiotiques ont été estimées et comparées à celles mesurées au cours du procédé de digestion anaérobie (voir **Figure F5**). Le réacteur témoin aérobie (Taéro) présente des pertes abiotiques significativement plus importantes que sous anaérobiose, avec près du double de pertes pour les HAPs les plus légers (Fluorène, Phénanthrène et Anthracène). Fortement liée au procédé en lui-même, l'augmentation des pertes abiotiques lors du traitement aérobie est vraisemblablement le résultat de l'aération du système engendrant une plus forte solubilisation et diffusion des HAPs par augmentation de la

turbulence du milieu, et une augmentation des phénomènes de volatilisation, résultats déjà observés lors du traitement par aération forcée de sols contaminés (Leduc et al., 1992).

Concernant les HAPs de plus gros poids moléculaire, il a été observé que ceux-ci se retrouvent en plus grande quantité en sortie de réacteur qu'en entrée (pertes négatives). Ils semblent donc être libérés de la fraction non extractible de la matrice boue du substrat, avec un gain significatif en HAPs totaux au cours du traitement (jusqu'à 20%). Ce relargage des HAPs de la fraction non extractible est probablement lié aux fortes conditions de turbulence créées par l'agitation mécanique et au brassage du milieu par l'aération qui favoriseraient la diffusion ou la libération de ces composés à l'interface matrice solide - milieu aqueux par dissociation mécanique de la matrice solide. A noter pourtant que les concentrations en phase liquide des HAPs restent négligeables par rapport aux concentrations mesurées en phase solide et bien inférieures aux limites de solubilisation. Ils semblent donc que, comme pour le cas de la digestion anaérobie, la solubilisation des HAPs de la matrice boue dans la fraction aqueuse soit régit par des phénomènes plus complexes qu'une simple loi linéaire de diffusion passive (ou loi de Fick).

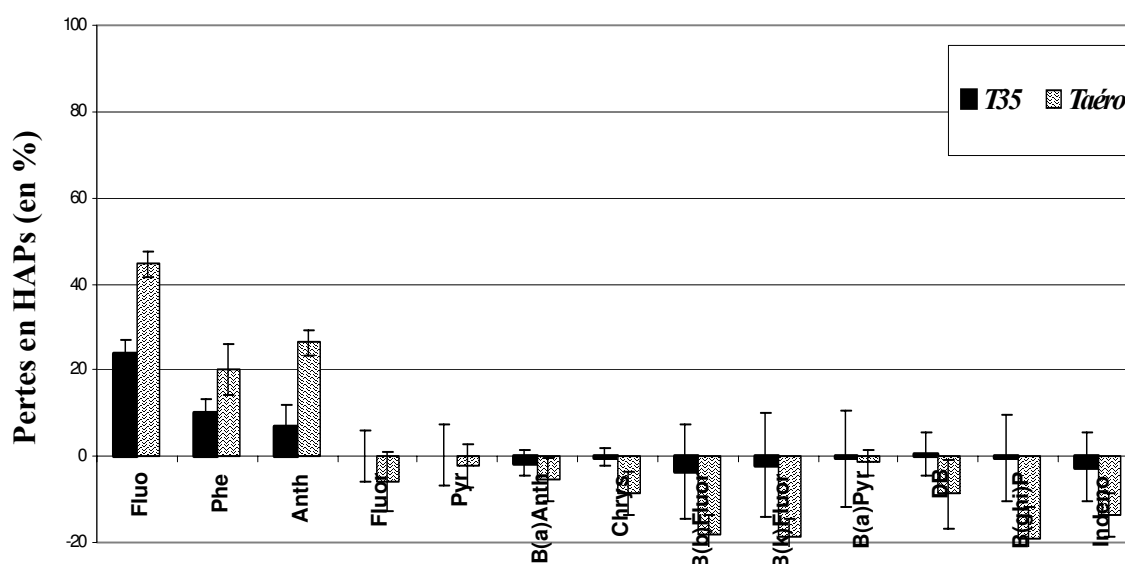


Figure F5: Pertes abiotiques en HAPs au sein des réacteurs témoins sous conditions anaérobies (T35) et aérobies (Taéro) en fonction du nombre croissant de cycles benzéniques.

Concernant les réacteurs biologiques, la comparaison du réacteur aérobie (Aéro) et anaérobie (ADA) montre une différence significative entre les deux procédés pour la plupart des HAPs (voir **Figure F6**). En effet, les performances apparentes d'élimination des HAPs sont nettement plus élevées sous conditions aérobies atteignant des pourcentages d'élimination de l'ordre de 90% pour les plus petits HAPs. Il semble donc que les capacités d'élimination soient nettement plus importantes sous conditions aérobies que sous anaérobiose. De tels résultats ont également été observés sous conditions nitrate réductrices où les vitesses de dégradation des HAPs étaient sensiblement plus faibles que sous aérobie (*Leduc et al.,1992; Mihelcic et al.,1988; Wilson et al.,1997*). De plus, dans le cas du réacteur aérobie, le nombre de cycles benzéniques et le poids moléculaire des HAPs possèdent un effet négatif sur les performances d'élimination (voir **Figure F6**). Cette observation est en accord avec les données de la littérature portant sur la biodégradation de ces composés sous conditions aérobies, où il est couramment admis que la dégradation des HAPs est fortement ralentie en fonction du poids moléculaire croissant (*Sutherland et al., 1990*). Ainsi, pour les HAPs les plus lourds (du Dibenzo(ah)anthracène à l'Indeno(123cd)pyrène), moins biodisponibles et plus difficilement biodégradables, les performances d'élimination apparentes sous conditions aérobies et anaérobies semblent sensiblement équivalentes (voir **Figure F6**).

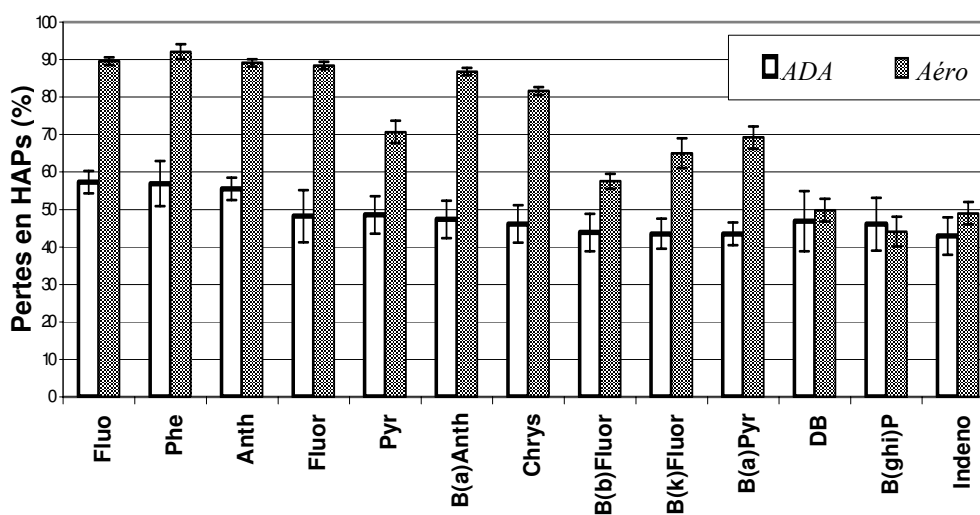


Figure F6: Pertes apparentes totales (abiotiques et biologiques) dans le cas de réacteurs anaérobie (réacteur ADA) et aérobie (réacteur Aéro) en fonction du nombre croissant de cycles benzéniques.

Toutefois, dans le cas du réacteur témoin, il a été précédemment montré que la quantité total de certains HAPs en sortie de réacteur était plus importante qu'en entrée, le réacteur présentant des pertes négatives, notamment pour les HAPs les plus lourds (voir **Figure F5**). Il paraît donc nécessaire de corriger les pertes apparentes mesurées par les pertes et gains abiotiques, donnant ainsi le potentiel en HAPs dégradés par voie biologique (voir **Figure F7**). Ainsi, après correction et à l'exception du Fluorène, les pertes réelles (potentielles) dues à l'activité biologique restent toujours supérieures aux pertes mesurées sous conditions anaérobies, même pour les plus gros HAPs avec environ 60 % d'élimination. L'activité biologique aérobie ainsi que les conditions de digestion favorisant la diffusion des HAPs semblent donc particulièrement intéressantes pour l'élimination de l'ensemble de ces composés lors de la digestion de boues contaminées.

Cependant, il reste fort probable que les quantités totales réelles en HAPs disponibles et dégradés au cours de la réaction biologique ne soient pas réellement connues. En effet, le « relargage » des HAPs de la fraction non extractible lors du traitement témoin ne correspond pas forcément aux quantités réelles totales vues par les micro-organismes lors du traitement biologique de la boue, avec la possibilité d'un relargage en HAPs encore plus important due à l'action biologique de lyse du substrat (augmentation de la biodisponibilité de certains HAPs de la fraction non extractible). Finalement, les performances d'élimination du procédé ne peuvent donc être déterminées qu'à partir des pertes apparentes en HAPs, celles-ci étant forcément sous-estimées pour les plus gros HAPs (pour les plus petits HAPs, les quantités potentielles totales ne peuvent être estimées, le flux de volatilisation étant dans ce cas prépondérant).

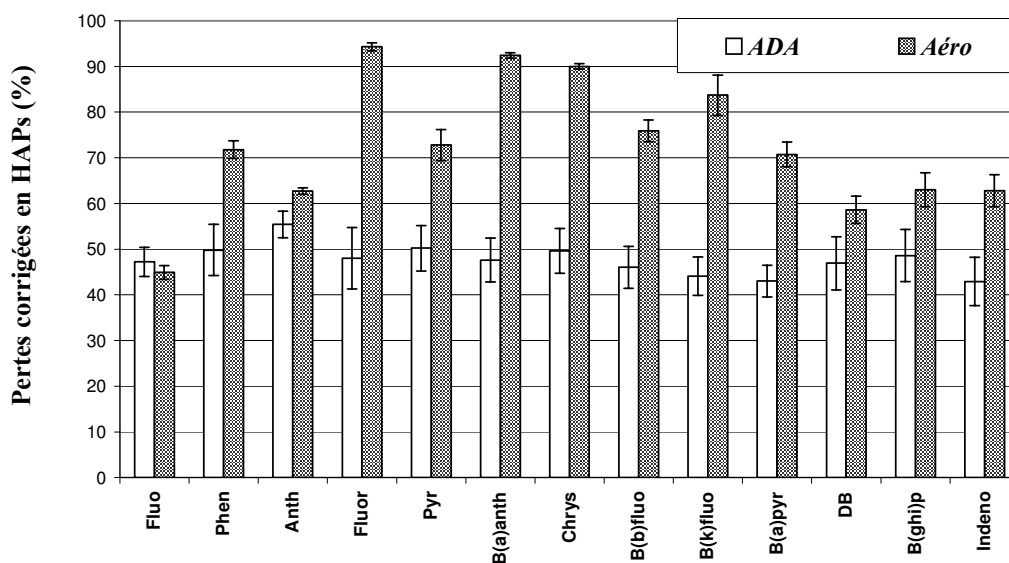


Figure F7: Pertes corrigées potentiellement dues à l'activité biologique dans le cas de réacteurs anaérobies (réacteur ADA) et aérobie (réacteur Aéro), en fonction du nombre croissant de cycles benzéniques.

Comme dans le cas du digesteur anaérobie, il peut être envisagé que l'élimination des HAPs soit fortement dépendante de la dégradation des matières organiques avec une forte liaison de ces composés aux matières organiques de la boue. Or, le taux de réduction en Matières Sèches du processus de digestion aérobie est significativement plus faible que sous conditions anaérobies (respectivement 38% contre environ 50%). Ainsi, afin de comparer ces deux procédés, il est nécessaire de s'affranchir de ce taux de réduction des matières sèches par la représentation du facteur d'efficacité (voir **Figure F8**). Le calcul de ce facteur montre ainsi que le procédé aérobie favorise significativement l'élimination biologique des HAPs au sein même de la matrice boue. Le facteur d'efficacité sous conditions aérobies reste donc significativement supérieur à 1 pour l'ensemble des HAPs, indépendamment de leur concentration dans le milieu (voir **Tableau F3**). En effet, ces performances d'élimination sont vraisemblablement dues non seulement à une meilleure activité biologique sous conditions aérobies, mais aussi aux conditions générales du procédé augmentant les phénomènes de transfert dans le milieu (agitation mécanique et forte aération). Ainsi, la concentration brute en HAPs diminue au sein même de la matière sèche, notamment pour les plus petits HAPs. Toutefois, le gain du procédé aérobie s'atténue avec le poids moléculaire croissant des HAPs passant de 2,3 à 1,3 (effet négatif du nombre de cycles benzéniques sur l'action biologique d'élimination des HAPs sous conditions aérobies).

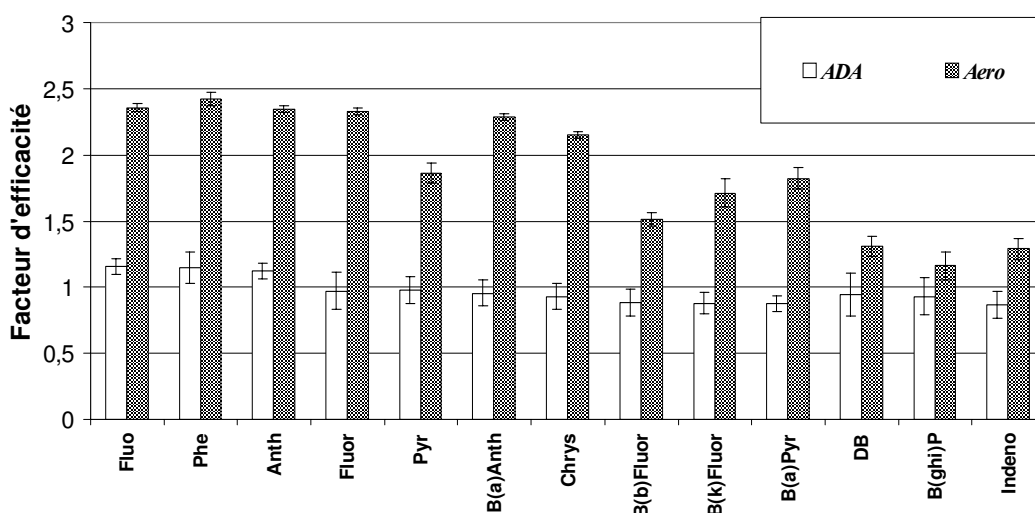


Figure F8 : Facteurs d'efficacité dans le cas de réacteurs anaérobie (ADA) et aérobie (Aero).

Tableau F3 : Concentrations moyennes en HAPs dans le substrat (boues fraîches) et pour les réacteurs aérobie en pseudo-équilibre témoin Taéro et biologique Aéro. (erreur maximale de 8%)

HAPs :		Fluo	Phé	Anth	Fluor	Pyr	B(a)A	Chrys	B(b)F	B(k)F	B(a)P	DB	B(ghi)P	Ind
Substrat	(mg.kg _{MS} ⁻¹)	0,5	3,29	0.71	8.79	6.54	3.7	4.43	3.45	2.34	4.06	0.59	2.76	2.95
	(µg.Γ ¹)	16.1	105	22.1	280	209	118	141	110	74.6	129	18.8	88.1	94
Réacteur Témoin Taéro	(mg.kg _{MS} ⁻¹)	0.29	2.81	0.53	9.31	7.12	3.96	4.77	4.2	2.82	4.14	0.65	3.31	3.52
	(µg.Γ ¹)	8.7	85.7	16.2	283	217	121	145	128	85.7	126	19.6	101	107
Réacteur Biologique Aéro	(mg.kg _{MS} ⁻¹)	0.09	0.45	0.13	1.64	3.26	0.8	1.3	2.4	1.34	2.24	0.48	2.5	2.52
	(µg.Γ ¹)	1.6	8.4	2.3	30.6	61.1	14.9	24.3	44.9	25	42	8.8	46.8	47.2

Les facteurs d'efficacité étant supérieurs à 1 pour l'ensemble des HAPs, les concentrations au sein de la matrice solide ont tendance à diminuer significativement au cours de la digestion aérobie des boues contaminées. Contrairement au procédé anaérobie où les concentrations brutes restent similaires à celles du substrat (voir **Figure F9**), les concentrations brutes en HAPs après traitement aérobie atteignent des valeurs proches ou inférieures aux seuils maximum en vigueur pour l'épandage des boues urbaines : le Fluoranthène passe ainsi de 9 à 1,6 mg.kg_{MS}⁻¹, le Benzo(b)Fluoranthène de 4 à 2,4 mg.kg_{MS}⁻¹ et le Benzo(a)Pyrène de 4,5 à 2,2 mg.kg_{MS}⁻¹, les normes étant, respectivement, de 5 mg.kg_{MS}⁻¹, 2,5 mg.kg_{MS}⁻¹ et 2 mg.kg_{MS}⁻¹ (voir **Tableau F3** et **Figure F9**).

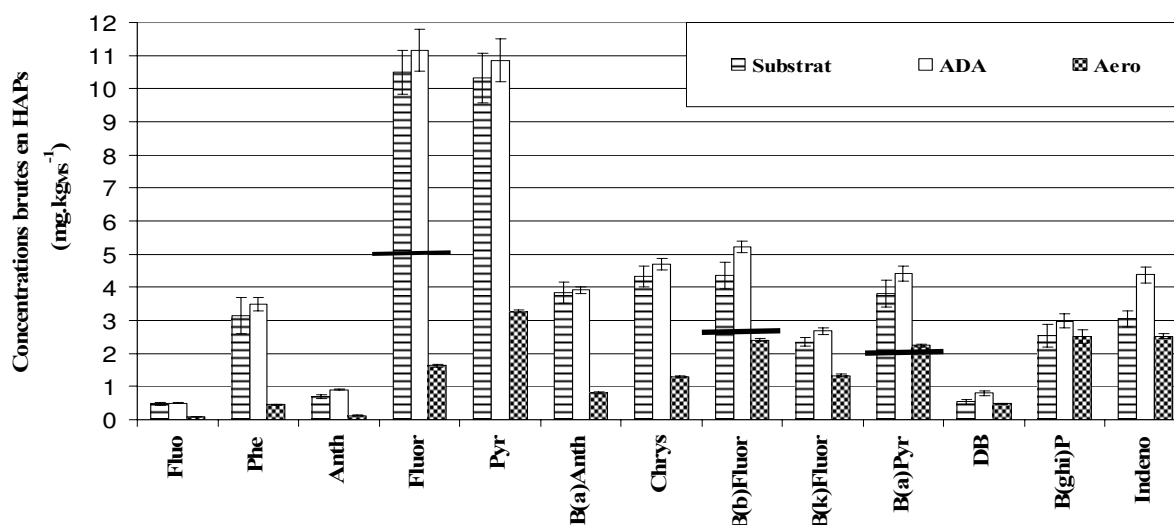


Figure F9 : Concentrations brutes en HAPs dans des boues contaminées (Substrat) et en sortie de réacteur de digestion anaérobie (ADA) et aérobie (Aéro).

En conclusion, le procédé mésophile aérobie de digestion de boues contaminées s'avère particulièrement performant pour l'élimination des HAPs, avec des pertes de l'ordre de plus de 90 % pour les plus petits HAPs et de 60 % pour les plus lourds. Ce procédé permet d'obtenir, après traitement des boues contaminées, des concentrations brutes proches des normes en vigueur concernant l'épandage des boues. Toutefois ces performances sont fortement dépendantes du nombre de cycles benzéniques, avec des pourcentages d'élimination plus faibles pour les plus gros HAPs (moins biodisponibles et plus difficilement biodégradables). Par comparaison, la digestion mésophile anaérobie de boues urbaines présente des performances plus faibles d'élimination, mais permet néanmoins de réduire significativement la quantité totale d'HAPs présents dans le système d'un facteur de l'ordre de 50 %. Dans ce cas, les concentrations brutes des HAPs dans la fraction solide, concernée par les normes d'épandage en vigueur, restent relativement constantes. Dans ce cas, leur élimination ne dépend ni de leur poids moléculaire, ni de leur concentration. Il est fort probable que leur disparition soit intimement liée à la réduction des matières sèches.

Dans les deux cas, les HAPs n'étant pas détectables dans la fraction liquide, les phénomènes mis en jeu pour leur diffusion de la matrice solide vers un compartiment plus biodisponible seraient donc plus complexes qu'une simple loi de diffusion ou loi de Fick) où les concentrations dans les différents compartiments régissent à elles seules la diffusion des HAPs. Les performances d'élimination étant indépendantes des concentrations dans le milieu, la réduction biologique des matières sèches et la diffusion des composés dans un compartiment plus biodisponible constituent les deux étapes clés du processus d'élimination des HAPs. Ainsi, afin d'optimiser ce procédé, il semble plus judicieux de faire varier les paramètres de diffusion et augmenter les performances d'élimination des MS que de jouer sur des aspects microbiologiques, notamment sous conditions anaérobies.

Enfin, à ce stade de l'étude, il est à souligner que la biodégradation de ces 13 HAPs reste encore à être démontrée, notamment en anaérobiose où l'élimination de ces composés est observée pour la première fois sous conditions méthanogènes. En effet, cette « disparition » pourrait également être le résultat d'une limitation analytique par incorporation de ces composés dans une fraction non extractible des boues ou d'une simple transformation non spécifique due à l'activité biologique (présence de radicaux libres).

F3. Mise en évidence du potentiel d'élimination de 7 PCBs au cours de procédés de stabilisation de boues urbaines

Suivant la même méthode de calcul que celle présentée dans le Chapitre E, les performances globales d'élimination des 7 PCBs d'intérêt lors de la digestion de boues naturellement contaminées ont été estimées afin de mettre en évidence le potentiel naturel d'élimination de ces composés par des écosystèmes acclimatés et dans des conditions dites « standard » de digestion : réacteurs mésophiles à 35°C sous un temps de séjour de 40 jours sous conditions anaérobies méthanogènes et de 20 jours sous conditions aérobies.

F3-1. Potentiel d'élimination des PCBs sous conditions anaérobies mésophiles méthanogènes

F3-1-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion

Afin de confirmer les conditions de méthanogénèse du réacteur ADAPCB, le flux de production et la composition du biogaz furent déterminées. Les rendements en biogaz furent d'environ $762 \pm 70 \text{ ml.gMSdégradée}^{-1}$ (ou $402 \pm 46 \text{ ml.gDCOdégradée}^{-1}$). Le taux de méthane du biogaz produit fut d'environ $68,3 \pm 0,5 \%$, le reste étant du dioxyde de carbone. Cette valeur, normalement comprise entre 70 et 75 %, reste caractéristique de bonnes conditions méthanogènes générales (Arundel, 2000). De même que pour les réacteurs anaérobies utilisés pour l'étude de l'élimination des HAPs, la présence d'ions sulfate n'a pu être détectée (concentrations inférieures à 5 mg.l^{-1}), indiquant une faible compétition entre les bactéries méthanogènes et sulfato-réductrices. Les Acides Gras Volatils, substrats inhibiteurs de la méthanogénèse, sont également en quantité négligeable dans le milieu ($< 0,05 \text{ g.l}^{-1}$), indiquant ainsi le bon aboutissement de la dégradation de la matière carbonée. Le réacteur ADAPCB a donc été essentiellement conduit sous des conditions de méthanogénèse. A noter que dans le cas du réacteur témoin TPCB, la production de biogaz fut négligeable, indiquant une bonne stérilisation du milieu.

Concernant la dégradation de la pollution carbonée, le réacteur ADAPCB a présenté des taux de réduction en matières sèches de $35,7 \pm 2,1 \%$ et en matières organiques de $48,8 \pm$

1,5 %, le rapport MO / MS passant de 60 % dans le substrat à 45,1 % dans le digestat (cf **Annexe 2** pour plus de détails).

F3-1-2. Performances d'élimination des PCBs sous conditions méthanogènes

De la même manière que pour les HAPs, les concentrations en PCBs mesurées dans la phase liquide sont négligeables, et le plus souvent, non détectables (largement inférieures à la limite de solubilisation des PCBs de $54 \mu\text{g.l}^{-1}$). Les calculs de performances d'élimination de ces composés seront donc effectués sur la fraction en PCBs piégés dans les solides, et en utilisant la méthode de calcul précédemment décrite (cf **Chapitre E**).

Dans un premier temps, comme dans le cas des HAPs et afin de conclure ultérieurement à une dégradation biologique de ces composés, les pertes abiotiques dues à la simple mise en œuvre du procédé ont été estimées. Les PCBs possédant des propriétés physico-chimiques proches des HAPs, ces pertes sont principalement dues à la volatilisation, à la photolyse ou à une combinaison chimique non spécifique avec la matière organique. Un réacteur témoin (réacteur TPCB) stérilisé chimiquement a donc été mis en œuvre. Les résultats sont présentés sur la **Figure F10** ci-dessous.

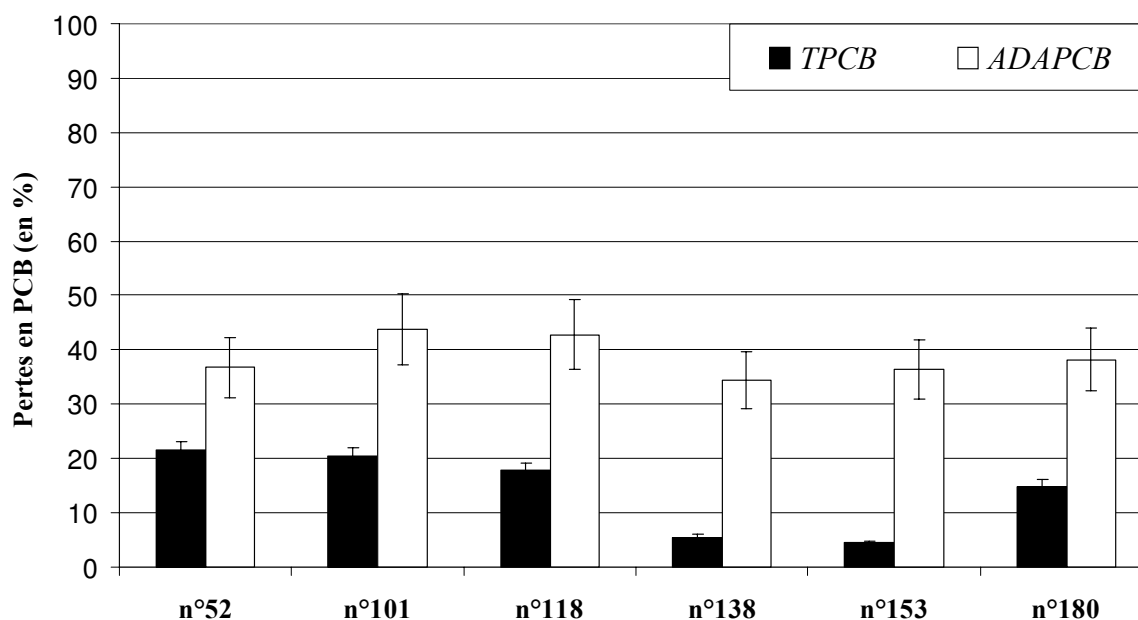


Figure F10 : Pertes abiotiques en PCB (réacteur témoin TPCB) et biologique (réacteur ADAPCB) sous conditions anaérobies strictes en fonction du poids moléculaire croissant.

Comme dans le cas des HAPs, les pertes abiotiques dues au procédé semblent plus liées au poids moléculaire des PCBs qu'à leur concentration, celle-ci variant d'un facteur de plus de 20 entre PCB (voir **Tableau F4**). En effet, ces pertes sont de l'ordre de 20 % pour les plus petits PCBs (n°52, n°101, n°118) et d'environ 5 à 15 % pour les plus gros (n°138, n°153, n°180). Contrairement aux HAPs, les pertes abiotiques concernent l'ensemble des PCBs. Ces derniers étant des composés semi-volatiles et, possédant de faibles températures d'ébullition et de point de fusion, ils sont plus sensibles aux phénomènes de volatilisation.

A noter que le PCB n°28, composé faisant partie des 7 PCBs concernés par la norme avant épandage, n'a pu être détecté, ni dans le substrat, ni dans les réacteurs (intermédiaires de réaction) indiquant que les boues ne sont pas contaminées *in situ* par ce PCB ou qu'il est perdu lors de l'étape de séchage des échantillons de boues.

Tableau F4 : Concentrations moyennes en PCBs dans le substrat (boues fraîches) et pour les réacteurs en pseudo-équilibre témoin TPCB et biologique ADAPCB. (erreur maximale de 10 %). *nd* : non détecté ($< 0.010 \text{ mg.kg}_{MS}^{-1}$). NB : La norme d'épandage se situe, pour la somme, à $0,8 \text{ mg.kg}_{MS}^{-1}$.

PCBs :		N°28	N°52	N°101	N°118	N°138	N°153	N°180	SOMME
Substrat	(mg.kg_{MS}^{-1})	<i>nd</i>	0,024	0,217	0,184	0,429	0,477	0,308	1,639
	($\mu\text{g.l}^{-1}$)	<i>nd</i>	1	8,98	7,58	17,71	19,70	12,72	-
Réacteur Témoin TPCB	(mg.kg_{MS}^{-1})	<i>nd</i>	0,019	0,180	0,157	0,415	0,463	0,269	1,503
	($\mu\text{g.l}^{-1}$)	<i>nd</i>	0,63	5,04	4,34	11,62	12,55	7,86	-
Réacteur Biologique ADAPCB	(mg.kg_{MS}^{-1})	<i>nd</i>	0,024	0,190	0,164	0,438	0,473	0,296	1,585
	($\mu\text{g.l}^{-1}$)	<i>nd</i>	0,79	7,15	6,23	16,73	18,81	10,82	-

Les pertes abiotiques estimées, les performances d'élimination des 6 PCBs sous conditions méthanogènes (réacteur ADAPCB) sont de l'ordre de 40 % pour l'ensemble des composés (voir **Figure F10**). La dégradation des PCBs ayant déjà été largement étudiée sous conditions anaérobies, le potentiel mis en évidence de dégradation de l'écosystème méthanogène reste en accord avec les données rapportées dans la littérature pour d'autres systèmes de dégradation comme les sédiments ou les sols (Abramowicz, 1990 ; Anid et al., 1991 ; Chang et al., 1999). Après suppression des pertes liées aux phénomènes abiotiques, la part des pertes liées à l'activité biologique est d'autant plus importante que le poids moléculaire du PCB est grand, à l'exception du PCB n°180 (voir **Figure 11**). Ce résultat montre que les PCBs les plus chlorés (de plus gros poids moléculaire) serait plus facilement dégradés sous

conditions anaérobies méthanogènes, résultat en accord avec de nombreuses données de la littérature [Abramowicz, 1990 ; Hartkamp-commandeur, 1996 ; Wu et al., 1996]. Toutefois, à partir des performances globales mesurées sur le réacteur biologique ADAPCB, le facteur limitant serait vraisemblablement plus lié au taux de réduction des matières sèches, comme dans le cas des HAPs. En effet, un test statistique ANOVA de comparaison de moyennes montre qu'aucune différence significative ne peut être mise en évidence entre les différents PCBs, avec un pourcentage d'élimination moyen de $38,7 \pm 10$ % (F de 2,81 < F_{critique} de 3,1 à 5%). Or, le taux de réduction des solides au cours du traitement biologique est de $35,7 \pm 2,1$ %. La comparaison de ces deux moyennes ne montre aucune différence significative (t -test = 1,32 < $t_{\text{critique}} = 2,92$ à 5%). Il paraît donc fort probable que, comme dans le cas des HAPs, la cinétique de disparition des PCBs soit intimement liée à la réduction des matières sèches, ceux-ci étant alors plus facilement disponibles aux micro-organismes pour leur élimination. Toutefois, comme dans le cas des HAPs, il ne peut être définitivement conclu en une réelle biodégradation des PCBs au regard de ces seuls résultats. En effet, la disparition des PCBs pourrait également être le résultat de plusieurs phénomènes indépendants d'une biodégradation spécifique de ces composés, comme leur simple transformation suite à l'activité biologique générale régnant dans le réacteur (formation de radicaux libres) ou suite à une incorporation au sein de la fraction non extractible.

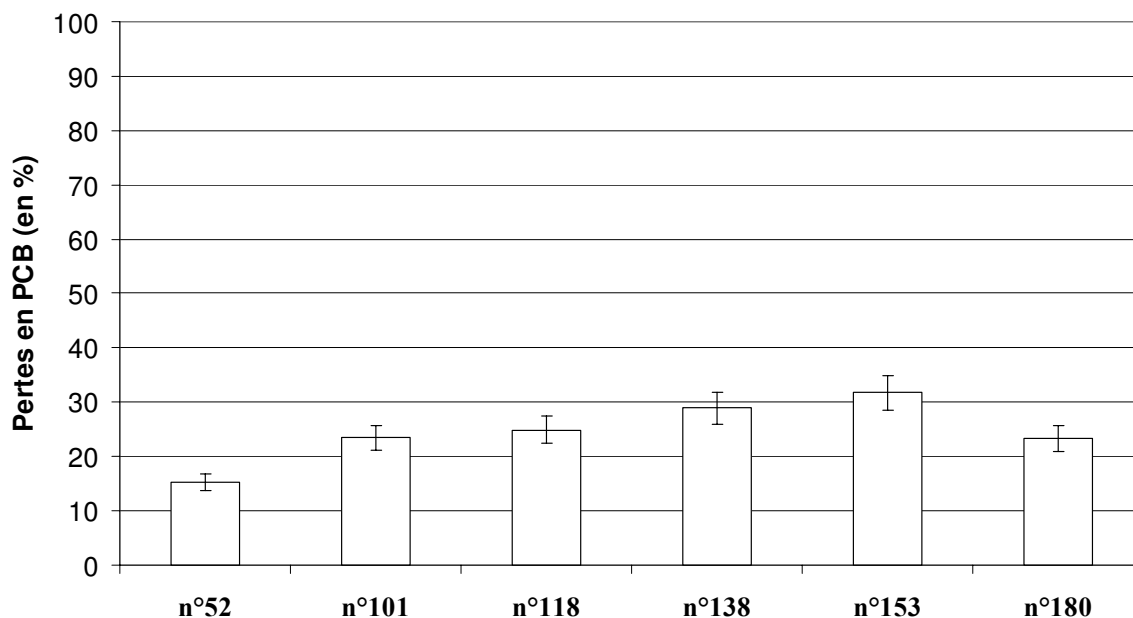


Figure F11: Pertes calculées potentielles en PCBs dues à l'action biologique sous conditions anaérobies strictes en fonction du poids moléculaire croissant (réacteur ADAPCB).

De même que dans le cas des HAPs et afin de s'affranchir du taux de réduction en matières sèches du procédé, il peut être intéressant de rapporter le pourcentage d'élimination de chaque PCBs sur le pourcentage de réduction des solides : le facteur calculé est alors appelé facteur d'efficacité du procédé de traitement (voir **Figure F12**). En effet, les normes concernent les concentrations brutes en PCBs, avec une somme des 7 PCBs d'intérêt qui doit être inférieure à $0,8 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ pour l'élimination des boues par épandage agricole. Il est donc intéressant de déterminer si le procédé tend à diminuer les concentrations brutes en PCB (facteur d'efficacité > 1) ou à les augmenter (facteur < 1). Dans le cas du réacteur ADAPCB, le facteur d'efficacité reste proche de 1 pour l'ensemble des PCBs, le taux de réduction des solides et les performances d'élimination des PCBs étant statistiquement similaires (F de 2,81 $< F_{\text{critique}}$ de 3,1 à 5%). Le facteur d'efficacité moyen est de $1,08 \pm 0,2$. La valeur moyenne de ce facteur indique donc que les concentrations brutes (en $\text{mg}_{\text{PCB.kg}_{\text{MS}}^{-1}}$) restent relativement constantes entre l'entrée et la sortie du réacteur biologique (voir **Tableau F4**), le procédé anaérobie mis en oeuvre permettant toutefois d'éliminer près de 40 % de la pollution en PCBs contenus dans les boues contaminées.

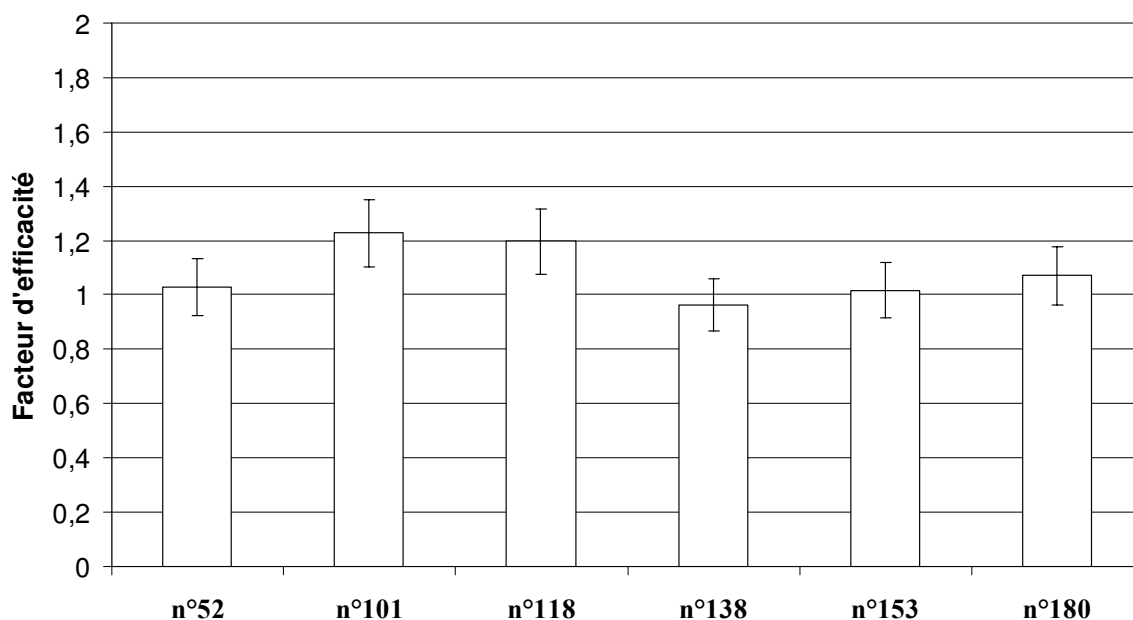


Figure F12: Facteur d'efficacité d'élimination des PCBs en fonction du poids moléculaire du PCB (réacteur ADAPCB). (rapport entre les performances d'élimination et le taux de réduction des solides d'environ 35,7 +/- 2,1 %).

F3-2. Potentiel d'élimination des PCBs sous conditions aérobies mésophiles

Suivant le même protocole expérimental que lors de l'étude du potentiel d'élimination des HAPs en aérobie, des réacteurs mésophiles aérobies ont été mis en oeuvre afin de déterminer le potentiel naturel d'élimination des PCBs sous conditions aérobies. Moins connue que sous conditions anaérobies, la biodégradation des PCBs sous conditions aérobies est toutefois décrite comme étant particulièrement performante pour les PCBs les plus légers (Abramowicz, 1990 ; Mohn et Tiedje, 1992) .

F3-2-1. Caractérisation des conditions aérobies de digestion

Par mesure périodique du taux d'oxygène au sein même des réacteurs aérobies témoin ou biologiques, respectivement dénommés TaéroPCB et AéroPCB, les conditions saturantes en oxygène dans le milieu (environ 7,5 mg.l⁻¹) ont été continuellement vérifiées. Les conditions d'aération ne furent donc pas limitantes dans le cas de ces réacteurs d'étude.

Les performances de dégradation globales furent plus faibles que dans le cas des réacteurs anaérobies avec, sous aérobie, une réduction en MS d'environ 28,2 ± 3,1 % et en MO de 23,7 ± 3,7 %. Les différences mesurées entre les procédés anaérobies et aérobies sont dues à l'influence du rendement en biomasse, plus élevé sous conditions aérobies (0,4 - 0,6 g.g_{DCO} dégradée⁻¹ contre 0,02 - 0,15 g.g_{DCO} deg⁻¹ en anaérobie).

F3-2-2. Performances d'élimination des PCBs sous conditions aérobies

Dans un premier temps, les pertes abiotiques sous conditions aérobies mésophiles ont été estimées et comparées à celles mesurées au cours du procédé anaérobie (voir **Figure F13**). Il s'avère que, contrairement aux HAPs, les pertes sous conditions aérobies sont du même ordre de grandeur que sous conditions méthanogènes pour les PCBs n°52, 128 et 153, voire même plus faibles pour les PCBs n°101, 118 et 180. Ce résultat, étonnant au regard des conditions opératoires appliquées sous conditions aérobies, peut être expliqué par la libération non quantifiée de PCBs de la fraction non extractible des boues contaminées, comme il l'a été précédemment observé dans le cas des HAPs. Les pertes mesurées correspondent alors à une résultante entre le flux de pertes abiotiques (volatilisation et photolyse) et la libération des PCBs de la fraction non extractible vers une zone extractible. Globalement, les pertes

abiotiques en PCBs sont limitées à environ 20 % au cours de ce procédé pour les plus petits PCBs.

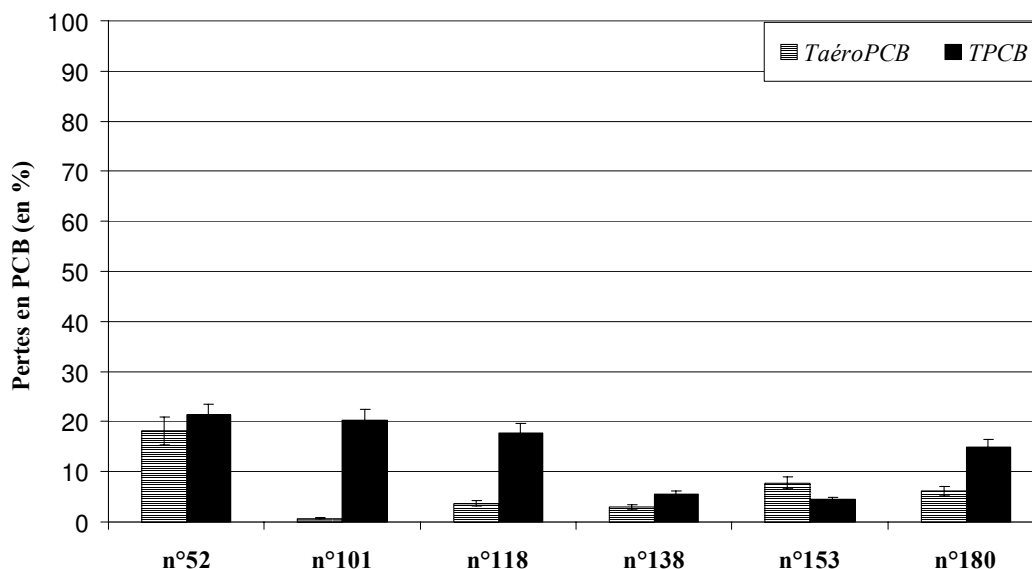


Figure F13: Pertes abiotiques en PCBs des réacteurs témoins fonctionnant sous conditions anaérobies (TPCB) et aérobie (TaéroPCB) en fonction du poids moléculaire croissant des PCBs.

Concernant les réacteurs biologiques, la comparaison du réacteur aérobie (AeroPCB) et anaérobie (ADAPCB) montre une différence significative entre les deux procédés uniquement pour les plus petits PCBs, c'est à dire le n°52 et le n°108 (voir **Figure F14**). Un test de comparaison de moyennes permet en effet de montrer que, pour ces deux composés, l'influence du procédé aérobie est significative, avec des valeurs respectives de la variable t (t-test) de 12,4 et 2,4 (t_{critique} de 2,35 et 2,15 à 5 %). Pour le PCB n°52, le plus léger, les conditions d'aérobiose permettent d'obtenir des concentrations en sortie de traitement inférieures au seuil de détection ($<0,01 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$). L'amélioration des performances d'élimination des PCBs les moins chlorés (n°52 et n°108) est en accord avec les données de la littérature portant sur la dégradation de ces PCBs sous conditions aérobie (Abramowicz, 1990 ; Mohn et Tiedge, 1992). Pour les autres PCBs, un test statistique de comparaison multiple de moyennes (ANOVA) montre qu'il n'existe aucune différence significative entre le procédé de digestion aérobie et anaérobie (valeur F de 1,93 $< F_{\text{critique}}$ de 2,65 à 5 %).

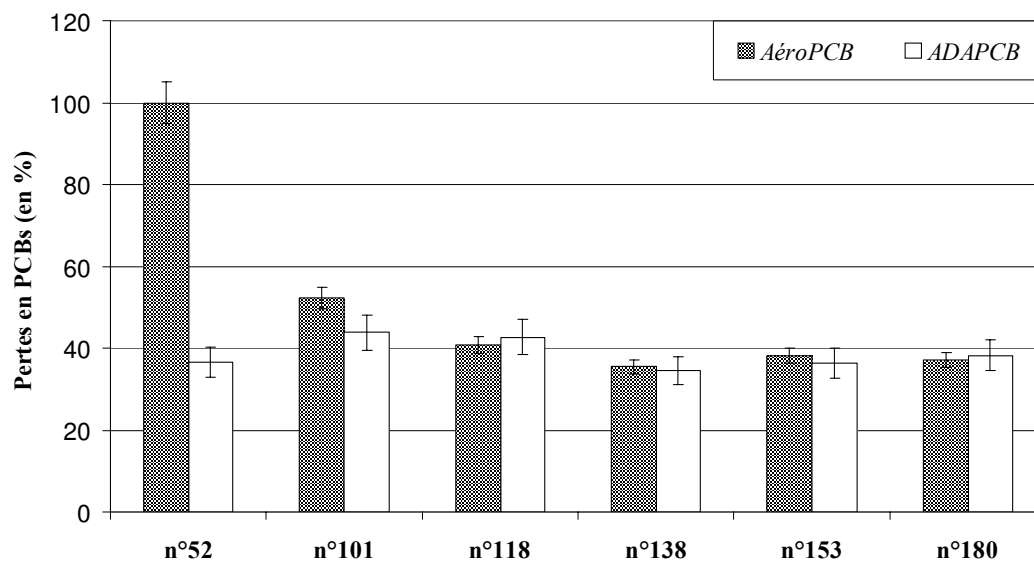


Figure F14: Pertes totales en PCBs (abiotiques et biologiques) sous conditions anaérobies (ADAPCB) et aérobie (AéroPCB) en fonction du poids moléculaire croissant.

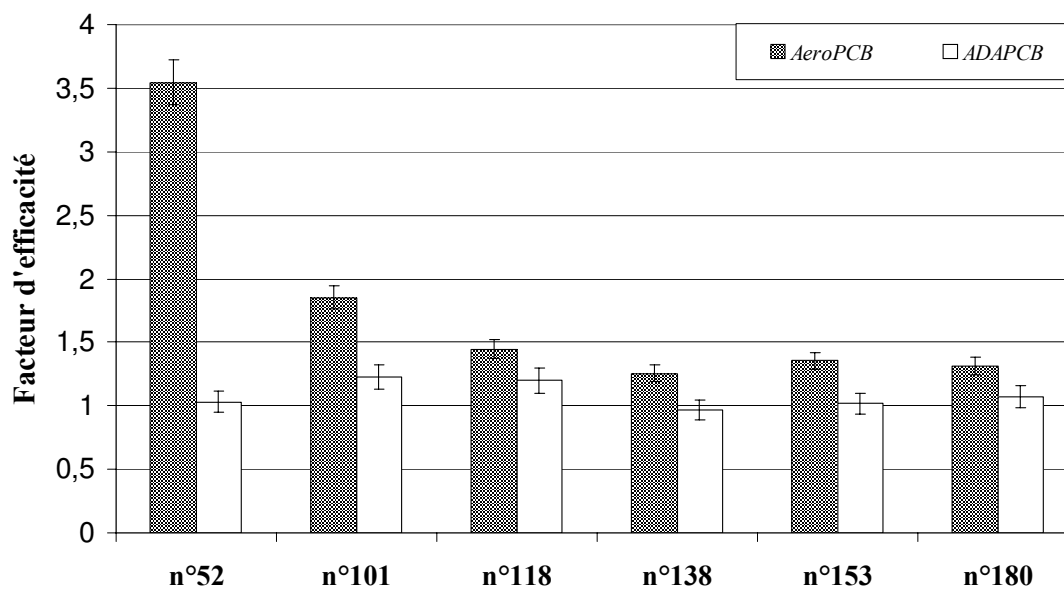


Figure F15 : Facteurs d'efficacité d'élimination des PCBs dans le cas de réacteurs anaérobie (ADAPCB) et aérobie (AéroPCB).

Toutefois, les taux de réduction des solides étant sensiblement différents sous anaérobiose et aérobie avec, respectivement, $35,7 \pm 2,1 \%$ et $28,2 \pm 3,1 \%$, le calcul du facteur d'efficacité d'élimination de ces composés permet de comparer ces deux procédés, indépendamment du paramètre de réduction des matières sèches (voir **Figure F15**). Il apparaît alors que, pour l'ensemble des PCBs, l'efficacité d'élimination est favorisée sous conditions aérobies avec un facteur plus élevé pour chaque PCB. Un test statistique de comparaison de moyennes deux à deux (pour chaque PCB) entre les facteurs aérobies et anaérobies montre une amélioration statistiquement significative du procédé aérobie de digestion (valeurs respectives de t pour les PCBs n°52 (14,4) ; n°101 (5,62) ; n°118 (2,6) ; n°138 (3,64) ; n°153 (3,92) et n°180 (2,81) $< t_{\text{critique}}$ de 2,13 à 5%). Les transferts de matières sont donc, comme dans le cas des HAPs, favorisés sous conditions aérobies. Cela permet d'obtenir des concentrations brutes en PCBs qui diminue au cours du procédé de digestion aérobie (voir **Tableau F5**).

Tableau F5 : Concentrations moyennes en PCBs dans le substrat (boues fraîches) et pour les réacteurs aérobies en pseudo-équilibre témoin TaéroPCB et biologique AéroPCB. (erreur maximale de 8%) (« nd » : non détecté).

PCBs :		N°28	N°52	N°101	N°118	N°138	N°153	N°180	SOMME
Substrat	(mg.kg _{MS} ⁻¹)	nd	0,024	0,217	0,184	0,429	0,477	0,308	1,720
	(µg.l ⁻¹)	nd	1,00	8,98	7,58	17,71	19,70	12,72	-
Réacteur Témoin TaéroPCB	(mg.kg _{MS} ⁻¹)	nd	0,021	0,232	0,187	0,441	0,467	0,306	1,656
	(µg.l ⁻¹)	nd	0,82	9,04	7,30	17,19	18,18	11,93	-
Réacteur Biologique AéroPCB	(mg.kg _{MS} ⁻¹)	nd	nd	0,145	0,151	0,386	0,411	0,270	1,363
	(µg.l ⁻¹)	nd	nd	4,29	4,49	11,43	12,18	8,00	-

Or, la norme concernant l'épandage de boues contaminées concerne exclusivement la concentration brute en PCBs, avec une valeur ne devant pas dépasser $0,8 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ afin de pouvoir épandre les boues. Or, lors du procédé de digestion aérobie, la concentration brute en PCBs diminue significativement en passant d'une valeur de $1,720 \pm 0,05 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ à une valeur significativement plus faible après traitement anaérobie de $1,538 \pm 0,061 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ et après traitement aérobie de $1,363 \pm 0,063 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$, mais encore supérieure à la valeur seuil actuelle (voir **Figure F16**).

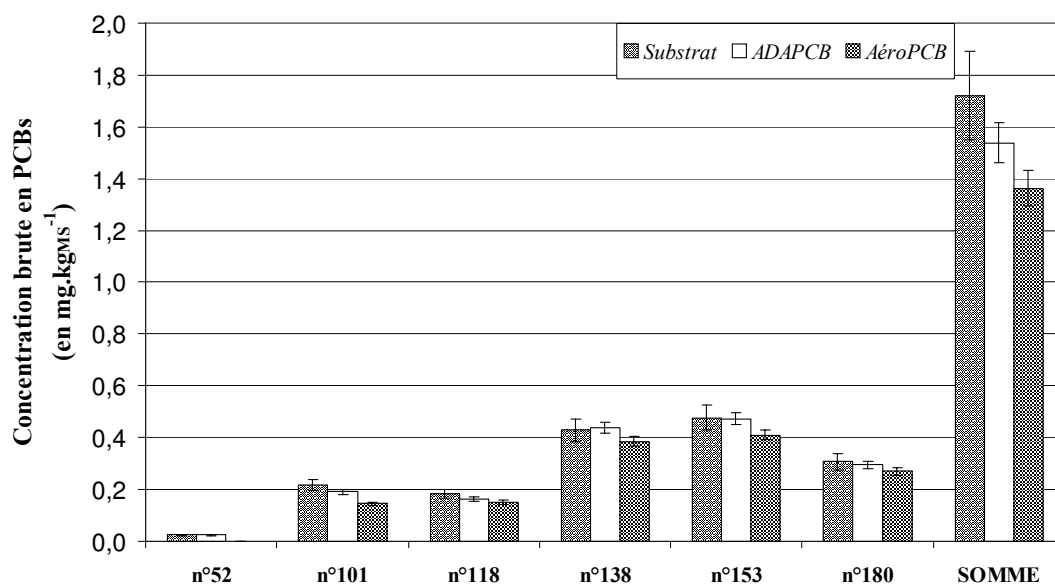


Figure F16 : Concentrations brutes en PCBs dans des boues contaminées avant traitement (Substrat) et en sortie de réacteur de digestion anaérobie (ADAPCB) et aérobie (AéroPCB).

En conclusion, le cas de l'élimination des PCBs au cours de la digestion de boues naturellement contaminées reste très proche du cas précédent portant sur les HAPs, leurs caractéristiques physico-chimiques étant très proches. En effet, comme dans le cas des HAPs, les performances d'élimination des PCBs semblent étroitement liées aux taux de réduction des matières sèches au cours de la digestion, et plus particulièrement sous anaérobiose (facteur d'efficacité proche de 1), indépendamment des concentrations et du poids moléculaire du composé. Le procédé de digestion aérobie est quant à lui plus performant au niveau transfert de ces micropolluants de la matrice solide vers une zone plus bioaccessible, mais reste relativement limité vis à vis de l'élimination des PCBs les plus chlorés. Enfin, comme dans le cas des HAPs, les PCBs ne sont trouvés, en quantités détectables, que dans la matrice solide, indiquant que leur diffusion est plus complexe qu'une simple loi de diffusion ou loi de Fick où seules les concentrations dans les différents compartiments régissent la réaction. Ainsi, comme pour les HAPs, l'optimisation du procédé de traitement des PCBs, surtout pour les plus chlorés, passe obligatoirement par l'amélioration des paramètres de diffusion de ces composés de la matrice solide vers une zone plus bioaccessible.

Chapitre G

Optimisation du potentiel anaérobie et aérobie d'élimination des HAPs

Dans le chapitre précédent, la mise en évidence du potentiel naturel d'élimination des HAPs et PCBs au cours de la digestion anaérobie et aérobie de boues urbaines contaminées a montré que les performances d'élimination de ces composés étaient certainement limitées par leur biodisponibilité, notamment sous conditions anaérobies. L'optimisation de ces procédés d'élimination passe donc par l'amélioration des phénomènes de transfert au sein de la matrice solide afin de rendre plus facilement accessible les HAPs et PCBs aux micro-organismes dégradants. Par ailleurs, notons que les HAPs et les PCBs présentent des propriétés similaires d'hydrophobicité et d'adsorption aux matières organiques et qu'il a été choisi d'utiliser les HAPs comme base d'études.

Ainsi, dans ce chapitre, l'influence des conditions opératoires de digestion sera étudiée avec (i) l'effet d'une étape de prétraitement du substrat en vue d'augmenter le taux de réduction des MS sous conditions anaérobies, et (ii) l'effet d'une température de digestion soit mésophile (35°C), soit intermédiaire (45°C), soit thermophile (55°C).

Dans un deuxième temps, il sera étudié l'influence de l'ajout d'activateurs de diffusion. Pour cela, des surfactants non ioniques comme le Brij35, le Tergitol NP10 et le Tyloxapol, seront ajoutés au système dans le but de favoriser la diffusion des HAPs et d'augmenter leur bioaccessibilité. Poursuivant le même objectif, il sera étudié l'effet de l'ajout d'un agent de solubilisation : le méthanol.

A noter que l'ensemble des performances des réacteurs étudiés dans ce chapitre sont présentées en Annexe 2.

G1. Influence des conditions opératoires de digestion

Afin d'optimiser les procédés anaérobies et aérobies d'élimination des HAPs, plusieurs variables opératoires pouvant améliorer les phénomènes de transfert ont été expérimentées : - l'influence d'une étape de broyage du substrat avant traitement biologique afin d'augmenter la surface d'échange des particules de boues et donc le flux de diffusion des HAPs, - l'influence de la température de digestion fut étudiée dans le cas de conditions de digestion mésophile (35°C), intermédiaire (45°C) et thermophile (55°C).

Toutefois, avant tout essai portant sur ces conditions opératoires de digestion, l'influence du temps de séjour hydraulique sous conditions anaérobies fut étudiée dans un souci de gain de temps d'expérimentation. En effet, l'abaissement du temps de séjour de 40 jours à 10 jours permettrait de réduire significativement le temps total d'expérimentation de 160 jours à 80 jours par réacteur (état d'équilibre atteint après 3 à 4 temps de séjour). A noter que cet essai fut uniquement réalisé sous conditions anaérobies méthanogènes, les réacteurs aérobies possédant déjà un temps de séjour de 10 jours. En effet, dans le cadre de la mise en évidence du potentiel naturel d'élimination des HAPs et PCBs (*cf Chapitre F*), il avait été choisi des temps de séjour maximum qui puissent être appliqués aux digesteurs industriels de boues urbaines, soit 40 jours en anaérobiose et 10 jours en aérobiose.

G1-1. Essai préliminaire - influence du temps de séjour hydraulique sous conditions anaérobies méthanogènes

Au cours de cet essai et à l'exception du temps de séjour hydraulique qui fut abaissé de 40 jours à 10 jours, le réacteur ADA10 mis en œuvre a été conduit sous les mêmes conditions que le réacteur ADA dont les performances d'élimination ont été présentées dans le chapitre précédent (*cf Chapitre F*).

G1-1-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion

Les conditions de méthanogénèse du réacteur ADA10 ont été confirmées par mesure du flux de production en biogaz et par sa composition : similaires à ceux mesurés dans le cas du réacteur ADA ($430 \pm 43 \text{ ml.g}_{\text{MSdégradée}}^{-1}$ et $307 \pm 17 \text{ ml.g}_{\text{DCOdegradée}}^{-1}$), les rendements en biogaz pour le réacteur ADA10 ont été estimés à $457 \pm 18 \text{ ml.g}_{\text{MSdégradée}}^{-1}$ et $363 \pm 43 \text{ ml.g}_{\text{DCOdegradée}}^{-1}$. Le taux en méthane du biogaz produit fut d'environ $73, \pm 0,5 \%$ ($74,8 \pm 0,1$

% pour ADA) et reste caractéristique de bonnes conditions méthanogènes générales. De plus, la quantité d'AGVs est négligeable dans le réacteur ($<0,05 \text{ g.l}^{-1}$), indiquant le bon aboutissement de la dégradation de la matière carbonée sous conditions de méthanogénèse.

Concernant la dégradation de la pollution carbonée, le réacteur ADA \square 0 présente des taux de réduction en matières sèches de $56,1 \pm \square,1 \%$ et en matières organiques de $65,1 \pm 5 \%$, le rapport MO / MS passant de 63 % dans le substrat à 44,3 % dans le digestat. Le taux de réduction de la DCO est de $55,8 \pm 6 \%$. Ces valeurs sont similaires à celles mesurées dans le cas du réacteur ADA : réduction des MS de $49,6 \pm 4, \square \%$, des MO de $65,5 \pm 7,4 \%$, et de la DCO de $51 \pm 8 \%$.

Ainsi, les deux réacteurs ADA et ADA \square 0 présentent des caractéristiques de traitement globalement similaires et l'abaissement du temps de séjour hydraulique de 40 jours à \square 0 jours ne possède pas une influence significative sur les performances globales de la digestion anaérobie.

G1-1-2. Comparaison des performances d'élimination des HAPs.

En utilisant la méthode de calcul précédemment présentée dans le *Chapitre F*, les performances d'élimination des HAPs des réacteurs ADA et ADA \square 0 ont été estimées puis comparées (voir **Figure G1**). Pour chaque HAP, un test de comparaison des performances moyennes entre les deux réacteurs fut pratiqué (test t de Student). Ce test statistique montre qu'il n'existe aucune différence significative entre les deux essais (valeurs de la variable t de, dans l'ordre des HAPs présentés sur la **Figure G1** : 1,35 ; 0,1 ; 0,34 ; 0,47 ; 1,35 ; 1,61 ; 0,98 ; 1, \square 7 ; 1, \square 6 ; 1,97 ; 1,57 ; 1 ; 1,97 $< t_{\text{critique}}$ de $\square,35$). Ainsi, comme pour les paramètres généraux de digestion, l'abaissement du temps de séjour de 40 jours à \square 0 jours ne présente pas d'influence significative sur les performances d'élimination des HAPs. Un temps de séjour de \square 0 jours paraît donc suffisant pour achever l'élimination des HAPs, le temps de réaction ne constituant donc pas le facteur limitant entre \square 0 jours et 40 jours.

De plus, pour les deux réacteurs, les performances d'élimination sont similaires pour l'ensemble des HAPs et sont indépendantes de leur poids moléculaire et de leur concentration. En effet, un test ANOVA de comparaison multiple de moyennes montre qu'il n'existe aucune différence significative entre les performances d'élimination des HAPs dans le réacteur ADA \square 0 (facteur F de $1,77 < F_{\text{critique}}$ de $\square,15$), la valeur moyenne d'élimination étant de $51,7 \pm 7,0 \%$.

Or, le taux de réduction en MS du réacteur est de $56,1 \pm 1$ %, soit proche des performances d'élimination des HAPs. Ainsi, comme dans le cas du réacteur ADA, il semblerait que les pertes en HAPs soient fortement liées au taux de réduction des MS. Afin de conforter cette observation, un facteur d'efficacité a été calculé (rapport des pertes en HAPs sur le taux de réduction des MS) (voir **Figure G2**).

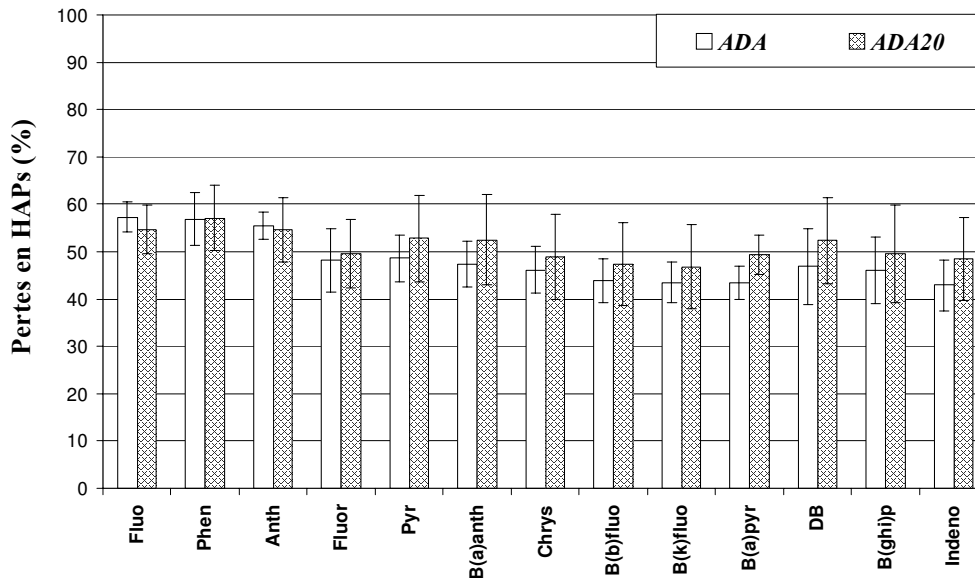


Figure G1 : Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies méthanogènes fonctionnant avec un temps de séjour de 40 jours (ADA) et de 10 jours (ADA10).

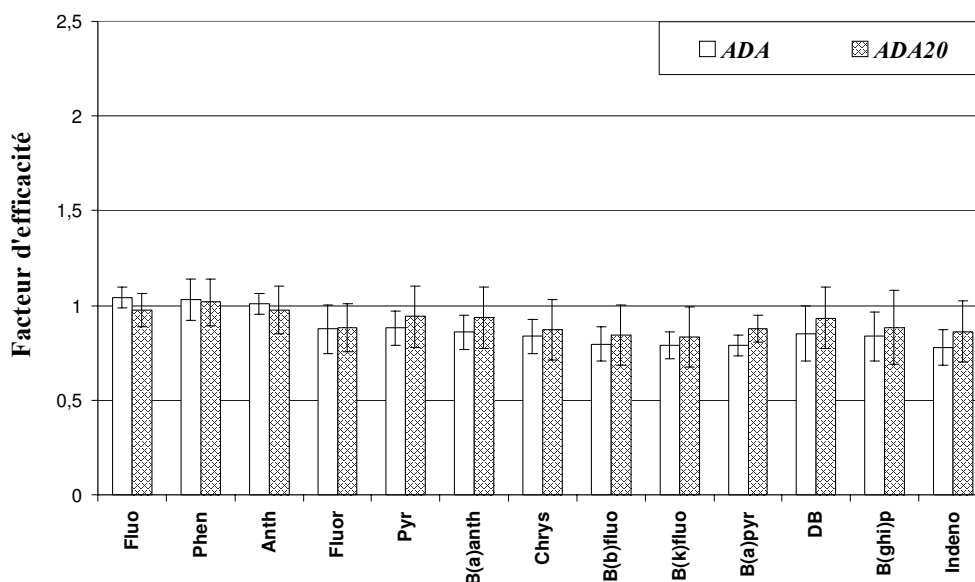


Figure G2: Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies méthanogènes fonctionnant avec un temps de séjour de 40 jours (ADA) et de 10 jours (ADA10).

Un test statistique montre que le facteur d'efficacité est identique pour l'ensemble des HAPs avec une moyenne de $0,91 \pm 0,06$ (facteur F de $0,14 < F_{\text{critique}}$ de $0,15$) (voir **Figure G2**). Cette moyenne, proche de 1, montre que les pertes en HAPs et le taux de réduction des MS sont étroitement corrélés, comme dans le cas du réacteur ADA servant de base de comparaison. Le processus d'élimination des HAPs semblerait donc limité par le taux de réduction des MS et donc par la biodisponibilité des HAPs vis à vis des micro-organismes dégradants. Il reste donc nécessaire soit d'optimiser le transfert de ces composés de la matrice solide vers des compartiments plus biodisponibles, soit d'augmenter les performances de réduction des MS.

En conclusion, malgré l'abaissement du temps de séjour de 40 jours à 10 jours, les performances d'élimination de tous les HAPs restent statistiquement similaires et probablement plus limitées par des aspects de transfert de matière et de réduction des MS, que par le temps de réaction. Il peut donc être envisagé de réduire le temps total d'expérimentation à 80 jours (4 temps de séjour) pour les essais suivants.

G1-2. Influence du prétraitement des boues avant digestion anaérobie

Muller et Pelletier (1998) ont récemment montré que le broyage mécanique des boues favorisait la réduction des MS au cours de procédés de digestion anaérobie à l'échelle industrielle, en passant de 50 % de réduction des solides à 60 % (pour une puissance dissipée de $0,7.10^6 \text{ W.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$). Ainsi, afin d'obtenir un plus fort abattement en MS dans notre système ce qui pourrait améliorer les performances d'élimination des HAPs, il a été mis en œuvre un réacteur de digestion anaérobie, dénommé BADA, dont le substrat fut préalablement broyé mécaniquement (broyeur à cellules $\text{MA}^{\text{®}}$ T5Basic, avec une puissance dissipée de $0,6.10^6 \text{ W.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$).

G1-2-1. Influence du broyage du substrat

◆ Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion anaérobie du réacteur BADA

De même que pour les réacteurs précédents, les conditions de méthanogénèse du réacteur BADA ont été confirmées par mesure du flux de production en biogaz et par sa composition. Le rendement en biogaz fut d'environ $599 \pm 60 \text{ ml.gMSdégradée}^{-1}$ (ou $58 \pm 31 \text{ ml.gDCOdégradée}^{-1}$) avec un taux de méthane dans le biogaz produit de $67,7 \pm 1,5 \%$, valeur

indicatrice de bonnes conditions méthanogènes. De plus, les AGV n'ont été trouvés qu'en quantité négligeable dans le milieu ($< 0,05 \text{ g.l}^{-1}$), indiquant ainsi le bon aboutissement de la dégradation de la matière carbonée.

Concernant les performances de dégradation, le réacteur BADA a présenté des taux de réduction en matières sèches de $3,6 \pm 5,3 \%$ et en matières organiques de $44,7 \pm 5 \%$, le rapport MO / MS passant de 63 % dans le substrat à 49,1 % dans le digestat. Le réacteur BADA a également présenté des taux de réduction de la DCO de près de $5,5 \pm 6 \%$. Contrairement à ce qui était attendu, les taux de réduction des MS et des MO sont plus faibles que ceux du réacteur mésophile anaérobie ADA0 (réduction des MS de $56,1 \pm 1 \%$ et des MO de $65,1 \pm 5 \%$). Le prétraitement des boues par broyage a donc été la cause de perturbations significatives de l'écosystème en réduisant ses performances de dégradation. Ceci pourrait s'expliquer notamment par l'action lytique du prétraitement créant un déficit en entrée en bactéries dégradantes et donc une réduction de l'activité biologique totale (réduction des bactéries viables sur milieu LB d'un facteur 10^3 environ (4 h, 35°C)).

◆ Influence du broyage du substrat sur les performances d'élimination des HAPs.

Les résultats obtenus après broyage du substrat et alimentation du réacteur BADA durant 4 temps de séjour sont présentés sur la **Figure G3**. Les réacteurs ADA0 et BADA possédant les mêmes conditions opératoires, les performances d'élimination de ces deux réacteurs ont été comparées. Il apparaît alors que l'opération de broyage des boues d'alimentation conduit à la réduction totale du processus biologique d'élimination de l'ensemble des HAPs. En effet, les résultats obtenus sont du même ordre de grandeur qu'un réacteur stérile témoin (entre 0 % et 15 %).

Dans un premier temps, il est intéressant de noter que l'hypothèse formulée au cours du *Chapitre F* d'une biodégradation réelle des HAPs sous conditions anaérobies peut être confortée. En effet, si la disparition des HAPs était la conséquence unique d'un phénomène physico-chimique d'adsorption dans une fraction non extractible ou de transformation non spécifique due à l'activité biologique globale, les performances d'élimination de l'ensemble des HAPs auraient dues être de l'ordre du taux de réduction des MS, c'est à dire d'environ 37 %. Or, comme le taux d'élimination des HAPs est proche de 0 %, l'hypothèse d'une dégradation biologique spécifique des HAPs sous conditions anaérobies peut donc être confirmée.

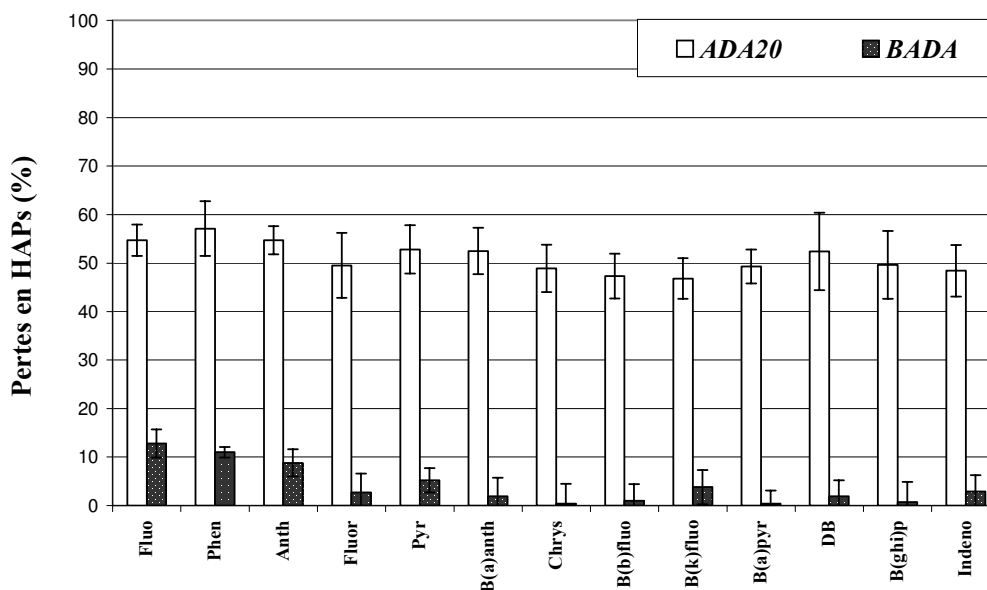


Figure G3: Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies avec un substrat en boues contaminées non broyées (ADA) ou broyées mécaniquement (BADA).

Le prétraitement du substrat par broyage mécanique avait été mis en œuvre dans le but de favoriser la libération et donc l'élimination des HAPs dans le milieu réactionnel par augmentation de la surface d'échange, et donc par augmentation du flux de diffusion. Or, il s'avère que ce type de prétraitement présente un effet inverse en réduisant totalement le potentiel d'élimination des HAPs. Dans un premier temps, il peut être formulée comme hypothèse que les HAPs pourraient être libérés par le broyage du substrat de la fraction non extractible vers la fraction extractible, les bilans de matière sur le réacteur n'étant alors plus corrects. Cependant, il a été vérifié que, pour l'ensemble des aliquots de substrats utilisés avant et après broyage, les quantités en HAPs apportés au système sont statistiquement similaires dans les deux cas (test t de Student de comparaison de moyennes). Ainsi, avant ou après broyage, les deux types de substrats restent strictement identiques vis à vis de la concentration en HAPs extractibles (voir **Figure G4**) (les valeurs du t-test sont : 0,63 ; 1,17 ; 0,81 ; 1,3 ; 0,5 ; 0,8 ; 1,31 ; 0,44 ; 0,44 ; 0,81 ; 1,13 ; 0,65 ; 0,17 < au t_{critique} de 0,77). L'influence significative de l'étape de broyage ne provient donc pas d'un biais analytique mais correspond bien à une réduction réelle des performances biologiques d'élimination des HAPs.

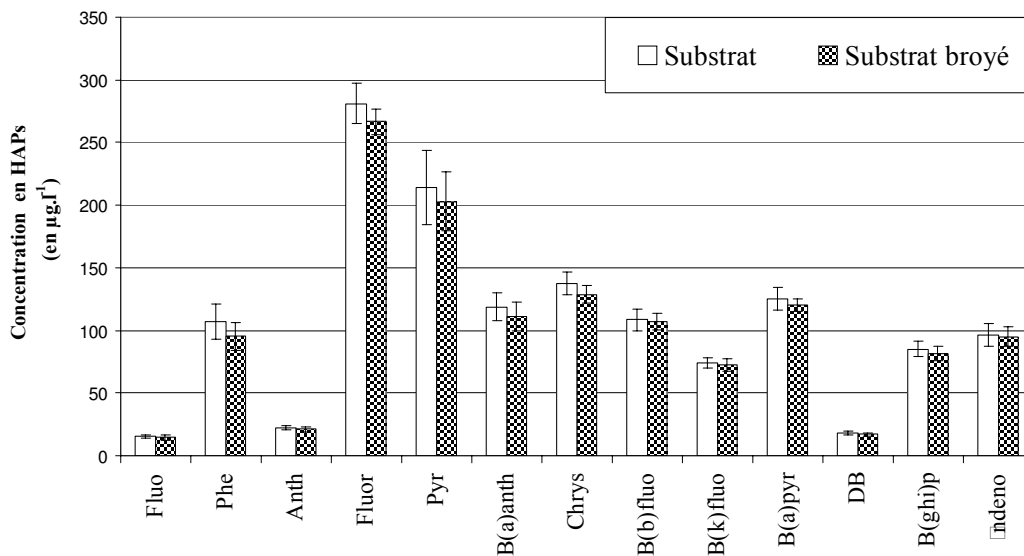


Figure G4 : Concentrations en HAPs dans des boues contaminées sans traitement (Substrat) et après broyage mécanique (Substrat broyé).

D'autre part, même si les performances d'abattement de la pollution carbonée et notamment des MS sont moins élevées que dans le cas du réacteur de base ADA□0, l'activité biologique n'est pas nulle et l'activité biologique d'élimination des HAPs semble spécifiquement affectée par le broyage des boues. A ce stade, deux hypothèses peuvent être formulées concernant ce phénomène de réduction du potentiel d'élimination des HAPs :

- ◆ La première hypothèse consiste en ce que les HAPs seraient plus facilement adsorbés par les particules après broyage et donc moins accessibles aux micro-organismes dégradants. En effet, même s'il est difficile de quantifier la taille d'une particule moyenne dans le cas de boues urbaines, le broyage des boues contaminées doit augmenter significativement la surface d'échange des particules dans le milieu. Ainsi, les HAPs pourraient être plus facilement adsorbés ce qui limiterait leur bioaccessibilité. Cette hypothèse implique que la cinétique de diffusion de ces composés soit régit par des phénomènes plus complexes qu'une simple loi de diffusion (cinétique de désorption non linéaire due à la présence de sites d'adsorption spécifiques). Dans ce cas, l'augmentation de la surface d'échange augmenterait d'autant plus le nombre de sites actifs d'adsorption des HAPs et donc limiterait leur bioaccessibilité. A l'origine de cette hypothèse, des résultats similaires ont déjà été observés dans des sols et sédiments contaminés où la dégradation biologique des HAPs était majoritairement contrôlée par les effets d'adsorption-désorption et était fortement ralentie par une surface d'échange élevée et une concentration en matière organique importante

(Bouwer *et al.*, 1996). De plus, la notion de sites d'adsorption spécifiques a été récemment évoquée par Bohl et Rice (1999) dans le cas de sols contaminés.

◆ Cependant, une seconde hypothèse peut également être formulée : elle consiste en ce que le broyage intense du substrat provoque une forte lyse bactérienne conduisant à la mort cellulaire partielle ou totale des micro-organismes responsables de l'élimination des HAPs (perturbation de l'équilibre microbiologique de l'écosystème). Sous cette hypothèse, il est sous-entendu que ces micro-organismes ne se maintiennent pas dans le réacteur et qu'après broyage, ils ne seraient plus apportés par le substrat au système d'où une réduction totale de l'élimination des HAPs.

Afin de conforter l'une ou l'autre hypothèse, une expérience de stérilisation du substrat sous UV fut mise en œuvre (réacteur ADASTER).

G1-2-2. Influence de la stérilisation sous UV du substrat.

Afin d'étudier l'influence de la lyse cellulaire due au broyage du substrat, celui-ci fut stérilisé sous lampe UV (254 nm, 6W, 1 heure pour 500 ml de boues) pour l'alimentation d'un réacteur anaérobie dénommé ADASTER. Ce réacteur fonctionne avec des conditions opératoires identiques au réacteur ADA0 servant de base de comparaison. Les conditions précitées de stérilisation furent préalablement déterminées pour fournir un taux de mortalité des bactéries viables sur milieu riche, équivalent à celui d'un traitement par broyage mécanique (réduction des bactéries viables sur milieu LB d'un facteur 10^3 environ (4 h, 35°C)). Ainsi, d'un point de vue efficacité de stérilisation, les prétraitements par broyage ou par stérilisation sous UV du substrat peuvent être considérés comme équivalents.

◆ Confirmation des conditions de méthanogénèse du réacteur ADASTER:

Les conditions de méthanogénèse du réacteur ADASTER furent quotidiennement vérifiées par mesure du flux de production et de la composition du biogaz. Plus importants que pour les réacteurs ADA0 et BADA, les rendements en biogaz furent d'environ 1107 ± 110 ml.g_{MS dégradée}⁻¹ (ou 796 ± 31 ml.g_{DCO dégradée}⁻¹). Ces rendements, particulièrement élevés, peuvent être le résultat de l'effet de la stérilisation du substrat provoquant un changement qualitatif des boues (oxydation de certaines molécules plus facilement dégradables) et par l'instauration d'une population bactérienne méthanogène plus performante. Le taux de

méthane du biogaz produit fut d'environ 70,1 +/- 0,5 %, cette valeur étant toujours caractéristique de bonnes conditions méthanogènes générales. De même que pour l'ensemble des réacteurs anaérobies précédemment étudiés, les AGVs sont en quantité négligeable dans le milieu (<0,05 g.l⁻¹), indiquant ainsi le bon aboutissement de la dégradation de la matière carbonée sous conditions méthanogènes.

Concernant la dégradation de la pollution carbonée, le réacteur ADASTER présente des taux de réduction en matières sèches de 36,05 ± 4,0% et en matières organiques de 57,8 ± 5 %, le rapport MO / MS passant de 68 % dans le substrat à 54 % dans le digestat. Le réacteur ADASTER présente également des taux de dégradation de la DCO de près de 53,9 ± 6 % à l'équilibre. Ces valeurs sont de l'ordre de grandeur de ce qui avait été obtenu pour le réacteur mésophile anaérobie fonctionnant avec un substrat broyé BADA (réduction des MS de 30,6 ± 5,3 %, et de la DCO de 50,5 ± 6 %) mais reste réduite, pour les MS, par rapport au réacteur servant de base de comparaison ADA0 (réduction des MS de 56,1 ± 0,1 %, et de la DCO de 55,8 ± 6 %). Ainsi, d'un point de vue performances générales, les réacteurs BADA et ADASTER possèdent des performances de dégradation similaires, plus faibles pour les MS que dans le cas du réacteur ADA, mais présentant des rendements en biogaz plus élevés (possibilité d'un changement qualitatif du substrat dû au prétraitement et, vraisemblablement, à l'instauration d'une population méthanogène différente).

◆ Effet de la stérilisation UV sur les performances d'élimination des HAPs

Les rayonnements UV peuvent provoquer une transformation chimique des HAPs due à la présence de radicaux libres dans le milieu lors de l'irradiation (Bernstein et al., 1999). Afin de s'affranchir, dans un premier temps, de la possible transformation des HAPs due à ce type de traitement, les concentrations en HAPs dans les substrats non stérilisés et stérilisés sous UV furent comparées (voir **Figure G5**). Il s'avère que les deux types de substrats (stérilisés ou non) sont statistiquement similaires pour chaque HAP, le prétraitement sous UV utilisé ne conduisant donc pas à une transformation physico-chimique significative de ces composés (les valeurs t sont de : 1,91 ; 1,54 ; 0,13 ; 1,89 ; 1,97 ; 0,11 ; 0,38 ; 1,45 ; 1,10 ; 0,4 ; 1,03 ; 1,50 ; 1,83 < à t_{critique} de 0,77 à 5%).

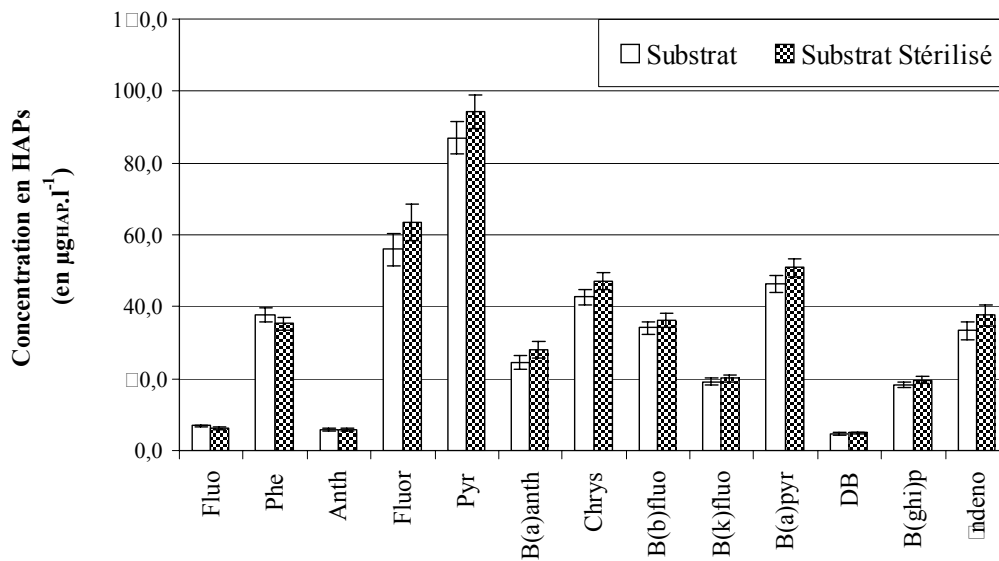


Figure G5 : Concentrations en HAPs dans des boues contaminées sans traitement (Substrat) et après stérilisation sous UV (254 nm) (Substrat Stérilisé).

Concernant les performances d'élimination des HAPs, les résultats obtenus pour les réacteurs ADA20, BADA et le réacteur d'intérêt ADASTER sont présentés sur la **Figure G6**.

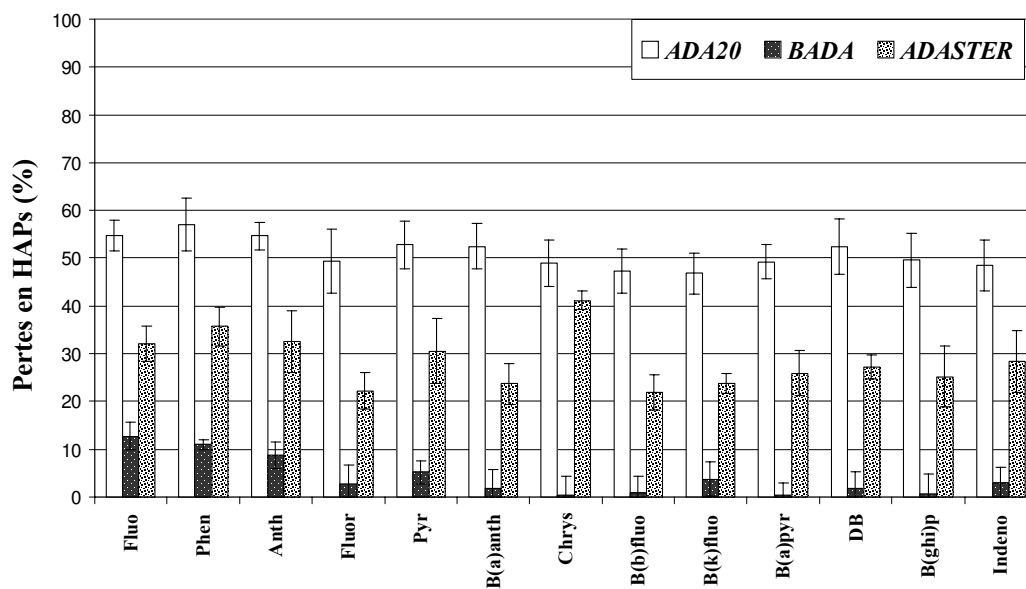


Figure G6 : Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies soit « de base » (ADA20), soit alimentés avec un substrat broyé (BADA) ou un substrat stérilisé (ADASTER).

Malgré que les performances d'élimination observées soient plus faibles dans le cas du réacteur ADASTER que pour le réacteur de base ADA□0, elles restent significativement plus importantes que dans le cas du réacteur BADA alimenté avec un substrat broyé. En effet, pour l'ensemble des HAPs, les pertes dans le réacteur ADASTER sont comprises entre □0 et 35 % (à l'exception du Chrysène à 40 %). Cependant, au regard de la disparité du taux de réduction des MS de chaque réacteur (de 56 % pour ADA□0 et de 35% pour BADA et ADASTER), il est nécessaire de calculer les facteurs d'efficacité d'élimination de chaque HAP (voir **Figure G7**). Une comparaison statistique de ces résultats montre que le réacteur ADASTER présente des facteurs d'efficacité globalement identiques à ceux retrouvés dans le cas du réacteur ADA□0 servant de base de comparaison. En effet, à l'exception du Fluoranthène, du Benzo(a)anthracène et du Chrysène (valeurs respectives de t de 3,37, □8□ et □97 > t_{critique} de □77), l'ensemble des facteurs d'efficacité calculés pour les réacteurs ADA□0 et ADASTER sont statistiquement identiques (dans l'ordre de présentation des HAPs, valeurs t de 1,17 ; 0,□4 ; 0,84 ; 3,37 ; 0,8□ ; □8□ ; □97 ; 1,75 ; 1,3 ; 1,53 ; 1,34 ; 1,49 ; 0,73 < t_{critique} de □77). L'influence de la stérilisation UV du substrat est donc statistiquement négligeable pour la majorité des HAPs et ne permet pas de réduire totalement les performances d'élimination, comme dans le cas du broyage mécanique du substrat (réacteur BADA).

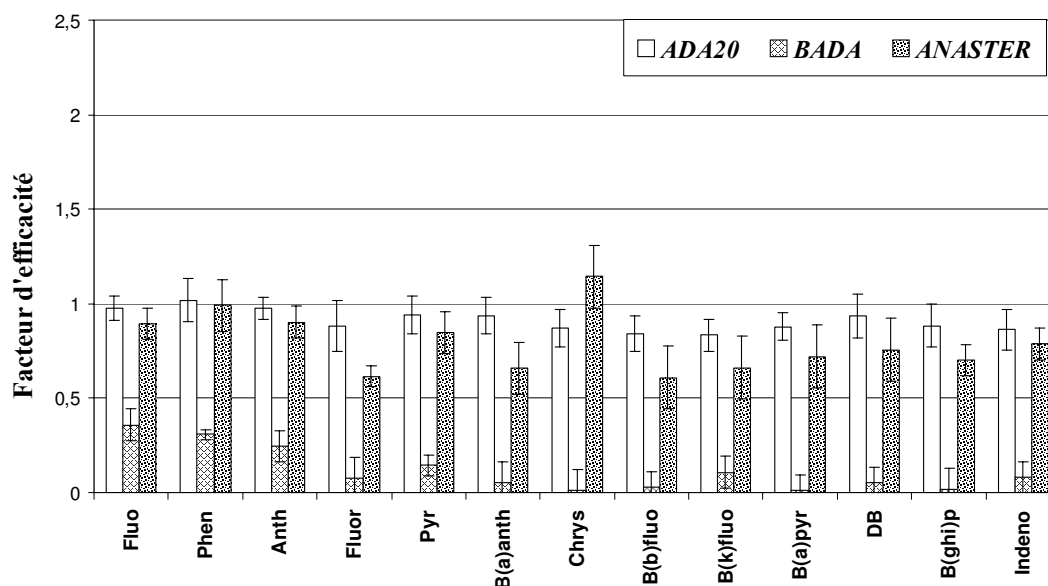


Figure G7 : Facteurs d'efficacité dans le cas de réacteurs anaérobies alimenté avec un substrat non broyé (ADA□0), préalablement broyé (BADA) ou stérilisé sous UV (ADASTER).

Suite à ces résultats, la première hypothèse précédemment formulée peut donc être retenue. En effet, cette hypothèse propose que, plus que par la lyse cellulaire qu'il engendre, le broyage mécanique du substrat provoque majoritairement l'augmentation de la surface d'échanges des particules et, donc l'augmentation du nombre de sites spécifiques d'adsorption des HAPs rendus alors non disponibles à leur dégradation biologique. Ce résultat conforte de plus certaines conclusions récentes montrant la présence de nombreux sites spécifiques d'adsorption dans les matrices chargées en composés organiques. La présence de tels sites d'adsorption spécifiques conduirait à ce que les cinétiques régissant la désorption des HAPs de ces matrices soient non linéaires et dépendraient plus de la nature des liaisons et de la matrice que des concentrations respectives dans la matrice solide et dans le milieu aqueux (*Braida et al., 2001 ; Conte et al., 2001 ; Laor et Rebhun, 2002*). Par extension, ces résultats suggèrent que les cinétiques d'élimination des HAPs par voie biologique sont fortement ralenties par les phénomènes de transfert dans le cas de boues à haute teneur en matière organique et faiblement contaminées.

Ainsi, afin d'optimiser le transfert de la phase solide vers un compartiment aqueux liquide et donc plus facilement bioaccessible, il a été envisagé d'étudier l'influence de la température de digestion qui est un paramètre essentiel de la diffusion de ce type de composé au sein même des matrices solides et déplaçant l'équilibre entre les HAPs fortement adsorbés et ceux plus facilement biodisponibles (*Ghosh et al., 2001 ; Zhang et al., 1995*).

G1-3. Influence de la température de digestion

Le paramètre température est un facteur primordial des phénomènes d'adsorption/désorption et d'accessibilité au substrat, comme dans le cas des HAPs en milieu solide. En effet, la majorité des coefficients de diffusion et des forces de liaison avec la matrice sont liés à ce facteur (*Miège et al., 1999*). Il a donc été choisi d'étudier, compte tenu des aspects limitants de la biodisponibilité des HAPs, l'influence de températures mésophile (35°C) et thermophile (55°C) au niveau de leur élimination biologique, aussi bien sous conditions anaérobies que sous conditions aérobies. En effet, il est fréquemment retrouvé des digesteurs thermophiles à l'échelle industrielle, ceux-ci étant principalement utilisés pour leurs propriétés hygiénisantes (*Ellisalde et al., 1994*). A noter qu'un essai intermédiaire à 45°C a permis de passer d'un état du système à l'autre sans saut brusque de température par une acclimatation progressive de l'écosystème.

G1-3-1. Influence de la température sous conditions anaérobies

◆ Confirmation des conditions de méthanogénèse mésophile à thermophile

Les bactéries méthanogènes étant très sensibles aux variations de leur environnement, l'augmentation de la température de digestion à 45°C et à 55°C a rapidement conduit à une accumulation des AGVs et donc à une inhibition de la méthanogénèse pour un temps de séjour hydraulique de 10 jours. Ainsi, l'ensemble des réacteurs présentés (ADA, ADA45 et ADA55) ont été conduits sous un temps de séjour de 40 jours permettant de finaliser l'étape de méthanogénèse sans accumulation d'AGV dans le milieu ($<0,05 \text{ g.l}^{-1}$). Concernant les performances générales de méthanogénèse, les rendements en biogaz furent constants entre tous les essais avec, pour les réacteurs ADA (35°C), ADA45 (45°C) et ADA55 (55°C), respectivement : $430 \pm 43 \text{ ml.gMSdégradée}^{-1}$; $476 \pm 45 \text{ ml.gMSdégradée}^{-1}$; $380 \pm 31 \text{ ml.gMSdégradée}^{-1}$ (ou $307 \pm 17 \text{ ml.gDCOdégradée}^{-1}$; $385 \pm 31 \text{ ml.gDCOdégradée}^{-1}$; $198 \pm 14 \text{ ml.gDCOdégradée}^{-1}$). Ces rendements de méthanogénèse étant similaires, ils indiquent que l'activité biologique de l'écosystème est macroscopiquement identique dans les trois cas. Les taux de méthane dans le biogaz produit sont également semblables avec, respectivement, $74,8 \pm 0,5 \%$; $69,4 \pm 0,1 \%$; $70,1 \pm 0,1 \%$. Ces valeurs restent indicatrices de bonnes conditions de méthanogénèse. Concernant la dégradation de la pollution carbonée, les réacteurs ADA, ADA45 et ADA55 présentent des taux similaires de réduction en matières sèches avec, respectivement, $49,6 \pm 4,1 \%$; $54,0 \pm 3,1 \%$ et $50,6 \pm 4,1 \%$. Ces réacteurs présentent également des taux de dégradation de la DCO relativement proches avec près de $50,6 \pm 5,1 \%$; $54,1 \pm 5,4 \%$; $56,5 \pm 6,0 \%$.

Ainsi, d'un point de vue performances générales, ces réacteurs présentent des caractéristiques similaires de réduction de la pollution organique. Enfin, dans le cas des réacteurs témoins mis en œuvre pour déterminer les pertes abiotiques en HAPs (T35, T45 et T55), leur bon état de stérilité est vérifié par l'absence de pertes significatives en MS, soit : $0,4 \pm 6,3 \%$ à 35°C (T35) ; $1,3 \pm 8,5 \%$ à 45°C (T45) ; $1,1 \pm 0,8 \%$ à 55°C (T55).

◆ Influence de la température sur les performances d'élimination des HAPs sous conditions anaérobies mésophile, intermédiaire et thermophile

Après réalisation des bilans de matière, calcul des courbes théoriques attendues en sortie de chaque réacteur et comparaison avec les valeurs mesurées, les performances

d'élimination des 13 HAPs étudiés furent déterminées dans un premier temps pour les réacteurs témoins (voir **Figure G8**). Ces réacteurs ont principalement été mis en œuvre pour estimer les pertes abiotiques dues au procédé en lui-même, notamment par volatilisation avec l'augmentation de température de digestion.

L'analyse des résultats obtenus montre que l'augmentation de température provoque un accroissement progressif et significatif des pertes abiotiques pour les plus petits HAPs, avec des pertes pour le Fluorène passant de 6 % à plus de 50 %. L'effet de la température sur les pertes abiotiques est donc plus marqué à 55°C. En effet, les HAPs sont définis comme étant des composés semi-volatiles et il est fortement recommandé de ne pas dépasser 40°C pour éviter toute volatilisation (recommandations pour leur analyse par l'AFNOR, 2001). L'augmentation de la température de fermentation induit également une augmentation progressive de la diffusion des HAPs les plus lourds de la matrice solide vers un compartiment plus accessible. En effet, pour les plus gros HAPs, la quantité d'HAPs est plus importante en sortie de réacteur qu'en entrée traduisant ainsi la libération par diffusion des HAPs de la zone non extractible de la matrice vers la zone extractible au cours du traitement (jusqu'à 0 % à 55° C).

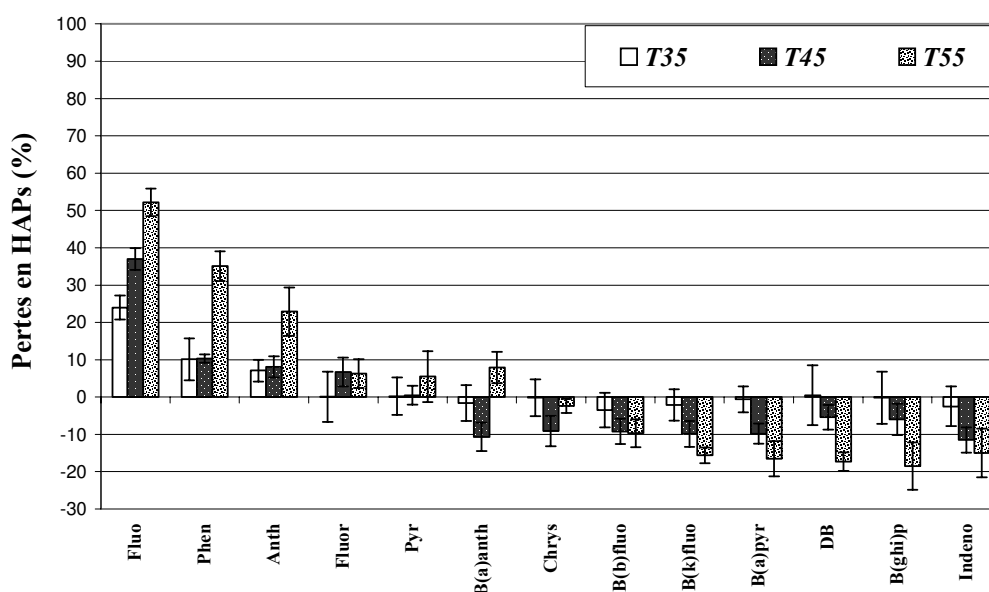


Figure G8 : Pertes abiotiques en HAPs dans le cas de réacteurs témoins anaérobies à 35°C (T35), 45°C (T45) et 55°C (T55).

Suite à ces observations, l'influence de la température de fermentation a été étudiée dans le cas de réacteurs biologiques (voir **Figure G9**). Par comparaison entre les différentes performances d'élimination mesurées, il a été mis en évidence que le passage de la

température de 35°C à 45 °C ne présente pas d'influence significative. En effet, en comparant les performances d'élimination de chaque HAP deux à deux (ADA et ADA45), un test statistique de comparaison de moyennes montre qu'il n'existe aucune différence significative entre les deux essais (facteurs t_{091} ; 0,87 ; 0,18 ; 1,31 ; 0,65 ; \square_{44} ; 1,0 \square ; 1,4 \square ; \square_{05} ; 1,1 \square ; 1,14 ; 1,31 ; $1,76 < t_{critique} \square_{77}$). L'influence de la température entre 35°C et 45°C est donc négligeable en ce qui concerne l'élimination par voie biologique des HAPs.

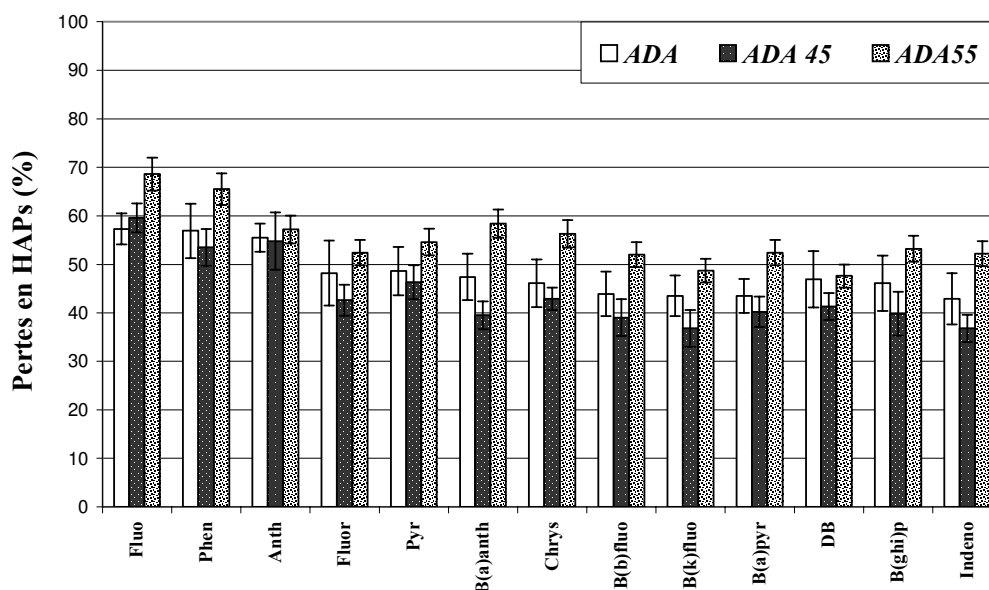


Figure G9 : Pertes apparentes en HAPs dans le cas de réacteurs biologiques anaérobies à 35°C (ADA), 45°C (ADA45) et 55°C (ADA55).

Néanmoins, l'augmentation de la température à 55°C provoque une augmentation significative des pertes apparentes pour certains HAPs, sauf pour l'Anthracène, le Fluoranthène et le Dibenzo(ah)anthracène. En effet, un test de comparaison multiple de moyenne (ANOVA) montre que les performances d'élimination du réacteur ADA55 sont statistiquement différentes de celles retrouvées pour les réacteurs ADA et ADA45, et ce pour une majorité d'HAPs, à l'exception des composés pré-cités (facteurs $F_{14,9}$; 6,5 ; 0,19 ; 3,81 ; 3,71 ; \square_{6} ; 1 \square_{6} ; 7,3 ; 6,88 ; 10,7 \square ; 1,14 ; 5,5 \square ; 9,1 avec un $F_{critique}$ de 5,14). Une température de 55°C favoriserait donc la diffusion des HAPs et par conséquent leur élimination en les libérant de la matrice solide par le déplacement de l'équilibre d'adsorption de ces composés. De plus, au regard des pertes abiotiques ou des gains en HAPs dus à leur diffusion d'une zone non extractible vers une zone extractible à 55°C, il est intéressant de calculer les pertes potentiellement dues à l'activité biologique au cours de ces différents procédés (voir **Figure G10**).

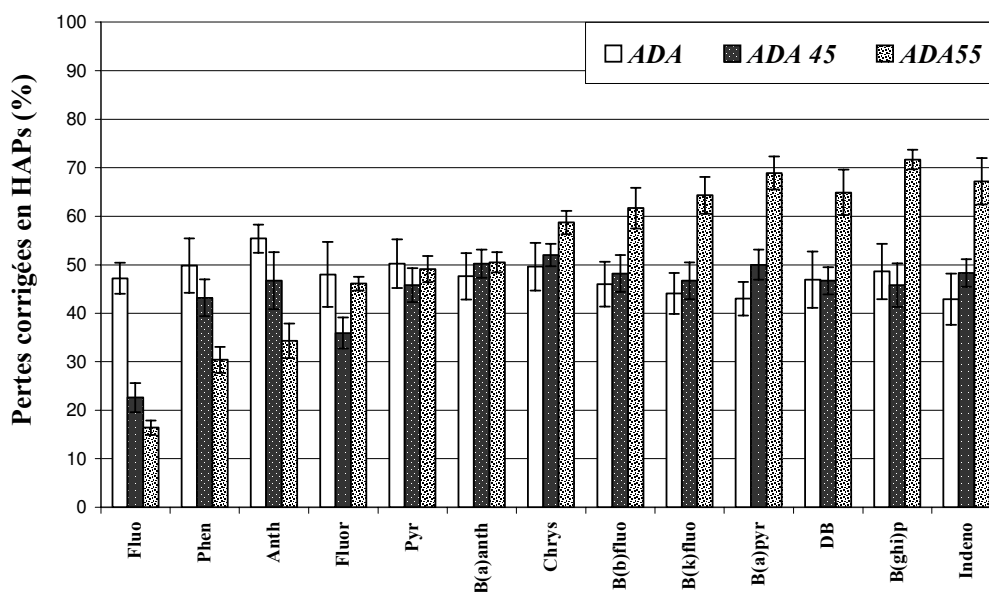


Figure G10 : Pertes corrigées en HAPs potentiellement dues à l'activité biologique dans le cas de réacteurs biologiques anaérobies à 35°C (ADA), 45°C (ADA45) et 55°C (ADA55).

Les résultats concernant les pertes potentiellement liées à l'activité biologique permettent de distinguer trois grands groupes d'HAPs : un premier regroupe les HAPs les plus légers (du Fluorène à l'Anthracène) où les pertes abiotiques sont largement favorisées et majoritaires à 55°C, provoquant ainsi une augmentation des performances apparentes totales de disparition des HAPs. A 55°C, le flux de volatilisation est prépondérant si bien que les pertes dues à l'activité biologique deviennent minoritaires. Le second groupe est composé d'HAPs « intermédiaires » où les performances biologiques n'évoluent pas entre les essais, l'activité biologique n'étant pas activée pour ces composés (du Fluoranthène au Benzo(a)anthracène). Le troisième groupe, le plus influencé par le facteur température, est constitué des HAPs les plus lourds. Dans ce groupe, les performances d'élimination par voie biologique sont largement favorisées sous conditions thermophiles (du Chrysène à l'Indeno(1,2,3-cd)pyrène). En effet, par rapport aux résultats obtenus avec les réacteurs témoins, ces HAPs diffusent plus facilement dans le milieu par passage de la fraction non extractible à la fraction extractible et deviennent donc potentiellement biodisponibles et peuvent être dégradés.

De plus, pour les trois réacteurs étudiés, les performances apparentes d'élimination des HAPs sont relativement indépendantes des concentrations et du poids moléculaire des HAPs. Les taux de réduction des solides étant proches de ces performances (de l'ordre de 50 %), il

semblerait que celles-ci soient effectivement liées au potentiel de réduction des MS. Afin de s'affranchir de ce taux de réduction de MS un facteur d'efficacité apparent a été calculé (voir **Figure G11**). Outre les HAPs particulièrement concernés par les pertes abiotiques (Fluorène, Phénanthrène et Anthracène), il apparaît que le facteur d'efficacité est statistiquement constant pour chaque essai et indépendant du poids moléculaire des HAPs (facteurs F de 0,61 à 35°C ; de 1,9 à 45°C et de ≈ 3 à 55°C de $< F_{\text{critique}}$ de ≈ 39). Les valeurs moyennes des trois essais sont de (moyenne excluant le Fluorène, le Phénanthrène et l'Anthracène): $0,9 \pm 0,04$ à 55°C ; $0,75 \pm 0,05$ à 45°C et de $1,04 \pm 0,06$ à 35°C. L'essai à 45°C présente un facteur d'efficacité statistiquement inférieur aux deux autres réacteurs. Ce résultat est vraisemblablement dû à la libération d'HAPs de la matrice non extractible sans augmentation significative de leur biodisponibilité (pas d'amélioration des pertes potentielles dues à l'activité biologique). Par comparaison, l'essai à 55°C est le cas le plus favorable. Une température thermophile favoriserait significativement le transfert des HAPs de la matrice solide vers un compartiment plus accessible aux micro-organismes. Toutefois, ce facteur reste encore proche d'une valeur moyenne de 1 et les concentrations brutes en HAPs (concernées par la norme avant épandage) n'évoluent pas significativement.

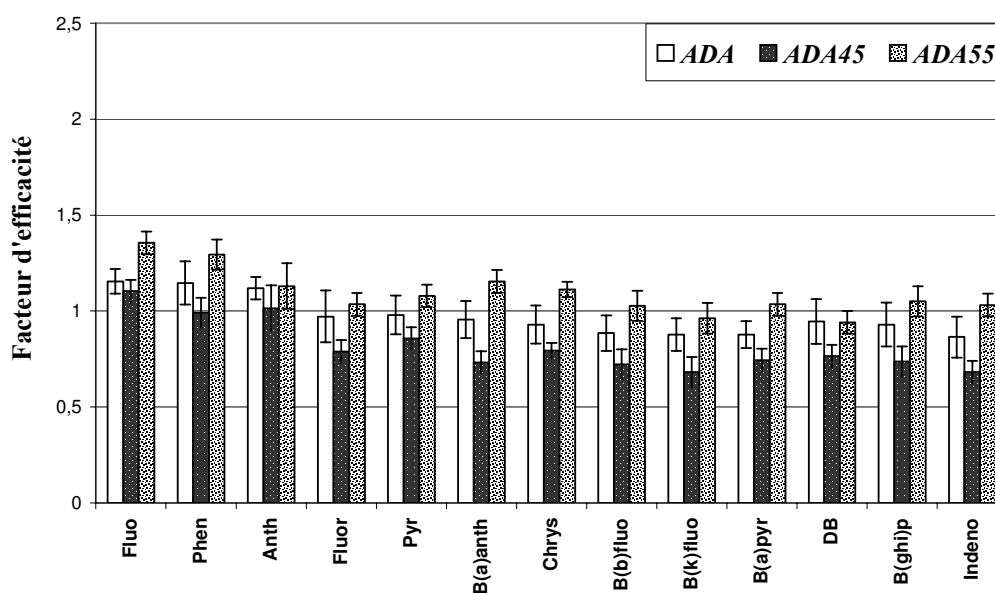


Figure G11: Facteurs d'efficacité dans le cas de réacteurs anaérobies à 35°C (ADA), 45°C (ADA45) et 55°C (ADA55).

En conclusion, l'augmentation de la température de 35°C à 55°C permet d'améliorer significativement l'élimination des HAPs au cours du procédé de digestion anaérobie. Il est intéressant de noter qu'à l'état intermédiaire (45°C), les performances apparentes sont statistiquement inférieures aux cas de conditions strictement mésophiles ou thermophiles. Cet effet est d'autant plus marqué si le potentiel biologique d'élimination du système est pris en compte (pertes potentielles). Ces résultats suggèrent donc que, sous l'influence de l'accroissement de température (35°C à 45°C), les HAPs ont tendance à diffuser de la fraction non extractible vers la fraction extractible sans pour autant que leur biodisponibilité soit améliorée et donc leur élimination biologique. Cette observation implique que les notions de fraction extractible et de biodisponibilité puissent être dissociés. En effet, les conditions d'extraction à l'ASE sont considérées comme étant relativement drastiques et les concentrations fournies peuvent prendre en compte une fraction également peu biodisponible pour les micro-organismes. Confirmant cette observation, certains auteurs ont montré qu'il existait, dans le cas de sols contaminés, une certaine corrélation entre fraction extractible et fraction biodisponible, mais pour des méthodes moins drastiques d'extraction à froid sous agitation au méthanol et au butanol (*Breedveld et Karlsen, 2000b ; Kelsey et al., 1997*).

D'autre part, sous des températures thermophiles, les performances potentielles d'élimination due à l'activité biologique peuvent atteindre près de 70 % pour les plus gros HAPs. Dans ce cas, les HAPs diffusant de la fraction non extractible sont également plus facilement biodisponibles et peuvent être éliminés par voie biologique. Malgré l'influence statistiquement significative du facteur température de digestion, l'efficacité de traitement ne permet pas de diminuer les valeurs en HAPs à l'intérieur de la matrice boue, sous conditions anaérobies. Cependant, d'un point de vue technologique et dans un souci de décontamination des boues, un traitement thermophile à 55°C peut être envisagé pour désorber les plus gros HAPs se trouvant dans une zone non extractible et les dégrader avant leur possible désorption dans les sols après épandage. Seul, ce type de traitement reste toutefois peut applicable pour les plus petits HAPs dont les pertes par volatilisation sont prépondérantes. Il serait plus envisageable d'utiliser une configuration séquentielle de réacteurs de digestion anaérobie en associant réacteurs thermophiles et mésophiles. Certains auteurs proposent notamment l'utilisation de prétraitement anaérobie thermophile associé à un traitement de finition mésophile, cette configuration présentant un fort pouvoir hygiénisant (*Han et al., 1997*).

G1-3-2. Influence de la température sous conditions de digestion aérobie

A 35°C, par comparaison avec les réacteurs anaérobies, le procédé de digestion aérobie est particulièrement performant pour l'élimination des HAPs de par ces conditions opératoires (*cf Chapitre F*). Il est donc particulièrement intéressant d'optimiser ce procédé afin d'abaisser les concentrations brutes en HAPs en deçà des normes en vigueur. Pour cela, il fut nécessaire, comme sous conditions anaérobies, d'améliorer les phénomènes de transfert de matière et notamment à l'aide du facteur température. De plus, le procédé le plus couramment mis en œuvre à l'échelle industrielle reste la digestion aérobie thermophile (température entre 55°C et 65°C), utilisé principalement pour ses propriétés hygiénisantes.

Ainsi et de la même manière que sous conditions anaérobies, l'influence de l'augmentation de la température de digestion de 35°C à 45°C puis à 55°C a été étudiée au sein de réacteurs témoins et biologiques, dénommés Taéro, Taéro45, Taéro55 et Aéro, Aéro45, Aéro55. Les réacteurs servant de base de comparaison sont les réacteurs Taéro et Aéro dont les résultats ont été préalablement présentés dans le *Chapitre F*.

◆ Caractérisation des conditions de digestion aérobie mésophile et thermophile:

Par mesure périodique du taux d'oxygène au sein même des réacteurs témoins et biologiques, les conditions saturantes en oxygène dans le milieu (environ 7,5 mg.l⁻¹) ont été continuellement vérifiées. Les conditions d'aération ne furent donc pas limitantes dans le cas de ces réacteurs d'étude. Les performances de dégradation globales furent plus faibles que dans le cas des réacteurs anaérobies, mais constantes entre les essais de 35°C à 55°C avec, respectivement, une réduction en MS d'environ 38,0 ± 3,3 % ; 41,4 ± 0,8 % ; 36,0 ± 3,0% et en DCO de 50,8 ± 4,0 ; 55,7 ± 4,5 ; 43,7 ± 3,5 %. Les différences mesurées entre les procédés anaérobies et aérobie sont principalement dues à l'influence du rendement en biomasse, plus élevé sous conditions aérobie (0,4 - 0,6 g.g_{DCO}dégradée⁻¹ contre 0,00 - 0,15 g.g_{DCO}deg⁻¹ en anaérobiose) (*Bitton, 1994*). Enfin, dans le cas des réacteurs témoins mis en œuvre pour déterminer les pertes abiotiques en HAPs, leur bon état de stérilité est vérifié par l'absence de pertes significatives en MS, soit : 0,3 ± 4,3 % à 35°C (T35) ; 1,6 ± 3,6 % à 45°C (T45) ; 0,9 ± 0,1 % à 55°C (T55).

◆ Influence de la température sur les performances d'élimination des HAPs sous conditions aérobies mésophile, intermédiaire et thermophile :

Dans un premier temps, les performances d'élimination des HAPs ont été déterminées pour différentes températures dans le cas des réacteurs témoins (stérilisés chimiquement). Ces réacteurs sont utilisés pour l'estimation des pertes abiotiques dues au procédé aérobie. Les résultats obtenus, présentés sur la **Figure G12**, montrent que l'augmentation de température provoque un accroissement significatif des pertes abiotiques pour les plus petits HAPs. Plus précisément, l'augmentation de la température de 35 à 45°C conduit dans un premier temps à accroître les pertes par volatilisation des plus petits HAPs, mais également à libérer les HAPs de la fraction non extractible vers une zone extractible, surtout pour les plus gros HAPs (peu de différence entre 35°C et 45°C pour les plus gros HAPs). En augmentant la température à 55°C, le flux de volatilisation devient si important que la résultante conduit à des pertes significatives en HAPs, jusqu'à près de 85 % pour l'Anthracène (HAP léger) et 45% pour le Benzo(a)pyrène (HAP lourd). L'effet température est donc d'autant plus marqué à 55°C où tous les HAPs présentent des pertes abiotiques. Par comparaison avec les pertes abiotiques mesurées dans un réacteur anaérobie thermophile, les conditions d'agitation et d'aération favorisent la diffusion et la volatilisation de ces composés d'où l'augmentation significative des pertes.

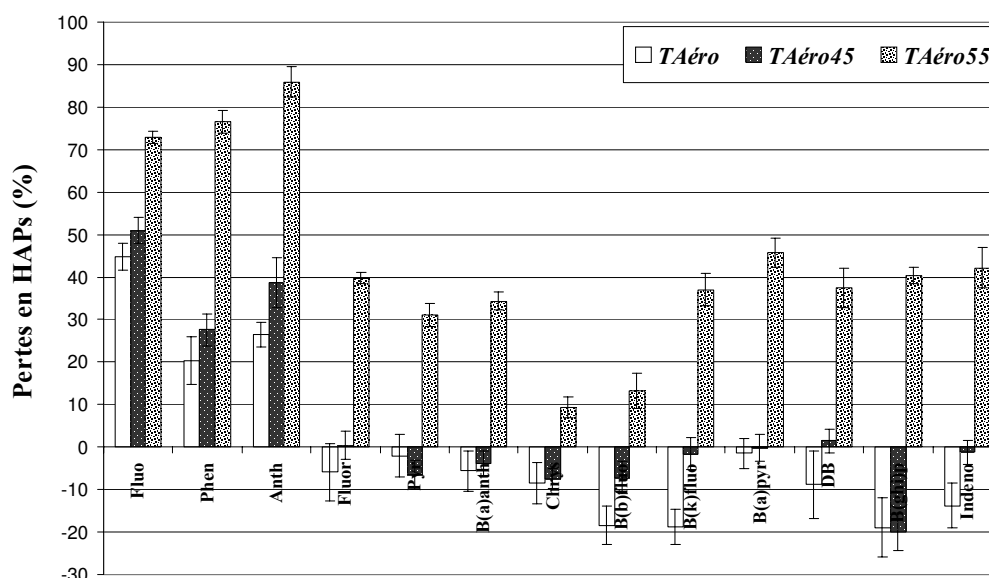


Figure G12 : Pertes abiotiques en HAPs dans le cas de réacteurs témoins aérobies à 35°C (Aéro), 45°C (Aéro45) et 55°C (Aéro55).

Dans un deuxième temps, l'influence de la température de digestion a été étudiée dans le cas des réacteurs biologiques (voir **Figure G13**). L'augmentation de température de 35°C à 45°C permet d'obtenir des performances d'élimination de l'ordre de 90 % pour 11 des 13 HAPs étudiés. Seuls le Dibenzo(ah)anthracène et le Benzo(ghi)pérylène présentent respectivement des taux d'élimination de 80% et 60 %, mais la température possède un effet activateur sur la diffusion et sur l'élimination de l'ensemble des HAPs. Toutefois, le passage de la température de digestion de 45°C à 55°C provoque une réduction significative des performances d'élimination des HAPs pour finalement obtenir des performances proches de celles retrouvées à 35°C (à l'exception des 3 plus gros HAPs, le Dibenzo(ah)anthracène, le Benzo(ghi)pérylène et l'indeno(1,2,3-cd)pyrène).

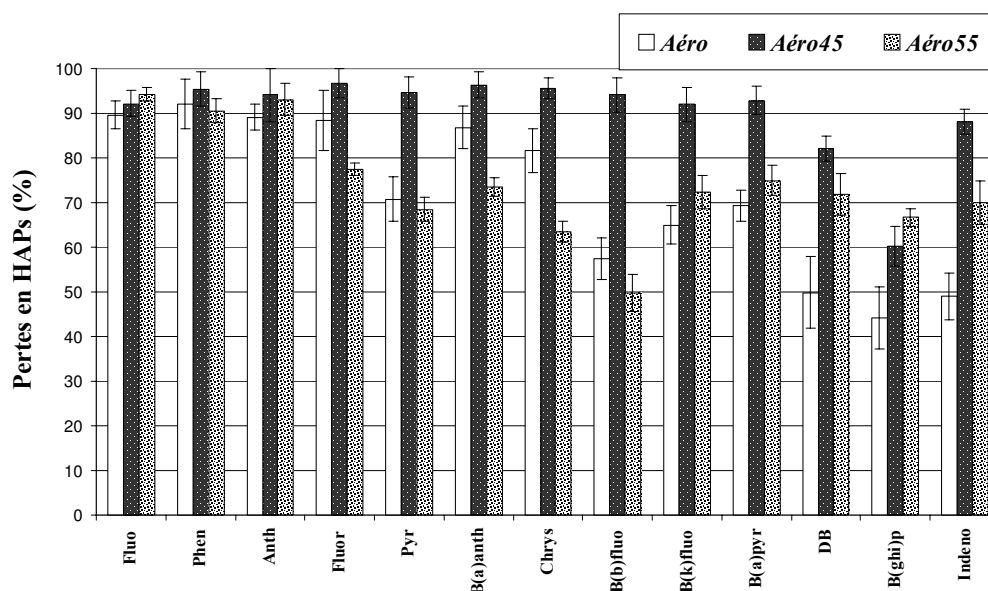


Figure G13 : Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs biologiques aérobies à 35°C (Aéro), 45°C (Aéro45) et 55°C (Aéro55).

Afin de confirmer ce résultat et afin de s'affranchir des pertes abiotiques qui peuvent être particulièrement prépondérantes pour les plus petits HAPs sous conditions thermophiles, il fut calculé les pertes potentielles dues à l'activité biologique de l'écosystème (voir **Figure G14**). Ainsi, pour les plus petits HAPs, les gains en performances suite au passage de 35°C à 45°C sont essentiellement le résultat de l'augmentation des pertes abiotiques (vraisemblablement par volatilisation). Par contre, pour l'ensemble des autres HAPs, l'influence du facteur température entre 35°C et 45°C est particulièrement significatif, de par le gain en HAPs qui ont diffusé de la zone non extractible vers la zone extractible au cours du processus abiotique. Cependant, le passage de la température à 55°C augmente

considérablement les pertes abiotiques et les performances totales restent plus faibles. Les pertes dues à l'activité biologique se trouvent alors réduites en fortes proportions. Une température thermophile ne semble donc pas convenir à l'élimination de ces composés par voie biologique aérobie. L'influence de la température sur la dégradation aérobie des HAPs reste encore peu étudiée et est, par conséquent, mal connue. Les quelques résultats retrouvés dans la littérature montrent essentiellement une limitation de la diffusion des HAPs pour des températures inférieures à $\square 5^{\circ}\text{C}$ (Ghosh et al., 2001 ; Zhang et al., 1995). Au regard des résultats obtenus, il semblerait donc que des températures thermophiles ne soient pas appropriées au bon développement des divers micro-organismes impliqués dans la dégradation des HAPs, soit, le plus souvent : *Pseudomonas sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Sphingomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Flavobacterium sp.* (Aitken et al., 1998 ; Harayama, 1997 ; Fava et al., 1999 ; Kanaly et Harayam, 2000 ; Mueller et al., 1997 ; Zylstra et al., 1997).

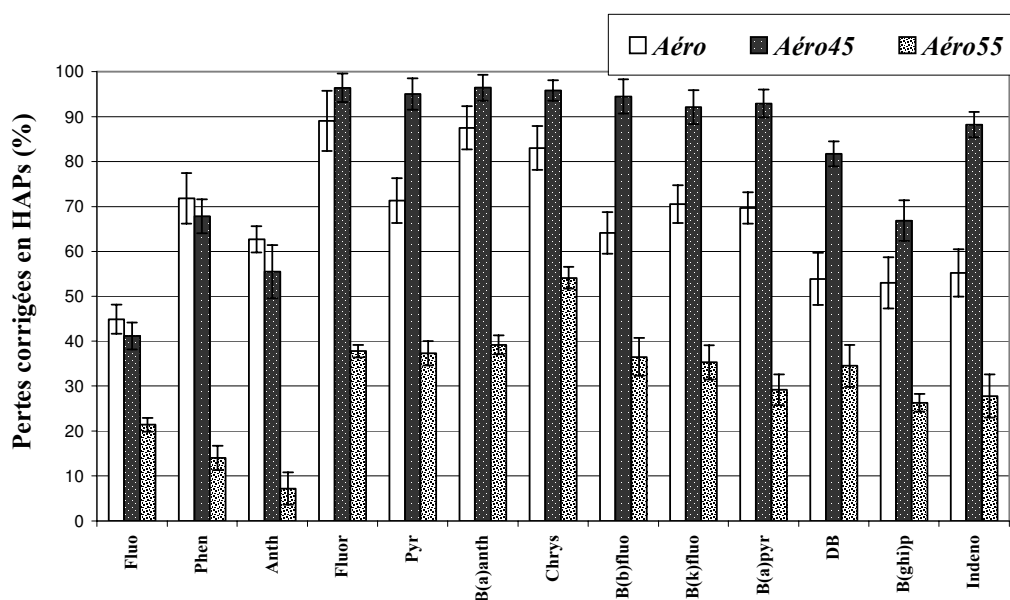


Figure G14 : Pertes potentielles d'élimination biologique des HAPs dans le cas de réacteurs biologiques aérobie à 35°C (Aéro), 45°C (Aéro45) et 55°C (Aéro55) (corrigées par les pertes abiotiques des témoins).

Enfin, afin de s'affranchir du taux de réduction des MS pour chaque essai, les facteurs d'efficacité ont été calculés pour les différentes températures (voir **Figure G15**). Il apparaît alors que, pour les températures de 35°C et de 45°C , les facteurs d'efficacité semblent saturer autour d'une valeur seuil de $\square 3$ - $\square 4$ où l'influence du nombre de cycles benzéniques est négligeable. Cette valeur est vraisemblablement liée au fait que les paramètres de transfert de matière sont de nouveau limitants, comme dans le cas des réacteurs

anaérobies où les performances d'élimination sont indépendantes du nombre de cycles benzéniques et de la concentration en HAPs. En effet, en cas de limitation par le potentiel biologique de dégradation, les performances de dégradation auraient été dépendantes du nombre de cycles benzéniques, les HAPs les plus lourds étant les plus réfractaires à leur biodégradation (Sutherland et al., 1995). De plus, le passage à 55°C permet de repousser ce seuil à environ $\times 6$ pour les HAPs les plus volatils. A cette température et pour les plus gros HAPs, le facteur d'efficacité est relativement plus important qu'à 35°C, mais essentiellement suite à de fortes pertes abiotiques.

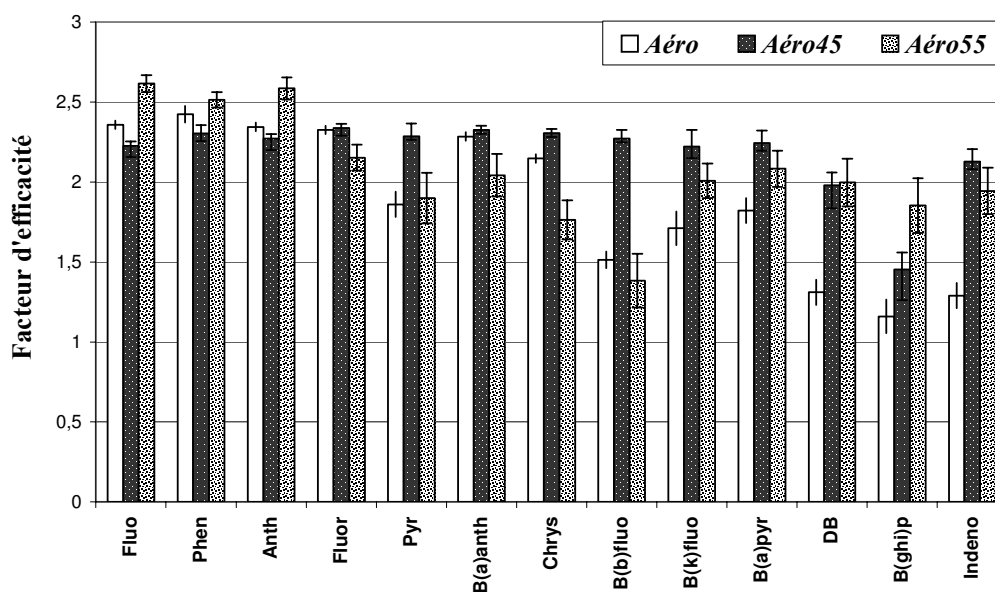


Figure G15 : Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas de réacteurs biologiques aérobies à 35°C (Aéro), 45°C (Aéro45) et 55°C (Aéro55)

Il est intéressant de noter que des valeurs du facteur d'efficacité de $\times 3$ à $\times 4$ traduisent le fait que plus de \times fois plus d'HAPs que de MS sont éliminés au cours du procédé. Les concentrations brutes en HAPs tendent donc à décroître très rapidement dans la matrice solide en sortie du réacteur Aéro45, jusqu'à atteindre des valeurs en dessous des normes actuelles concernant l'épandage agricole (voir **Figure G16**). Les concentrations obtenues après traitement atteignent même des valeurs en deçà de la norme à venir qui limiterait la somme de 11 HAPs à moins de $6 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$. Après traitement, la somme des concentrations des 13 HAPs atteint une valeur de $3,9 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$. Le procédé de dégradation sous conditions aérobies à 45°C se révèle donc être particulièrement performant vis à vis de l'élimination des HAPs par rapport aux systèmes de digestion anaérobie limités majoritairement par les conditions de transfert de matière et de biodisponibilité des HAPs.

Ces résultats mettent donc en évidence le fort potentiel des écosystèmes et des procédés aérobies pour l'élimination des HAPs dans les boues. A noter que, jusqu'à ce jour, la biodégradation aérobie des HAPs dans les boues restait encore peu étudiée et essentiellement limitée au cas de compostage de matrices hautement contaminées (Potter et al., 1999). Néanmoins, de forts potentiels de biodégradation aérobie avaient déjà été observés dans le cas de sols et sédiments contaminés ou dopés artificiellement (Broholm et al., 2000 ; Broholm et Arvin, 2001 ; Sparrevik et Breedveld, 2000 ; Woo et Park, 1999).

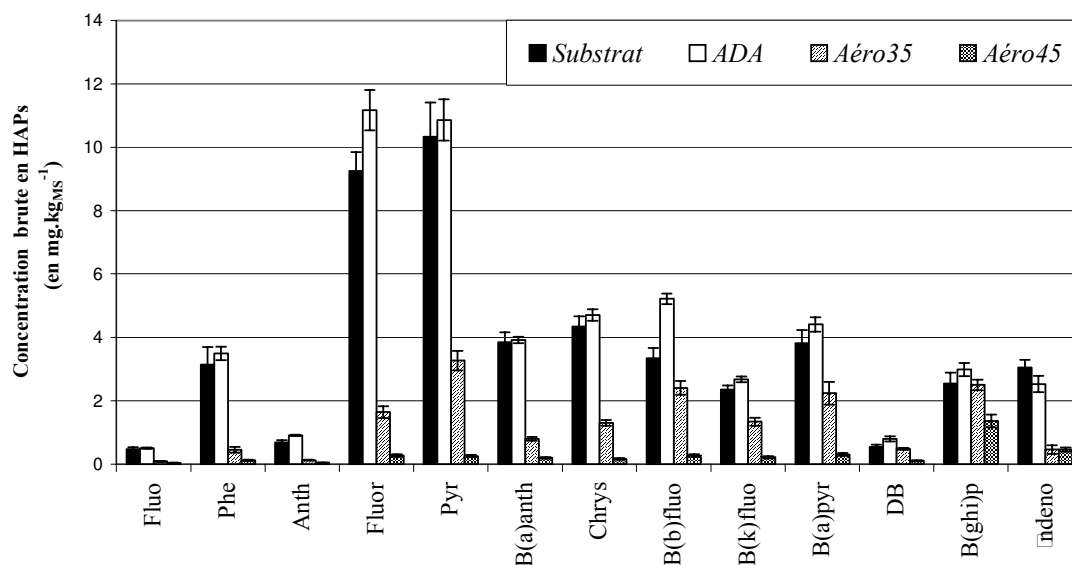


Figure G16 : Concentrations brutes en HAPs dans des boues contaminées avant traitement (Substrat) et en sortie de réacteur de digestion anaérobie mésophile 35°C (ADA) et aérobie mésophile 35°C (Aéro) ou 45°C (Aéro45°C). Norme actuelle : Fluoranthène < 5 mg.kg_{MS}⁻¹ ; Benzo(b)fluoranthène < 0,5 mg.kg_{MS}⁻¹ et Benzo(a)pyrène < 0,1 mg.kg_{MS}⁻¹

En conclusion, l'étude des conditions opératoires de procédés de digestion de boues urbaines contaminées a montré l'importance des phénomènes de transfert de matière pour l'élimination biologique des HAPs. En effet, il a été observé que le broyage du substrat réduisait totalement le potentiel d'élimination de ces composés sous conditions anaérobies par augmentation de la surface d'échange et donc des sites d'adsorption des HAPs. De plus l'augmentation de la température possède un effet significatif sur l'élimination des HAPs, notamment sous conditions aérobies par augmentation de la diffusion des HAPs, mais surtout de leur biodisponibilité. Un procédé aérobie a donc été mis en œuvre permettant une décontamination partielle des HAPs (à 45°C). Toutefois, d'autres paramètres peuvent être testés pour optimiser le procédé de digestion mésophile (à 35°C) avec, entre autres, l'ajout de surfactants ou par l'ajout d'agent de solubilisation comme le méthanol.

G2. Influence de l'ajout d'activateurs de diffusion

Afin d'améliorer la biodisponibilité et donc l'élimination des HAPs du sein d'une matrice boue, de nombreux composés sont susceptibles d'améliorer la diffusion des HAPs au sein de la matrice solide. Les plus utilisés sont les surfactants, de par leurs propriétés de formation de micelles et donc de solubilisation des HAPs (Boochan et al., 1998 ; Chun et al., 2002 ; Grimberg et al., 1996 ; Paterson et al., 1999 ; Volkering et al., 1995). Les solvants possèdent également la particularité de solubiliser les HAPs dans un milieu aqueux (technique d'extraction dite « à froid ») (Miège, 1999). Au cours de cette étude, il fut étudié l'influence de ces deux types de composés au travers de l'influence de l'ajout de trois surfactants non ioniques (Brij35, TergitolNP10 et Tyloxapol) et de méthanol au cours de la digestion anaérobie et aérobie des boues. De plus, dans un essai préliminaire, l'ajout d'un activateur potentiel de la solubilisation des HAPs fut également étudié : l'antimousse □EMAZUR™. Ajouté en continu dans les réacteurs aérobies, ce tensioactif pourrait présenter des effets sur la solubilisation des HAPs en se complexant avec ceux-ci (effet de dissolution des micelles). Ainsi, dans un essai préliminaire, l'ajout d'un tel composé sous conditions anaérobies fut testé.

G2-1. Essai préliminaire - Ajout d'antimousse KEMAZUR™ sous conditions anaérobies

G2-1-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion

Afin de confirmer l'anaérobiose stricte du réacteur étudié, les conditions de méthanogénèse furent globalement vérifiées par mesure du flux de production en biogaz et par la composition de ce dernier. Les rendements en biogaz furent d'environ : 854 ± 60 ml.g_{MSdégradée}⁻¹ ou 388 ± 31 ml.g_{DCOdégradée}⁻¹, avec un taux de méthane dans le biogaz d'environ $71,3 \pm 3,8$ %. Les performances de réduction des MS furent d'environ $3 \square 8 \pm 1,6$ % et en DCO de 67 ± 7 %. Les performances de réduction des MS restent relativement faibles par rapport à ce qui avait été mesuré dans le réacteur de base de comparaison ADA□0 ($56,1 \pm \square 1$ %), mais le rendement en biogaz est assez élevé. Ces différences de performances de dégradation sont vraisemblablement dues non seulement à une dégradation partielle de l'antimousse ajouté (de nature inconnue), mais également à une activité méthanogène distincte entre les deux écosystèmes (ADA□EM et ADA□0).

G2-1-2. Influence de l'antimousse KEMAZUR™ sous conditions anaérobies sur les performances d'élimination des HAPs

Les performances d'élimination des HAPs dans les réacteurs ADA□EM et ADA□0 (base de comparaison) sont présentées sur la **Figure G17**. Les performances obtenues pour le réacteur ADA□EM sont significativement plus faibles que dans le cas du réacteur ADA□0. La réduction des performances pour chaque HAP n'a pu être corrélée avec aucun facteur physique mesuré, comme le poids moléculaire de l'HAP considéré, sa concentration, sa solubilité dans l'eau ou son coefficient de partition avec la matière organique. Si le □EMAZUR™ possédait une influence sur la solubilisation des HAPs, une corrélation particulière avec les propriétés physico-chimiques de ces composés aurait dû être observée (comme dans le cas de l'effet de la température où les pertes abiotiques sont dépendantes du poids moléculaire des HAPs). Or, comme il l'a été montré précédemment, l'ajout de ce composé semble perturber significativement l'écosystème anaérobie qui présente, dans ce cas, une activité méthanogène bien distincte. Les résultats obtenus pourraient donc provenir d'une perturbation à différents niveaux des micro-organismes impliqués dans l'élimination des HAPs. L'ajout d'une source de carbone extérieure ou d'une substance toxique pourraient en effet favoriser le développement des micro-organismes non dégradants à l'instar de ceux sélectionnés pour dégrader les HAPs (peu sélectifs puisque peu concentrés). De la même manière, le calcul du facteur d'efficacité confirme cette hypothèse en montrant l'influence de l'ajout de □EMAZUR™ tout en s'affranchissant du taux de réduction des MS (voir **Figure G18**).

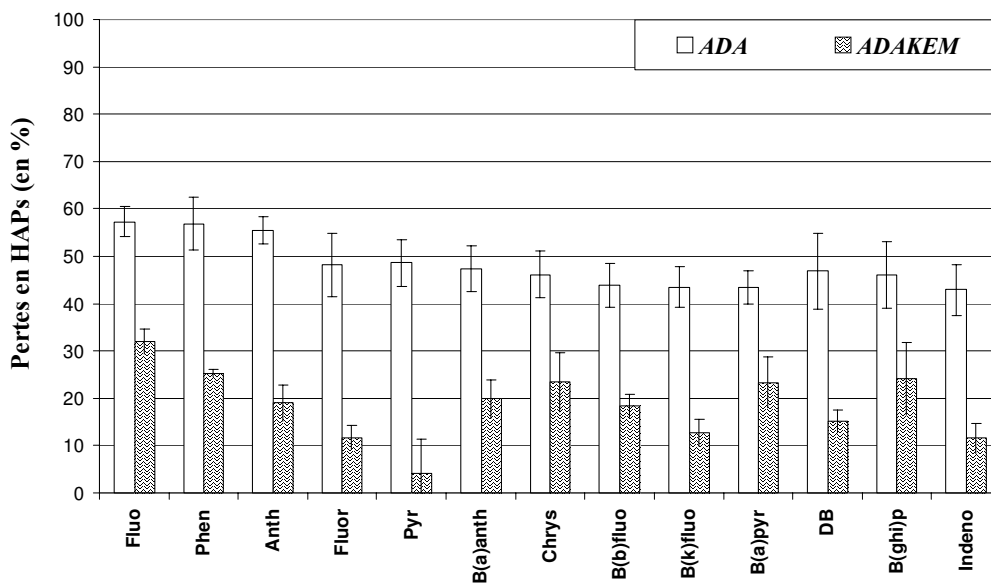


Figure G17 : Pertes apparentes en HAPs dans le cas d'un réacteur anaérobie (ADA) et supplémenté avec de l'antimousse (ADA□EM).

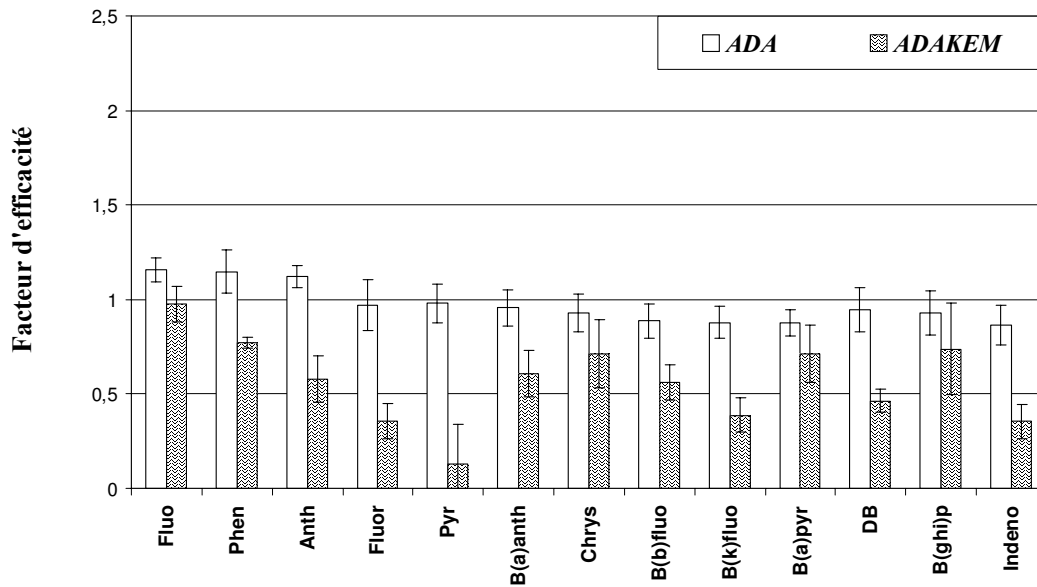


Figure G18 : Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas d'un réacteur anaérobie (ADA) et supplémenté avec de l'antimousse (ADAKEM)

En conclusion, la présence d'antimousse \square EMAZUR™ au sein de réacteurs de digestion anaérobie ne permet pas d'améliorer les performances d'élimination biologique des HAPs et ne peut expliquer à lui seul les différences de performances mesurées entre les réacteurs anaérobies et aérobie. Toutefois, il est intéressant de noter que le mode d'action de ce composé, réduisant significativement l'élimination des HAPs, semblerait plus lié à des limitations biologiques dues à une perturbation de l'écosystème anaérobie qu'à des facteurs physico-chimiques (pas de corrélation particulière mise en évidence). Le \square EMAZUR™ ne semble pas posséder d'influence particulière sur la solubilisation des HAPs et, afin d'améliorer leur biodisponibilité, d'autres composés peuvent être ajoutés au milieu réactionnel comme les surfactants.

G2-2. Ajout de surfactants non ioniques

Utilisés à l'origine pour solubiliser les graisses, les surfactants permettent également d'augmenter sensiblement les concentrations en HAPs dans l'eau, favorisant ainsi leur biodisponibilité et leur diffusion en milieu aqueux (Bury et Miller, 1993 ; Grimberg et al., 1996 ;

Volkering et al., 1995 ; Willumsen et Arvin, 1999 ; Yeom et Ghosh, 1998). Dans ce cadre d'études, trois surfactants non ioniques furent choisis pour leur faible toxicité, par rapport aux surfactants anioniques ou cationiques, vis à vis de souches pures dégradantes des HAPs (*Stenotrophomonas maltophilia*) et pour des concentrations allant jusqu'à 10 g.l⁻¹ (Boochan et al., 1998). Les trois surfactants choisis sont le Brij35, le Tergitol-NP10 et le Tyloxapol. Formant facilement des micelles de solubilisation, les concentrations micellaires critiques (CMC) de ces composés sont, en milieu aqueux, d'environ 75 mg.l⁻¹ (Brij35), 45 mg.l⁻¹ (Tergitol-NP10) et 75 mg.l⁻¹ (Tyloxapol) (Boochan et al., 1998).

La concentration opérationnelle en surfactants dans les boues fut déterminée par les contraintes analytiques liées à leur présence dans les échantillons. En effet, pour des concentrations supérieures à 1 g.l⁻¹, l'extraction des HAPs de la phase aqueuse est bloquée au niveau du passage de la colonne SPE par la formation d'une émulsion (pour le Brij35 et le Tyloxapol). Considérée comme une limite d'ordre technique, la concentration dans les réacteurs de chaque surfactant a donc été fixée à 1g.l⁻¹, afin de permettre la détermination des concentrations en HAPs dans la phase aqueuse. Cette concentration en surfactants reste toutefois largement suffisante pour former des micelles de solubilisation et favoriser la diffusion des HAPs (entre 10 et 100 fois la CMC).

Concernant les concentrations en HAPs de la phase aqueuse et pour l'ensemble des essais en présence de surfactants (à 1g.l⁻¹), celles-ci correspondent au maximum à 3 % des HAPs totaux (fraction liquide et solide), alors qu'elles étaient non détectables sans surfactant. L'ajout de ces agents solubilisant possède donc une influence significative sur la désorption de ces composés dans la phase aqueuse de l'échantillon. Toutefois ces valeurs restent relativement négligeables par rapport aux quantités totales en HAPs et vis à vis des performances d'élimination biologique des écosystèmes anaérobies et aérobies (de l'ordre de 50 %) (voir **Tableau G1a,b,c**).

Tableau G1a,b,c: Concentrations en HAPs mesurées dans la phase liquide aqueuse par comparaison avec les concentrations retrouvées dans la phase solide pour le BRJ 35 (G1a), Tergitol-NP10 (G1b) et pour le Tyloxapol (G1c) à 1g.l^{-1} .

a.

HAPs :	Fluo	Phé	Anth	Fluor	Pyr	B(a)A	Chrys	B(b)F	B(k)F	B(a)P	DB	B(ghi)P	Ind
Concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$) Solide	12,0	53,2	18,1	209,6	214,3	156,8	177,7	219	82,4	129,4	11,5	86,3	113,1
Coccentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$) SPE	0,01	0,08	0	0	0,22	0,15	0,21	0	0	0,11	0,03	0,02	0,03
Proportion par rapport A la phase solide (en %)	0,1	0,1	0	0	0,1	0,1	0,1	0	0	0,1	0,3	0,05	0,05

b.

HAPs :	Fluo	Phé	Anth	Fluor	Pyr	B(a)A	Chrys	B(b)F	B(k)F	B(a)P	DB	B(ghi)P	Ind
Concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$) Solide	9,8	92,3	11,9	195,9	181,8	100,7	86,4	101,8	43	97,1	18,1	46,5	52,49
Coccentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$) SPE	0	2,1	0	3,29	4,82	2,28	2,41	2,75	0,84	1,87	0,24	0,5	0,5
Proportion par rapport à la phase solide (en %)	0	2,3	0	1,7	2,6	2,3	2,8	2,7	1,9	1,9	1,3	1,1	0,9

c.

HAPs :	Fluo	Phé	Anth	Fluor	Pyr	B(a)A	Chrys	B(b)F	B(k)F	B(a)P	DB	B(ghi)P	Ind
Concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$) Solide	12,2	53,9	18,8	255	328,4	181	194,3	225,5	85,5	194,8	34,6	90,7	116
Coccentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$) SPE	0	1,77	0,46	2,66	7,89	3,58	3,83	3,86	1,31	3,82	0,7	1,08	1,32
Proportion par rapport à la phase solide (en %)	0	3,2	2,4	0,1	2,4	1,98	1,97	1,7	1,5	1,96	2	1,2	1,1

G2-2-1 . Influence des surfactants sous conditions anaérobies

◆ Confirmation des conditions de méthanogénèse

Au cours de l'étude portant sur l'influence de la présence de surfactants au cours de la digestion de boues contaminées, trois réacteurs anaérobies furent mis en œuvre : les réacteurs ADABR□ (Brij35 à 1g.l^{-1}), ADATERG□ (Tergitol à 1g.l^{-1}) et ADATYLO□ (Tyloxapol à 1g.l^{-1}). Les conditions de méthanogénèse de ces réacteurs furent vérifiées par la mesure du flux de production en biogaz et de sa composition. Les rendements en biogaz produit furent, à titre indicatif, de respectivement pour ADABR□, ADATERG□ et ADATYLO□, $709 \pm 40 \text{ ml.gMSdégradée}^{-1}$; $1348 \pm 110 \text{ ml.gMSdégradée}^{-1}$; $576 \pm 35 \text{ ml.gMSdégradée}^{-1}$ (ou $66 \pm 31 \text{ ml.gDCOdégradée}^{-1}$; $59 \pm 40 \text{ ml.gDCOdégradée}^{-1}$; $95 \pm 18 \text{ ml.gDCOdégradée}^{-1}$). Ces rendements, élevés par rapport au digesteur de comparaison ADA□0, restent fortement dépendants de la nature du surfactant et peuvent traduire une dégradation partielle de ceux-ci au cours du procédé. Afin de confirmer les bonnes conditions de digestion méthanogène, la composition du biogaz,

normalement comprise entre 70 et 75 %, fut également déterminée. Elle fut respectivement de : $70,6 \pm 0,8$ % ; $71,8 \pm 0,6$ % ; $70,7 \pm 0,4$ % et reste hautement caractéristique de bonnes conditions méthanogènes.

Concernant la dégradation de la pollution carbonée, les réacteurs ADABR□, ADATERG□ et ADATYLO□ ont présenté des taux de réduction en matières sèches relativement faibles de, respectivement, $0,8 \pm 6,1$ % ; $35,4 \pm 0,9$ % et $37,3 \pm 0,8$ % et en matières organiques de, respectivement $56,9 \pm 0,7$ % ; $53,8 \pm 3,8$ % ; $55,5 \pm 0,1$ %. Ainsi, en moyenne, le rapport MO / MS passe d'environ 70 % dans le substrat à 56 % dans le digestat (boues après traitement). A noter que ces mêmes réacteurs ont également présentés des taux de dégradation de la DCO de $51,5 \pm 5$ % ; $60,4 \pm 8$ % ; $50,0 \pm 5$ %.

Ainsi, d'un point de vue performances générales de méthanogénèse, l'ensemble de ces réacteurs semblent présenter des performances de digestion relativement similaires avec une augmentation du rendement en biogaz lors de l'ajout de Tergitol. Cependant, il est à noter que les taux de réduction des MS, comme dans le cas de l'ajout de □EMAZURTM, paraissent relativement faibles (de 0,8 % à 37 %) par rapport au réacteur de base ADA□0 ($56,1 \pm 0,1$ %). Ce résultat peut traduire une certaine évolution de l'écosystème méthanogène, comme dans le cas précédent du réacteur ADA□EM, par apport de matières biodégradables supplémentaires.

◆ Influence des surfactants sur les performances d'élimination des HAPs sous conditions anaérobies méthanogènes

Dans un premier temps, il a été observé que la présence de Tyloxapol ou de Tergitol dans les échantillons de boues interfère avec l'analyse du Fluorène (présence d'un pic parasite masquant la présence de Fluorène). Ce composé n'a donc pas pu être dosé au cours de l'étude des réacteurs ADATERG□ et ADATYLO□. A l'exception de ce composé et de ces surfactants, les analyses des autres HAPs ont été réalisées sans incident. Les performances apparentes d'élimination des HAPs des réacteurs ADABR□, ADATERG□ et ADATYLO□ ont donc été comparées au réacteur servant de base de comparaison : le réacteur ADA□0 (mésophile à 35°C sous un temps de séjour de 10 jours). Les résultats sont présentés sur la **Figure G19**.

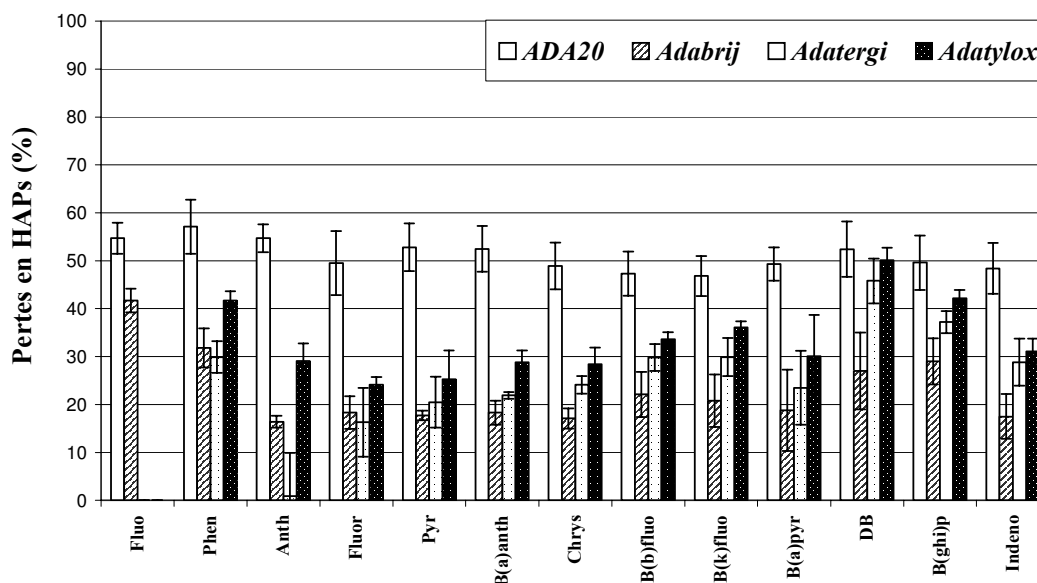


Figure G19 : Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs biologiques anaérobies de base (ADA□0) ou supplémentés avec un surfactant non ionique, soit du Brij35 (ADABR□), soit du Tergitol-NP10 (ADATERG□) soit du Tyloxapol (ADATYLO□).

Les résultats obtenus montrent que, sur l'ensemble des essais effectués, l'ajout de surfactants tend à réduire significativement le potentiel d'élimination des HAPs sous conditions anaérobies, à l'exception du Dibenzo(ah)anthracène. Or, les performances générales de méthanogénèse sont également significativement réduites suite à l'ajout de ces composés au sein du réacteur de digestion (taux de réduction en MS relativement faibles). De plus, les performances d'élimination des HAPs ne paraissent pas présenter de corrélation particulière avec le poids moléculaire ou la concentration en HAPs dans les boues (possibilité de fortes variations de performances d'un HAP sur l'autre). Ainsi, comme dans le cas du réacteur ADA□EM, sous ces conditions et à cette concentration en surfactants, l'écosystème anaérobie semblerait perturbé suite à l'addition d'une source de carbone supplémentaire dans le milieu réactionnel ou suite à une possible toxicité des surfactants vis à vis de certains micro-organismes. En effet, il est couramment admis que l'action globale d'un surfactant sur l'élimination des HAPs est généralement le résultat d'une toxicité vis à vis des micro-organismes dégradants et de la solubilisation des HAPs (Stelmack et al., 1999). Par sélection de certains micro-organismes (source de carbone apportée par les surfactants) et par inhibition de la croissance d'autres, l'écosystème anaérobie peut donc se trouver partiellement perturbé dans sa composition et donc dans ces performances avec, entre autres, l'élimination des HAPs (peu sélectifs au regard des faibles concentrations rencontrées).

Pour confirmer cette observation et ces essais possédant des taux de réduction en matières sèches différents, il semble plus intéressant de comparer le facteur d'efficacité d'élimination des HAPs du sein même de la matrice solide (voir **Figure G20**).

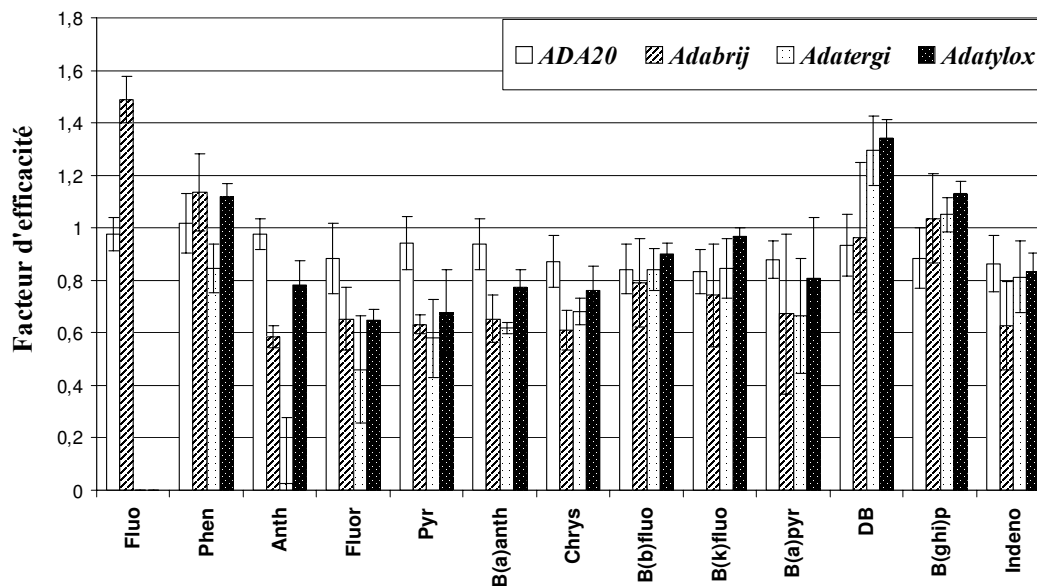


Figure G20 : Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas de réacteurs biologiques anaérobies de base (ADA□0) ou supplémentés avec un surfactant non ionique, soit du Brij35 (ADABR□J), soit du Tergitol-NP10 (ADATERG□) soit du Tyloxapol (ADATYLO□).

La comparaison des facteurs d'efficacité entre les réacteurs ADA□0, ADABR□J, ADATERG□et ADATYLO□, montre que, dans la majorité des cas, la présence de surfactants dans le milieu réactionnel ne favorise pas l'élimination des HAPs, à l'exception de deux HAPs : le Dibenzo(ah)anthracène et le Benzo(ghi)pérylène, notamment en présence de Tergitol ou de Tyloxapol. Ces résultats suggèrent que les différents micro-organismes impliqués dans l'élimination des HAPs et, plus généralement dans la méthanogénèse, possèdent une sensibilité différente vis à vis des composés apportés au milieu (comme pour le cas du réacteur avec du □EMAZUR™). En effet, d'un HAP sur l'autre, les performances d'élimination peuvent être fortement variables. De plus, en fonction de la nature du surfactant apporté, les performances d'élimination peuvent être plus ou moins affectées. Dans le cas de l'ajout de BR□J35, la présence de ce surfactant ne favorise que l'élimination du Fluorène et dans une moindre mesure du Phénanthrène. Pour les autres HAPs, les performances restent sensiblement équivalentes aux niveaux de base pour les plus gros HAPs (ADA□0), voire plus faibles pour certains HAPs de taille intermédiaire (de l'Anthracène au Benzo(a)pyrène).

De plus, dans le cas de l'ajout de Tergitol et de Tyloxapol dans le milieu réactionnel, il a été observé une amélioration significative des performances d'élimination du Dibenzo(ah)anthracène et du Benzo(ghi)pérylène. Le facteur d'efficacité atteint une valeur proche de 1,4 traduisant ainsi une certaine solubilisation de ces composés par rapport au taux de réduction des MS. Dans ces deux cas, le potentiel biologique d'élimination semble faiblement influencée par la présence de ces surfactants. Ainsi, en conclusion, le résultat global de l'action de chaque surfactant s'avère relativement spécifique à chaque HAP, en fonction de la sensibilité plus ou moins importante des micro-organismes mis en jeu, dans le cas d'un écosystème de digestion anaérobie.

G2-2-2. Influence des surfactants sous conditions aérobies

Comme dans le cas des réacteurs anaérobies présentés ci-dessus, la présence de surfactants dans le milieu réactionnel fut testée sous conditions aérobies afin d'améliorer les performances d'élimination des HAPs du sein même de la matrice. Les surfactants utilisés, le Brij35 (AéroBR□), le Tergitol NP10 (AéroTERG□) et le Tyloxapol (AéroTYLO□), sont ajoutés au milieu réactionnel à hauteur de 1g.l^{-1} dans le substrat d'alimentation.

◆ Confirmation des conditions aérobies de digestion

Les conditions d'aérobiose stricte (concentration saturante en oxygène dans le milieu ($7,5\text{mgO}_2\text{.l}^{-1}$)) furent périodiquement vérifiées au sein même des réacteurs mis en œuvre. □ fut donc considéré que les conditions d'aération ne furent pas limitantes dans le cas de ces réacteurs d'étude.

Les performances de dégradation globales furent relativement constantes entre les essais, avec une réduction des MS de l'ordre de, respectivement pour AéroBR□, AéroTERG□ et AéroTYLO□ : $44,5 \pm 4,9\%$; $35,4 \pm 5,3\%$; $47 \pm \square\%$. L'écosystème aérobie semble donc moins influencée par la présence de surfactants que l'écosystème anaérobie, les résultats observé restant dans l'ordre de grandeur d'une digestion aérobie de boues (autour de 41 % pour le réacteur Aéro). Par ailleurs, la dégradation de la DCO reste relativement constante entre les essais, avec, respectivement, des taux de dégradation de $66,6 \pm 4,\square$; $63,5 \pm 4,5$; $65 \pm 3,5\%$.

D'un point de vue performances générales, il peut en être conclu que les trois essais restent dans l'ordre de grandeur du procédé de digestion aérobie servant de base de comparaison (Aéro), la présence de surfactant influençant peu les performances générales des réacteurs aérobies.

◆ Influence des surfactants sur les performances d'élimination des HAPs sous conditions aérobies

Dans un premier temps, les performances d'élimination des réacteurs ADABR□, ADATERG□ et ADATYLO□ furent déterminées (voir Figure G21). A noter, que comme sous conditions anaérobies, la présence des surfactants Tergitol et Tyloxapol ne permet pas de déterminer les concentrations et donc les performances d'élimination du Fluorène au cours du procédé de digestion. Les résultats montrent que tous les surfactants provoquent une amélioration significative des performances d'élimination des HAPs, surtout pour les plus gros HAPs (du Dibenzo(ah)anthracène à l'Indeno(1,2,3-cd)pyrène). L'ordre décroissant d'influence des surfactants est le suivant : 1. le Brij35 qui favorise l'élimination de l'ensemble des HAPs, 2. le Tergitol aux performances intermédiaires puis 3. le Tyloxapol qui favorise essentiellement l'élimination des HAPs les plus lourds. Ainsi, le Brij35 présentant la plus grande influence, près de 80 % des HAPs les plus lourds sont susceptibles d'être éliminés sous conditions aérobies en présence de ce surfactant.

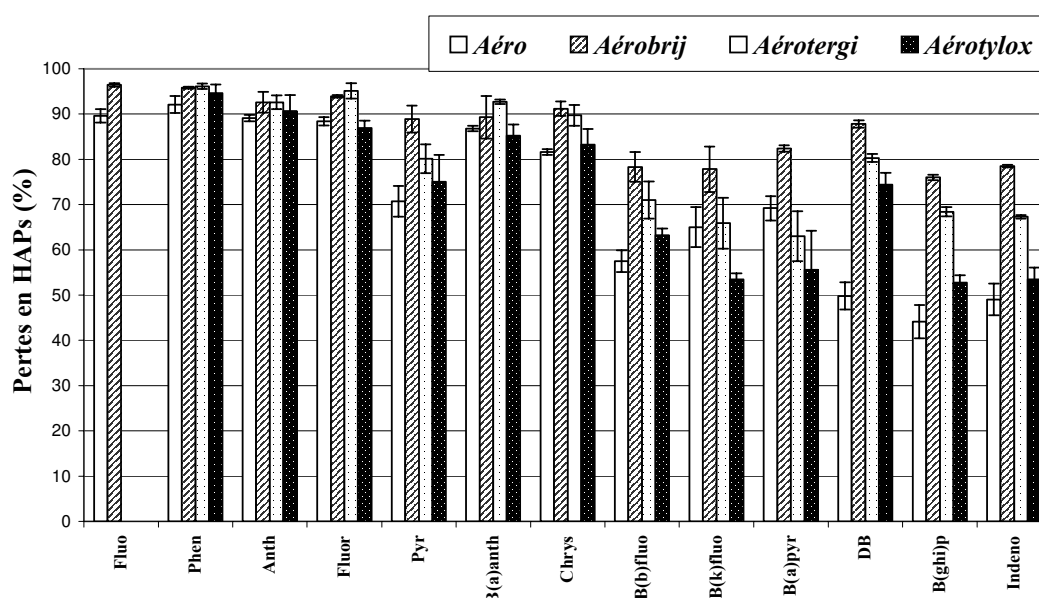


Figure G21 : Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs biologiques aérobies de base (Aéro) ou supplémentés avec un surfactant non ionique, soit du Brij35 (AéroBR□), soit du Tergitol-NP10 (AéroTERG□) soit du Tyloxapol (AéroTYLO□).

Toutefois, comme il l'a été vu précédemment, les performances de réduction des MS présentent une variation de près de 10 % entre les essais. Il semble donc nécessaire de comparer les facteurs d'efficacité entre les différentes expérimentations (voir Figure G22). La comparaison des différents facteurs d'efficacité montre qu'après s'être affranchi du taux de réduction des solides, le surfactant Brij35 n'améliore la diffusion que des HAPs les plus lourds par rapport au réacteur Aéro (du Dibenzo(ah)anthracène à l'indeno(1,2,3-cd)pyrène). L'augmentation mesurée des performances totales d'élimination n'était donc que le résultat de l'amélioration des performances de réduction des solides en présence de ce surfactant.

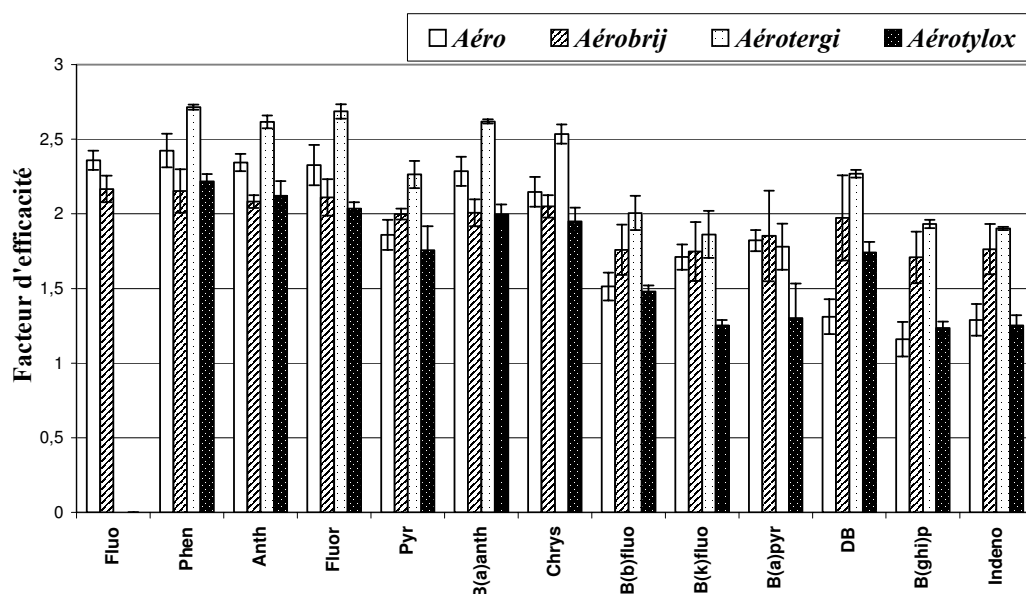


Figure G22 : Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas de réacteurs biologiques aérobies de base (Aéro) ou supplémentés avec un surfactant non ionique, soit du Brij35 (AéroBR), soit du Tergitol-NP10 (AéroTERG) soit du Tyloxapol (AéroTYLO).

En outre, dans le cas du réacteur AéroTERG, alors qu'il ne présentait que peu de différences avec le réacteur de base Aéro (voir Figure G21), la plupart des facteurs d'efficacité sont significativement supérieurs à ceux rencontrés dans les autres réacteurs, à l'exception du Benzo(k)fluoranthène et du Benzo(a)pyrène. Enfin dans le cas du réacteur AéroTYLO, l'action du Tyloxapol dépend fortement de la nature de l'HAP considéré. Toutefois, pour la plupart des HAPs, il semble que ce surfactant ne présente pas de gain de performances, à l'exception du Dibenzo(ah)anthracène, et, à l'inverse, avec deux composés où les performances sont partiellement réduites : le Benzo(k)fluoranthène et le Benzo(a)pyrène. Dans les trois cas, l'inconstance de l'influence de ces surfactants, pourtant non sélectifs, peut être directement la conséquence, comme il l'a été suggéré sous conditions anaérobies, d'une sensibilité différentes vis à vis des surfactants par les divers micro-

organismes impliqués dans l'élimination des HAPs (probable toxicité des surfactants vis à vis de certains micro-organismes ou sélection d'autres par l'apport d'une source de carbone additionnelle). D'autre part, il avait été précédemment remarqué qu'il existait une valeur seuil sous aérobiose autour de $\square 4$ qui pouvait être repoussée à $\square 6$ sous des conditions de températures plus élevées (45 et 55°C) c'est à dire après amélioration du transfert des HAPs de leur matrice. \square apparaît ici qu'en présence de surfactant, le facteur d'efficacité peut atteindre une valeur seuil de plus de $\square 7$ pour le Tergitol et pour les plus petits HAPs. La présence de ce surfactant améliore donc la solubilisation de certains HAPs lors de la digestion des boues contaminées (Phénanthrène, Anthracène, Fluoranthène, Benzo(a)anthracène). De la même manière, la présence de Brij35 et de Tergitol dans le milieu réactionnel améliore significativement la dissolution des plus gros HAPs, avec un facteur d'efficacité qui passe de 1-1, \square à plus de \square (du Dibenzo(ah)anthracène à l'indeno(1,2,3-cd)pyrène).

En conclusion, la présence de surfactants dans le milieu réactionnel de digestion de boues contaminées en HAPs ne possède une influence significative et bénéfique sur leur élimination que sous conditions aérobies. En effet, sous conditions anaérobies, il semblerait que les micro-organismes dégradants et la flore totale soient plus sensibles à la présence de surfactants dans le milieu présentant alors un effet négatif sur les performances d'élimination des HAPs. \square a été suggéré que l'ajout en surfactant pouvait soit perturber le consortium anaérobie en modifiant le profil microbien total par simple apport d'une source de carbone supplémentaire, soit présenter un effet toxique sur les micro-organismes dégradants. De plus, l'influence du surfactant sur l'amélioration de la disparition de l'HAP est grandement variable. \square semblerait donc que l'action globale d'un surfactant sur l'augmentation de la biodisponibilité d'un HAPs soit un résultat dynamique entre la dissolution de ce composé et la relative sélection (maintien ou toxicité) sur les micro-organismes le dégradant. Dans la littérature, il est fréquemment démontré des effets inverses pour un même HAP et un même surfactant présentant une action soit activatrice, soit inhibitrice, soit nulle, la résultante dépendant des HAPs étudiés, des micro-organismes et des voies métaboliques mises en jeu (Acquaviva et al., 2001 ; Liu et al., 1995 ; Mueller et al., 1997 ; Stelmack et al., 1999). L'impact positif ou négatif d'un surfactant serait le résultat dynamique entre d'une part une inhibition ou un effet toxique sur la croissance des micro-organismes dégradants, et d'autre part une augmentation des performances d'élimination par une amélioration de la solubilisation des HAPs dans la phase aqueuse (Stelmack et al., 1999).

A noter toutefois que ces essais ont été réalisés uniquement dans le but d'étudier l'influence de tels surfactants sur la solubilisation des HAPs en milieu complexe, comme les boues. En dépit des performances de décontamination élevées en présence de Tergitol, l'ajout de surfactants à l'échelle industrielle paraît peu envisageable au regard des fortes conséquences environnementales engendrées par l'utilisation de ce type de composé. Toutefois, ces essais ayant été réalisés avec un objectif prospectif, il apparaît que, sous conditions aérobies, il peut s'agir d'une voie possible de développement de procédés de décontamination, sous réserve d'étudier d'autres types de surfactants, plus facilement biodégradables et naturels, comme les biosurfactants (Kanaly et Harayama, 2000 ; Noordman et al., 1998 ; Zhang et al., 1997). D'autre part, la solubilisation des HAPs peut également être réalisée à partir de composés plus facilement biodégradables, comme le méthanol.

G2-3. Ajout d'un agent solubilisant : le méthanol

Afin d'activer les performances de digestion par l'amélioration du transfert de matière, il a été envisagé d'ajouter aux boues des composés favorisant la diffusion des HAPs au sein même de la matrice, c'est à dire en réalisant une pré-extraction à l'aide d'un solvant approprié. Or, le méthanol constitue un solvant particulièrement employé à l'échelle industrielle comme source de carbone externe dans les bassins biologique de dénitrification (Halling-Sorensen, 1993 ; Randall et al., 1992 ; Sedlak, 1991). De plus, le méthanol possède la particularité d'augmenter la solubilité des HAPs dans l'eau. Ainsi, il a été choisi d'étudier l'influence du méthanol sur les performances d'élimination des HAPs sous conditions anaérobies et aérobies. Ce composé fut donc ajouté à hauteur de $7,8 \text{ g.l}^{-1}$ afin d'apporter une charge ajoutée maximale équivalente en DCO de $0,5 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{l}^{-1}.\text{j}^{-1}$ au système anaérobie et éviter ainsi une surcharge du réacteur conduisant à l'arrêt de la méthanogénèse (la charge appliquée totale est alors d'environ $1,5$ à $1,8 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{l}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Les réacteurs anaérobie et aérobie sont dénommés, respectivement, ADAMET et AéroMET. A noter que, pour les deux réacteurs, la concentration en méthanol dans le réacteur est négligeable ($< 0,1 \text{ g.l}^{-1}$), celui-ci étant vraisemblablement dégradé très rapidement au cours du processus de digestion.

G2-3-1. Influence de l'ajout de méthanol sous conditions anaérobies

◆ Confirmation des conditions de méthanogénèse

De même que pour l'ensemble des réacteurs anaérobies méthanogènes, les conditions de méthanogénèse furent vérifiées par mesure des rendements en biogaz et de la teneur en méthane de celui-ci : les rendements furent d'environ (tenant compte de la quantité de méthanol ajouté) : $511 \pm 60 \text{ ml.gMSdégradée}^{-1}$ ou $611 \pm 6 \text{ ml.gDCOdégradée}^{-1}$, avec un taux de méthane dans le biogaz de $70,9 \pm 3 \%$. Ces valeurs restent caractéristiques des performances générales sous conditions méthanogènes (pour le réacteur de base ADA0 : $457 \text{ ml.gMSdégradée}^{-1}$ et $369 \text{ ml.gDCOdégradée}^{-1}$). A noter que le rendement en DCO du réacteur ADAMET est particulièrement élevé et proche de la valeur théorique sur milieu synthétique de $600\text{-}650 \text{ ml.gDCOdégradée}^{-1}$, et vraisemblablement dû à la présence de méthanol facilement dégradé.

Les performances de réduction des MS furent d'environ $30,9 \pm 1,9 \%$ et en DCO de $51,7 \pm 6 \%$ et restent relativement faibles au regard de ce qui avait été mesuré dans le réacteur de base de comparaison ADA0 (taux de réduction des MS de $56,1 \pm 1 \%$). Comme pour les cas précédents, il semblerait que l'écosystème anaérobie soit particulièrement perturbé par le changement environnemental dû à l'ajout d'une source de carbone externe comme le méthanol.

◆ Influence de l'ajout de méthanol sur les performances d'élimination des HAPs sous conditions anaérobies

Dans un premier temps, la détermination des HAPs de la fraction aqueuse (par extraction sur colonne SPE) a montré que, malgré la présence de méthanol, les quantités d'HAPs retrouvés dans l'eau n'étaient pas détectables.

Ainsi, après avoir réalisé le bilan sur la fraction totale en HAPs, les performances totales d'élimination ont été calculées (voir **Figure G23**). Ces résultats montrent que, dans leur globalité, les pertes en HAPs sont majoritairement plus faibles en présence de méthanol. Toutefois, au regard du faible taux de réduction des solides du réacteur ADAMET, il est nécessaire d'étudier l'influence du méthanol à l'aide du facteur d'efficacité d'élimination (voir **Figure G24**). Ainsi, après s'être affranchi du taux de réduction des solides, les résultats montrent que la présence de méthanol entraîne une certaine perturbation de l'écosystème vis à vis de l'élimination des HAPs. Toutefois, cet aspect est fortement dépendant de l'HAP étudié, et il apparaît que, pour le Fluorène et pour le Chrysène, les performances d'élimination de ces

deux HAPs au sein même de la matrice boue sont fortement améliorées. En effet, le facteur d'efficacité présenté par l'élimination du Fluorène est de près de 1,5 contre 1 pour l'ensemble des HAPs pour le réacteur ADA□0.

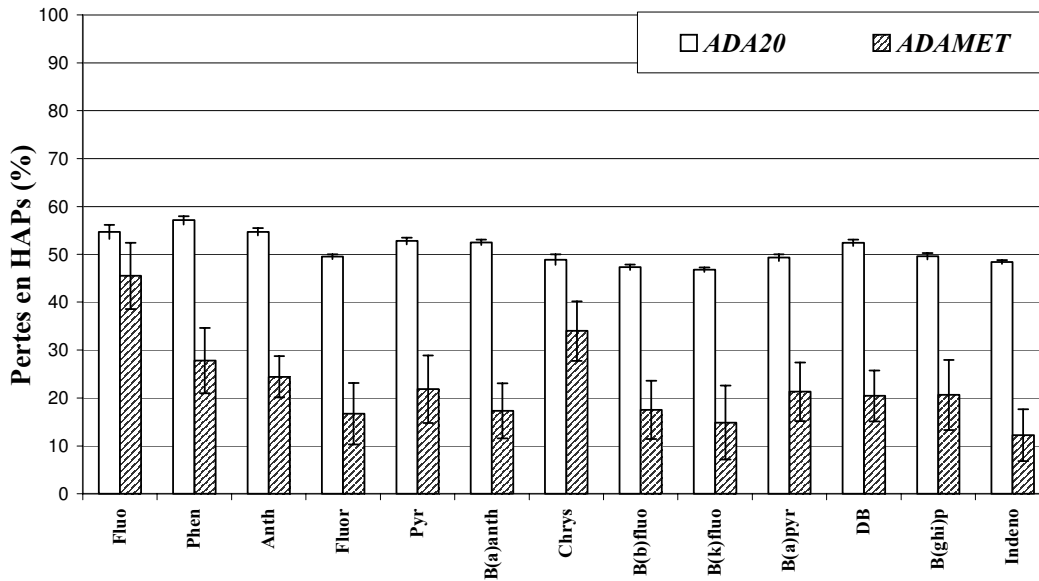


Figure G23 : Pertes apparentes des HAPs dans le cas d'un réacteur anaérobie supplémenté avec du méthanol (ADAMET) et du réacteur anaérobie de base (ADA□0).

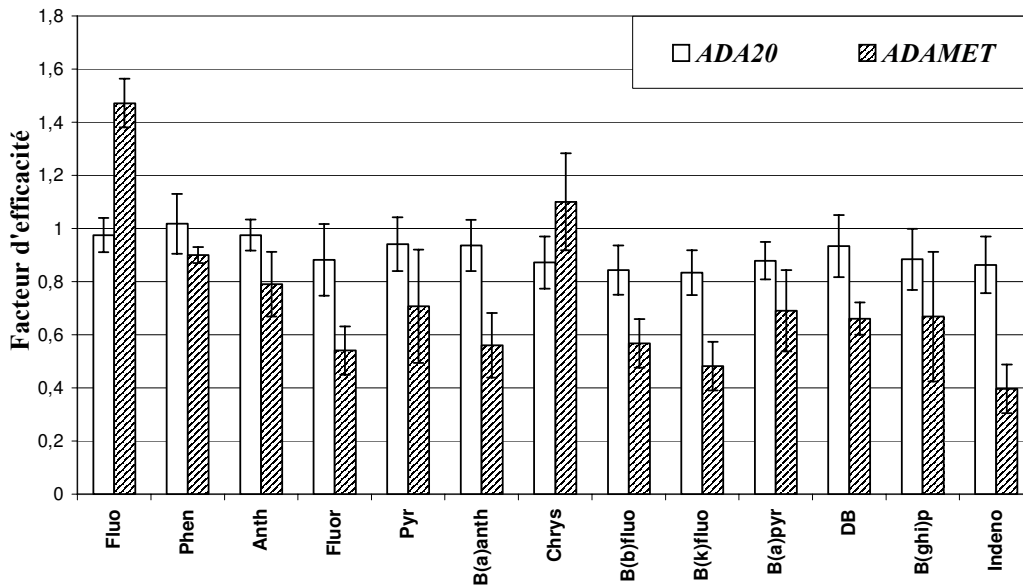


Figure G24 : Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas d'un réacteur anaérobie supplémenté avec du méthanol (ADAMET) et du réacteur anaérobie de base (ADA□0).

En conclusion, sous conditions anaérobies, il semblerait que le méthanol influence différemment les différentes voies d'élimination des HAPs. Or, le méthanol étant un composé

facilement dégradé, il est fort probable que l'ajout de méthanol influence fortement la sélection de micro-organismes au sein de l'écosystème anaérobie, à l'instar de ceux dégradants les HAPs. La perturbation de l'écosystème en place et une source de carbone plus facilement accessible (que les HAPs) ne favoriseraient pas l'installation de la communauté microbienne nécessaire à la dégradation des HAPs.

G2-3-2. Influence de l'ajout de méthanol sous conditions aérobies

◆ Caractérisation des conditions aérobies de digestion

Par mesure périodique du taux d'oxygène, il a été vérifié que les conditions d'aération ne furent pas limitantes dans le cas du réacteur AéroMET (environ 7,5 mg.l⁻¹). Les performances globales de dégradation de ce réacteur ont pour caractéristiques principales un taux de réduction des MS d'environ $5,35 \pm 4$ % et en DCO de $50,6 \pm 4$ %. Ces performances, plus faibles que ce qui avait été obtenu dans le cas du réacteur Aéro, sont vraisemblablement dues à la présence de méthanol dans le milieu utilisé comme principale source de carbone et réduisant les performances de dégradation des autres composés.

◆ Influence de l'ajout de méthanol sur les performances d'élimination des HAPs sous conditions aérobies :

Les performances d'élimination des HAPs sous conditions aérobies après ajout de méthanol furent déterminées (voir **Figure G25**). Contrairement à ce qui a été observé sous conditions anaérobies, les résultats montrent que l'influence du méthanol sur l'élimination des HAPs est particulièrement bénéfique dans tous les cas. En effet, elle permet d'augmenter les performances d'élimination des HAPs à environ 90 % jusqu'au Chrysène, avec un gain de 0 à 5 % pour les plus gros HAPs. Ainsi, l'influence du méthanol semble être relativement significative sur la diffusion et l'élimination des HAPs au sein même de la matrice boue.

Afin de confirmer ce résultat en s'affranchissant du taux de réduction des solides, un facteur d'efficacité fut calculé et est représenté sur la **Figure G26**. Il s'avère que le facteur d'efficacité atteint, de par le faible taux de réduction des solides et le fort potentiel d'élimination des HAPs, des niveaux relativement élevés avec une valeur seuil d'environ 3,5 pour les HAPs du Fluorène au Chrysène (contre 4 pour le réacteur de base et 6 en présence de surfactants). L'ajout de méthanol dans le milieu permet donc d'augmenter

significativement la diffusion des HAPs, et donc leur biodisponibilité au sein des réacteurs de digestion aérobie.

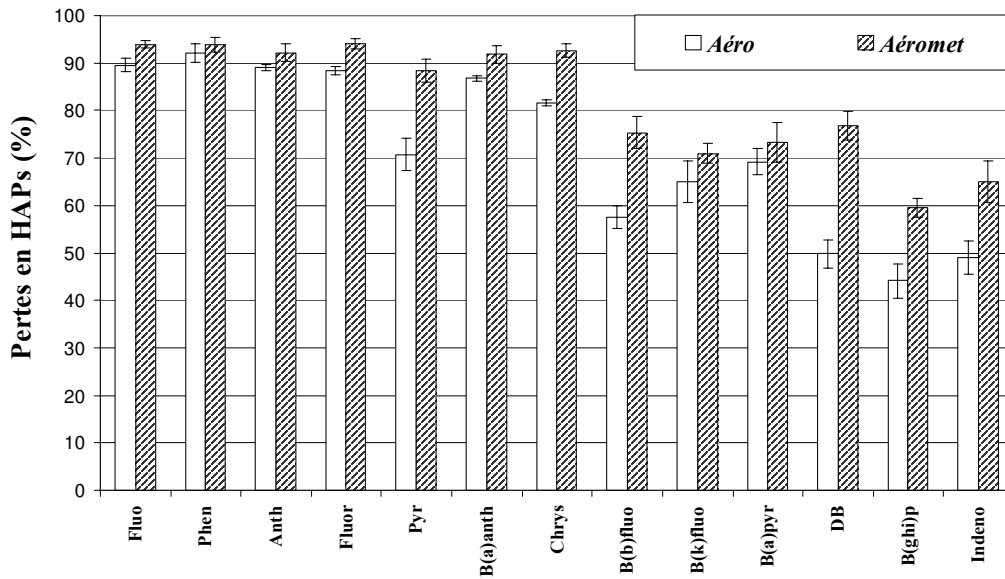


Figure G25 : Pertes apparentes en HAPs dans le cas d'un réacteur aérobie supplémenté avec du méthanol (AéroMET) et du réacteur aérobie de base (Aéro).

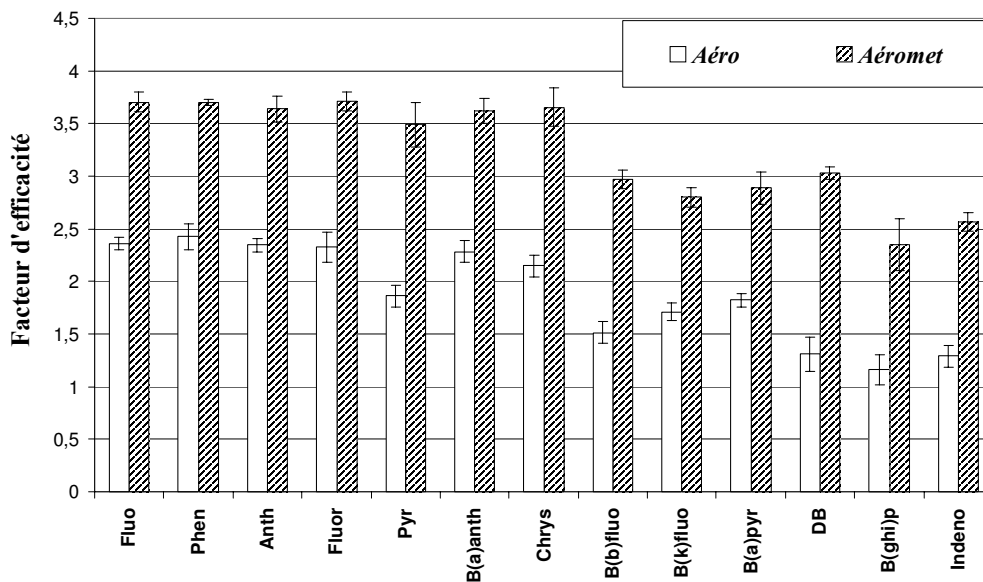


Figure G26: Facteurs d'efficacité d'élimination des HAPs dans le cas d'un réacteur aérobie supplémenté avec du méthanol (AéroMET) et du réacteur aérobie de base (Aéro).

De plus, il peut être souligné que la présence de méthanol dans le milieu réactionnel permet de réduire les concentrations brutes en HAPs au sein des boues d'un facteur de près de 3,5. Ainsi, les concentrations obtenues après traitement correspondent aux normes à venir concernant l'épandage des boues où la somme de 11 HAPs ne devra pas dépasser $6 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ (la somme des 13 HAPs étudiés est de moins de $15 \text{ mg.kg}_{\text{MS}}^{-1}$, après traitement) (à noter que le substrat en boues contaminées possède dans ce cas des concentrations en HAPs inférieures aux normes actuelles, mais que la somme des HAPs reste potentiellement supérieures aux normes à venir) (voir **Figure G27**).

Au regard de ces résultats, il est important de noter que le méthanol, solvant hautement toxique, est très rapidement dégradé au sein des réacteurs et ne se retrouve qu'en quantité négligeable après traitement. Ainsi, et contrairement à l'ajout de surfactants, il peut être envisagé d'utiliser ce type de procédé pour décontaminer les boues avant épandage.

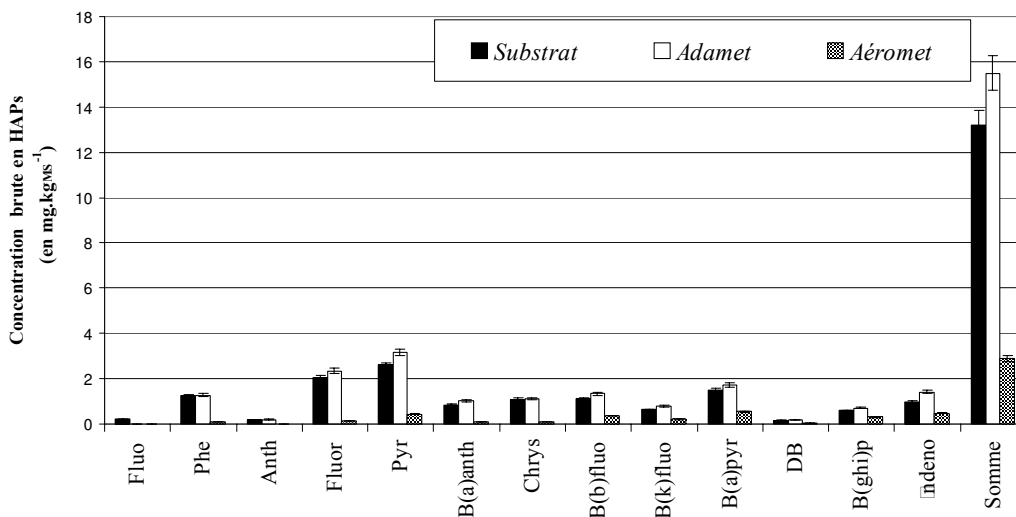


Figure G27 : Concentrations brutes en HAPs dans des boues contaminées avant traitement (Substrat) et en sortie de réacteur de digestion supplémenté avec du méthanol soit sous anaérobiose (ADAMET), soit sous aérobie (Aéromet)

En conclusion, sur l'ensemble des paramètres étudiés dans ce chapitre, il a été montré que certains facteurs pouvaient améliorer significativement la diffusion des HAPs au sein de la matrice boue, notamment la température et l'ajout de méthanol dans le digesteur. Peu applicable à l'échelle industrielle, les résultats obtenus en présence de surfactants montrent toutefois le potentiel intéressant de solubilisation des HAPs. Dans tous les cas, les conditions

aérobies paraissent particulièrement favorables à l'élimination des HAPs, dues aux aspects de transfert de matière (agitation mécanique et aération en continu). Certains procédés s'avèrent de plus particulièrement efficaces pour la décontamination des boues (à 45°C et en présence de méthanol). Par comparaison, la digestion anaérobie possède des performances d'élimination des HAPs relativement limitées, mais toutefois significatives. En effet, la mise en œuvre de digesteurs anaérobies permet d'éliminer approximativement autant d'HAP que de matières sèches au cours du traitement. Mais, les résultats obtenus ont montré que la digestion anaérobie reste plus sensible que la digestion aérobie aux changements environnementaux, comme la présence de surfactants ou de méthanol dans le réacteur. Toute perturbation de l'équilibre de l'écosystème anaérobie (source de carbone externe, toxicité possible des surfactants), entraîne une limitation des performances d'élimination des HAPs, ceux-ci étant en quantités insuffisantes pour permettre la sélection des micro-organismes dégradants. Un changement de la configuration physico-chimique des boues contaminées (prétraitement de broyage) peut également provoquer une perte totale des performances d'élimination des HAPs suite à l'augmentation des sites d'adsorption de ces composés dans les boues.

L'ensemble des observations rapportées sous conditions anaérobies reste toutefois d'ordre général et le devenir des HAPs, bien que dû à une certaine activité biologique, n'a pas encore été déterminé avec certitude. Or, il a été démontré dans cette étude, pour la première fois, une disparition significative des HAPs sous conditions méthanogènes. L'implication de l'écosystème et de l'activité biologique fut observée, mais il reste encore nécessaire de déterminer les micro-organismes impliqués, ainsi que le devenir exacte des HAPs sous conditions anaérobies méthanogènes (minéralisation, dégradation ou incorporation dans une fraction non extractible).

Chapitre H

Caractérisation du potentiel d'élimination des HAPs sous conditions anaérobies méthanogènes

Alors que la biodégradation des HAPs sous conditions aérobies a été largement étudiée au cours de ces dernières années et que leurs voies de dégradation sont désormais bien connues, peu de données sont actuellement disponibles concernant la biodégradation des HAPs sous conditions anaérobies. Au cours de cette étude et pour la première fois sous conditions anaérobies méthanogènes, il a été montré une disparition significative de l'ensemble des HAPs (cf Chapitre F). Afin de caractériser le devenir réel des HAPs dans ce système de digestion anaérobie de boues contaminées et la part de leur élimination liée à une activité biologique spécifique, ce chapitre présentera un ensemble d'expérimentations mis en œuvre dans le but de caractériser les phénomènes mis en jeu.

Pour cela, dans un premier temps, le devenir des HAPs au cours du traitement anaérobie sera déterminé par l'utilisation de radioéléments (exemple du Benzo(a)pyrène). Suite aux résultats obtenus, l'influence de l'adaptation de l'inoculum méthanogène de départ sera étudiée. Différents essais de bioaugmentation seront alors présentés, l'objectif étant de déterminer si la population bactérienne participant à la dégradation des HAPs est capable de se maintenir au sein d'un système complexe de digestion de boues. Ensuite, il sera mis en évidence l'implication de l'activité des bactéries méthanogènes dans les voies d'élimination des HAPs et la flore méthanogène archaea susceptible de participer à la dégradation des HAPs sera caractérisée et identifiée.

H1. Devenir du ¹⁴C-Benzo(a)pyrène sous conditions anaérobies méthanogènes

Les résultats obtenus précédemment (*cf. Chapitres F et G*) ont montré qu'une certaine activité biologique était impliquée dans l'élimination ou la transformation des HAPs au cours du procédé de traitement anaérobie méthanogène de boues contaminées. Une dégradation biologique des HAPs est fortement suspectée mais n'est pas encore réellement démontrée. L'objectif principal de l'étude présentée ci-dessous a donc été de décrire et de caractériser le devenir d'un HAP par un marquage radioactif (¹⁴C) au cours du procédé de digestion anaérobie : le ¹⁴C-Benzo(a)pyrène. Le mode d'étude des réacteurs fut le plus proche possible des réacteurs dits "froids" de digestion anaérobie méthanogène, réacteurs fonctionnant en mode continu. Pour cela, deux réacteurs furent mis en œuvre : l'un sous conditions stériles (réacteur témoin supplémenté avec de l'azide de sodium) et l'autre sous conditions anaérobies méthanogènes (réacteur biologique), le premier servant à estimer les pertes abiotiques dues au procédé et le second les pertes totales en ¹⁴C-Benzo(a)pyrène.

Avant toute analyse des résultats, il est nécessaire de rappeler que les réacteurs ont été initialement inoculés à l'aide d'un écosystème méthanogène "froid" et, également, qu'ils ont été continuellement alimentés avec un substrat supplémenté en ¹⁴C-Benzo(a)pyrène. A noter que le substrat "froid" contenait initialement une concentration en Benzo(a)pyrène de : $138 \pm 7 \mu\text{g.l}^{-1}$. Après ajout d'une quantité suffisante de radioactivité totale dans le système ($\approx 6000 \text{ dpm.ml}^{-1}$, d'activité spécifique $234.10^3 \text{ dpm.}\mu\text{g}^{-1}$ de ¹⁴C-Benzo(a)pyrène), la concentration en Benzo(a)pyrène totale fut augmentée à $171 \pm 5 \mu\text{g.l}^{-1}$, soit un rapport [¹⁴C-Benzo(a)pyrène / Benzo(a)pyrène total] d'environ 20 % (rapport assez élevé mais nécessaire pour un suivi significatif de la radioactivité totale). A noter que, dans le cas du réacteur témoin, le substrat avec azide de sodium (Benzo(a)pyrène à $184 \pm 8 \mu\text{g.l}^{-1}$) présente une concentration finale de $212 \pm 4 \mu\text{g.l}^{-1}$, soit un rapport [¹⁴C-Benzo(a)pyrène / Benzo(a)pyrène total] équivalent d'environ 13 %.

H1-1. Suivi du ¹⁴C-Benzo(a)pyrène au sein d'un réacteur témoin

Concernant les performances de méthanogénèse du réacteur témoin, sa stérilité fut vérifiée par l'absence de réduction significative des matières sèches au cours du traitement à l'équilibre (après 4 temps de séjour, soit 160 jours de fermentation), le taux moyen de

réduction des matières sèches étant de $1,5 \pm 2,6$ %. De plus, la quantité de biogaz dégagé par le procédé fut négligeable, indiquant l'absence d'activité biologique méthanogène.

La stérilité biologique du réacteur vis à vis de l'activité méthanogène ayant été vérifiée, la radioactivité totale due à la présence de ^{14}C -Benzo(a)pyrène fut mesurée au cours du temps de mise à l'équilibre du procédé témoin (voir **Figure H1a**). Afin de calculer à tout instant t les performances d'élimination du ^{14}C -Benzo(a)pyrène dans ce réacteur, les concentrations attendues en sortie de réacteur ont été calculées en suivant la méthode précédemment présentée dans le *Chapitre F* (voir **Figure H1b**). Les pertes en radioactivité totale ont alors été estimées à tout instant t (voir **Figure H1c**). Ces pertes sont de $0,6 \pm 2,9$ % au cours du procédé témoin et peuvent être globalement négligées. La totalité de la radioactivité du substrat marqué se retrouve donc en sortie de réacteur. Les pertes abiotiques par volatilisation du ^{14}C -Benzo(a)pyrène (ou de ces dérivés) peuvent donc être négligées. Toutefois, après obtention de l'équilibre, le réacteur témoin présente une concentration moyenne en Benzo(a)pyrène total de $204 \pm 2 \mu\text{g.l}^{-1}$, pour un substrat d'alimentation à environ $212 \pm 3 \mu\text{g.l}^{-1}$. Ces deux valeurs sont statistiquement différentes (test t de $3,75 > t_{\text{critique}}$ de $3,18$ à 5 %). Le réacteur témoin présente donc des pertes en Benzo(a)pyrène total d'environ $3,8$ % (soit près de $8 \mu\text{g.l}^{-1}$), suite à la transformation non spécifique de la molécule mère. Ainsi, malgré des pertes en radioactivité nulles, le devenir réel du ^{14}C -Benzo(a)pyrène au cours du traitement témoin reste à être déterminé. En effet, la radioactivité totale peut être répartie dans plusieurs fractions au sein d'un échantillon de boue. Outre la fraction liquide, le ^{14}C -Benzo(a)pyrène peut se retrouver, soit dans la fraction non extractible, soit dans la fraction extractible sous sa forme native ou sous une autre forme (HAP transformé). Suivant ce schéma, la répartition de la radioactivité a donc été déterminée dans le substrat et en sortie de réacteur témoin à l'équilibre (voir **Tableau H1**).

Tableau H1 : Répartition mesurée de la radioactivité au sein des différentes fractions d'un échantillon de substrat (avec azide) et du réacteur témoin à l'équilibre ("nd" : non détectable)

FRACTIONS		Substrat +azide ($\approx 6553 \pm 156 \text{ dpm.ml}^{-1}$)	Témoin ($\approx 6456 \pm 64 \text{ dpm.ml}^{-1}$)
Fraction aqueuse		nd	nd
Fraction solide	Extractible : Benzo(a)pyrène	$85,9 \pm 1,3$ %	$79,3 \pm 0,8$ %
	Autres	nd	$2,2 \pm 0,8$ %
	Non Extractible :	$12,5 \pm 0,6$ %	$16,9 \pm 0,7$ %
	Pertes calculées à l'extraction (séchage, évaporation) :	$1,6$ %	$1,6$ %

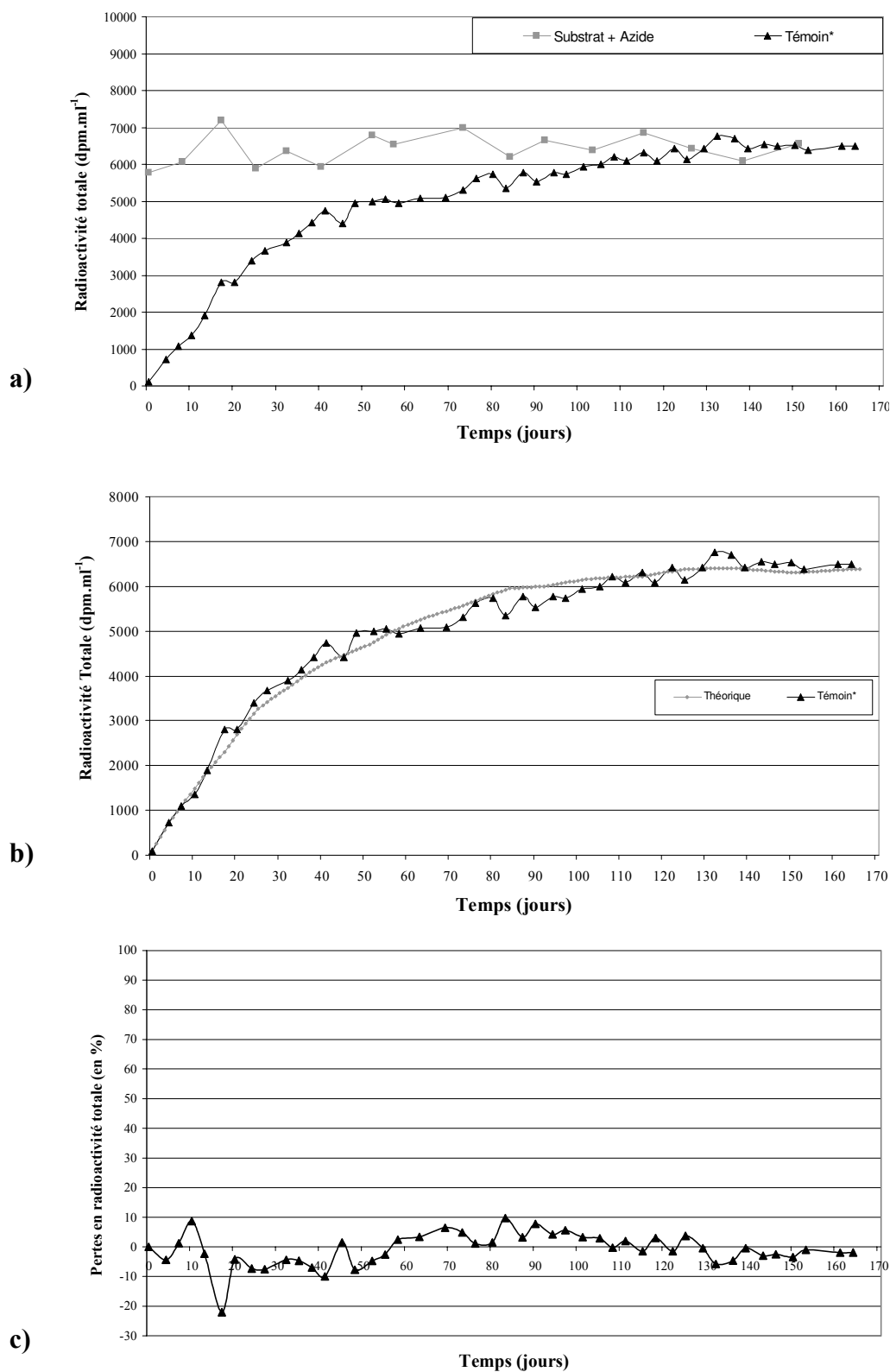


Figure H1: Evolution des concentrations en radioactivité totale (a) dans le substrat et en sortie de réacteur témoin, (b) pour la courbe théorique et (c) par comparaison entre les mesures et les concentrations attendues, estimation des pertes en radioactivité totale au cours du procédé.

Ainsi, dès l'addition de ^{14}C -Benzo(a)pyrène dans le Substrat lors de la préparation du mélange de boues marquées, une fraction non négligeable de celui-ci (12,5 %) se retrouve très rapidement, en moins d'une heure, dans la fraction non extractible de l'échantillon de boues. Ceci implique que l'incorporation d'HAP par ajout dans une boue, même déjà contaminée, provoque une perte de ce dernier par simple piégeage dans une zone fortement résistante à l'extraction par solvants. Toutefois, cette fraction n'augmente que faiblement au cours du temps en passant à environ 17 % de la radioactivité totale de l'échantillon final. En prenant en compte les 2,2 % liés à une transformation non spécifique, la molécule mère de ^{14}C -Benzo(a)pyrène ajoutée se trouve être transformée sous une action abiotique au total à hauteur de 6,6 % au cours du procédé, soit environ $2 \mu\text{g.l}^{-1}$ (sur les $8 \mu\text{g.l}^{-1}$ perdus en Benzo(a)pyrène total). A noter que la transformation du Benzo(a)pyrène correspond à une étape aspécifique, comme la méthylation ou la polymérisation chimique et abiotique de ce composé, pouvant conduire finalement à la formation de résidus liés (Kästner et al., 1999 ; Richnow et al., 1998 ; Richnow et al., 2000).

H1-2. Suivi du ^{14}C -Benzo(a)pyrène au sein d'un réacteur biologique

Dans un second temps, un réacteur biologique de digestion anaérobie méthanogène a été mis en œuvre. Ce réacteur biologique présente un taux de réduction des matières sèches de $28,9 \pm 1,6 \%$. Les conditions de méthanogénèse furent vérifiées par la production du biogaz en continu au cours de la fermentation (voir **Figure H2**).

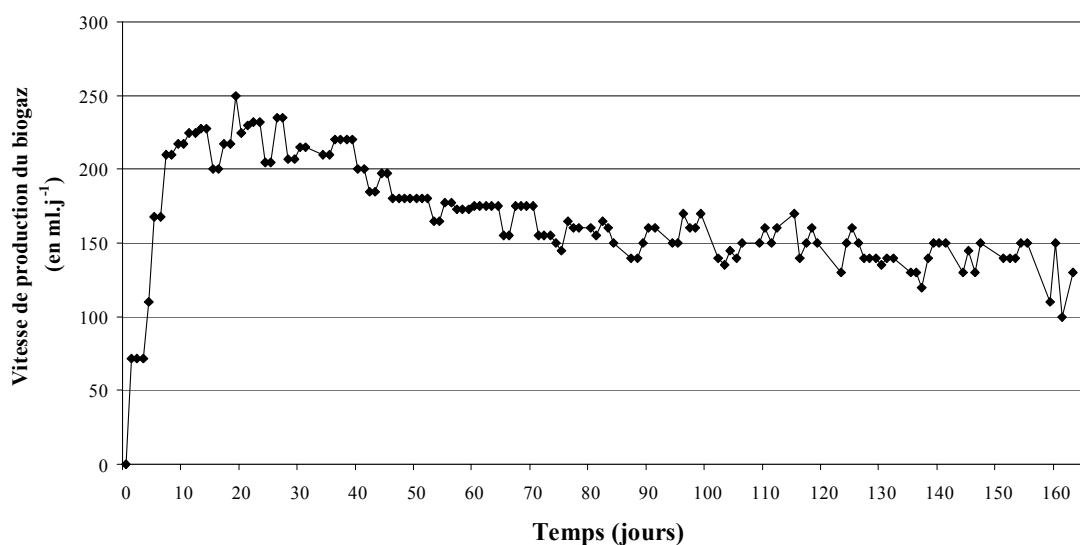


Figure H2 : Vitesse de production de biogaz au cours du temps (réacteur biologique).

Il est nécessaire de noter que la production en biogaz est variable au cours du temps d'expérimentation, passant d'environ 200-230 ml.j⁻¹ en début de test à une moyenne d'environ 150 ml.j⁻¹ lors de l'atteinte de l'état d'équilibre du réacteur. Or, les pièges à CO₂ ont préalablement été dimensionnés par rapport aux rendements en biogaz observés pour le réacteur ADA conduit sous les mêmes conditions, soit entre 100 et 150 ml.j⁻¹ (430 ± 43 mg.kg_{MS}⁻¹). Ainsi, les pièges à CO₂, non interchangeables, ont été rapidement saturés par du CO₂ froid en début de réaction où les pertes en radioactivité furent très faibles (saturation des pièges à environ 60-70 jours). Ceux-ci ne présentèrent alors qu'une concentration négligeable en radioactivité totale (de l'ordre du niveau de base, c'est à dire 50 ± 20 dpm.ml⁻¹).

Cependant, outre le manque de CO₂ marqué produit au cours du procédé, les pertes en radioactivité totale dans le réacteur furent estimées à 9,8 ± 1,1 % (soit environ 3,2 µg.l⁻¹) (voir **Figure H3**). Suite à un test statistique de comparaison de moyennes (Substrat et Sortie du réacteur à l'équilibre), cette différence s'avère hautement significative (test t de 5,11 > t_{critique} de 3,18 à 5 %). Ainsi, sous des conditions anaérobies méthanogènes, des pertes réelles en ¹⁴C-Benzo(a)pyrène ont été mesurées indiquant la possibilité, (i) soit d'une minéralisation de ce composé, le CO₂ marqué n'ayant pu être détecté suite à la saturation des pièges à CO₂, (ii) soit d'une possible évaporation d'intermédiaires de réaction (un ou deux cycles benzéniques) plus sensibles aux pertes abiotiques par volatilisation.

D'autre part, la concentration en Benzo(a)pyrène total en sortie de réacteur fut estimée à 154 ± 2 µg.l⁻¹. Par comparaison avec la concentration en Benzo(a)pyrène total mesurée dans le substrat (171 ± 5 µg.l⁻¹), les pertes en Benzo(a)pyrène total peuvent être estimées à environ 10 % (soit 17 µg.l⁻¹). Ainsi, outre les pertes en radioactivité totale mesurées précédemment, les pertes par transformation biologique ou incorporation dans la fraction non extractible du ¹⁴C-Benzo(a)pyrène ont été estimées (voir **Tableau H2**). Les résultats obtenus montrent que, dans le cas du Substrat, une fraction du ¹⁴C-Benzo(a)pyrène est rapidement incorporée dans la fraction non extractible de l'échantillon (à 12,7 ± 0,6 %), comme dans le cas du Substrat + azide (12,5 ± 0,6 %). Par ailleurs, seulement 55 % du ¹⁴C-Benzo(a)pyrène est retrouvé sous sa forme native, avec près de 10 % de radioactivité sous forme d'intermédiaires de réactions (¹⁴C-Benzo(a)pyrène transformé), près de 20 % dans la fraction non extractible et plus de 15 % perdu lors de l'extraction. Ces résultats montrent donc que le ¹⁴C-Benzo(a)pyrène est réellement dégradé sous l'action biologique méthanogène spécifique et non pas seulement

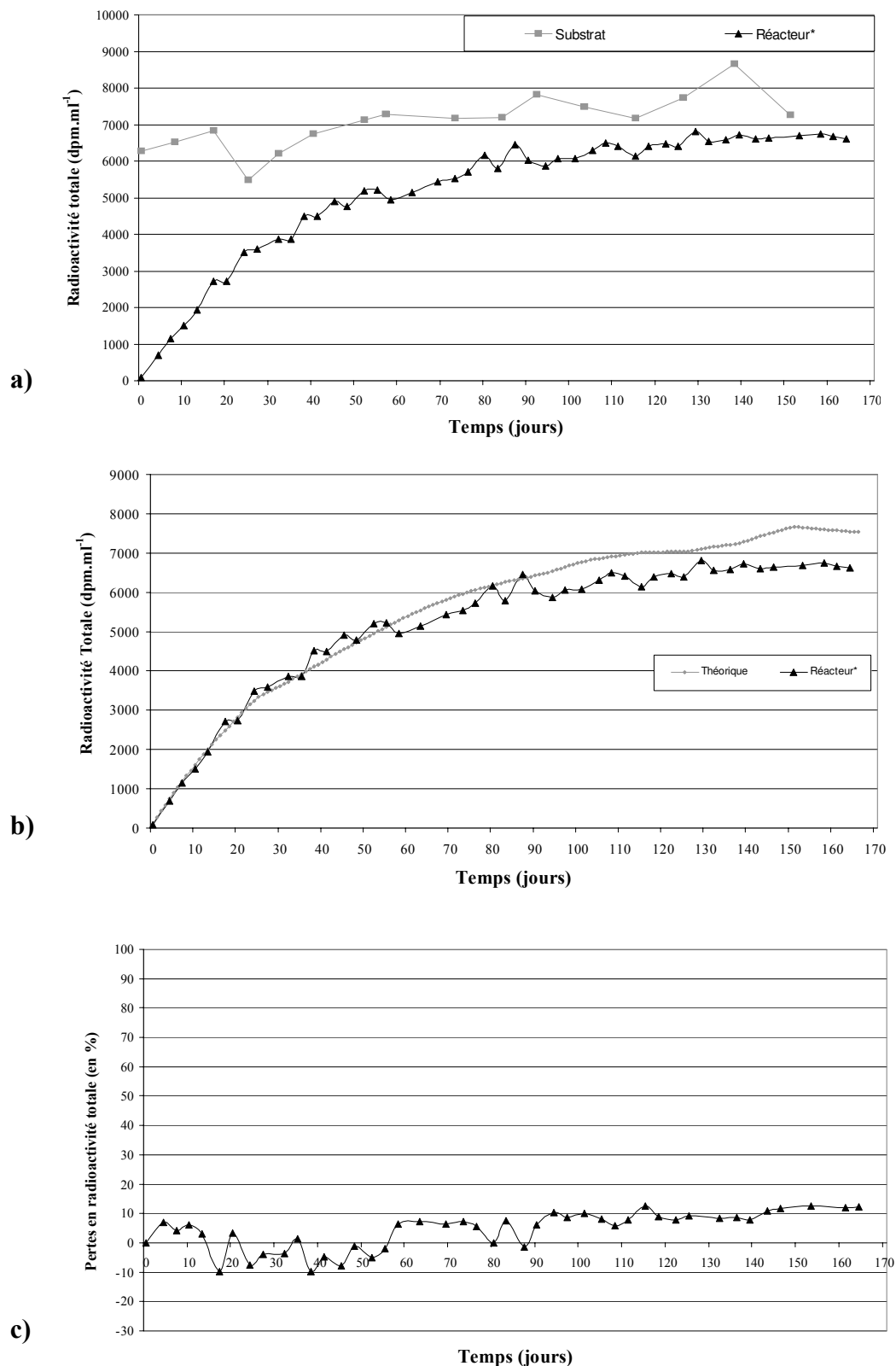


Figure H3 : Evolution des concentrations en radioactivité totale (a) dans le substrat et en sortie de réacteur biologique, (b) de la courbe théorique et (c) par comparaison entre les mesures et les concentrations attendues, évolution des pertes en radioactivité totale au cours du procédé.

transformé non spécifiquement ou incorporé dans la fraction non extractible. En effet, au travers des différentes fractions où se retrouve la radioactivité, il apparaît que le ^{14}C -Benzo(a)pyrène est transformé suite à l'action biologique à hauteur de 10,3 % (contre 2,2 % pour le Témoin) et près de 15 % de celui-ci est perdu au cours du processus d'extraction. Ces pertes lors de l'extraction (1,6 % pour le Témoin) se situent lors du séchage de l'échantillon et sont le plus souvent le résultat de l'évaporation de molécules très volatiles (1 ou 2 cycles benzéniques). De plus, seulement 7 % du ^{14}C -Benzo(a)pyrène sont incorporés dans la fraction non extractible au cours du procédé (6,6 % dans le cas du réacteur témoin). L'influence de l'activité biologique n'est donc pas significative dans ce type de processus d'élimination. Ainsi, le ^{14}C -Benzo(a)pyrène ajouté semble être dégradé sous l'action biologique en différentes fractions et notamment en molécules plus simples et plus volatiles. De plus, malgré la présence d'un phénomène de dégradation au sein de la matrice solide, aucune radioactivité n'a pu être détectée dans la fraction liquide. Ce résultat montre que, comme le Benzo(a)pyrène, l'ensemble des composés formés (intermédiaires de dégradation) restent fortement liés à la matrice boues quelle que soit leur forme moléculaire (possibilité de bioconcentration à l'intérieur de cellules ou de membranes cellulaires et de transformation *in situ* du ^{14}C -Benzo(a)pyrène).

Tableau H2 : Répartition de la radioactivité au sein des différentes fractions d'un échantillon de substrat et du réacteur biologique à l'équilibre (" nd " : non détectable)

FRACTIONS		Substrat (7058 ± 118 dpm.l ⁻¹)	Réacteur (6671 ± 43 dpm.l ⁻¹)
Fraction aqueuse		nd	nd
Fraction solide	Extractible : Benzo(a)pyrène	86,2 ± 0,5 %	55 ± 0,6 %
	Autres	nd	10,3 ± 1,8 %
	Non Extractible :	12,7 ± 0,6 %	19,7 ± 0,7 %
	Pertes calculées à l'extraction (séchage, évaporation) :	1,1 %	15 %

A noter enfin que près de 10,3 $\mu\text{g.l}^{-1}$ du ^{14}C -Benzo(a)pyrène total ajouté dans le substrat est dégradé au cours du procédé de digestion anaérobie (calculé à partir d'un bilan sur la radioactivité retrouvé sous forme de ^{14}C -Benzo(a)pyrène natif dans le Substrat et en sortie du Réacteur). A cela, s'ajoute la part perdue par volatilisation ou minéralisation sous forme de

radioactivité totale ($3,2 \mu\text{g.l}^{-1}$), soit un total de $13,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ (sur les $17 \mu\text{g.l}^{-1}$ de pertes en Benzo(a)pyrène total). Ainsi près de 80 % du Benzo(a)pyrène dégradé biologiquement au cours du procédé provient de l'ajout en ^{14}C -Benzo(a)pyrène. La part ajoutée de ce composé au sein d'un système déjà contaminé est donc plus facilement dégradée. Ce résultat est en accord avec Eggen et Majcherczyk (1998) qui ont montré que les HAPs ajoutés (Benzo(a)pyrène) étaient plus rapidement dégradés que ceux déjà présents par contamination naturelle, vraisemblablement plus fortement liés à leur matrice.

H2. Mise en évidence de l'influence de l'adaptation aux HAPs de l'inoculum méthanogène

La dégradation biologique du Benzo(a)pyrène étant montrée, l'origine de l'inoculum méthanogène peut présenter une influence significative sur les performances d'élimination de l'ensemble des HAPs. En effet, au regard des faibles concentrations en HAPs retrouvées dans l'environnement, le potentiel microbiologique de dégradation sous conditions anaérobies de ces composés très réduits est relativement restreinte à des écosystèmes issus de milieux contaminés depuis de nombreuses années, comme dans le cas de sédiments marins (Coates *et al.*, 1996 ; Hayes *et al.*, 1999). Les performances globales de l'écosystème dépendent donc non seulement du temps de contamination, mais également du degré de contamination qui permettent la sélection de micro-organismes performants (Hayes *et al.*, 1999).

Dans l'ensemble des réacteurs précédemment étudiés, l'écosystème méthanogène utilisé pour l'inoculation de départ est issu d'un digestat de digesteur industriel méthanogène ayant connu des contaminations en HAPs depuis quelques années. Ainsi, afin d'étudier l'influence de l'origine de l'inoculum méthanogène, des études ont été conduites à partir d'un inoculum non adapté aux HAPs (pas de contamination connue et détectable du digesteur). Par la suite et afin d'estimer le potentiel de maintenance de l'écosystème adapté aux HAPs dans un nouvel environnement, des expériences de bioaugmentation ont été réalisées. Suite aux résultats obtenus, un essai de bioaugmentation de l'écosystème adapté avec des sédiments contaminés par des HAPs a été réalisé.

H2-1. Potentiel d'élimination des HAPs d'un inoculum non adapté

H2-1-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion

Au cours de cette étude, un réacteur, dénommé NADA, fut initialement inoculé avec un écosystème non adapté aux HAPs. Les conditions de méthanogénèse de ce réacteur furent vérifiées par la mesure du flux de production en biogaz et de sa composition : le rendement en biogaz produit fut de $812 \pm 110 \text{ ml.g}_{\text{MSdégradée}}^{-1}$ ou de $638 \pm 54 \text{ ml.g}_{\text{DCOdégradée}}^{-1}$. Le rendement en biogaz, dépendant du substrat utilisé et de l'activité de l'écosystème, est significativement plus élevé que dans le cas du réacteur ADA inoculé avec un écosystème adapté aux HAPs ($430 \pm 43 \text{ ml.g}_{\text{MSdégradée}}^{-1}$ et $307 \pm 17 \text{ ml.g}_{\text{DCOdégradée}}^{-1}$), montrant ainsi que ces deux écosystèmes possèdent des caractéristiques distinctes pour la méthanisation des boues contaminées. D'autre part, les bonnes conditions de méthanogénèse dans le réacteur NADA sont confirmées par un taux de méthane dans le biogaz produit de $70,4 \pm 0,8 \%$, caractéristique des conditions méthanogènes (entre 70 % et 75 %). Concernant la dégradation de la pollution carbonée, le réacteur NADA présente un taux de réduction en matières sèches de $28 \pm 6,1 \%$ et un taux de dégradation de la DCO de $34,9 \pm 2,9 \%$, valeurs plus faibles que dans le cas du réacteur ADA (réduction des MS de $49,6 \pm 4,2 \%$ et de la DCO de $51 \pm 8 \%$).

Ainsi, d'un point de vue performances générales de méthanogénèse, l'écosystème non adapté présente des caractéristiques relativement distinctes de l'écosystème adapté aux HAPs, avec notamment des taux de réduction des solides et de la DCO significativement plus faibles, indiquant que l'écosystème non adapté aux HAPs est moins performant sur ce type de boues que l'écosystème adapté aux HAPs (et à ce substrat).

H2-1-2. Comparaison des performances d'élimination des HAPs d'un inoculum adapté et non adapté aux HAPs

En utilisant la méthode de calcul précédemment présentée dans le Chapitre F, les performances d'élimination des HAPs des réacteurs ADA et NADA ont été estimées puis comparées (voir **Figure H4**). Les résultats obtenus montrent que les performances d'élimination des HAPs par un écosystème non adapté sont significativement inférieures à celles retrouvées dans le cas d'un écosystème adapté, mais restent toutefois significativement supérieures aux pertes du réacteur témoin. En effet, un test de comparaison de moyenne (test t

de Student) montre que, pour les HAPs du Phénanthrène au Chrysène, leur élimination est statistiquement supérieure aux pertes témoins (valeurs de t de, dans l'ordre des HAPs, de : 5,7 ; 5,51 ; 3,44 ; 2,89 ; 4,08 ; 3,82 > $t_{\text{critique}} 2,77$). Pour les autres HAPs, notamment les plus lourds, les pertes entre le réacteur NADA et le réacteur Témoin sont équivalentes (Fluorène - Benzo(b)fluoranthène à l'Indeno(123cd)pyrène : 1,9 - 1,87 ; 1,43 ; 1,15 ; 2,41 ; 2,11 ; 2,6 < $t_{\text{critique}} 2,77$).

De plus et contrairement aux résultats obtenus avec un écosystème adapté, les performances d'élimination dans le réacteur NADA décroissent significativement en fonction du poids moléculaire de l'HAP étudié. Il semblerait donc que, dans ce cas, le potentiel d'élimination soit plus limité par les performances biologiques de l'écosystème que par la biodisponibilité des HAPs. D'autre part, la sélection de micro-organismes capables de dégrader les HAPs demande un certain temps d'acclimatation (le plus souvent quelques années). Les performances d'élimination des HAPs mesurées dans le réacteur NADA sont donc le résultat soit d'une activité basale liée à l'introduction de boues non stériles apportant des micro-organismes compétents, soit de pertes non spécifiques liées à l'activité biologique générale. Par comparaison, il peut en être conclu que, comme il l'a été précédemment montré dans le cas du réacteur ADA, l'élimination des HAPs est bien le résultat d'une dégradation spécifique de ces composés de performances vraisemblablement limitées par la biodisponibilité du substrat, d'où la nécessité de micro-organismes adaptés à leur dégradation.

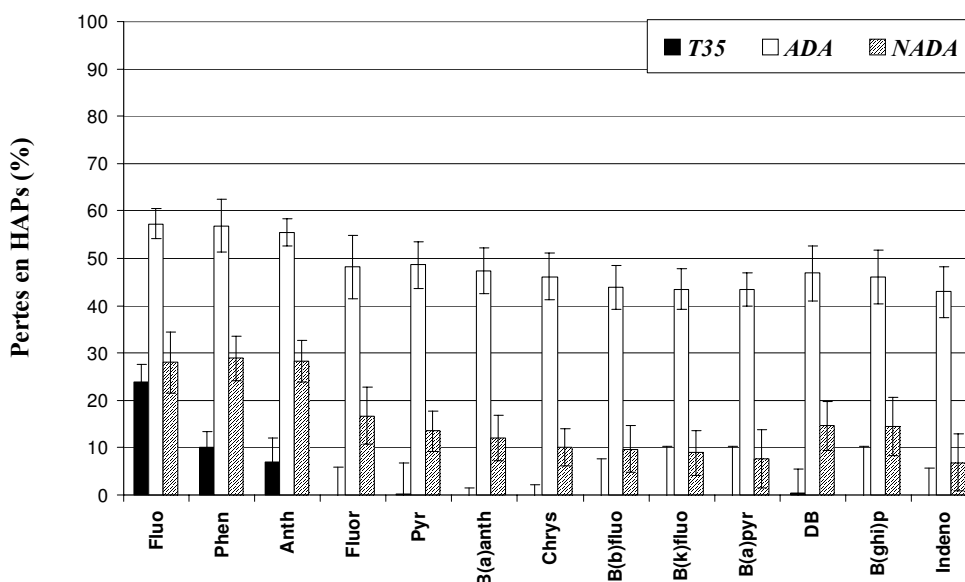


Figure H4 : Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies inoculés à partir d'un écosystème adapté (réacteur ADA et témoin T35) et non adapté (NADA) aux HAPs.

Afin de s'affranchir du taux de réduction des MS, le facteur d'efficacité fut également calculé (voir **Figure H5**). Il apparaît alors que, comme précédemment, les pertes en HAPs dépendent fortement du poids moléculaire de l'HAP étudié, indiquant ainsi une probable limitation biologique au procédé d'élimination. Toutefois, dans le cas du réacteur NADA, il est remarquable que pour le Fluorène, le Phénanthrène et l'Anthracène les facteurs d'efficacité des réacteurs ADA et NADA sont strictement similaires. Ainsi, pour les trois HAPs précités, le potentiel d'élimination est rapidement et facilement implanté au sein du réacteur, vraisemblablement suite à l'apport de micro-organismes par le substrat non stérile. Néanmoins, pour les plus gros HAPs, l'acclimatation de l'écosystème semble nécessaire afin que la réaction soit limitée par les phénomènes de biodisponibilité des HAPs et non pas par le potentiel de dégradation microbiologique.

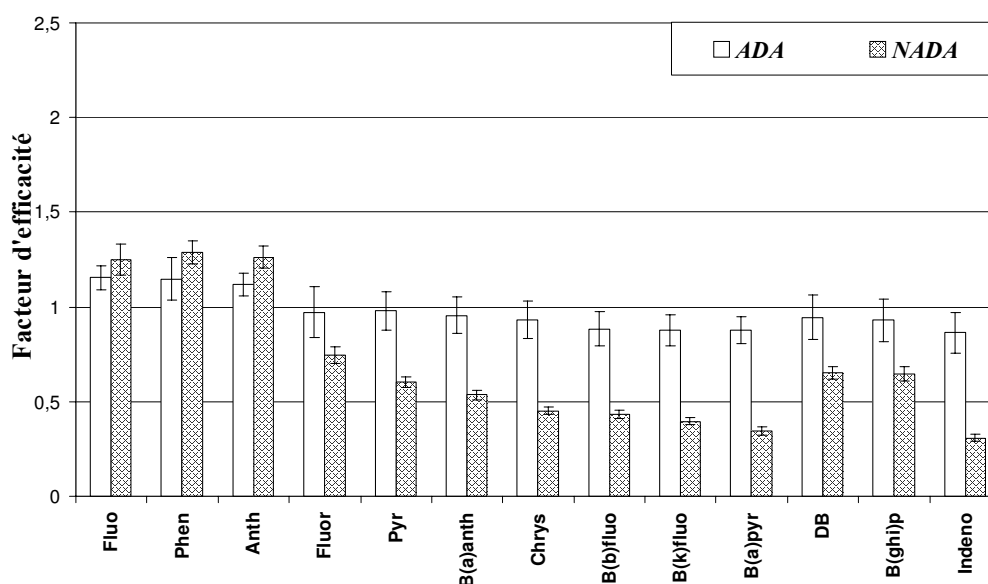


Figure H5 : Facteurs d'efficacité des HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies inoculés à partir d'un écosystème adapté (réacteur ADA et témoin T35) et non adapté (NADA) aux HAPs.

H2-2. Essai de bioaugmentation de l'inoculum non adapté

Suite à la détermination du potentiel d'élimination d'un écosystème non adapté aux HAPs, il fut étudié les possibilités de maintenance des micro-organismes capables d'éliminer ces composés dans ce même système, tant bien même que ceux-ci se trouvent en faibles concentrations dans le milieu réactionnel et ne participent que faiblement à la sélection des divers micro-organismes. Pour cela deux tests ont été réalisés : l'un avec 4 % et l'autre avec

10 % (en volume) de l'écosystème adapté dans l'écosystème non adapté aux HAPs, les réacteurs étant dénommés NADA4+ et NADA10+ .

H2-2-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion

Les conditions de méthanogénèse des réacteurs NADA4+ et NADA10+ furent vérifiées par la mesure du flux de production en biogaz et par sa composition : les rendements respectifs en biogaz produit furent de $670 \pm 55 \text{ ml.g}_{\text{MSdégradée}}^{-1}$ et $491 \pm 36 \text{ ml.g}_{\text{MSdégradée}}^{-1}$ (ou de $395 \pm 40 \text{ ml.g}_{\text{DCOdégradée}}^{-1}$ et $427 \pm 22 \text{ ml.g}_{\text{DCOdégradée}}^{-1}$). A noter que le rendement biogaz tend à diminuer avec l'augmentation de la part en écosystème adapté dans l'inoculum (ce point sera discuté ultérieurement dans le paragraphe H3-2). Par ailleurs, les bonnes conditions de méthanogénèse des réacteurs NADA4+ et NADA10+ sont confirmées par un taux de méthane dans le biogaz produit de $72,9 \pm 3,4\%$ et $69,5 \pm 5,5\%$, caractéristique de bonnes conditions méthanogènes. Concernant la dégradation de la pollution carbonée, les réacteurs NADA4+ et NADA10+ présentent des taux de réduction en matières sèches respectifs de $24,6 \pm 4,7\%$ et $36,3 \pm 2,3\%$; et un taux de dégradation de la DCO de $43,7 \pm 3,6\%$ et $46,9 \pm 6,8\%$, valeurs plus faibles que dans le cas du réacteur ADA (réduction des MS de $49,6 \pm 4,2\%$ et de la DCO de $51 \pm 8\%$).

Ainsi, d'un point de vue performances générales de méthanogénèse, l'écosystème non adapté même supplémenté (à 4 % ou 10 %) présente des caractéristiques relativement distinctes de l'écosystème adapté aux HAPs (réacteur ADA), avec notamment un taux de réduction des solides significativement plus faible dans les deux cas.

H2-2-2. Influence de l'inoculum bioaugmenté sur les performances d'élimination des HAPs

Dans un premier temps, les performances d'élimination des HAPs des écosystèmes bioaugmentés à 4% et à 10 % furent déterminées (voir **Figure H6**). Les résultats obtenus montrent que, d'un point de vue pertes totales en HAPs, les essais à 0% et 4% ne possèdent aucune différence significative pour l'ensemble des HAPs (valeurs t-test de 0,8 ; 0,6 ; 1,98 ; 0,71 ; 2,15 ; 1,2 ; 0,3 ; 0,32 ; 1,77 ; 0,26 ; 0,1 ; 0,91 ; 0,45 < t_{critique} de 3,18).

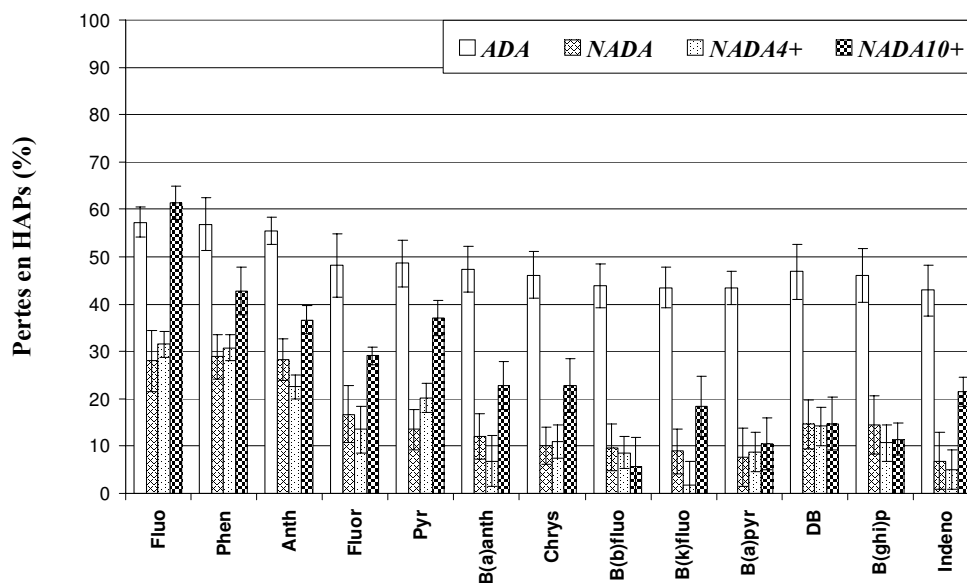


Figure H6 : Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies inoculés à partir d'un écosystème adapté aux HAPs (réacteur ADA), non adapté (NADA) avec une fraction en écosystème adapté de 4% (NADA4+) et de 10 % (NADA10+).

Un taux de bioaugmentation de l'inoculum de départ de 4 % en écosystème adapté ne permet donc pas d'obtenir un effet significatif sur les performances globales du procédé à l'équilibre. Par contre, le réacteur NADA10+ présente des performances d'élimination plus élevées pour l'ensemble des HAPs, performances relativement intermédiaires entre le réacteur non adapté (NADA) et le réacteur totalement adapté (ADA). Un taux de bioaugmentation à 10% en volume permettrait donc d'obtenir un effet significatif sur les performances totales d'élimination des HAPs. Ce gain reste toutefois fortement dépendant de l'HAP étudié (gain entre - 3% et + 25%).

D'autre part, afin de s'affranchir des pertes en MS des différents réacteurs, un facteur d'efficacité d'élimination fut calculé (voir **Figure H7**). Les résultats obtenus montrent que les gains de pertes dépendent fortement de la nature de l'HAP étudié. Dans tous les cas, pour les plus petits HAPs, les pertes semblent limitées par un facteur d'efficacité proche de 1. A noter que, dans le cas du Fluorène, le facteur d'efficacité atteint une valeur proche de 1,7, indiquant la possibilité d'une action synergique de deux écosystèmes pour l'élimination de ce composé, mais cette action reste de nature inconnue (production d'un biosurfactant ou caractéristiques intrinsèques des boues favorables ?).

En conclusion, il a été observé au cours de cette étude une forte influence de l'adaptation de l'écosystème pour l'obtention d'une élimination significative des HAPs. Les

essais de bioaugmentation montrent que, plus que les seuls micro-organismes permettant la dégradation des HAPs, tout un consortium microbien semble nécessaire. En effet, les performances globales de dégradation paraissent intimement liées avec les performances d'élimination des HAPs, notamment dans le cas du taux de réduction des MS.

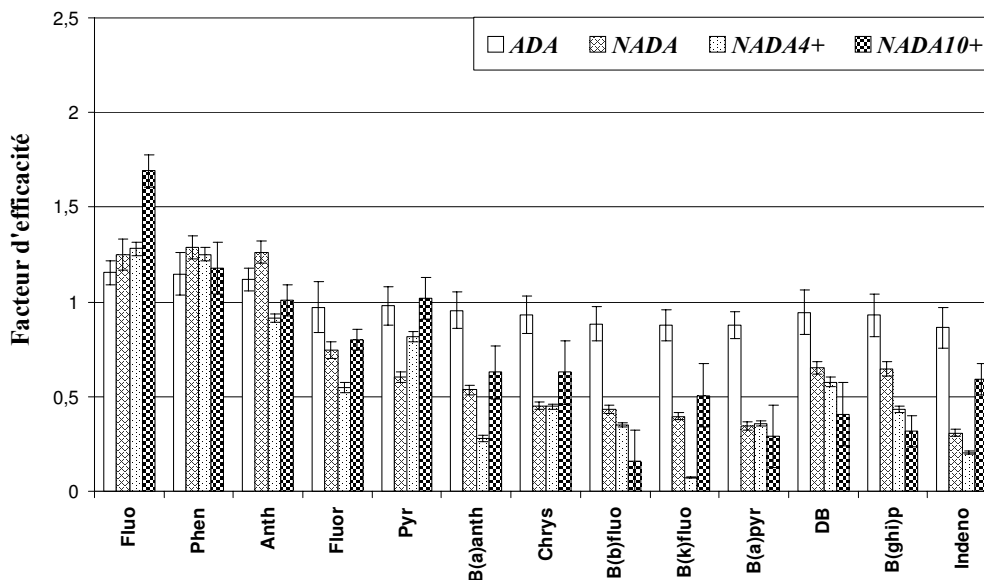


Figure H7 : Facteurs d'efficacité des HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies inoculés à partir d'un écosystème adapté aux HAPs (réacteur ADA), non adapté (NADA) avec une fraction en écosystème adapté de 4% (NADA4+) et de 10 % (NADA10+).

H2-3. Essai de bioaugmentation de l'inoculum adapté

Suite à l'essai de bioaugmentation d'un écosystème non adapté aux HAPs, il a été montré qu'il était nécessaire d'ajouter au minimum 10 % d'un écosystème adapté pour que le gain en performances d'élimination des HAPs soit significatif. Afin d'améliorer ces performances dans le cas de l'écosystème anaérobie déjà adapté aux HAPs, un essai de bioaugmentation de l'écosystème adapté fut réalisé par ajout d'un sédiment fortement contaminé en HAPs et pouvant être une source en micro-organismes particulièrement adaptés. Alors que l'élimination des HAPs serait vraisemblablement limitée par le transfert de matière de la matrice solide vers un compartiment plus biodisponible, l'introduction de nouvelles souches bactériennes adaptées pourrait permettre d'améliorer les performances de dégradation des HAPs par simple déplacement de l'équilibre. Dans cet objectif, un réacteur anaérobie méthanogène, dénommé ADABIO, fut mis en œuvre (addition à 10 % en poids d'un sédiment fortement contaminé en HAPs).

H2-3-1. Caractérisation des conditions méthanogènes de digestion

Les conditions de méthanogénèse du réacteur ADABIO furent confirmées par la mesure du flux de production en biogaz et de sa composition : le rendement en biogaz produit fut de $1154 \pm 166 \text{ ml.g}_{\text{MSdégradée}}^{-1}$ (ou de $862 \pm 40 \text{ ml.g}_{\text{DCOdégradée}}^{-1}$) avec un taux de méthane dans le biogaz produit de $69,6 \pm 2,1 \%$, caractéristique de bonnes conditions méthanogènes. Concernant la dégradation de la pollution carbonée, le réacteur ADABIO présente un taux de réduction en matières sèches de $35,5 \pm 3,4 \%$ et un taux de dégradation de la DCO de $63,2 \pm 6,5 \%$. Un taux de réduction des matières sèches plus faible que le réacteur de base ADA20, ainsi que des rendements en biogaz différents indiquent que l'activité et la composition des deux écosystèmes est relativement distincte.

H2-3-2. Influence de l'inoculum bioaugmenté sur les performances d'élimination des HAPs

Dans un premier temps, les performances totales d'élimination furent déterminées dans le cas du réacteur ADABIO et ADA20 servant de base de comparaison (voir **Figure H8**). Il apparaît que, plus qu'améliorer les performances d'élimination des HAPs, celles-ci se trouvent particulièrement réduites suite à l'ajout des sédiments dans l'inoculum. Cette observation peut donc être le simple résultat d'une perturbation significative de l'écosystème anaérobie méthanogène, avec un changement de composition et d'activité à l'équilibre suite à l'introduction de nouvelles espèces anaérobies.

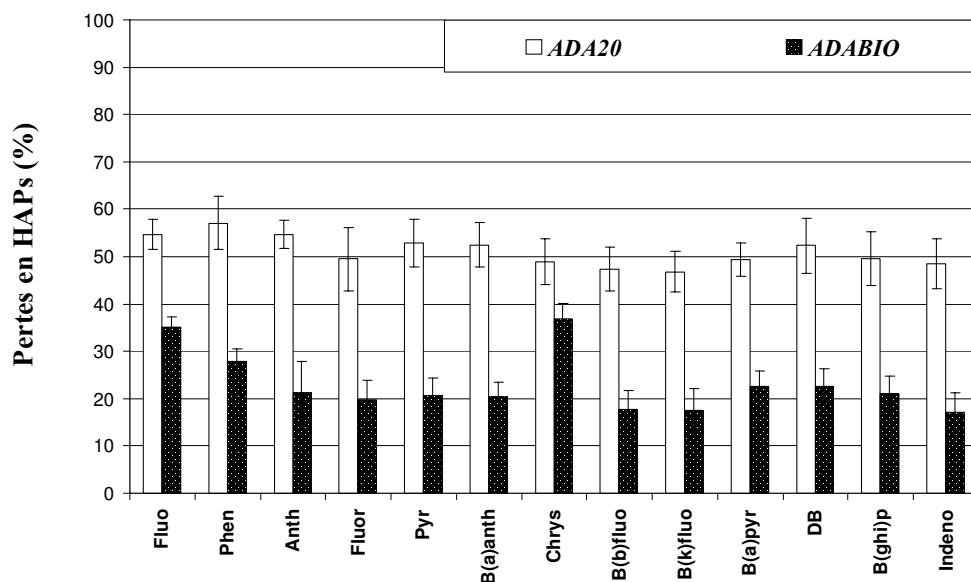


Figure H8 : Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies inoculés à partir d'un écosystème adapté aux HAPs (réacteur ADA) ou bioaugmenté avec des sédiments fortement contaminés (ADABIO).

Suite à ces observations, il semblerait que le phénomène d'élimination des HAPs serait vraisemblablement le résultat d'un profil bactérien particulier et toute perturbation de cette population engendrerait une perte d'activité significative sur l'élimination des HAPs. De plus, le calcul du facteur d'efficacité montre que, outre le Chrysène et le Fluorène, l'ensemble des potentiels d'élimination des HAPs est affecté par l'ajout de sédiments (voir **Figure H10**).

Confortant les conclusions précédentes, l'écosystème adapté aux HAPs présente une activité biologique et vraisemblablement une configuration particulière en micro-organismes qui fait que toute perturbation de cet équilibre engendre une réduction des performances d'élimination des HAPs (perturbation du cométabolisme et autres actions symbiotiques).

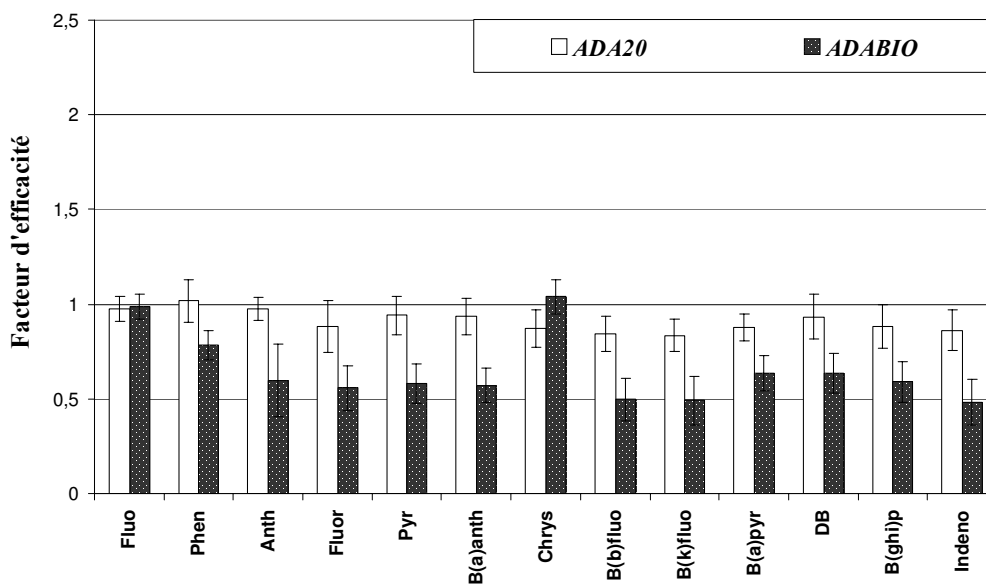


Figure H9: Facteurs d'efficacité des HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies inoculés à partir d'un écosystème adapté aux HAPs (réacteur ADA) ou bioaugmenté avec des sédiments fortement contaminés (ADABIO).

H3. Implication de l'activité bactérienne méthanogène pour l'élimination des HAPs

H3-1. Le rendement en biogaz : indicateur de l'activité de l'écosystème méthanogène sur l'élimination des HAPs.

Suite aux résultats précédemment obtenus, il apparaît que les différents écosystèmes anaérobies et plus précisément méthanogènes, semblent être particulièrement impliqués dans

le processus d'élimination des HAPs. En effet, il a été remarqué que le rendement en biogaz était lié à l'élimination des HAPs non concernés par les pertes abiotiques (voir **Figure H10**). Ainsi, le rendement peut être un bon indicateur de l'activité biologique d'élimination des HAPs.

Toutefois, il semble peu probable, au regard des faibles contaminations mesurées en HAPs dans le milieu, que ce résultat soit une simple relation de cause à effet entre les HAPs et les performances de méthanogénèse. En effet, il paraît plus probable que cette corrélation soit le résultat d'une certaine composition et activité de l'écosystème méthanogène biologique, avec l'implication de complexes et d'étroites relations entre micro-organismes et de substrats utilisés (notion de cométabolisme ou d'action symbiotique).

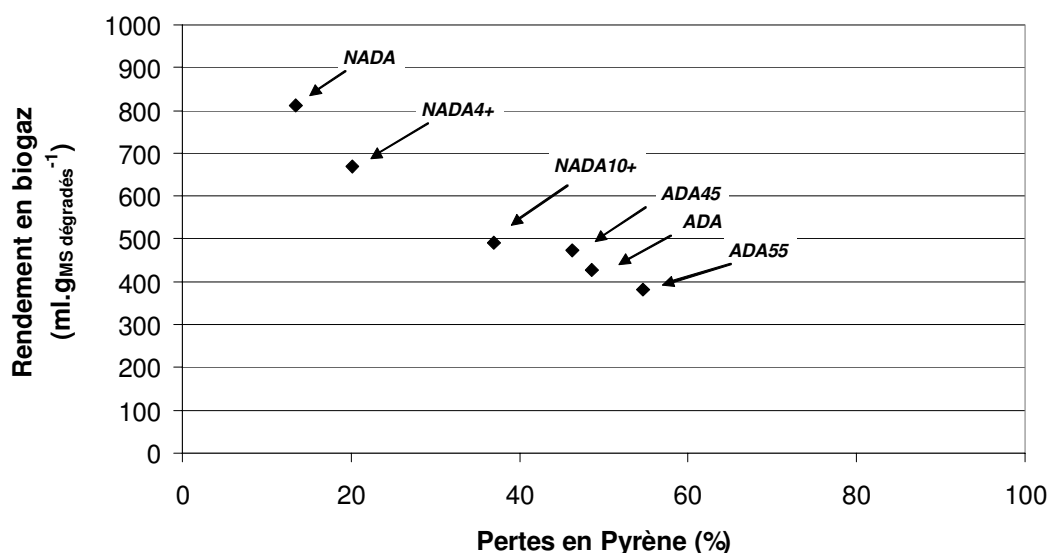


Figure H10: Rendement en biogaz en fonction des pertes en Pyrène mesurées pour les réacteurs méthanogènes inoculés avec un écosystème adapté (ADA (35°C), ADA45 (45°C) et ADA55°C)) ou avec un ajout d'écosystème adapté dans un non adapté aux HAPs (NADA (à 0%), NADA4+ (à 4%) et NADA10+ (à 10%)).

H3-2. Influence du blocage de l'étape de méthanogénèse

Suite aux observations citées précédemment, il apparaît que les performances de méthanogénèse et les performances d'élimination des HAPs soient intimement liées. Ainsi, afin de mieux appréhender le caractère indispensable de l'étape de méthanogénèse, celle-ci fut, dans le réacteur dénommé ADACH4, bloquée par addition de BromoEthaneSulfonate

(BES à 1 g.l^{-1}), inhibiteur spécifique de l'action de la communauté *archaea* méthanogène (Freedman et Gossett, 1989 ; Pulliam Holoman et al., 1998 ; Le Van et al., 1998).

Le blocage de la digestion fut vérifiée par la non production de biogaz et la conservation des matières sèches entre l'entrée et la sortie du traitement ($2,2 \pm 5,8 \%$), ainsi que la conservation de la pollution organique sous forme de DCO ($5,2 \pm 11,2 \%$). Toutefois, l'activité biologique n'est pas complètement bloquée et l'activité d'accumulation des AGV reste significative, avec à l'équilibre pour somme des 6 AGV : $3,4 \pm 0,2 \text{ g.l}^{-1}$ contre environ $2,42 \pm 0,03 \text{ g.l}^{-1}$ dans le substrat.

Concernant les performances d'élimination des HAPs dans le réacteur ADACH4, les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative entre ce réacteur et le réacteur témoin T35 (valeurs de t de 0,54 ; 0,46 ; 2,71 ; 0,97 ; 1,66 ; 1,03 ; 1,37 ; 0,33 ; 0,05 ; 2 ; 0,9 ; 0,6 ; $0,9 < t_{critique}$ de 2,77) (voir **Figure H11**).

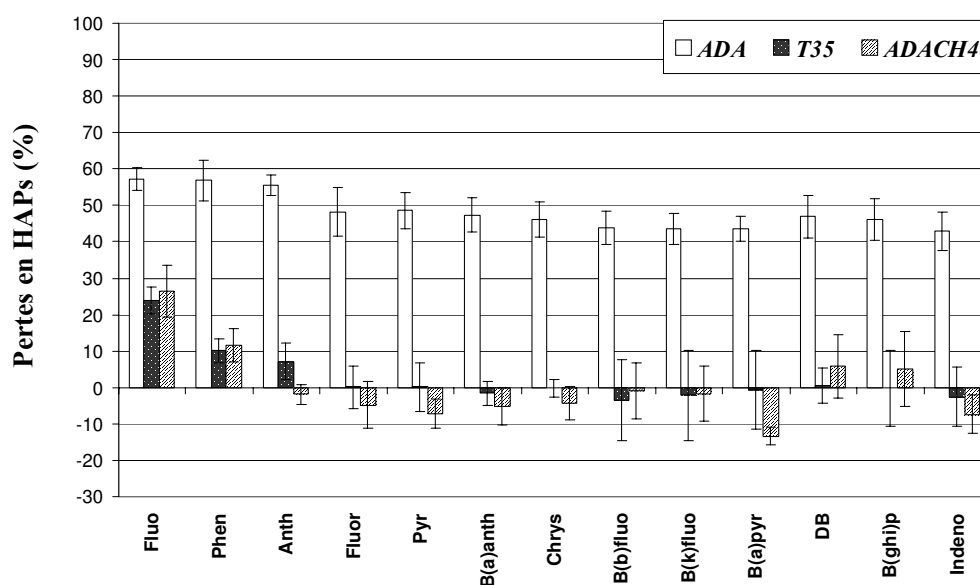


Figure H11 : Pertes en HAPs dans le cas de réacteurs anaérobies méthanogènes (ADA), stérilisé chimiquement (T35) ou strictement acidogène (ADACH4).

De plus, à l'exception du Fluorène et du Phénanthrène, les moyennes d'élimination de tous les HAPs pour le réacteur ADACH4 sont toutes statistiquement non différentes et proche de 0 %, avec une moyenne totale de $1,75 \pm 4,5 \%$ (test ANOVA de valeur de F de $1,17 < F_{critique}$ 1,8). Il apparaît donc que l'élimination des HAPs est étroitement liée à l'activité méthanogène et que l'étape de méthanogénèse est indispensable. Les bactéries méthanogènes sont donc particulièrement impliquées dans le processus d'élimination-dégradation des HAPs. Leur mode d'action pourrait donc être soit qu'elles dégradent directement les HAPs pour leur

métabolisme, soit qu'elles participent à leur dégradation par l'intermédiaire de relations syntrophiques étroites au sein de l'écosystème.

A ce stade, il paraît particulièrement intéressant de caractériser la flore bactérienne méthanogène (*archaea*) afin d'identifier les micro-organismes pouvant être impliqués dans le processus d'élimination des HAPs.

H4. Caractérisation de la flore anaérobie méthanogène (identification de la communauté archaea)

H4-1. Profils SSCP de la communauté archaea des différents réacteurs étudiés

Dans les digesteurs anaérobies, la communauté *archaea* représente la majorité des micro-organismes méthanogènes et peut constituer jusqu'à 10 % de la population totale (Garcia, 1990). Or, les résultats précédents montrent qu'il existerait une étroite relation entre les performances d'élimination des HAPs et les performances de méthanogénèse. Il a donc été envisagé de déterminer la population *archaea* des réacteurs d'étude les plus représentatifs de cette corrélation activité méthanogène / élimination des HAPs et de distinguer les principales espèces pouvant participer à ce processus de dégradation (voir **Tableau H3**).

Tableau H3 : Performances moyennes de méthanogénèse et de réduction des HAPs des 7 réacteurs d'intérêt (profils SSCP déterminés de la population *archaea*).

<i>Réacteurs d'étude</i>	<i>Performances moyennes de méthanogénèse</i>		<i>Performances d'élimination des HAPs (moyennes sur l'ensemble des HAPs) (en %)</i>
	Réduction des MS (en %)	Rendement biogaz (ml.g ⁻¹ MSdégradé ⁻¹)	
<i>ADA</i>	50,6 ± 5,1	430 ± 43	48,2 ± 5,1
<i>ADA45</i>	54,1 ± 5,4	476 ± 45	44,1 ± 7,3
<i>ADA55</i>	50,6 ± 4,2	382 ± 31	55,3 ± 6,1
<i>NADA</i>	28 ± 6,1	813 ± 110	15,4 ± 8
<i>NADA4+</i>	24,6 ± 4,7	670 ± 35	14,3 ± 9,4
<i>NADA10+</i>	36,3 ± 2,3	491 ± 36	25,8 ± 15,4
<i>ADAKEM</i>	32,8 ± 1,6	854 ± 60	18,5 ± 7,4

Les réacteurs précédemment étudiés se différencient principalement par leurs performances d'élimination des HAPs qui sont elles-mêmes inversement corrélées aux performances de méthanogénèse (voir **Tableau H3**). Parmi l'ensemble de ces réacteurs, trois groupes se distinguent : 1. les réacteurs dits « adaptés » (ADA, ADA45 et ADA55) qui présentent des performances proches d'élimination des HAPs et de méthanogénèse,

2. les réacteurs dits « non adaptés » ou bioaugmentés (NADA, NADA4+ et NADA10+) qui présentent, en suivant l'ordre de citation, des performances croissantes d'élimination des HAPs et des rendements en biogaz qui se réduisent,

3. le réacteur ADAKEM qui présente des performances intermédiaires entre les deux groupes précédents, notamment concernant le potentiel d'élimination des HAPs qui varie en fonction de l'HAP étudié (pas de corrélation ni avec leur poids moléculaire, ni avec leur concentration). Dans ce cas, il avait été proposé comme hypothèse que la population méthanogène totale subissait des changements significatifs dus à l'addition de KEMAURTM, perturbant par conséquent les interactions entre micro-organismes participant à la dégradation des HAPs, substrat peu sélectif au regard des faibles concentrations rencontrées (sélection d'un nouveau consortium méthanogène).

Ainsi, dans un premier temps, la communauté *archaea* de ces différents réacteurs a été caractérisée à l'aide de profils SSCP. Cette technique permet de séparer et d'identifier les différentes espèces majoritaires de la communauté bactériennes et *archaea* au sein d'un écosystème complexe (Delbès, 2000). En effet, suite à l'extraction de l'ADN total et à l'amplification par PCR d'un fragment conservé d'ADNr 16S (caractéristique de « l'espèce »), celui-ci est séparé par électrophorèse en fonction de sa structure tridimensionnelle, donc de sa séquence. Les profils ainsi obtenus correspondent à une alternance de pics représentant chacun un ADNr 16S distinct et par extension une espèce. Suivant ce principe, les profils SSCP de la communauté *archaea* des écosystèmes « adaptés » et « non adaptés » utilisés pour l'inoculation initiale des réacteurs ont été déterminés dans un premier temps (temps initial) (voir **Figure H12**). Il apparaît que les profils de la communauté *archaea* des deux écosystèmes sont sensiblement différents, chacun présentant des pics majoritaires distincts (à l'exception du pic majoritaire commun **A**). Ces différences sont le résultat de l'origine de ces deux écosystèmes, chaque digestat étant particulièrement adapté aux boues à traiter (elles-mêmes caractéristiques des procédés de traitement). De plus, par comparaison entre le profil correspondant au substrat en boues mixtes fraîches et celui de l'écosystème adapté, il apparaît que ces deux profils sont proches, ceux-ci présentant les

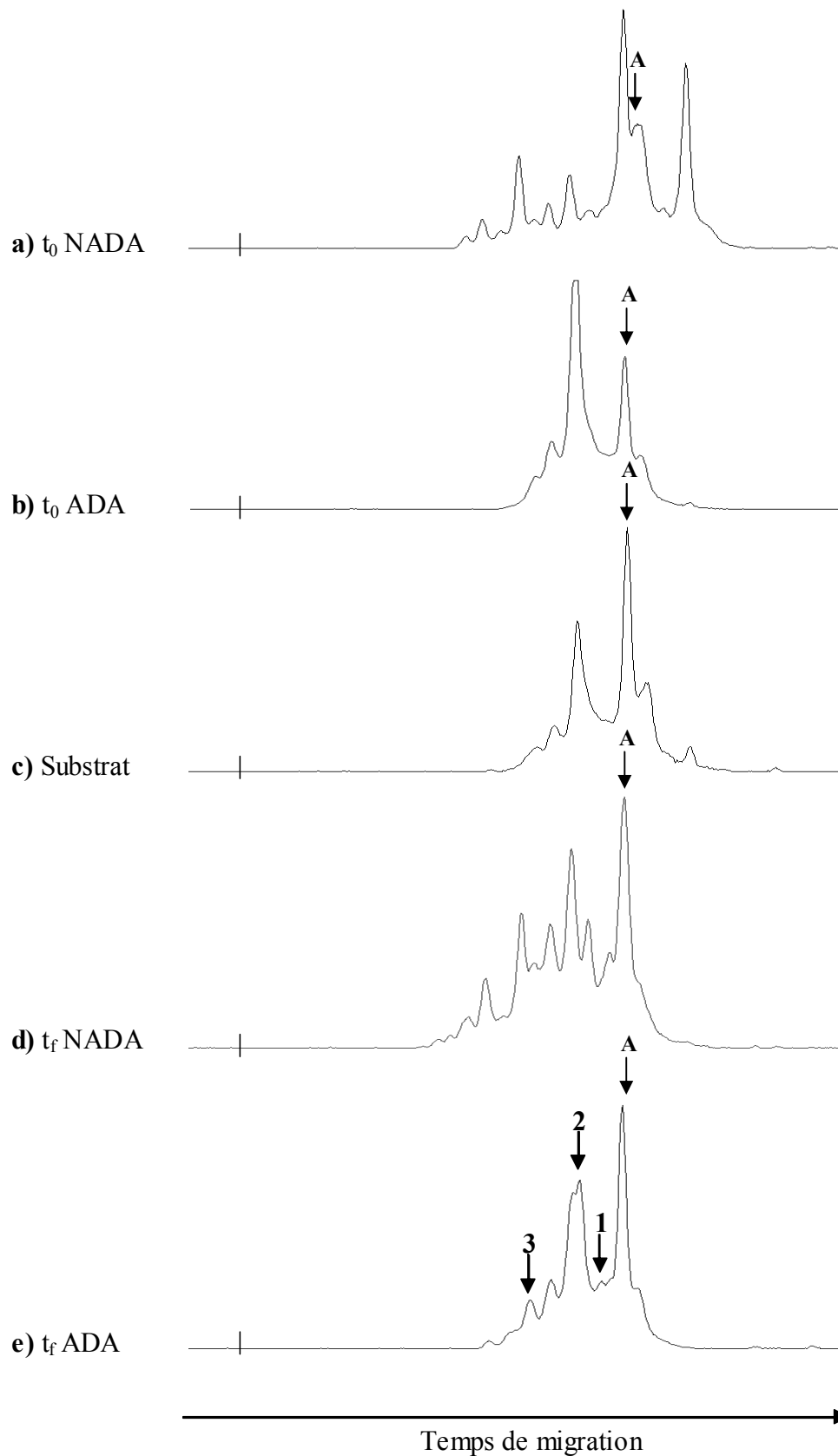


Figure H12 : Profils SSCP alignés de la communauté *archaea* des écosystèmes d'inoculation non adapté (NADA) et adapté aux HAPs (ADA) au temps initial (t₀) et au temps final (t_f), et du substrat en boues fraîches d'alimentation.

mêmes pics majoritaires. Les boues fraîches n'étant pas stérilisées avant digestion, la similitude de ces deux profils est vraisemblablement le résultat d'une sélection naturelle au sein du digesteur industriel qui s'est peu à peu parfaitement adapté au type de boues à traiter.

Dans un deuxième temps, les profils SSCP de la communauté *archaea* des réacteurs NADA et ADA à l'équilibre ont été réalisés (temps final), l'alimentation des réacteurs ayant été effectuée avec le même substrat (voir **Figure H12**). Il apparaît alors que, pour le réacteur NADA, l'écosystème s'est diversifié, par rapport au temps initial, avec un nombre plus important de pics majoritaires et un profil significativement différent. Ce changement de la communauté *archaea* majoritaire est vraisemblablement le résultat d'une sélection particulière due à l'introduction d'un nouveau type de substrat en continu et des espèces retrouvées à l'origine dans l'écosystème non adapté. L'apport exogène par le substrat *d'archaea* méthanogènes a donc permis de diversifier cette population. Dans le cas du réacteur ADA, le profil final présente les mêmes pics majoritaires qu'au temps initial, l'écosystème adapté n'ayant pas évolué de manière significative et restant proche du profil obtenu pour le substrat d'alimentation. En effet, le substrat et les conditions opératoires utilisées pour le réacteur ADA sont strictement identiques aux conditions ayant permis d'obtenir cet écosystème adapté et sélectionné dans le digesteur d'origine. D'autre part, au regard de la corrélation entre les performances méthanogènes et d'élimination des HAPs, il peut être intéressant d'identifier les pics ou les caractéristiques du profil de population qui se distinguent entre les deux écosystèmes. Ainsi, la comparaison entre les deux profils SSCP (NADA et ADA) montre que trois pics semblent se distinguer particulièrement et qui pourraient expliquer les différences de performances des deux écosystèmes (pic n°1, n°2 n°3, voir **Figure H12**).

Afin d'estimer l'implication des trois séquences différants entre les écosystèmes adaptés et non adaptés, les profils SSCP des réacteurs précédemment cités ont été déterminés (voir **Figure H13**): Ainsi, dans un premier temps, les profils SSCP des réacteurs bioaugmentés à 4 % (NADA4+) et à 10 % (NADA10+) ont été réalisés et comparés aux réacteurs non adapté NADA et adapté ADA. Il apparaît alors que dans l'essai à 4 %, outre le pic majoritaire, les pics d'intérêt ne sont pas retrouvés dans le profil SSCP. En effet, ce profil reste relativement proche du profil du réacteur NADA, exception faite des proportions entre les pics, mais avec le même nombre de pics majoritaires.

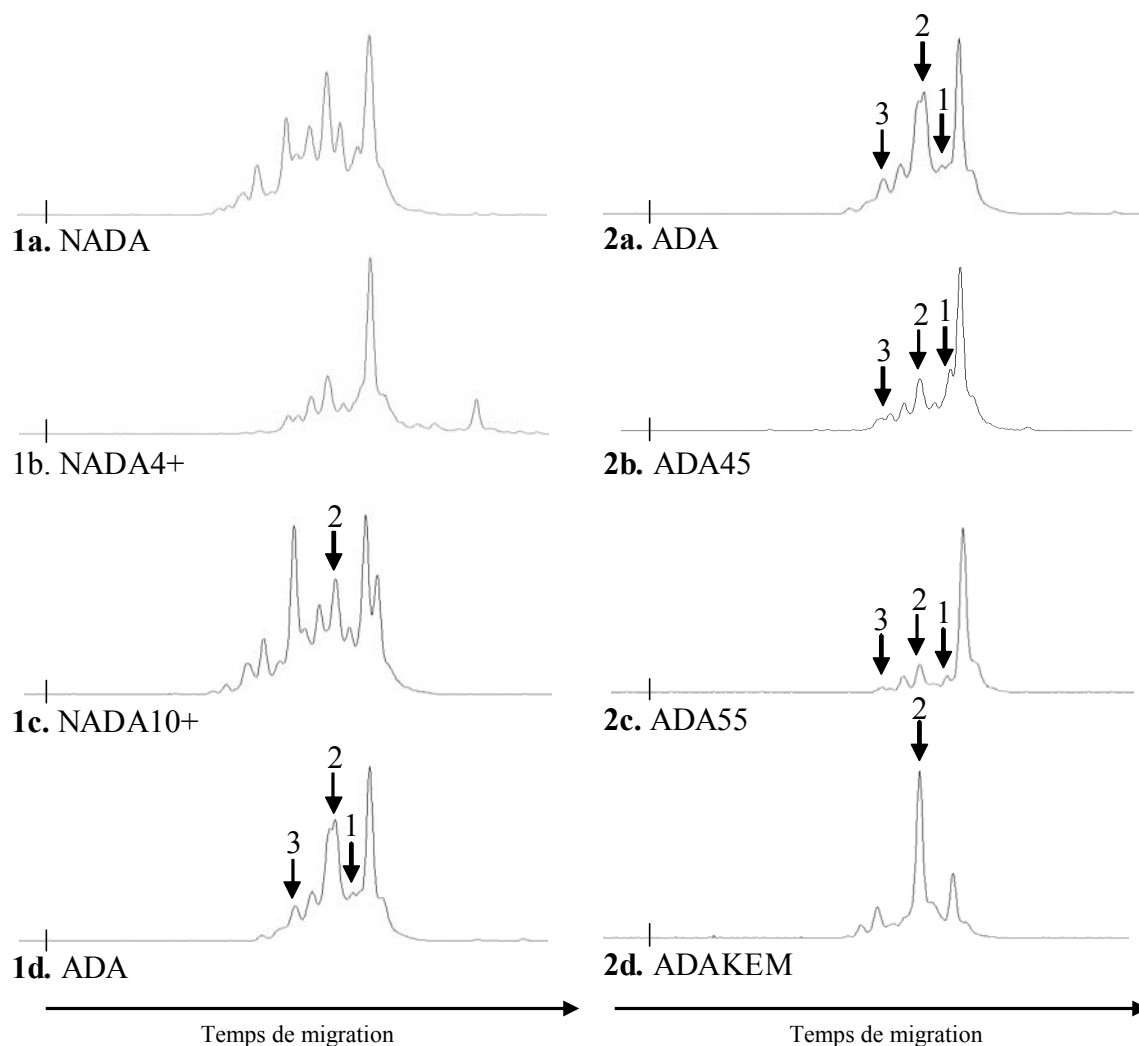


Figure H13 : Profils SSCP de la population *archaea* de divers écosystèmes à l'équilibre pour les réacteurs non adaptés - **série 1**- (NADA) ou adapté à 4 % (NADA4+), à 10 % (NADA10+) et des réacteurs à écosystème adapté – **série 2** - à 35°C (ADA), 45°C (ADA45), 55°C (ADA55) et après ajout de KEMAUR (ADAKEM). (unité arbitraire en ordonnées).

Par comparaison, les caractéristiques présentées par le profil du réacteur NADA10+ sont intermédiaires entre les profils des réacteurs NADA et ADA, avec une certaine prépondérance de pics distincts. Dans ce réacteur, une grande diversité s'est installée au cours du procédé, la bioaugmentation à 10 % de l'écosystème non adapté ayant permis d'intégrer et de maintenir les *archaea* méthanogènes de l'inoculum non adapté, mais également ceux du substrat ou de l'écosystème adapté. Au sein de ce mélange complexe de pics, il apparaît toutefois que le pic n°2 est spécifiquement retrouvé dans ce profil (voir **Figure H13 – série 1** -). A noter que les pics n°1 et 3 pourraient être présents mais minoritaires et donc peu distingués au sein de l'ensemble des pics détectés. Ainsi, dans le cas des réacteur NADA, NADA4+, NADA10+ et ADA, les performances de méthanogénèse peuvent être étroitement

corrélées avec les profils SSCP correspondants, le profil SSCP du réacteur NADA10+ étant un intermédiaire entre les deux écosystèmes non adapté NADA et adapté ADA. Enfin, la présence d'un pic majoritaire n°2 pourrait être corrélées avec les performances croissantes d'élimination des HAPs.

Dans une seconde série d'expérience, l'effet de la température (ADA35 - ADA45 - ADA55) a été testée sur les performances d'élimination des HAPs (*cf Chapitre F*). Confirmant le fait que les performances de méthanogénèse et d'élimination des HAPs furent proches pour les trois essais, il apparaît que les profils SSCP de la population *archaea* comportent de grandes similitudes (voir **Figure H13 – série 2 -**). En effet, les profils, donc les différentes espèces présentes, restent rigoureusement similaires entre les essais et seules les proportions entre les différentes espèces différent. Les pics n°1, n°2 et n°3 peuvent alors être identifiés pour l'ensemble des essais.

Cependant, plus que la présence des pics d'intérêt au sein de l'écosystème complexe, il semblerait que le profil entier de la population *archaea* soit déterminant dans le processus d'élimination des HAPs et de méthanogénèse. En effet, dans le cas du réacteur ADAKEM, l'ajout de KEMA□URTM au sein de l'écosystème a conduit à des performances intermédiaires de méthanogénèse et d'élimination des HAPs (*cf Chapitre F*). Or, le profil SSCP de ce réacteur, présente une composition significativement différente de l'écosystème méthanogène, non pas par les espèces en présence (profils identiques), mais bien par leur rapport relatif : le pic majoritaire retrouvé dans la plupart des réacteurs est, dans ce cas, devenu minoritaire, l'écosystème ayant été perturbé par la présence du KEMA□URTM dans le milieu réactionnel (voir **Figure H13**). Ce composé peut en effet être à l'origine de la sélection et du changement de population de l'écosystème méthanogène qui a dû s'adapter à de nouvelles conditions expérimentales. Ce résultat est de plus à rapprocher des observations précédentes où l'addition d'une source externe de carbone avait introduit une perturbation apparente de l'écosystème de dégradation et une réduction significative du potentiel d'élimination des HAPs (*cf Chapitre F, ajout de surfactants et de méthanol sous conditions anaérobies*).

Ainsi, dans tous les cas, il apparaît que les performances de méthanogénèse et, par conséquent d'élimination des HAPs, sont étroitement corrélées avec les profils SSCP des populations *archaea* en présence. La présence de certains pics majoritaires, notamment le pic n°2, pourrait être une condition nécessaire mais pas suffisante, d'obtention de performances

optimales d'élimination des HAPs. Plus que les espèces en présence, la biodégradation de ces composés pourrait plutôt requérir un profil bien spécifique de la population *archaea* méthanogène.

H4-2. Séquençage et positionnement des clones archaea des réacteurs ADA et NADA au sein d'un arbre phylogénétique

Afin d'identifier les espèces en présence et de nommer les pics étudiés, le clonage et le séquençage des échantillons issus des réacteurs NADA et ADA ont été réalisés lorsque ces réacteurs furent sous un état d'équilibre macroscopique (1 clone = 1 séquence unique représentant une espèce *archaea*). Dans le cas du réacteur ADA, 19 clones, dénommés FAX, ont été obtenus et, après analyse par SSCP (1 clone = 1 pic), chaque pic du profil SSCP total a pu être identifié et assigné à un groupe de clones (voir **Figure H14**). De la même manière, 16 clones, dénommés FBx, ont été isolés dans le cas du réacteur NADA et ont permis d'identifier la majorité des pics du profil initial (voir **Figure H14**). Ainsi, sur l'ensemble des clones obtenus, certains possèdent des séquences identiques à moins de 2 %. Ils peuvent donc être regroupés dans des groupes distincts qui représentent une espèce unique (5 groupes au total pour l'écosystème ADA et 9 groupes pour NADA).

Dans le cas du réacteur ADA, il s'avère qu'aucun clone ne présente de profil s'ajustant avec les pics n°1 et n°3 précédemment définis. Ces deux pics correspondent en fait à des fragments de pics déjà identifiés (groupe FA1 et FA5). Ainsi, seul le pic n°2 (FA2) se distingue de par sa propre existence et de par sa proportion dans l'échantillon. Ce pic reste toutefois accolé avec celui des clones du groupe FA3. A noter également que la majorité des clones se répartissent entre FA1 (6 clones), FA2 (4 clones) et FA5 (6 clones), ces trois groupes représentant plus de 80 % des clones totaux. Ces fréquences, qui possèdent toutefois une faible valeur statistique vu le nombre de clones obtenus (19), illustrent le fait que les pics FA1 et FA2 sont largement majoritaires dans le profil de la communauté *archaea* du réacteur ADA (voir **Figure H14**).

Dans le cas du réacteur NADA présentant un nombre de clones isolés plus faibles (16 au total), il apparaît que la diversité de la population *archaea* est beaucoup plus importante avec près de 9 groupes de clones distincts. Cette diversité est vraisemblablement le résultat du mélange d'un écosystème non adapté à l'inoculation du réacteur et de l'implantation des bactéries méthanogènes présentes dans le substrat d'alimentation. Peu de groupes se

distinguent par leur fréquence de clones retrouvés à l'exception de FB9 (4 clones) et FB1 le pic majoritaire (3 clones), le reste représentant des groupes minoritaires.

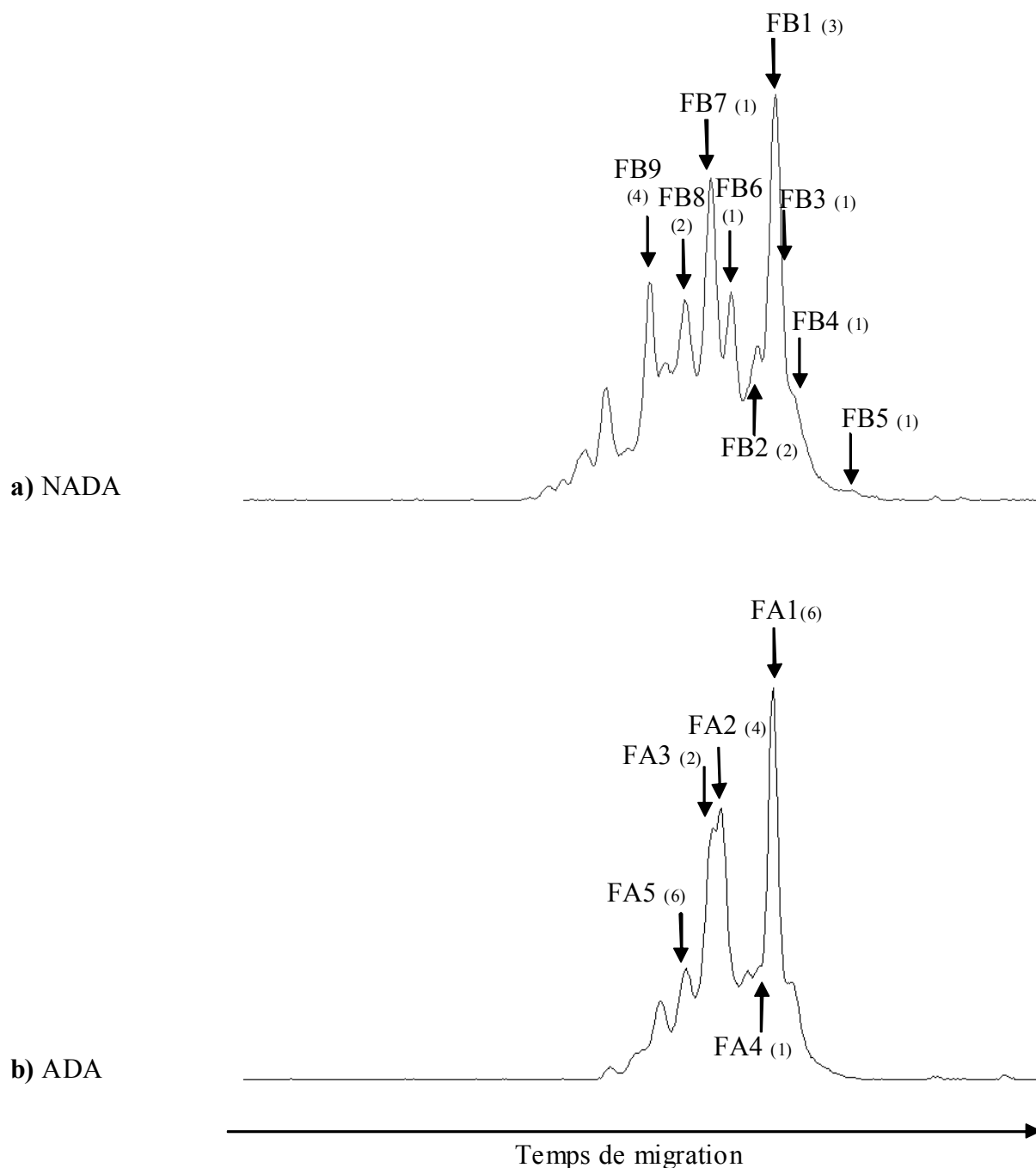


Figure H14 : Profils SSCP et assignation des groupes de clones isolés (nom et nombre de clones isolés) de la population *archaea* des écosystèmes à l'équilibre pour les réacteurs non adapté – série FBx - (NADA) et adapté aux HAPs – série FAx -(ADA) (unité arbitraire en ordonnées).

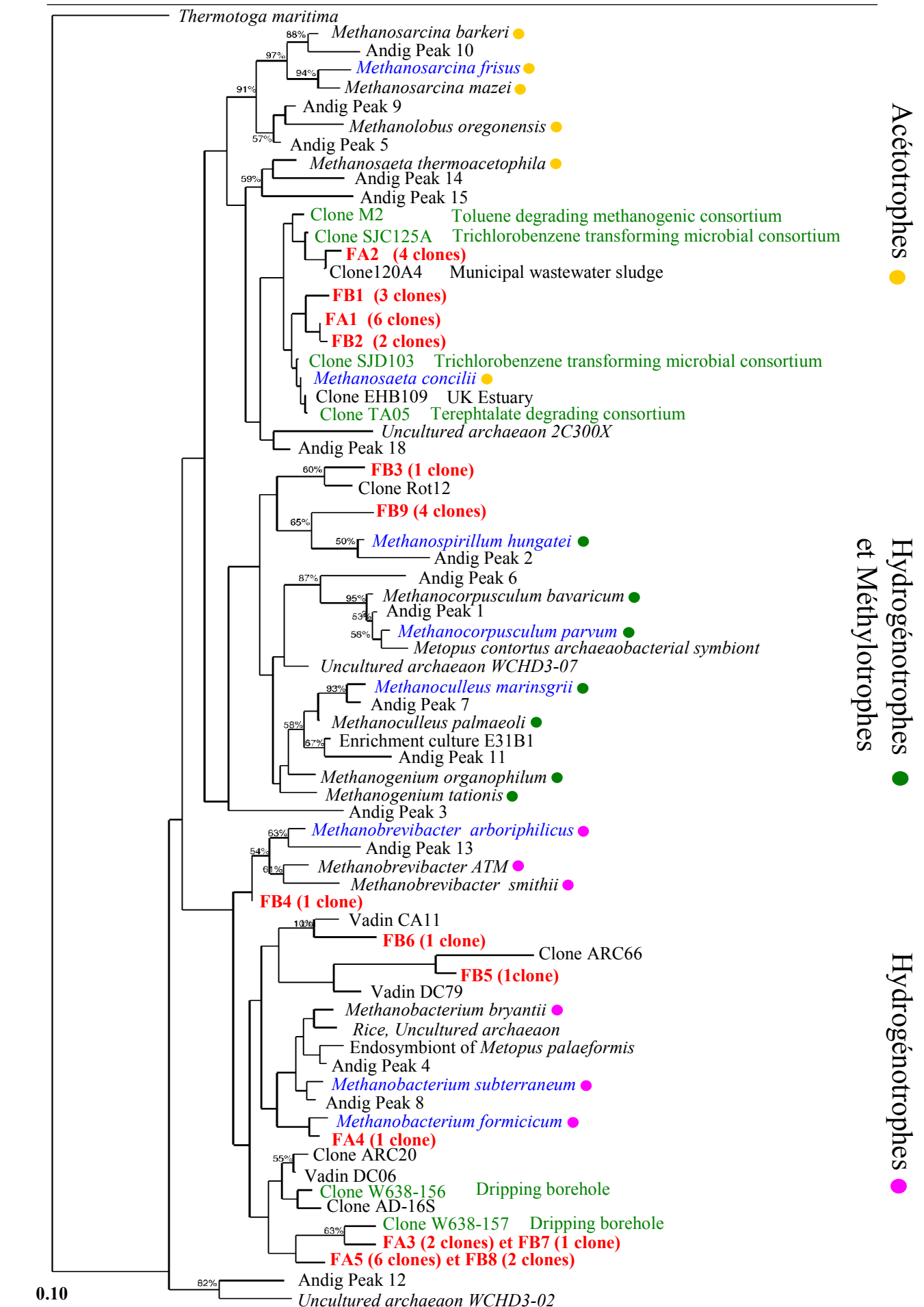
Après avoir regroupé les différents clones isolés en fonction de leur profil SSCP unique, le séquençage de chaque grand groupe représentant une espèce *d'archaea* a permis d'identifier les espèces *archaea* présentes dans les deux écosystèmes. Ensuite, par le positionnement des séquences des clones isolés au sein d'un arbre phylogénétique de la communauté *archaea* décrite dans la littérature, les différentes espèces en présence ont été caractérisées (voir **Figure H15**). Parmi l'ensemble des clones isolés, il en est retrouvé dans les trois grands groupes *d'archaea* méthanogènes : les Acétotrophes qui utilisent principalement l'acétate comme source de carbone et d'énergie, les Hydrogéntrophes utilisant uniquement le CO₂ et l'H₂ et les Hydrogéntrophes-Méthylotrophes pouvant utiliser les composés à groupement méthyl comme le méthanol, les méthylamines ou les diméthyl sulfides (Garcia et al., 2000). Plus précisément, dans le réacteur ADA, le groupe majoritaire FA1 est proche de *Methanosaeta concilii*. Ce micro-organisme possède la particularité de n'utiliser que l'acétate comme source de carbone (acétotrophe obligatoire) (Garcia, 2000). Relativement commun, *Methanosaeta concilii* est retrouvé dans plus de 80 % des digesteurs anaérobies industriels (Leclerc, 2002). Particulièrement intéressant pour l'étude de l'élimination des HAPs, divers auteurs ont montré son implication dans la dégradation sous conditions anaérobies de divers hydrocarbures et autres solvants chlorés (composés aromatiques). Ce micro-organisme participerait en effet à fournir au système l'énergie nécessaire pour la dégradation de ces molécules par d'autres micro-organismes (Dojka et al., 1998). Particulièrement adapté, il est retrouvé à plus de 80 % dans des réacteurs anaérobies méthanogènes de dégradation de molécules aromatiques comme le trichlorobenzène (von Wintzingerode et al., 1999). Ainsi, *Methanosaeta concilii* semblerait particulièrement impliqué dans les diverses relations syntrophiques pour la dégradation de molécules aromatiques. Il a en effet été montré son implication dans la dégradation du benzoate en association avec *Syntrophus gentianae* et d'autres *archaea* comme *Methanospirillum hungatei* (Dojka et al., 1998). Proche de *Methanosaeta concilii*, le groupe FA2, qui représente le pic n°2 suspecté de participer à l'élimination des HAPs, reste proche de clones récemment isolés participant à la dégradation des molécules aromatiques comme le trichlorobenzène, le toluène voire le téréphtalate (Ficker et al., 1999 ; von Wintzingerode et al., 1999 ; Wu et al., 2000). Ces deux groupes (FA1 et FA2), largement majoritaires dans le réacteur ADA se trouvent donc dans une zone où les différentes espèces répertoriées participent activement à la dégradation de certaines molécules aromatiques en symbiose avec d'autres micro-organismes. Particulièrement adapté aux boues granulaires, *Methanosaeta concilii* présente de plus des propriétés hautement

hydrophobes lui conférant une plus forte accessibilité à ces substrats aromatiques plus ou moins solubles dans l'eau (Grotenhuis et al., 1992). Enfin, outre les espèces du genre *Syntrophus* sp. reconnues pour leur activité symbiotique avec *Methanosaeta concilii*, d'autres espèces peuvent également participer à la dégradation symbiotique de composés aromatiques, dont les HAPs pour certaines bactéries sulfato-réductrices (Garcia, 2000 ; Kathikeyan et Bhandari, 2000 ; von Wintzingerode et al., 1999 ; Zhang et al., 2000). D'autre part, le second grand groupe de clones retrouvés dans le réacteur ADA, FA3, FA4 et FA5 (9 clones au total), se trouve être très proche d'autres bactéries d'intérêt : *Methanobacterium* sp. Ces *archaea*, hydrogénophiles obligatoires, peuvent également participer à une action symbiotique indirecte en éliminant les molécules de H₂, inhibitrices de l'activité méthanogène et produites au cours de la dégradation des composés aromatiques (Dojka et al., 1998).

Par comparaison, un grand nombre d'*archaea* différentes sont retrouvées dans le réacteur NADA et nombre d'entre elles restent très proches des clones isolés dans le réacteur ADA (voir **Figure H15**). Moins représentées dans le réacteur NADA (FB1 et FB2, 30 % des clones) par rapport à FA1 et FA2 (53 % des clones), un nombre limité de souches *archaea* proches de *Methanosaeta concilii* permettrait d'expliquer les performances minimales observées au cours du procédé. En effet, dans un milieu où les HAPs ne participent vraisemblablement pas à la sélection des *archaea* méthanogènes de par leurs faibles concentrations, la composition et les diverses interactions entre les différentes espèces méthanogènes peuvent s'avérer primordiales dans le processus de dégradation de ce type de composés. Ainsi, comme il l'a été suggéré précédemment, plus qu'une simple espèce, une certaine configuration de la population *archaea* (en qualité et en quantité) serait nécessaire pour permettre une dégradation optimale des HAPs, et ce en symbiose avec d'autres micro-organismes de l'écosystème.

En conclusion, au regard des résultats obtenus, l'écosystème méthanogène apparaît non seulement indispensable au processus de dégradation anaérobie des HAPs, mais une certaine configuration de la flore microbienne est nécessaire afin d'obtenir des performances d'élimination optimales (action symbiotique ou cométabolisme de ces composés).

FIGURE H15 (page suivante) : Arbre phylogénétique *archaea* et positionnement des groupes de clones issus des réacteurs ADA (FA) et NADA (FB) (en Rouge). En bleu : les *archaea* méthanogènes le plus souvent retrouvés dans les digesteurs anaérobies de boues (Leclerc et al., 2002). En vert : les clones *archaea* d'intérêt récemment isolés et séquencés au sein d'écosystèmes environnementaux complexes (Ficker et al., 1999 ; Moser et al., 2002 ; von Wintzingerode et al., 1999 ; Wu et al., 2000).



L'objectif principal de ce travail a été d'étudier et d'optimiser l'élimination biologique des HAPs et PCBs au cours de la digestion anaérobie et aérobie de boues urbaines naturellement contaminées. Choisies comme modèle d'étude, ces deux familles de micropolluants organiques sont les seules actuellement concernées par les textes législatifs en vigueur concernant l'épandage de boues urbaines. En outre, leur devenir au cours des procédés actuels de stabilisation biologique des boues reste encore indéterminé, notamment sous des conditions anaérobies et aérobies de digestion. Ainsi, dans l'objectif de répondre à ces interrogations, la présente étude a été réalisée en plusieurs étapes :

- Dans un premier temps, une méthode d'analyse des HAPs a été mise au point avec pour objectif le suivi de réacteurs de digestion à l'échelle du laboratoire. En effet, alors que l'analyse des PCBs avait été préalablement optimisée (laboratoire d'analyse des sols d'ARRAS), l'analyse des HAPs dans les boues restait encore peu reproductible au regard des fortes disparités répertoriées dans la littérature (en général entre 10% et 20% d'erreur). Au cours de cette étude, il fut donc montré que, plus que les conditions d'extraction à l'ASE, les conditions de reprise et de séchage de l'échantillon étaient primordiales pour une extraction optimale et reproductible des HAPs. La fiabilité de la méthode proposée fut également validée par les faibles pertes mesurées sur l'ensemble de l'extraction, par les résultats fournis proches de la méthode de référence au Soxhlet et par l'utilisation de boues certifiées. Ainsi, après optimisation, la méthode proposée permet de doser des concentrations fiables en HAPs avec un taux moyen d'erreur inférieur à 2%. Ce résultat fut confirmé par l'analyse à long terme de plus de 80 échantillons de boues et pour l'ensemble des HAPs. Une fois cette méthode mise au point, il fut alors envisagée d'étudier la disparition des HAPs et PCBs lors d'étude au sein de réacteurs de digestion à l'échelle du laboratoire.

- Dans la seconde partie de l'étude, il fut mis en évidence le potentiel naturel d'élimination des HAPs et des PCBs par des écosystèmes adaptés lors de la digestion anaérobie et aérobie de boues naturellement contaminées. Avant toute détermination des performances d'élimination, il a été proposé une méthode de calcul et d'analyse des résultats, méthode basée sur un bilan de matière entre les concentrations en micropolluants dans le substrat et les caractéristiques du procédé de digestion (temps de séjour hydraulique). Ainsi, il a été possible de déterminer des performances d'élimination avec une erreur totale comprise entre 5 et 10% (erreurs d'analyse et d'homogénéité du réacteur). Dans le cas des HAPs, les pertes abiotiques étant strictement limitées aux plus petits HAPs, il fut montré pour la

première fois sous conditions de digestion anaérobie méthanogène une disparition significative de l'ensemble des HAPs étudiés. Longtemps considérée comme irréalisable, la dégradation des HAPs sous conditions anaérobies méthanogènes requiert certaines conditions opératoires (mode continu) et un écosystème parfaitement adapté à ce genre de pollution. Cette disparition semble toutefois fortement limitée par le taux de réduction des MS, donc par des aspects de transfert de matière et de bioaccessibilité des HAPs. Des résultats similaires ont été montrés pour l'élimination des PCBs sous conditions anaérobies méthanogènes, avec une forte limitation par les propriétés de transfert de matière. D'autre part, il fut montré sous conditions aérobies que, pour les deux familles de micropolluants concernés, les performances d'élimination étaient nettement améliorées, en conséquence directe de conditions opératoires favorisant vraisemblablement leur diffusion. Pour ces deux familles de micropolluants présentant des propriétés physico-chimiques d'hydrophobicité relativement proches, les performances d'élimination furent donc similaires et semblaient plus particulièrement limitées par des aspects de transfert de matière, notamment sous conditions anaérobies. En prenant les HAPs comme modèle d'étude, il fut donc choisi d'améliorer les conditions de transfert et de diffusion des HAPs notamment en variant les conditions opératoires et par l'addition de composés activateurs de la diffusion comme les surfactants et les solvants.

- Ainsi, dans une troisième partie, l'influence des conditions opératoires puis de l'ajout d'activateurs de diffusion (surfactants et méthanol) fut étudiée vis à vis des performances d'élimination des HAPs. Lors d'un essai préliminaire et contrairement à ce qui était attendu, une étape de broyage du substrat a montré une réduction totale de l'élimination des HAPs liée probablement à l'augmentation de la surface d'échange et à l'emprisonnement spécifique des HAPs au sein de la matrice solide. Ainsi, confirmant l'absence d'HAPs dans la phase aqueuse, il s'avère qu'une simple loi de diffusion ne permet pas d'expliquer ces résultats et il semblerait plus vraisemblable que les HAPs soient spécifiquement adsorbés à la matrice solide (cinétique de désorption non linéaire). Toutefois, sous conditions aérobies, il a été montré que l'augmentation à $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ou la présence de méthanol dans le milieu réactionnel permettait d'éliminer l'ensemble des HAPs dans leur plus grande partie ($> 80\%$). Les deux procédés proposés permirent d'obtenir des boues dont les concentrations finales en HAPs respectent les normes actuelles et futures. Par comparaison, il est apparu que l'écosystème méthanogène de digestion était plus fortement influencé par les changements environnementaux. En effet, les performances d'élimination biologique des HAPs sont

fortement limitées par une certaine perturbation de l'écosystème suite à l'ajout de surfactants ou d'une source de carbone supplémentaire comme le méthanol. Il semble donc que les mécanismes mis en jeu pour l'élimination des HAPs soient plus complexes que sous conditions aérobies et surtout plus sensibles aux conditions environnementales. Il fut donc suggérer la présence d'un consortium de dégradation particulièrement adapté aux boues (et aux HAPs) et toute perturbation de l'équilibre de celui-ci engendre une réduction des performances d'élimination des HAPs.

- L'objectif principal de la quatrième et dernière partie de l'étude fut de caractériser les mécanismes mis en jeu lors de l'élimination des HAPs au cours de la digestion anaérobie méthanogène des boues contaminées. L'utilisation de molécules marquées radioactivement a alors permis de montrer que les HAPs étaient réellement dégradés sous conditions anaérobies méthanogènes, sans toutefois montrer la minéralisation totale des HAPs, ni la nature des intermédiaires de réaction. Dans un second temps, il a été montré l'influence de l'adaptation à long terme de l'inoculum méthanogène ainsi que la nécessité de l'étape de méthanogénèse dans le processus d'élimination des HAPs. Suite à l'identification moléculaire des souches en présence dans l'écosystème méthanogène de dégradation, il fut montré que, outre la présence de certaines souches impliquées dans la dégradation de diverses molécules aromatiques, il semblerait qu'une configuration particulière du consortium méthanogène soit particulièrement adaptée à la dégradation des HAPs.

Au regard de l'ensemble des résultats obtenus, les principales perspectives de recherche qui pourraient être mises en oeuvre à ce stade, seraient de deux ordres :

- Le premier type d'investigations à envisager porterait sur un aspect applicatif avec la mise au point des bioprocédés anaérobies et aérobies. Sous conditions anaérobies (procédé le plus utilisé), il pourrait être intéressant d'améliorer les conditions de transfert par l'étude de l'influence de l'agitation mécanique et d'une agitation fluïdique par réinjection du biogaz produit au sein du réacteur. Toutefois, dans ce cadre d'étude, la principale difficulté reste que le consortium méthanogène ne doit pas être perturbé. D'autre part, sous conditions aérobies, deux procédés présentent des performances intéressantes pour une application industrielle, c'est à dire la digestion à 35°C et suite à l'ajout de méthanol. A ce stade, il paraît indispensable de tester la robustesse de ces procédés, notamment en testant les limites de

concentrations acceptées. Par la suite, afin de réaliser le changement d'échelle, il reste nécessaire de tester des conditions d'aération et d'agitation proche de la réalité industrielle qui pourraient s'avérer limitantes pour la diffusion des HAPs. De plus, il serait nécessaire de vérifier que le comportement des PCBs sous conditions aérobies présente bien des similitudes quant aux performances de dégradation biologique de ces composés.

- Le second type d'investigations à mettre en oeuvre porterait essentiellement sur une meilleure compréhension des nombreux mécanismes impliqués dans la dégradation anaérobie des HAPs. De nature relativement complexe, les nombreuses interactions existant entre les divers micro-organismes restent à être déterminées et notamment par la détermination des intermédiaires de réaction et des différentes souches de micro-organismes mis en jeu. Une approche globale d'écologie microbienne et de dynamique des populations bactériennes serait alors nécessaire pour caractériser l'évolution des communautés bactériennes méthanogènes au sein de ces réacteurs de digestion de boues contaminées.

- [1] **Abramowicz D.A. (1990).** Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. *Crit.Rev.Biotechnol.* **10**, 241-251.
- [2] **Acobas F., Beluze V., Benanou D., Bonnin C., Herremans L. and Sztajn bok P (1997).** Problématique de l'analyse des HAPs et PCBs dans les boues de stations d'épuration. *Journées techniques : Aspects sanitaires et environnementaux de l'épandage des boues d'épuration urbaines*. Editions ADEME, Angers.
- [3] **Acquaviva M., Bertrand J.C. and Gilewicz M. (2001).** Effect of a synthetic surfactant on phenanthrene and n-eicosane utilization by two pure marine strains grown separately in batch cultures with or without sand particles. *World J. Microbiol.Biotechnol.* **17**, 481-485.
- [4] **Adriaens P. and Focht D.D. (1990).** Continuous coculture degradation of selected polychlorinated biphenyl congeners by *Acinetobacter spp.* in an aerobic reactor system. *Environ.Sci.Technol.* **24**, 142-149.
- [5] **AFNOR (2001).** *Caractérisation des boues – Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des polychlorobiphényles (PCB)*. Norme expérimentale **X33-012** du 2^e Janvier 2001 Association Française de Normalisation, St-Denis la Plaine, France.
- [6] **Agences de l'Eau (1994).** *L'assainissement des agglomérations : techniques d'épuration actuelles et évolutions*. Etude inter-agences n°27. Editions Agences de l'eau.
- [7] **Aitken M.D., Stringfellow W.T., Nagel R.D., Kazunga C. and Chen S.H. (1998).** Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can.J.Microbiol.* **44**, 743-752.
- [8] **Anid P.J., Nies L. and Vogel T.M. (1991).** Sequential anaerobic-aerobic biodegradation of PCBs in the river model. *In: On-site bioreclamation*. Ed. Butterworth-Heinemann, Boston, 428-436.
- [9] **Arai H., Kosono S., Taguchi K., Maeda M., Song E., Fuji F., Chung S.Y. and Kudo T. (1998).** Two sets of biphenyl and PCB degradation genes on a linear plasmid in *Rhodococcus erythropolis* TA421. *J.Ferment.Bioeng.* **86**(6), 595-599.
- [10] **Arundel J. (2000).** *Sewage and industrial effluent treatment*. Blackwell Science, Oxford.
- [11] **Arzayus K.M., Dickhut R.M. and Canuel E.A. (2001).** Fate of atmospherically deposited polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Chesapeake bay. *Environ.Sci.Technol.* **35**(11), 2178-2183.
- [12] **Avramova J., Link W., Naydenov A., Schulz A., Bratanov Z. and Mehandjiev D. (1999).** Combined ozone and microbial degradation of the six-membered rings PAH indeno(1,2,3-cd)pyrene in water solution. *Toxicol.Environ.Chem.* **70**, 305-315.
- [13] **Balashova N.V., Kosheleva I.A., Golovchenko N.P. and Boronin A.M. (1999).** Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains. *Process Biochem.* **335**, 291-296.
- [14] **Barkay T., Navon-Venezia S., Ron E.Z. and Rosenberg E. (1999).** Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier Alasan. *Appl.Environ.Microbiol.* **65**(6), 2697-2702.

- [15] **Barr D.P. and Aust S.D. (1992).** Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ.Sci.Technol.* **28**(2), 79-87.
- [16] **Bastiaens L., Springael D., Wattiau P., Harms H., deWachter R., Verachtert H. and Diels L. (2000).** Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria using PAH sorbing-carriers. *Appl.Environ.Microbiol.* **66**(5), 1834-1843.
- [17] **Bauer J.E. and Capone D.G. (1985).** Effects of four aromatic organic pollutants on microbial glucose metabolism and thymidine incorporation in marine sediments. *Appl.Environ.Microbiol.* **49**(4), 828-835.
- [18] **Beaudette L.E., Davies S., Fedorak P.M., Ward O.P. and Pickard M.A. (1998).** Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. *Appl.Environ.Microbiol.* **64** (6), 2222-2225.
- [19] **Beckles D.M., Ward C.H. and Hughes J.B. (1998).** Effect of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and sediments on fluoranthene biodegradation patterns. *Environ.Toxicol.Chem.* **17**(7), 1246-1251.
- [20] **Bedard D.L. and Quensen III J.F. (1995).** Microbial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. In : *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Edited by Young L.Y. and Cerniglia C.E., Wiley-Liss, Inc., New-York.
- [21] **Bernstein M.P., Sandford S.A., Allamandola L.J., Gillette J.S., Clemett S.J. and Zare R.N. (1999).** UV irradiation of polycyclic aromatic hydrocarbons in ices : production of alcohols, quinones and ethers. *Science.* **283**, 1135-1138.
- [22] **Berset J.D., Ejem M., Holzer R. and Lischer P. (1999).** Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Anal.Chim.Acta.* **383**, 263-275.
- [23] **Billingsley K.A., Backus S.M. and Ward O.P. (1999).** Effect of surfactant solubilization on biodegradation of polychlorinated biphenyl congeners by *Pseudomonas* LB4. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **52**, 255-260.
- [24] **Bispo A., Jourdain M.J. and Jauzein M. (1999).** Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Org.Geochem.* **30**, 947-952.
- [25] **Bitton G. (1994).** *Wastewater Microbiology*. Wiley-Liss, Inc., New-York.
- [26] **Boffetta P., Jourenkova n. and Gustavsson P. (1997).** Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control.* **8**(3), 444-472.
- [27] **Bogan B.W., Lahner L.M. and Paterek J.R. (2001).** Limited roles for salicylate and phthalate in bacterial PAH bioremediation. *Bioremediation Journal.* **5**(2), 93-100.
- [28] **Boldrin B., Tiehm A. and Fritzsche C. (1993).** Degradation of Phenanthrene, Fluorene, Fluoranthene and Pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl.Environ.Microbiol.* **59**(6), 1927-1930.

- [29] **Bomio M., Sonnleitner B. and Fiechter A. (1989).** Growth and biocatalytic activities of aerobic thermophilic populations in sewage sludge. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **32**, 356-362.
- [30] **Boonchan S., Britz M.L. and Stanley G.A. (1998).** Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotech.Bioeng.* **59**(4), 482-494.
- [31] **Bouwer E.J., Zhang W., Wilson L.P. and Durant N.D. (1997).** Biotreatment of PAH-contaminated soils/sediments. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **829**, 103-117.
- [32] **Boyle D., Wiesner C. and Richardson A. (1998).** Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white rot fungi. *Soil Biol.Biochem.* **30**(7), 873-882.
- [33] **Braida W.J., White J.C., Ferrandino F.J. and Pignatello J.J. (2001).** Effect of solute concentration on sorption of polyaromatic hydrocarbons in soil : uptake rates. *Environ.Sci.Technol.* **35**(13), 2765-2772.
- [34] **Breedveld G.D. and Sparrevik M. (2000-a).** Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodeg.* **11**, 391-399.
- [35] **Breedveld G.D. and Karlson D.A. (2000-b).** Estimating the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons for bioremediation of creosote contaminated soils. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **54**, 255-261.
- [36] **Broholm K., Nilsson B., Sidle R.C. and Arvin E. (2000).** Transport and biodegradation of creosote compounds in clayey till, a field experiment. *J.Contam.Hydrol.* **41**, 239-260.
- [37] **Broholm K. and Arvin E. (2001).** Biodegradation of creosote compounds : comparison of experiments at different scales. *Ground Water Monitoring and Remediation.* **21**(4), 101-108.
- [38] **Brunet H. (1998).** Recyclage agricole des boues : impact de la nouvelle norme réglementaire. *L'eau, l'industrie, les nuisances.* **217**, 50-53.
- [39] **Brunner W., Sutherland F.H. and Focht D.D. (1985).** Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil by analog enrichment. *J.Environ.Qual.* **14**, 324-328.
- [40] **Buitron G. and Capdeville B. (1993).** Uptake rate and mineralization of hexadecane and naphthalene by a mixed aerobic culture. *Water Res.* **27**(5), 847-853.
- [41] **Bury S.J. and Miller C.A. (1993).** Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons. *Environ.Sci.Technol.* **27**(1), 104-110.
- [42] **Canet R., Birnstingl J.G., Malcolm D.G., Lopez-Real J.M. and Beck A.J. (2001).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white rot fungi in a coal tar contaminated soil. *Bioresource Technol.* **76**,113-117.
- [43] **Castello G. and Gerbino T.C. (1993).** Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons with an ion-trap mass detector and comparison with other gas chromatographic and high-performance liquid chromatographic techniques. *J.Chromatog.A.* **642**, 351-357.
- [44] **Cerniglia C.E. (1992).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodeg.* **3**, 351-368.

- [45] **Chang B.V., Chou S.W. and Yuan S.Y. (1999).** Microbial dechlorination of polychlorinated biphenyls in anaerobic sewage sludge. *Chemosphere*. **39**(1), 45-54.
- [46] **Chassande C., Merillot J.M. and Wiart J. (2000).** *Les boues d'épuration municipales et leur utilisation en agriculture*. Dossier ADEME, Angers.
- [47] **Chaudhry G.R. and Chapalamadugu S. (1991).** Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol.Rev.* **55**(1), 59-79.
- [48] **Chen S.-H. and Aitken M. (1999).** Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environ.Sci.Technol.* **33**(3), 435-439.
- [49] **Cheubarn T. and Pagilla K.R. (1999).** Temperature and SRT effects on aerobic thermophilic sludge treatment. *J.Environ.Eng.* **125**(7), 626-629.
- [50] **Chun C.L., Lee J.J. and Park J.W. (2002).** Solubilization of PAH mixtures by three different anionic surfactants. *Environ.Pollut.* **118**, 307-313.
- [51] **Churchill S.A., Harper J.P. and Churchill P.F. (1999).** Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Appl.Environ.Microbiol.* **65**(2), 549-552.
- [52] **Clicquot de Mencque C. (1999).** Les équipements pour traiter les boues. *Environnement Magazine*. **1578**, 43-50
- [53] **Coates J.D., Anderson R.T. and Lovley D.R. (1996).** Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**(3), 1099-1101.
- [54] **Coates J.D., Woodward J., Allen J., Philp P. and Lovley D.R. (1997).** Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**(9), 3589-3593.
- [55] **Colberg P.J.S. and Young L.Y. (1995).** Anaerobic degradation of nonhalogenated homocyclic aromatic compounds coupled with nitrate, iron or sulfate reduction. In : *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Edited by L.Y. Young and C.E. Cerniglia, Wiley-Liss, Inc., New York.
- [56] **Commandeur L.C.M. and Parsons J.R. (1990).** Degradation of halogenated aromatic compounds. *Biodeg.* **1**, 207-220
- [57] **Commandeur L.C.M., May R.J., Mokross H., Bedard D.L., Reineke W., Govers H.A.J. and Parsons J.R. (1996).** Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes* sp.JB1 : metabolites and enzymes. *Biodeg.* **7**, 435-443.
- [58] **Conte P., Zena A., Pilidis G. and Piccolo A. (2001).** Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils induced by soil treatment with humic substances. *Environ.Pollut.* **112**, 27-31.
- [59] **Cook J.W., Hewett C.L. and Hieger I. (1933).** Isolation of a cancer-producing hydrocarbon

- from coal-tar. Isolation of 1,2- and 4,5-benzopyrenes, perylenes and 1,2-benzanthracene. *J.Chem.Soc.* **1933**, 396-398.
- [6□] **Cornelissen G., Van Zuilen H. and Van noort P.C.M. (1999-a).** Particle size dependence of slow desorption of *in situ* PAHs from sediments. *Chemosphere.* **38**(1□), 2369-238□
- [61] **Cornelissen G., Van Der Pal M., Van Noort P.C.M. and Govers H.A.J. (1999-b).** Competitive effects on the slow desorption of organic compounds from sediments. *Chemosphere.* **39**(11), 1971-1981.
- [62] **Cui Y. (1993).** *Détermination de valeurs limites pour des micropolluants organiques dans les boues de station d'épuration.* Editions Agence de l'eau Rhin-Meuse. Moulins-les-Metz, France.
- [63] **Cuny P., Faucet J., Acquaviva M., Bertrand J.-C. and Gilewicz M. (1999).** Enhanced biodegradation of phenanthrene by a marine bacterium in presence of a synthetic surfactant. *Lett.Appl.Microbiol.* **29**, 242-245.
- [64] **De Beer T., Besoo P., Hoornweg G.P., Velthorst N.H., Brinkman U.A.T. and Gooijer C. (1999).** Sensitive absorption detection for micro-column liquid chromatography by ultraviolet forward-scattering degenerate four-wave mixing. *Anal.Chim.Acta.* **390**, 55-64.
- [65] **Degremont (1989).** Stabilisation des boues. In : *Mémento Technique de l'eau.* 9^{ème} Edition. Tome 2. Editions Lavoisier, Paris.
- [66] **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. Thèse de l'Université LYON I, 26 Octobre 2□□□
- [67] **Deziel E., Paquette G., Villemur R., Lepine F. and Bisailon J.G. (1996).** Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas strain* growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**(6), 19□8-1912.
- [68] **Dickhut R.M., Canuel E.A., Gustafson K.E., Liu K., Arzayus K.M., Walker S.E., Edgecombe G., Gaylor M.O. and MacDonald E.H. (2000).** Automotive sources of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particulate matter in the Chesapeake Bay region. *Environ.Sci.Technol.* **34**(21), 4635-464□
- [69] **Dionex (1995).** *Système d'extraction accélérée à solvants ASE200™.* Dionex Corporation.
- [7□] **Dionex (1999).** *Extraction of PAHs from environmental samples by accelerated solvent extraction (ASE).* Application note (313). Dionex corporation.
- [71] **Dojka M.A., Hugenholtz P., Haack S.K. and Pace N.R. (1998).** Microbial diversity in a hydrocarbon-and chlorinated-solvent contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**(1□), 3869-3877
- [72] **Dur J.C., Rama R., Parola H. and Chaplain V. (1999).** Heterogeneous dissolution of benzo(a)pyrene by surfactant solutions. *Colloid Surface.* **162**, 249-257.
- [73] **Duteau N.M., Rogers J.D., Bartholomay C.T. and Reardon K.F. (1998).** Species-specific oligonucleotides for enumeration of *Pseudomonas putida* F1, *Burkholderia sp.* strain JS15□ and

- Bacillus subtilis* ATCC 7□3 in biodegradation experiments. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**(12), 4994-4999.
- [74] **Eggen T. and Majcherczyk A. (1998).** Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Int.Biodeter.Biodeg.* **41**, 111-117.
- [75] **Ellisalde N., Feix I. and Wiart J. (1994).** *Les germes pathogènes dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines.* n°1798. Editions ADEME, Angers.
- [76] **Environnement Magazine (1999).** Traiter les boues urbaines. *Environnement Magazine.* Oct 1999, Publidossier.
- [77] **Eschenbach A., Wienberg R. and Mahro B. (1998).** Fate and stability of non-extractable residues of [C₁₄]-PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. *Environ.Sci.Technol.* **32**(17), 2585-259□
- [78] **Ewen A., Lafontaine H.J., Hildesheim K.T. and Stuurman H.W. (1993).** Separation and determination of 22 PAHs by minibore HPLC with dual-wavelength UV detection. *Int.Chromatog.Lab.* **14**,4-8.
- [79] **Fava F., Bertin L., Pinelli D. and Nocentini M. (1999).** Characterization of the indigenous bacteria involved in the *ex-situ* aerobic bioremediation of a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Annali di chimica.* **89**,777-782.
- [8□] **Ferrari M.D. (1996).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and its application to bioremediation of contaminated soils and sludges. *Revista Argentina de Microbiologia.* **28**,83-98.
- [81] **Feix I., Jauzein M. and Wiart J. (1995).** *Les micropolluants organiques dans les boues résiduaires de stations d'épuration urbaines.* n°1800. Editions ADEME, Angers.
- [82] **Ficker M., Krastel K., Orlicky S. and Edwards E. (1999).** Molecular characterization of a toluene degrading methanogenic consortium. *Appl.Environ.Microbiol.* **65**(12), 5576-5585
- [83] **Fladung N.C. (1995).** Optimization of automated solid-phase extraction for quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous media by high-performance liquid chromatography-UV detection. *J.Chromatog.A.* **692**, 21-26.
- [84] **Flyvbjerg J., Arvin E., Jensen B.K. and Olsen S.K. (1993).** Microbial degradation of phenols and aromatic hydrocarbons in creosote-contaminated groundwater under nitrate-reducing conditions. *J.Contam.Hydrol.* **12**,133-15□
- [85] **Focht D.D., Searles D.B. and Koh S.C. (1996).** Genetic exchange in soil between introduced chlorobenzoate degraders and indigenous biphenyl degraders. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**(1□), 391□3913.
- [86] **Foght J.M., Gutnick D.L. and Westlake D.W.S. (1989).** Effect of Emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. *Appl.Environ.Microbiol.* **55**(1), 36-42.
- [87] **Freedman D.L. and Gossett J.M. (1989).** Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl.Environ.Microbiol.* **55** (9), 2144-2151.

- [88] **Furukawa K. (1994).** Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. *Biodeg.* **5**, 289-300
- [89] **Garcia J.L. (1990).** Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiol.Rev.* **87**, 297-308.
- [90] **Garcia J.L., Patel B.K.C. and Ollivier B. (2000).** Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe.* **6**, 205-226.
- [91] **Garcia Falcon M.S., Gonzalez Amigo S., Lage Yusty M.A., Lopez de Alda Villaizan M.J. and Simal Lozano J. (1996).** Enrichment of benzo(a)pyrene in smoked food products and determination by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J.Chromatog.A.* **753**, 207-215.
- [92] **Garrigues P. and Raoux C. (1997).** Inhibition sélective de la fluorescence des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) : Applications à la chromatographie en phase liquide. *Analisis.* **25**,243-246.
- [93] **Geiselbrecht A.D., Herwig R.P., Deming J.W. and Staley J.T. (1996).** Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget Sound sediments. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**(9), 3344-3349.
- [94] **Geiselbrecht A.D., Hedlung B.P., Tichi M.A. and Staley J.T. (1998).** Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the gulf of Mexico and comparison of their PAH degradation ability with that of Puget sound *Cycloclasticus* strains. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**(12), 4703-4710
- [95] **Gervaise Y., Heranval C., Beucher I. and Huau J. (1998).** Extraction accélérée et automatique par solvants : applications à l'analyse de micropolluants. *APTEN98*.
- [96] **Ghosh U., Talley J.W. and Luthy R.G. (2001).** Particle-size investigation of PAH desorption kinetics and thermodynamics from sediment. *Environ.Sci.Technol.* **35**(17), 3468-3475.
- [97] **Goodin J.D. and Webber M.D. (1995).** Persistence and fate of anthracene and benzo(a)pyrene in municipal sludge treated soil. *J.Environ.Qual.* **24**, 271-278.
- [98] **Gramss G., Voigt K.-D. and Kirsche B. (1999).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodeg.* **10**, 51-62.
- [99] **Grimberg S.J., Stringfellow W.T. and Aitken M.D. (1996).** Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**(7), 2387-2392.
- [100] **Grotenhuis J.T.C., Plugge C.M., Stams A.J.M. and Zehnder A.J.B. (1992).** Hydrophobicities and electrophoretic mobilities of anaerobic bacterial isolates from methanogenic granular sludge. *Appl.Environ.Microbiol.* **58**(3), 1054-1056
- [101] **Guerin W.F. and Jones G.E. (1988).** Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl.Environ.Microbiol.* **54**(4), 937-944.

- [1□2] **Guerin T.F. (1999-a).** Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using *ex-situ* landtreatment. *J.Hazard.Mat.* **65**, 3□5-315.
- [1□3] **Guerin T.F. (1999-b).** The extraction of aged polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues from a clay soil using sonication and a Soxhlet procedure: a comparative study. *J.EnvIRON.Monitor.* **1**, 63-67.
- [1□4] **Guha S., Peters C.A. and Jaffe P.R. (1999).** Multisubstrate biodegradation kinetics of naphthalene, phenanthrene and pyrene mixtures. *Biotechnol.Bioeng.* **65**(5), 491-499.
- [1□5] **Hagestuen E.D. and Campiglia A.D. (1999).** New approach for screening polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Talanta.* **49**, 547-56□
- [1□6] **Haitzer M., Höss S., Traunspurger W. and Steinberg C. (1999).** Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo(a)pyrene. *Aquat.Toxicol.* **45**, 147-158.
- [1□7] **Hakstege A.L. and van Geldermalsen L.A. (1998).** Pilot remediation of sediment from the petroleum harbour in Amsterdam. *Water Sci.Technol.* **37**(6-7), 4□3-4□9.
- [1□8] **Halling-Sorensen B. (1993).** Process chemistry and biochemistry of denitrification. *In: The removal of nitrogen compounds from wastewater.* Ed by Halling – Jorgensen. Elsevier, Amsterdam.
- [1□9] **Hamann C., Hegemann J. and Hildebrandt A. (1999).** Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**, 255-263.
- [11□] **Han Y., Sung S. and Dague R.R. (1997).** Temperature-phased anaerobic digestion of wastewater sludges. *Water Sci. Technol.* **36**(6-7), 367-374.
- [111] **Harayama S. (1997).** Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Curr.Opin.Biotechnol.* **8**, 268-273.
- [112] **Hartkamp-Commandeur L.C.M., Gerritse J., Govers H.A.J. and Parsons J.R. (1996).** Reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms enriched from dutch sediments. *Chemosphere.* **32**(7), 1275-1286.
- [113] **Hasegawa S. and Katsura K. (1999).** *Solubilization of organic sludge by thermophilic aerobic bacteria as a pretreatment for anaerobic digestion.* International Symposium on anaerobic digestion of solid waste. **Vol 1** (3B).
- [114] **Hawthorne S.B. and Grabanski C.B. (2000).** Vaporization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from sediments at ambient conditions. *Environ.Sci.Technol.* **34**(2□), 4348-4353.
- [115] **Hayes L.A., Nevin K.P. and Lovley D.R. (1999).** Role of prior exposure on anaerobic degradation of naphthalene and phenanthrene in marine harbor sediment. *Org.Chem.* **30**, 937-945.
- [116] **Hedlund B.P., Geiselbrecht A.D., Bair T.J. and Staley J.T. (1999).** Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp.

- nov. *Appl.Environ.Microbiol.* **65**(1), 251-259.
- [117] **Heemken O.P., Theobald N. and Wenclawiak B.W. (1997).** Comparison of ASE and SFE with Soxhlet, sonication, and methanolic saponification extractions for the determination of organic micropollutants in marine particulate matter. *Anal.Chem.* **69**, 2171-218□
- [118] **Heider J. and Fuchs G. (1997).** Microbial anaerobic aromatic metabolism. *Anaerobe.* **3**, 1-22.
- [119] **Heider J., Spormann A.M., Beller H.R. and Widdel F. (1999).** Anaerobic metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews.* **22**, 459-473
- [12□] **Henner P., Schiavon M., Morel J.L. and Lichtfouse E. (1997).** Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. *Analisis.* **25**(9-1□), 56-59.
- [121] **Herrick J.B., Stuart-Keil K.G., Ghiorse W.C. and Madsen E.L. (1997).** Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**(6), 233□2337.
- [122] **Hesselink W., Schiffer R.H.N.A. and Kootstra P.R. (1995).** Separation of polycyclic aromatic hydrocarbons on a wide-pore polymeric C₁₈ bonded phase. *J.Chromatog.A.* **697**, 165-174.
- [123] **Holliger C. and Zehnder A.J.B. (1996).** Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Curr.Opin.Biotechnol.* **7**, 326-33□
- [124] **Huau J. and Compiano A.M. (1996).** Préparation d'échantillons par extraction accélérée par solvant : application aux échantillons solides de l'environnement. *Spectra Analyse.* **190** (Mai-Juin), 34-36.
- [125] **Hughes J.B., Beckles D.M., Chandra S.D. and Ward C.H. (1997).** Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* **18**, 152-16□
- [126] **Jahan K., Ahmed T. and Maier W.J. (1999).** Modeling the influence of nonionic surfactants on biodegradation of phenanthrene. *Water Res.* **33**(9), 2181-2193.
- [127] **Johnson M.D., Keinath T.M. and Weber W.J. (2001).** A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. Characterization and modeling of phenanthrene desorption rates. *Environ.Sci.Technol.* **35**(8), 1688-1695.
- [128] **Joyce J.F., Sato C., Cardenas R. and Surampalli R.Y. (1998).** Composting of polycyclic aromatic hydrocarbons in simulated municipal solid waste. *Water Environ.Res.* **70**(3), 356-361
- [129] **Juhasz A.L. and Naidu R. (2000).** Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene. *Int.Biodeter.Biodeg.* **45**, 57-88.
- [13□] **Kanaly R.A. and Harayama S. (2000).** Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J.Bacteriol.* **182**(8), 2□59-2□67.
- [131] **Karthikeyan R. and Bhandari A. (2001).** Anaerobic biotransformation of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil microcosms : a review. *J.Hazard.Subs.Res.* **3**, 1-19.

- [132] **Kästner M., Breuer-Jammali M. and Mahro B. (1998).** Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**(1), 359-362.
- [133] **Kästner M., Streibich S., Beyrer M., Richnow H.H. and Fritsche W. (1999).** Formation of bound residues during microbial degradation of C₁₄-anthracene in soil. *Appl.Environ.Microbiol.* **65**(5), 1834-1842.
- [134] **Kelley I., Freeman J.P., Evans F.E. and Cerniglia C.E. (1993).** Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl.Environ.Microbiol.* **59**(3), 8□□8□6.
- [135] **Kelsey J.W., Kottler B.D. and Alexander M. (1997).** Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ.Sci.Technol.* **31**(1), 214-217.
- [136] **Kiene R.P. and Capone D.G. (1984).** Effects of organic pollutants on methanogenesis, sulfate reduction and carbon dioxide evolution in salt marsh sediments. *Mar.Environ.Res.* **13**, 141-16□
- [137] **Kipopoulou A.M., Manoli E. and Samara C. (1999).** Bioconcentration of PAHs in vegetables grown in an industrial area. *Environ.Pollut.* **106**, 369-38□
- [138] **Kirk P.W.W. and Lester J.N. (1990).** The fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during sewage sludge digestion. *Environ.Technol.* **12**,13-2□
- [139] **Kirso U. and Irha N. (1998).** Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotoxicol.Environ.Safety.* **41**, 83-89.
- [14□] **Koeleman M., Janssen W. and Letswaart H. (1999).** Dispersion of PAH and heavy metals along motorways in the Netherlands : an overview. *Sci.Total Environ.* **235**, 347-349.
- [141] **Kohl S.D. and Rice J.A. (1999).** Contribution of lipids to the nonlinear sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to soil organic matter. *Org.Geochem.* **30**, 929-936.
- [142] **Kopinke F.D., Georgi A. and Mackenzie K. (2001).** Sorption of pyrene to dissolved humic substances and related model polymers : Structure-Property correlation. *Environ.Sci.Technol.* **35**(12), 2536-2542.
- [143] **Kotterman M.J.J., Vis E.H. and Field J.A. (1998-a).** Successive mineralization and detoxification of benzo(a)pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp.strain BOS55 and indigenous microflora. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**(8), 2853-2858.
- [144] **Kotterman M.J.J., Rietberg H.-J., A. H. and Field J.A. (1998-b).** Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants. *Biotech.Bioeng.* **57**(2), 22□227.
- [145] **Kottler B.D. and Alexander M. (2001).** Relationship of properties of polycyclic aromatic hydrocarbons to sequestration in soil. *Environ.Pollut.* **113**, 293-298.
- [146] **Koyama O., Kamagata Y. and Nakamura K. (1994).** Degradation of chlorinated aromatics by fenton oxidation and methanogenic digester sludge. *Wat. Res.* **28**(4), 895-899.

- [147] **Krauss M. and Wilcke W. (2001).** Predicting soil-water partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls by desorption with methanol-water mixtures at different temperatures. *Environ.Sci.Technol.* **35**(11), 2319-2325.
- [148] **La Goy P.K. and Quirk T.C. (1994).** Establishing generic remediation goals for the polycyclic aromatic hydrocarbons : critical issues. *Environ.Health Persp.* **102**, 348-352.
- [149] **Lagadec A.J.M., Miller D.J., Lilke A.V. and Hawthorne S.B. (2000).** Pilot-scale subcritical water remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticide contaminated soil. *Environ.Sci.Technol.* **34**, 1542-1548.
- [150] **Lahlou M., Harms H., Springael D. and Ortega Calvo J.J. (2000).** Influence of soil components on the transport of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria through saturated porous media. *Environ.Sci.Technol.* **34**(17), 3649-3656.
- [151] **Lajoie C.A., Layton A.C. and Sayler G.S. (1994).** Cometabolic oxidation of polychlorinated biphenyls in soil with a surfactant-based field application vector. *Appl.Environ.Microbiol.* **60** (8), 2826-2833.
- [152] **Lamoureux E.M. and Brownawell B.J. (1999).** Chemical and biological availability of sediment-sorbed hydrophobic organic contaminants. *Environ.Toxicol.Chem.* **18**(8), 1733-1741.
- [153] **Laor Y. and Rebhun M. (2002).** Evidence for nonlinear binding of PAHs to dissolved humic acids. *Environ.Sci.Technol.* **36**(5), 955-961.
- [154] **Laplace J.M. (1992).** Cultures microbiennes pures et mixtes: production d'éthanol à partir des pentoses et des hexoses dérivés des lignocelluloses. Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire. Thèse de l'Université MONTPELLIER II, 18 Septembre 1992.
- [155] **Laurie A.D. and Lloyd-Jones G. (1999).** The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP17 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. *J.Bacteriol.* **181**(2), 531-540.
- [156] **Layton A.C., Muccini M., Ghosh M.M. and Sayler G.S. (1998).** Construction of a bioluminescent reporter strain to detect polychlorinated biphenyls. *Appl.Environ.Microbiol.* **64** (12), 5223-5226.
- [157] **Lazzari L., Sporni L., Salizzato M. and Pavoni B. (1999).** Gas chromatographic determination of organic micropollutants in samples of sewage sludge and compost : behaviour of PCB and PAH during composting. *Chemosphere.* **38**(8), 1925-1935.
- [158] **Leclerc M., Delgenes J.P. and Godon J.J. (2002).** Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by SSCP analysis and 16S rDNA sequencing. (Accepté dans *Environmental Microbiology* - 2002).
- [159] **Leduc R., Samson R., Al-Bashir B., Al-Hawari J. and Cseh T. (1992).** Biotic and abiotic disappearance of four PAH compounds from flooded soil under various redox conditions. *Water Sci.Technol.* **26**(1-2), 51-60.
- [160] **Lee P.H., Ong S.K., Golchin J. and Nelson G.L. (2001).** Use of solvents to enhance PAH

- biodegradation of coal tar-contaminated soils. *Water Res.* **35**(16), 3941-3949.
- [161] **Le VAN T.D., Robinson J.A., Ralph J., Greening R.C., Smolenski W.J., Leedle J.A.Z. and Schaefer D.M. (1998).** Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium populations and *Acetitomaculum ruminis*. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**(9), 3429-3436.
- [162] **Liebeg E.W. and Cutright T.J. (1999).** The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *Int.Biodeter.Biodeg.* **44**, 55-64.
- [163] **Limbert E.S.B. and Betts W.B. (1994).** Biodegradation of trace levels of a complex organic pollutant mixture. *Microbios.* **78**,237-243.
- [164] **Liu Z., Jacobson A.M. and Luthy R.G. (1995).** Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**(1), 145-151.
- [165] **Lloyd-Jones G., Laurie A.D., Hunter D.W.F. and Fraser R. (1999).** Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. *FEMS Microbiol.Ecol.* **29**, 69-79.
- [166] **Luster-Teasley S.L., Yao J.J., Herner H.H., Trosko J.E. and Masten S.J. (2002).** Ozonation of chrysene : evaluation of byproduct mixtures and identification of toxic constituent. *Environ.Sci.Technol.* **36**(5), 869-876.
- [167] **Madichie C., Greenway G.M. and McCreedy T. (1999).** The effects of surfactants on the analysis of organic pollutants in natural waters. *Anal.Chim.Acta.* **392**, 39-46.
- [168] **Madsen T. and Kristensen P. (1997).** Effects of bacterial inoculation and nonionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ.Toxicol.Chem.* **16**(4), 631-637.
- [169] **Malik R.K., Singh R. and Tauro P. (1989).** Fuel gases from biogas digesters. In : *Biological Waste Treatment Advances in Biotechnological Processes.* **Vol. 12.** Edited by A.Mizrahi.AlanR.Liss, Inc., New-York.
- [170] **Mangas E., Vaquero M.T., Comellas L. and Broto-puig F. (1998).** Analysis and fate of aliphatic hydrocarbons, linear alkylbenzenes, polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soils. *Chemosphere.* **36**(1), 61-72.
- [171] **Masaphy S., Levanon D., Henis Y., Venkateswarlu K. and Kelly S.L. (1996).** Evidence for cytochrome P-450 and P-450-mediated benzo(a)pyrene hydroxylation in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol.Lett.* **135**, 51-55.
- [172] **Mason C.A., Hamer G., Fleischmann T. and Lang C. (1987).** Aerobic thermophilic biodegradation of microbial cells. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **25**, 568-576.
- [173] **Mason C.A., Häner A. and Hamer G. (1992).** Aerobic thermophilic waste sludge treatment. *Water Sci.Technol.* **25** (1), 113-118.
- [174] **Mastral A.M., Callen M.S., Murillo R. and Garcia T. (1999).** Combustion of high calorific value waste material : organic atmospheric pollution. *Environ.Sci.Technol.* **33**(23), 4155-4158.

- [175] **Mastral A.M. and Callen M.S. (2000).** A review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation. *Environ.Sci.Technol.* **34**(5), 351-357.
- [176] **Mastral A.M., Callen M.S., Garcia T. and Lopez J.M. (2001).** Benzo(a)pyrene, benzo(a)anthracene, dibenzo(ah)anthracene emissions from coal and waste tire energy generation at atmospheric fluidized bed combustion (AFBC). *Environ.Sci.Technol.* **35**(13), 2645-2649.
- [177] **Mathevon V. (1999).** Les techniques existantes d'élimination et de traitement des boues. In : *Station d'épuration, comment maîtriser à la source la qualité et la quantité des boues ?* Journée technique nationale du 29 Avril 1999. INSA, Toulouse.
- [178] **Matsuzawa S., Nasser-ali L. and Guarrigues P. (2001).** Photolytic behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel particulate matter deposited on the ground. *Environ.Sci.Technol.* **35**(15), 3139-3143.
- [179] **Mc Nally D.L., Mihelcic J.R. and Lueking D.R. (1999).** Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. *Chemosphere.* **38**(6), 1313-1321.
- [180] **McGowin A.E., Adom K.K. and Obubuafo A.K. (2001).** Screening of compost for PAHs and pesticides using static subcritical water extraction. *Chemosphere.* **45**, 857-864.
- [181] **Mercier R. (1998).** Traitement par des champignons filamenteux de sols contaminés par des composés organiques persistants : application aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Thèse de l'université Aix-Marseille I. Spécialité Biologie Cellulaire et Microbiologie. (15 Décembre 1998).
- [182] **Meyer S. and Steinhart H. (2000).** Effects of heterocyclic PAHs (N,S,O) on the biodegradation of typical tar oil PAHs in soil/compost mixture. *Chemosphere.* **40**, 359-367.
- [183] **Miège C., Dugay J. and Hennion M.C. (1998).** Optimization and validation of solvent and supercritical-fluid extractions for the trace-determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. *J.Chromatog.A.* **823**, 219-230.
- [184] **Miège C., Dugay, J. and Hennion, M.C. (1999).** *Méthodes de caractérisation des HPA et des PCB dans les boues résiduelles de stations d'épuration.* n°3359. Editions ADEME, Angers.
- [185] **Miège C. (2000).** *Nouvelles techniques d'extraction et de purification appliquées aux boues issues du traitement des eaux usées pour la détermination de polluants organiques par les méthodes chromatographiques.* Thèse de l'université Paris VI. Spécialité Chimie Analytique. 24 Février 2000.
- [186] **Mihelcic J.R. and Luthy R.G. (1988-a).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. *Appl.Environ.Microbiol.* **54**(5), 1182-1187.
- [187] **Mihelcic J.R. and Luthy R.G. (1988-b).** Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-water systems. *Appl.Environ.Microbiol.* **54**(5), 1188-1198.
- [188] **Miller K.M., Suidan M.T., Sorial G.A., Khodaloust A.P., Acheson C.M. and Brenner R.C.**

- (1998). Anaerobic treatment of soil wash fluids from a wood preserving site. *Water Sci.Technol.* **38**(7), 63-72.
- [189] **Miller J.S. (1999).** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by spectrofluorimetry. *Anal.Chim.Acta.* **388**, 27-34.
- [190] **Mohn W.W. and Tiedje J.M. (1992).** Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol.Rev.* **56** (3), 482-507.
- [191] **Mohn W.W., Westerberg K., Cullen W.R. and Reimer K.J. (1997).** Aerobic biodegradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls by arctic coil microorganisms. *Appl.Environ.Microbiol.* **63** (9), 3378-3384.
- [192] **Moser R. and Stahl U. (2001).** Insights into the genetic diversity of initial dioxygenases from PAH-degrading bacteria. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **55**, 609-618.
- [193] **Mueller J.G., Devereux R., Santavy D.L., Lantz S.E., Willis S.G. and Pritchard P.H. (1997).** Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Anton.Leeuw.Int.J.* **71**, 329-343.
- [194] **Mukerjee-Dhar G., Hatta T., Shimura M. and Kimbara K. (1998).** Analysis of changes in congener selectivity during PCB degradation by *Burkholderia* sp. strain TSN 101 with increasing concentrations of PCB and characterization of the *bphBCD* genes and gene products. *Arch.Microbiol.* **169**, 61-70.
- [195] **Muller J. and Pelletier L. (1998).** Désintégration mécanique des boues activées. *L'eau, l'industrie, les nuisances.* **217**, 61-66.
- [196] **Mustin M. (1987).** *Le compost, gestion de la matière organique.* Editions François Dubusc, Paris.
- [197] **Negrao M.R. and Alpendurada M.F. (1998).** Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid phase microextraction-high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J.Chromatog.A.* **823**, 211-218.
- [198] **Ng W.J., Hu J.Y., Ong S.L. and Aziz M.A. (1999).** Effect of acidogenic stage on aerobic toxic organic removal. *J.Environ.Engineering.* **125**(6), 495-500.
- [199] **Niederer M., Maschka-Selig A. and Hohl C. (1995).** Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals in urban soil, compost and vegetation. *Environ.Sci.Pollut.Res.* **2**(2), 83-89.
- [200] **Noordman W.H., Ji W., Brusseau M.L. and Janssen D.B. (1998).** Effects of rhamnolipid biosurfactant on removal of phenanthrene from soil. *Environ.Sci.Technol.* **32**(12), 1806-1812.
- [201] **Northcott G.L. and Jones K.C. (2001).** Partitioning, Extractability and formation of nonextractable PAH residues in soil. 1.Compound differences in aging and sequestration. 2.Effects on compound dissolution behavior.. *Environ.Sci.Technol.* **35**(6), 1103-1117.
- [202] **Oanh N.T.K., Nghiem L.H. and Phyu Y.L. (2002).** Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons, toxicity and mutagenicity from domestic cooking using sawdust briquettes, wood

- and kerosene. *Environ.Sci.Technol.* **36**(5), 833-839.
- [203] **OTV (1997).** *Traiter et valoriser les Boues.* Ouvrage collectif n°2. Editions Lavoisier, Cachan
- [204] **Oude Elferink S.J.W.H., Visser A., Hulshoff Pol L.W. and Stams A.J.M. (1994).** Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol.Rev.* **15**, 119-136.
- [205] **Pagilla K.R., Craney K.C. and Kido W.H. (1996).** Aerobic thermophilic pretreatment of mixed sludge for pathogen reduction and *Nocardia* control. *Water Environ.Res.* **68**(7), 1093-1098.
- [206] **Park J.H., Zhao X. and Voice T.C. (2001).** Biodegradation of non-desorbable naphthalene in soils. *Environ.Sci.Technol.* **35**(13), 2734-2740
- [207] **Partanen T. and Boffetta P. (1994).** Cancer risk in asphalt workers and roofers : review and meta-analysis of epidemiologic studies. *Am.J.Ind.Med.* **26** (6), 721-740
- [208] **Paterson I.F., Chowdhry B.Z. and Leharne S.A. (1999).** Polycyclic aromatic hydrocarbon extraction from a coal tar-contaminated soil using aqueous solutions of nonionic surfactants. *Chemosphere.* **38**(13), 3095-3107.
- [209] **Perez S., Ferrer I., Hennion M.C. and Barcelo D. (1998).** Isolation of priority polycyclic aromatic hydrocarbons from a natural sediments and sludge reference materials by an antifuorene immunosorbent followed by liquid chromatography and diode array detection. *Anal.Chem.* **70**, 4996-5001.
- [210] **Perez S., Farre M., Garcia M.J. and Barcelo D. (2001-a).** Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge and their contribution to its toxicity in the Toxalert 1 bioassay. *Chemosphere.* **45**, 705-712.
- [211] **Perez S., Guillamon M. and Barcelo D. (2001-b).** Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from wastewater treatment plants. *J.Chromatog.A.* **938**, 57-65.
- [212] **Perminova I.V., Grechishcheva N.Y. and Petrosyan V.S. (1999).** Relationships between structure and binding affinity of humic substances for polycyclic aromatic hydrocarbons : relevance of molecular descriptors. *Environ.Sci.Technol.* **33**(21), 3781-3787.
- [213] **Pino V., Ayala J.H., Afonso A.M. and Gonzalez V. (2000).** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by high-performance liquid chromatography after microwave-assisted extraction with micellar media. *J.Chromatog.A.* **869**, 515-522.
- [214] **Pinto L.J. and Moore M.M. (2000).** Release of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils by surfactant and remediation of this effluent by *Penicillium spp.* *Environ.Toxicol.Chem.* **19**(7), 1741-1748.
- [215] **Pulliam Holoman T.R., Elberson M.A., Cutter L.A., May H.D. and Sowers K.R. (1998).** Characterization of a defined 2,3,5,6-Tetrachlorobiphenyl-ortho-dechlorinating microbial community by comparative sequence analysis of genes coding for 16S rRNA. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**(9), 3359-3367.
- [216] **Pothuluri J.V., Freeman J.P., Fu P.P. and Cerniglia C.E. (1999).** Biotransformation of 1-nitrobenzo(e)pyrene by the fungus *Cunninghamella elegans*. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* **22**, 52-

57.

- [217] **Potter C.L., Glaser J.A., Chang L.W., Meier J.R., Dosani M.A. and Herrmann R.F. (1999).** Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons under bench-scale compost conditions. *Environ.Sci.Technol.* **33**(1), 1717-1725.
- [218] **Rachdawong P., Christensen E.R. and Karls J.F. (1998).** Historical PAH fluxes to lake Michigan sediments determined by factor analysis. *Water Res.* **32**(8), 2422-2431
- [219] **Rama R., Mougin C., Boyer F.D., Kollmann A., Malosse C. and Sigoillot J.C. (1998).** Biotransformation of Benzo(a)pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Biotechnol.Lett.* **20**(12), 1111-1114.
- [220] **Rama-Mercier R., Mougin C., Sigoillot J.C., Sohier L., Chaplain V. and Asther M. (1998).** Wet sand cultures to screen filamentous fungi for the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnol.Tech.* **12**(1), 725-728.
- [221] **Randall C.W., Barnard J.L. and Stensel M.D. (1992).** *Design and retrofit of wastewater treatment plants for biological nutrient removal.* Technomic Publishing, Lancaster, USA.
- [222] **Ravelet C., Krivobok S., Sage L. and Steiman R. (2000).** Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere.* **40**, 557-563.
- [223] **Reeves W.R., Barhoumi R., Brughardt R.C., Lemke S.L., Mayura K., McDonald T.J., Phillips T.D. and Donnelly K.C. (2001).** Evaluation of methods for predicting the toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Environ.Sci.Technol.* **35**(8), 1631-1636.
- [224] **Rehmann K., Noll H.P., Steinberg C.E.W. and Kettrup A.A. (1998).** Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KR2. *Chemosphere.* **36**(14), 2977-2992.
- [225] **Renoux A.Y., Millette D., Tyagi R.D. and Samson R. (1999).** Detoxification of fluorene, phenanthrene, carbazole and p-cresol in columns of aquifer sand as studied by the microtox assay. *Water Res.* **33**(9), 2145-2152.
- [226] **Resnick S.M. and Gibson D.T. (1996).** Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, dibenzofuran, and dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**(11), 4173-4181
- [227] **Richnow H.H., Eschenbach A., Mahro B., Seifert R., Wehrung P., Albrecht P. and Michaelis W. (1998).** The use of ^{13}C -labelled polycyclic aromatic hydrocarbons for the analysis of their transformation in soil. *Chemosphere.* **36**(1), 2211-2224.
- [228] **Richnow H.H., Annweiler E., Koning M., Lüth J.C., Stegmann R., Garms C., Francke W. and Michaelis W. (2000).** Tracing the transformation of labelled [^{13}C]phenanthrene in a soil bioreactor. *Environ.Pollut.* **108**, 91-101.
- [229] **Richter B.E., Ezzell J.L., Felix D., Roberts K.A. and Later D.W. (1995).** An accelerated solvent extraction system for the rapid preparation of environmental organic compounds in soil. *Int.Laboratory.* May 1995,18-21
- [230] **Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L. and Porter N.L. (1996).** Accelerated Solvent Extraction : a

- technique for sample preparation. *Anal.Chem.* **68**(6), 133-139.
- [231] **Robert Gan D. and Berthouex P.M. (1994).** Disappearance and crop uptake of PCBs from sludge-amended farmland. *Water Environ. Res.* **66** (1), 54-69.
- [232] **Rockne K.J. and Strand S.E. (1998).** Biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments. *Environ.Sci.Technol.* **32**(24), 3962-3967.
- [233] **Romero M.C., Cazau M.C., Giorgeri S. and Arambarri A.M. (1998).** Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environ.Pollut.* **101**, 355-359.
- [234] **Ross W.R., Novella P.H., Pitt A.J., Lund P., Thomson B.A., King P.B. and Fawcett K.S. (1992).** *Anaerobic Digestion of wastewater sludge : operating guide.* Project n°390. Report to the Water Research Commission of Pretoria, South Africa.
- [235] **Rulkens W.H., Bruning H., Van Hasselt H.J., Rienks J., Van Veen H.J. and Terlingen J.P.M. (1998).** Design of a solvent extraction process for PAH-contaminated sediments : the WAU-acetone process. *Water Sci.Technol.* **37**(6-7), 411-418.
- [236] **Saim N., Dean J.R., Abdullah M.P. and Zakaria Z. (1997).** Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurized and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. *J.Chromatog.A.* **791**(1-2), 361-366.
- [237] **Saim N., Dean J.R., Abdullah M.P. and Zakaria Z. (1998).** An experimental design approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soil using accelerated solvent extraction. *Anal.Chem.* **70**(2), 424-424.
- [238] **Salicis F., Krivobok S., Jack M. and Benoit-Guyod J.L. (1999).** Biodegradation of fluoranthene by soil fungi. *Chemosphere.* **38**(13), 331-339.
- [239] **Sanseverino J., Applegate B.M., King J.M.H. and Sayler G.S. (1993).** Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. *Appl.Environ.Microbiol.* **59**(6), 1931-1937.
- [240] **Sayles G.D., Acheson C.M., Kupferle M.J., Shan Y., Zhou Q., Meier J.R., Chang L. and Brenner R.C. (1999).** Land treatment of PAH-contaminated soil : performance measured by chemical and toxicity assays. *Environ.Sci.Technol.* **33**(23), 4314-4317.
- [241] **Schantz M.M., Nichols J.J. and Wise S.A. (1997).** Evaluation of pressurized fluid extraction for the extraction of environmental matrix reference materials. *Anal.Chem.* **69**(2), 4214-4219.
- [242] **Schützendübel A., Majcherczyk A., Johannes C. and Hüttermann A. (1999).** Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. *Int.Biodeter.Biodeg.* **43**, 93-100.
- [243] **Sedlack R. (1991).** *Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater (principle and practice).* 2nd edition. Lewis Publishers, NY.

- [244] **Semple K.T., Cain R.B. and Schmidt S. (1999).** Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiol.Lett.* **170**, 291-305.
- [245] **Sharak Genthner B.R., Townsend G.T., Lantz S.E. and Mueller J.G. (1997).** Persistence of polycyclic hydrocarbon components of creosote under anaerobic enrichment conditions. *Arch.Environ.Contam.Toxicol.* **32**, 99-105.
- [246] **Shi Z. (1998).** Biodegradation of UV-irradiated polychlorinated biphenyls in surfactant micelles. *Water.Sci.Technol.* **38**(7), 25-32.
- [247] **Sicilia D., Rubio S., Perez-Bendito D., Maniasso N. and Zagatto E.A.G. (1999).** Anionic surfactants in acid media : a new cloud point extraction approach for the determination of PAHs in environmental samples. *Anal.Chim.Acta.* **392**, 29-38.
- [248] **Smith M.J., Lethbridge G. and Burns R.G. (1999).** Fate of Phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene during biodegradation of crude oil added to two soils. *FEMS Microbiol.Lett.* **173**, 445-452.
- [249] **Smith K.E.C., Green M., Thomas G.O. and Jones K.C. (2001).** Behavior of sewage sludge-derived PAHs on pasture. *Environ.Sci.Technol.* **35**(11), 2141-2150.
- [250] **Sparrevik M. and Breedveld G.D. (2000).** The impact of in situ biosparging on a creosote-contaminated site. *Land Contam.Reclam.* **8**(4), 367-374.
- [251] **Steffes G. (1998).** Monitoring of environmental effects and process performance during biological treatment of sediment from the petroleum harbour in Amsterdam. *Water Sci.Technol.* **37**(6-7), 395-402.
- [252] **Stelmack P.L., Gray M.R. and Pickard M.A. (1999).** Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl.Environ.Microbiol.* **65**(1), 163-168.
- [253] **Stinson M.K., Skovronek H.S. and Ellis W. (1992).** EPA Site demonstration of the Biotrol soil washing process. *J.Air Waste Manag.Assoc.* **42**(1), 96-103.
- [254] **Straube W.L., Jones-Meehan J., Pritchard P.H. and Jones W.R. (1999).** Bench-scale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons. *Resou.Conserv.Recy.* **27**,27-37.
- [255] **Stringfellow W.T. and Alvarez-Cohen L. (1999).** Evaluating the relationship between the sorption of PAHs to bacterial biomass and biodegradation. *Water Res.* **33**(11), 2535-2544.
- [256] **Stronach S.M., Rudd T. and Lester J.N. (1986).** Anaerobic digestion processes in industrial wastewater treatment. In : *Biotechnology Monographs. Vol 2* Springer Verlag, Heidelberg.
- [257] **Sun F., Littlejohn D. and Gibson M.D. (1998).** Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up for determination of US EPA 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. *Anal.Chim.Acta.* **364**, 1-11.
- [258] **Sutherland J.B., Rafii F., Khan A.A. and Cerniglia C.E. (1995).** Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In : *Microbial transformation and degradation of toxic*

organic chemicals. Edited by L.Y. Young and C.E. Cerniglia, Wiley-Liss, Inc., New York.

- [259] **Swadesh J. (1997)**. *HPLC : Practical and Industrial Applications*. Editions CRC, Boca Raton, Florida, USA.
- [260] **Thibault S.L., Anderson M. and Frankenberger W.T. (1996)**. Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**(1), 283-287.
- [261] **Tiehm A. (1994)**. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl.Environ.Microbiol.* **60**(1), 258-263.
- [262] **Tomassone R., Devin C. and Masson J.P. (1993)**. *Biométrie: modélisation de phénomènes biologiques*. Editions Masson.
- [263] **Touraud E., Crone M. and Thomas O. (1998)**. Rapid diagnosis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soils with the use of ultraviolet detection. *Field Anal.Chem.Technol.* **2**(4), 221-229.
- [264] **Tran F.T. and Tyagi R.D. (1990)**. Mesophilic and thermophilic digestion of municipal sludge in a deep-shaft U-shaped bioreactor. *Water Sci.Technol.* **38** (8-9), 435-442.
- [265] **Trapido M. (1999)**. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Estonian Soil : Contamination and profiles. *Environ.Pollut.* **105**,67-74.
- [266] **Veeken A. and Hamelers B. (1999)**. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. *Bioresource Technol.* **69**, 249-254.
- [267] **Vergé-Leviel C. (2001)**. *Les micropolluants organiques dans les composts d'origine urbaine : étude de leur devenir au cours du compostage et biodisponibilité des résidus après épandage des composts au sol*. Thèse de doctorat de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon. (20 Avril 2001).
- [268] **Vierle O., Launhardt T., Strehler A., Dumler-Gratl R., Thoma H. and Schreiner M. (1999)**. Investigation of organic pollutants from house heating systems using biogenic fuels and correlation with other exhaust gas components. *Anal.Chim.Acta.* **393**, 131-140.
- [269] **Villholth K.G. (1999)**. Colloid characterization and colloidal phase partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in two-creosote-contaminated aquifers in Denmark. *Environ.Sci.Technol.* **33**(5), 691-699.
- [270] **Volkering F., Breure A.M., van Andel J.G. and Rulkens W.H. (1995)**. Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**(5), 1699-1705.
- [271] **Von Wintzingerode F., Selent B., Hegemann W. and Göbel U.B. (1999)**. Phylogenetic analysis of an anaerobic trichlorobenzene transforming microbial consortium. *Appl.Environ.Microbiol.* **65**(1), 283-286
- [272] **Wang Y., Lau P.C.K. and Button D.K. (1996)**. A marine oligobacterium harboring genes known to be part of aromatic hydrocarbon degradation pathways of soil *pseudomonads*. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**(6), 2169-2173.

- [273] **Wang J.M., Marlowe E.M., Miller-Maier R.M. and Brusseau M.L. (1998).** Cyclodextrin-enhanced biodegradation of Phenanthrene. *Environ.Sci.Technol.* **32**(13), 1917-1912.
- [274] **Wang Y. and Hong C. (1999).** Effect of hydrogen peroxide, periodate and persulfate on photocatalysis of 2-chlorobiphenyl in aqueous TiO₂ suspensions. *Water.Res.* **33**(9), 2331-2336.
- [275] **Wang Y., Fengkai L., Zhulu L., Zheng X. and Yubin T. (1999).** Photolysis of anthracene and chrysene in aquatic systems. *Chemosphere.* **38**(6), 1273-1278.
- [276] **Wang J., Levendis Y.A., Richter H., Howard J.B. and Carlson J. (2001).** Polycyclic Aromatic Hydrocarbon and particulate emissions from two-stage combustion of polystyrene : the effect of the primary furnace temperature. *Environ.Sci.Technol.* **35**(17), 3541-3552.
- [277] **Ward A., Stensel H.D., Ferguson J.F., Ma G. and Hummel S. (1998).** Effect of autothermal treatment on anaerobic digestion in the dual digestion process. *Water Sci.Technol.* **38** (8-9), 435-442.
- [278] **Weigand H., Totsche K.U., Kögel-Knabner I., Annweiler A., Richnow H.H. and Michaelis W. (1999).** Desorption controlled mobility and intrinsic biodegradation of anthracene in unsaturated soil. *Phys.Chem.Earth.* **24**(6), 549-555.
- [279] **White J.C. and Pignatello J.J. (1999).** Influence of bisolute competition on the desorption kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ.Sci.Technol.* **33**(23), 4292-4298.
- [280] **Whyte L.G., Bourbonniere L. and Greer C.W. (1997).** Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (*alk*) and naphthalene (*nah*) catabolic pathway. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**(9), 3719-3723.
- [281] **Wiert J., Duvaud E., Mugnier E., Gazzo A. and Aubain P. (1999).** *Situation du recyclage agricole des boues d'épuration urbaines en Europe et dans divers autres pays du monde.* Editions ADEME. N°3358.
- [282] **Widdel F. and Rabus R. (2001).** Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr.Opin.Biotechnol.* **12**, 259-276.
- [283] **Wikström E., Tysklind M. and Marklund S. (1999).** Influence of variation in combustion conditions on the primary formation of chlorinated organic micropollutants during municipal solid waste combustion. *Environ.Sci.Technol.* **33** (23), 4263-4269.
- [284] **Wild S.R., McGrath S.P. and Jones K.C. (1990).** The polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) content of archived sewage sludges. *Chemosphere.* **20**(6), 733-716.
- [285] **Wild S.R. and Jones K.C. (1993).** Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge. *Environ.Toxicol.Chem.* **12**, 5-12.
- [286] **Willumsen P.A. and Arvin E. (1999).** Kinetics of degradation of surfactant-solubilized fluoranthene by a *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ.Sci.Technol.* **33**(15), 2571-2578.
- [287] **Wilson L.P. and Bouwer E.J. (1997).** Biodegradation of aromatic compounds under mixed

- oxygen/denitrifying conditions : a review. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* **18**, 116-130
- [288] **Wilson M.S., Bakermans C. and Madsen E.L. (1999).** *In situ*, real-time catabolic gene expression : extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(1), 80-87.
- [289] **Wise S.A., Sander L.C. and May W.E. (1993).** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography. *J. Chromatog. A.* **642**, 329-349.
- [290] **Woo S.H. and Park J.M. (1999).** Evaluation of drum bioreactor performance used for decontamination of soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74**, 937-944.
- [291] **Wornat M.J., Ledesma E.B. and Sandrowitz A.K. (2001).** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons identified in soot extracts from domestic coal-burning stoves of Henan province, China. *Environ. Sci. Technol.* **35**(10), 1943-1952.
- [292] **Wu Q., Bedard D.L. and Wiegel J. (1996).** Influence of incubation temperature on the microbial reductive dechlorination of 2,3,4,6-tetrachlorobiphenyl in two freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (11), 4174-4179.
- [293] **Wu J.H., Liu W.T., Tseng I.C. and Cheng S.S. (2001).** Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiol.* **147**(2), 373-382.
- [294] **Yao J.J., Huang Z.H. and Masten S.J. (1998).** The ozonation of pyrene : pathway and product identification. *Water Res.* **32**(10), 3001-3012.
- [295] **Yeom I.T. and Ghosh M.N. (1998).** Mass transfer limitation in PAH-contaminated soil remediation. *Water Sci. Technol.* **37**(8), 111-118.
- [296] **Yuan S.Y., Chang J.S., Yen J.H. and Chang B.V. (2001).** Biodegradation of phenanthrene in river sediment. *Chemosphere.* **43**, 273-278.
- [297] **Zaidi B.R. and Imam S.H. (1999).** Factors affecting microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon Phenanthrene in the Caribbean coastal water. *Mar. Pollut. Bull.* **38**(8), 737-742.
- [298] **Zeikus J.G. (1982).** Microbial intermediary metabolism in anaerobic digestion. In: *1st International Symposium on Anaerobic Digestion*. Travemünde, 23-25.
- [299] **Zeng Y., Andrew Hong P.K. and Wavrek D.A. (2000).** Chemical-biological treatment of pyrene. *Water Res.* **34**(4), 1157-1172.
- [300] **Zhang W., Bower E., Wilson L. and Durant N. (1995).** Biotransformation of aromatic hydrocarbons in subsurface biofilms. *Water Sci. Technol.* **31**(1), 1-14.
- [301] **Zhang Y., Maier W.J. and Miller R.M. (1997).** Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of Phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 2211-2217.
- [302] **Zhang X. and Young L.Y. (1997).** Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.*

63(12), 4759-4764.

- [3□3] **Zhang X., Sullivan, E.R. and Young, L.Y. (2000).** Evidence for aromatic ring reduction in the biodegradation pathway of carboxylated naphthalene by a sulfate reducing consortium. *Biodeg.* **11**, 117-124.
- [3□4] **Zink G. and Lorber K.E. (1995).** Mass spectral identification of metabolites formed by microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Chemosphere.* **31(9)**, 4□77-4□84.
- [3□5] **Zylstra G.J., Kim E. and Goyal A.K. (1997).** Comparative molecular analysis of genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Genet.Eng.* **19**, 257-269.

ANNEXE I :

LISTE DES PUBLICATIONS ET TRAVAUX

PUBLICATIONS INTERNATIONALES A COMITE DE LECTURE

Trably E., Delgenès N., Patureau D. and Delgenès J.P. (2002). Comparison of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) removals during anaerobic and aerobic sewage sludge treatment. In : *Environmental Chemistry*. Ed. Springer. (Accepté, en cours de révision).

Trably E., Delgenès N., Patureau D. and Delgenès J.P. (2002). Enhancement of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) removal during anaerobic treatment of urban sludge. *Water Science and Technology*. (Accepté le 27 Septembre 2002).

Trably E., Delgenès N., Patureau D. and Delgenès J.P. (2002). Removal of 13 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons under anaerobic methanogenic conditions. *Chemosphere*. (Soumis le 22 Juillet 2002).

Trably E., Delgenès N., Patureau D. and Delgenès J.P. (2002). Optimization and validation of a highly reproducible method for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) analysis in sludge samples. *Journal of Chromatography A*. (Soumis le 22 Juillet 2002).

Trably E., Leclerc M., Bru V., Patureau D., Godon J.J. and Delgenès J.P. (2003). Involvement of methanogenesis and diversity of Archae in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-degrading methanogenic reactors. *FEMS Microbiology Letters*. (En préparation).

COMMUNICATIONS ORALES EN CONGRES

Trably E., Delgenès N., Patureau D. and Delgenès J.P. (2001). Disappearance of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) during anaerobic-aerobic digestion of naturally contaminated sewage sludge. *2nd European Meeting on Environmental Chemistry*. 12-15, December. Dijon, France.

Patureau D., Trably E. and Delgenès J.P. (2002). La méthanisation des boues : impact du procédé sur le devenir des Composés Traces Organiques. *Rencontre Technique nationale. Quelles évolutions technologiques pour mieux garantir et pérenniser une gestion optimale des boues ?* 4-5, Juin. Toulouse, France.

Patureau D., Trably E., Delgenès N. and Delgenès J.P. (2002). Enhancement of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) removal during anaerobic treatment of urban sludge. *Anaerobic Digestion of Solid Wastes*. 18-20, September. Munich, Allemagne.

POSTER EN CONGRES

Trably E., Delgenès N., Patureau D. and Delgenès J.P. (2001). The disappearance of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during anaerobic digestion of naturally contaminated sewage sludges. *9th World Congress on Anaerobic Digestion*. 2-5, September. Anvers, Belgique.

ANNEXE II :
**Récapitulatif des performances de méthanogénèse et
d'élimination des HAPs / PCBs**

NOM usuel	Description (paramètre étudié)	Réduction des MS (en %)	Réduction de la DCO (en %)	Rendement Biogaz		Taux de méthane (en %)
				ml _{g_{EST}} ⁻¹	ml _{g_{DCO}} ⁻¹	
ADA	Réacteur de base mésophile	49,6 ± 4,2	51 ± 8	430 ± 43	307 ± 17	74,8 ± 0,1
T35	Témoin mésophile	0,4 ± 6,3	-	-	-	-
ADA45	Réacteur intermédiaire (45°C)	54,0 ± 3,2	54,1 ± 5,4	476 ± 45	385 ± 31	69,4 ± 2,2
T45	Témoin 45°C	1,3 ± 8,5	-	-	-	-
ADA55	Réacteur thermophile (55°C)	50,6 ± 4,2	56,5 ± 6	382 ± 31	298 ± 24	70,2 ± 0,2
T55	Témoin 55°C	1,2 ± 2,8	-	-	-	-
NADA	Ecosystème non adapté	28,0 ± 6,1	34,9 ± 2,9	812 ± 110	638 ± 54	70,4 ± 0,8
NADA 4+	Bioaugmentation à 4%	24,6 ± 4,7	43,7 ± 3,6	670 ± 55	395 ± 40	72,9 ± 3,4
NADA 10+	Bioaugmentation à 10%	36,3 ± 2,3	46,9 ± 6,8	491 ± 36	427 ± 22	69,5 ± 5,5
ADABio	Bioaugmentation avec sédiments	2,2 ± 5,8	-	-	-	-
ADA20	Temps de séjour de 20 jours	56,1 ± 2,1	55,8 ± 6	457 ± 28	363 ± 43	73,2 ± 0,5
ADAKem	Ajout de KEMAZUR™	32,8 ± 1,6	67 ± 7	854 ± 60	388 ± 31	67 ± 7
BADA	Substrat Broyé	32,6 ± 5,3	52,5 ± 6	599 ± 60	258 ± 31	67,7 ± 1,5
ADAster	Substrat Stérilisé UV	36,05 ± 4,2	53,9 ± 6	1107 ± 110	796 ± 32	70,1 ± 0,5
ADACH ₄	Blocage de la méthanogénèse	35,5 ± 3,4	63,2 ± 6,5	1154 ± 166	862 ± 40	69,6 ± 2,1
ADAMet	Ajout de Méthanol	30,9 ± 1,9	51,7 ± 6,6	511 ± 60	611 ± 26	70,9 ± 2,3
ADATylox	Ajout de Tyloxapol	37,3 ± 2,8	50,2 ± 5	576 ± 35	295 ± 18	70,7 ± 2,4
ADATergi	Ajout de Tergitol-NP10	35,4 ± 2,9	62,4 ± 8	1348 ± 110	529 ± 40	71,8 ± 2,6
ADABrij	Ajout de Brij35	28,0 ± 6,1	51,5 ± 5	709 ± 40	266 ± 31	70,6 ± 2,8
ADAPCB	Réacteur de base (PCB)	35,7 ± 2,1	48,8 ± 1,5	762 ± 70	402 ± 46	68,3 ± 0,5
TPCB	Témoin (PCB)	3,3 ± 6	-	-	-	-

<i>NOM usuel</i>	<i>Description (paramètre étudié)</i>	<i>Réduction des MS (en %)</i>	<i>Réduction de la DCO (en %)</i>
<i>Aéro</i>	<i>Réacteur aérobic de base mésophile</i>	38,1 ± 3,3	52,8 ± 4,2
<i>Taéro</i>	<i>Témoin mésophile</i>	0,3 ± 4,3	-
<i>Aéro45</i>	<i>Réacteur intermédiaire (45°C)</i>	41,4 ± 2,8	55,7 ± 4,5
<i>Taéro45</i>	<i>Témoin 45°C</i>	1,6 ± 3,6	-
<i>Aéro55</i>	<i>Réacteur thermophile (55°C)</i>	36 ± 3,2	43,7 ± 3,5
<i>Taéro55</i>	<i>Témoin 55°C</i>	2,9 ± 2,1	-
<i>AéroMet</i>	<i>Ajout de Méthanol</i>	25,4 ± 2,3	50,6 ± 4,2
<i>AéroTylox</i>	<i>Ajout de Tyloxapol</i>	42,7 ± 2,2	62,5 ± 3,5
<i>AéroTergi</i>	<i>Ajout de Tergitol-NP10</i>	35,4 ± 5,3	63,5 ± 4,5
<i>AéroBrij</i>	<i>Ajout de Brij35</i>	44,5 ± 4,9	66,6 ± 4,2
<i>AéroPCB</i>	<i>Réacteur aérobic de base (PCB)</i>	28,2 ± 3,1	70,5 ± 5,6
<i>TaéroPCB</i>	<i>Témoin (PCB)</i>	3,3 ± 5,8	-

RESUME :

Cette étude porte sur le devenir des HAPs et PCBs au cours de procédés anaérobies et aérobie de digestion de boues naturellement contaminées. Dans un premier temps, une méthode d'analyse de 13 HAPs à partir de boues contaminées a été optimisée et validée pour sa fiabilité et sa haute reproductibilité, pour le suivi des HAPs au sein de réacteurs à l'échelle du laboratoire. Afin d'estimer avec précision le potentiel d'élimination biologique de ces composés, il a été également proposé une méthode d'analyse des résultats basée sur un bilan de matière. Il fut alors observé, pour la première fois sous conditions anaérobies méthanogènes, une élimination significative de l'ensemble des HAPs. Les performances d'élimination en PCBs et en HAPs furent limitées par des aspects de transfert de matière et notamment par le taux de réduction en matières sèches. Par conséquent, dans un deuxième temps, les procédés anaérobies et aérobie de digestion furent optimisés en améliorant les conditions opératoires [température] et de diffusion par l'ajout de surfactants ou d'un solvant d'extraction, le méthanol. Il fut alors mis en évidence non seulement la grande fragilité des écosystèmes méthanogènes, mais également le fort potentiel de dégradation sous conditions aérobie avec la possibilité de décontaminer significativement les boues [à 45°C ou en présence de méthanol]. Enfin, la biodégradation des HAPs encore peu connue fut caractérisée par le suivi de molécules marquées radioactives [¹⁴C] et par l'identification des *archaeobactéries* méthanogènes vraisemblablement impliquées dans la biodégradation des HAPs sous conditions anaérobies strictes.

TITLE : Study and optimization of the biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons [PAHs] and Polychlorobiphenyls [PCBs] during the anaerobic and aerobic digestion of long-term contaminated urban sludge

ABSTRACT :

This study deals with the behavior of PAHs and PCBs during anaerobic and aerobic digestion of long-term contaminated sludge. Initially, an analytical method of 13 PAHs in sludge was developed to PAH-monitoring in laboratory-scaled bioreactors. For this, the method was optimized and validated for its high accuracy and its high reproducibility. In order to estimate precisely the PAH and PCB biological removal performances of each reactor, it was also proposed a method of analysis of the results based on mass balance. Therefore, it was observed for the first time significant PAHs removal under methanogenic conditions. It was also shown that PAH and PCB removals were limited by the mass transfer kinetics and particularly by the reduction of solids. The anaerobic and aerobic processes were then optimized by improving the PAH diffusion with the enhancement of reactor temperature and with the addition of surfactants and solvent, such as methanol. It was highlighted the great fragility of the methanogenic ecosystems and, on the opposite, the strong potential of the aerobic ecosystem for PAHs biodegradation. Indeed, some aerobic processes were successful in decontaminating sludge significantly [at 45°C or in the presence of methanol]. Lastly, the PAH biodegradation was characterized partly by the monitoring of ¹⁴C-radiolabelled compounds and by the molecular identification of the methanogenic *archaea* species. It was suggested that some *archaea* microorganisms were implied in PAHs biodegradation under strict anaerobic methanogenic conditions.

DISCIPLINE : Génie des Procédés

MOTS-CLES : Biodégradation, Boues, Digestion anaérobie et aérobie, HAPs, Méthanogénèse, PCBs, Radioéléments, SSCP, Surfactants.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : Institut National de la Recherche Agronomique - Laboratoire de Biotechnologies de l'Environnement [INRA-LBE] Avenue des Etangs 11110 NARBONNE