

N° d'ordre : 2207

Thèse

Présentée

Pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

Formation doctorale : Sciences Agronomiques

Par

Soumia AMIR

**CONTRIBUTION A LA VALORISATION DE BOUES DE STATIONS
D'EPURATION PAR COMPOSTAGE : DEVENIR DES MICROPOLLUANTS
METALLIQUES ET ORGANIQUES ET BILAN HUMIQUE DU COMPOST**

Soutenue le 14 Mars 2005, devant le jury composé de :

| | | |
|----------------|--|-----------------------|
| M. J.C. REVEL | Professeur, INP- ENSAT Toulouse | Président |
| M. A. AMBLES | Professeur, Université de Poitiers | Rapporteur |
| M. M. EL HADEK | Professeur, Université Ibn Zohr Agadir | Rapporteur |
| M. M. HAFIDI | Professeur, Université Cadi Ayyad Marrakech | Co-Directeur de thèse |
| M. G. MERLINA | Ingénieur d'Etudes, HDR, INP- ENSAT Toulouse | Co-Directeur de thèse |
| M. M. EL MARAY | Professeur, Université Cadi Ayyad Marrakech | Membre |

DEDICACE

A mes très chers parents Mohammed et Zahra

A mes frères : Rachid et Youness

A mes sœurs : Leila, Bouchra et la petite Mouna

A tous ceux qui me sont chers : grande famille et mes amis

Remerciements

Les travaux présentés ci-joint ont été initiés dans le cadre d'un stage de DESA et achevés lors d'une préparation d'une thèse en cotutelle au sein du Laboratoire d'Ecologie Végétale (Unité Sol et Environnement), Faculté des Sciences Semlalia sous la direction du Professeur Mohamed HAFIDI conjointement avec l'Equipe Agronomie, Environnement et Ecotoxicologie A2E, (ENSAT-INP), sous la co-direction de Dr. Géorge MERLINA.

Ces quelques lignes vont me permettre de remercier les responsables et personnes qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail soit au niveau scientifique mais aussi personnel, et sans qui, mon travail n'aurait pu aboutir.

Je tiens d'abord à remercier le Doyen de la faculté des Sciences Semlalia, A. Mokhlisse, et le président de l'INP-Toulouse Roland Morancho et qu'ils trouvent ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Quoique j'adresse ma gratitude et je remercie le Professeur Mohammed HAFIDI qui a dirigé ce travail, ça sera pas suffisant pour lui exprimer toute ma grande reconnaissance pour la confiance et le grand soutien et disponibilité qu'il m'a accordée pour faire avancer ce travail, soit au niveau scientifique ou matériel, ainsi que son encouragement pour ma participation à de nombreuses manifestations internationales et nationales qui m'ont enrichie et donné de l'assurance. Il a fait preuve à la fois d'une grande patience, gentillesse, et d'un esprit responsable, critique et rigoureux.

J'adresse également mes profonds remerciements à mon co-encadrant Georges MERLINA pour vouloir co-diriger mes travaux. Malgré ses énormes occupations au laboratoire, il m'a consacré énormément de temps pour me transmettre une partie de son savoir de chimiste. Sans pour autant oublier cette occasion pour lui adresser mes remerciements sur sa grande compréhension, respect et humanité.

Je tiens à remercier vivement M^f Jean Claude REVEL de m'avoir aider à s'intégrer au sein de leur équipe, son accueil chaleureux, ses conseils scientifiques surtout dans le domaine de l'environnement, ainsi que pour son soutien matériel pour assister aux manifestations scientifiques internationales. Je le remercie aussi d'avoir pris la peine de se déplacer malgré son emploi de temps surchargé pour siéger au jury de ma thèse.

J'adresse mes remerciements à l'Agence Universitaire de Francophonie AUF pour son soutien financier, ainsi qu'à l'assistante Mme Sophie Villeret pour son aide et sa compréhension.

J'adresse aussi mes remerciements au Professeur Ali BOUMZZOUGH, Responsable de l'UFR « Ecologie et Fonctionnement de Ecosystèmes Terrestres » pour ses encouragements et son soutien moral et aussi pour l'estime qui a toujours manifesté à mon égard. Je remercie également M^f Hassan HAMDI pour son aide et ses conseils scientifiques.

J'adresse un remerciement particulier, à M^f Jean René BAILLY, Professeur à l'ENSAT pour avoir encouragé mon inscription en cotutelle, ainsi que pour ses grandes discussions et conseils scientifiques ; Ainsi que, Mr Eric Pinelli, responsable actuel de l'équipe A2E, Mr Kaemmerer M., Mme Guiresse M., Mr Sylvestre pour leur accueil chaleureux et assistances.

Je tiens à remercier vivement M^r André AMBLES et Laurent LEMEE au laboratoire de Chimie XII, Université de Poitiers pour leur esprit de recherche scientifique et leur sympathie de m'avoir offert l'opportunité de réaliser une étude des substances humiques par TMAH-GC/MS.

Je remercie par ailleurs l'ensemble des membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail et d'assister à la soutenance de ma thèse : Professeurs HASSANI L, AMBLES A, EL GHAROUS M, EL MERAY M, EL HADEK M, HALIM M, OUATMANE A.

En outre, la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien moral et affectif de mes parents. Je remercie ainsi tous les membres de ma famille qui ont su me comprendre dans les moments les plus difficiles lors de mes déplacements et mes absences. Je remercie mes parents pour leur appui et leur dévotion durant toutes ces années.

Je tiens à remercier aussi toutes les collègues personnels et amis du « labo » à l'ENSAT : Mr Girard, Mme Annik, Boris, Faouzi, Javier, Victor, Goeffrey, Damien etc, et j'adresse un remerciement très particulier à ma chère amie Hind, pour son soutien toujours moral d'avoir de la patience, la confiance et le courage pour aboutir à achever ce long travail, difficile, mais de qualité.

Finalement, j'exprime mes remerciements à tous mes collègues au laboratoire Sol et Environnement à la Faculté de Science Semlalia avec qui j'ai passé de très bons moments et qui ont contribué au plaisir que j'ai eu de réaliser ce travail : Farid, Taha, Jouraiphy, Houda, Raja, Nezha, Nawal, Ghita, Hasna, Kaoutar sans oublier mes grandes amies Souad, Ilham, Najwa, Amal et Soumia.

AVANT-PROPOS

Nom et prénom de l'auteur : AMIR Soumia

Intitulé du travail : Contribution à la valorisation de boues de stations d'épuration par compostage : devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost

Nom et Prénom du directeur des travaux de recherche : Mohamed Hafidi, Equipe sol et Environnement, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc

Co-Encadrant : Georges MERLINA , Equipe Agronomie, Environnement et Ecotoxicologie, ENSAT-INP Toulouse France.

Laboratoires où les travaux ont été réalisés :

- Laboratoire d'Ecologie Végétale (Unité Sol et Environnement), Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.
- Laboratoire d'Agronomie, Environnement et Ecotoxicologie, Ecole Nationale Supérieure Agronomie, Institut National Polytechnique (ENSAT-INP), Toulouse, France.

Laboratoires avec lesquels il y a eu collaboration pour ce travail :

- Laboratoire de Chimie XII, Université de Poitiers, Poitiers, France.
- Laboratoire de Sol et Fertilité, Centre d'Arido-Culture, INRA, Settat, Maroc.

Début des travaux de recherche : janvier 2001.

Rapporteurs autres que l'encadrant :

- EL Meray M., Professeur, FSS-Marrakech
- EL Hadek M., Professeur, Université Ibn Zohr, Agadir
- Ouatmane A., Professeur habilité, FST, Beni Mellal

Cadre de coopération-soutien financier :

- JER 6013 associée à l'AUF
- Projet de Recherche et Développement franco-marocain PRAD 99/10 et PRAD 02/10.
- Bourse de stage de formation à la recherche de l'Agence Universitaire de Francophonie (2002-2005).

Les travaux réalisés dans ce cadre ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publications :

- **Amir, S.**, Hafidi, M., 2001. Valorisation de boues de stations d'épuration des eaux usées par un bioprocédé aérobie "compostage", **Ann. Chim. Sci. Mat.** 26, S 409 – S 414.
- **Amir, S.**, Hafidi, M., Bailly, J.R., Revel, J.C., 2003. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex gel fractions. **Agronomie** 23, 269-275.
- **Amir, S.**, Hafidi, M., Merlina, G., Hamdi, H., Revel, J.C., 2004. Elemental analysis, FTIR, ¹³C-NMR of humic acids from sewage sludge composting. **Agronomie** 24, 13-18.
- **Amir S.**, Hafidi M., Merlina G., Hamdi H., Revel J.C. 2005. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of lagooning sewage sludge. **Chemosphere** 58, 449-458. *Available online at [www. sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).*
- **Amir S.**, Hafidi M., Merlina G., Revel J.C. 2005. Structural characterization of fulvic acids during composting of sewage sludge. **Process Biochemistry** 40, 5, 1693-1700. *Available online at www. sciencedirect.com.*
- **Amir S.**, Hafidi M., Merlina G., Hamdi H., Jouraiphy A., El Gharous M., Revel J.C. 2005. Fate of phthalic acid esters during composting of both lagooning and activated sludges. **Process Biochemistry** 40, 6, 2183-2190. *Available online at www. sciencedirect.com.*
- **Amir S.**, Hafidi M., Merlina G., Revel J.C. 2005. Sequential extraction of heavy metals during composting of sewage sludge. **Chemosphere** 59, 6, 801-810. *Available online at www. sciencedirect.com.*
- **Amir S.**, Hafidi M., Merlina G., Revel J-C. 2005. Structural changes in lipid-free humic acids during composting of sewage sludge. **Internationnal biodeterioration biodegradation** (in press).
- **Amir S.**, Hafidi M, Lemee L., Bailly J-R., Merlina G., Guiesse M., Pinelli E., Revel J-C., Ambles A. Structural characterization of humic acids, extracted from sewage sludge during composting, by Thermochemolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Process Biochemistry** (submitted 2005).
- **Amir S.**, Hafidi M, Lemee L., Bailly J-R., Merlina G., Kaemmerer M. Revel J-C., Ambles A. Structural characterization of fulvic acids, extracted from sewage sludge during composting, by Thermochemolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Science of the Total Environment** (submitted 2005).

- **Amir, S**, Hafidi, M., Merlina, G., Revel, J-C., Study of some phospholipid fatty acids and neutral lipids as microbial markers during composting of lagooning sewage sludge (En préparation).

Communications :

- **Amir S**, Jouraiphy A., Hafidi M., Hamdi H., Merlina G., El Gharous M., Revel J.C. : Devenir des polluants organiques et métalliques au cours du compostage des boues de stations d'épuration. The First International Symposium on the Management of Liquid and Solid Residues. Malisore. 26-27 April, 2004, Mohammedia, Morocco.

- **Amir S.**, Merlina G., Hafidi M., Hamdi H., Jouraiphy A., Kaemmerer M, El Gharous M., Revel J.C. : Etude par GC/MS du devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques durant le compostage de boues de lagunage ou de boues activées. Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique. 20^{èmes} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse. 16-19 Septembre, 2003, Toulouse, France.

- **Amir S**, Hafidi M., Merlina G., Hamdi H., Jouraiphy A., El Gharous M., Revel J.C. : Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of both lagooning and activated sewage sludges. 16th International Symposium on Environmental Biogeochemistry, September 1-6, 2003, Japan.

- **Amir S** Hafidi M, Lemee L., Bailly J-R., Merlina G., Revel J-C., Ambles A : PY/GC/ MS des acides humiques et fulviques extraits du compost des boues de stations d'épurations a différents stades de compostage. 5^{ème} Colloque sur la Matière Organique Naturelle, 26-28 Mars, 2003, Clermont-Ferrand, France.

- Jouraiphy A., **Amir S**, El Gharous M., Hafidi M. : Traitement de boues de station d'épuration des eaux résiduaires par compostage (Cas de la Station de boues activées de Khouribga, Maroc). 5^{ème} Colloque sur la Matière Organique Naturelle, 26-28 Mars, 2003, Clermont-Ferrand, France.

- **Amir S.**, Hafidi M., Merlina G., Revel J.C. : Structural Characterization of humic acid extracted from composted sewage sludge using different analytical techniques: Elemental analysis, FTIR, 13 C-NMR and H-NMR. 20th Anniversary Biennial Conference of the International Humic Substances Society, July 21-26, 2002, Boston, USA.

- **Amir S**, Jouraiphy A., Hafidi M., Gharous G., Merlina G., Revel J. C. Treatment of Moroccan Sewage Sludge by composting, First World Wide Workshop for Junior Environmental Scientists, May 21-24, 2002, Paris, France. www.enpc.fr/cereve/HomePages/thevenot/www-jes-2002/-Amirpaper-2002.doc.

- **Amir S.**, Revel J.C., Bailly J.R. Hafidi M. : Fractionnement sur gel de sephadex des acides humiques d'un compost des boues résiduaires : caractérisation des fractions. Quatrième Colloque sous l'égide du groupe Français de l'IHSS, 22-23 novembre 2001, Limoges France.

- **Amir S.**, Revel J.C., EL Gharouss M. Hafidi M. : Devenir des métaux lourds lors du compostage des boues résiduaires (Cas de la station expérimentale de Marrakech) : Extraction sélective. Quatrième Congrès International GRUTTEE (Groupement de Recherche Universitaire

sur les Techniques de Traitement et d'Épuration des Eaux), 22-23 novembre 2001, Limoges, France.

- **Amir S.**, Revel J.C., El Gharouss M. Hafidi M. : Changes in sewage sludge properties during composting, 15 Symposium International of Biogeochemistry, 11-15 September 2001, Poland.

- **Amir S.**, Hafidi M. : Valorisation des boues de station d'épuration des eaux usées par un bio-procédé aérobie « compostage ». Troisième Symposium International Environnement, Catalyse et Génie des Procédés ECGP'3. 13-14 novembre 2000 à Fès, Maroc.

Abréviations

| | |
|---------------------|--|
| ADEME | : Agence de l'environnement et la Maîtrise de l'Energie, France |
| AFNOR | : Association Française de Normalisation |
| ¹³ C-NMR | : Spectroscopie Résonance Magnétiques Nucléaire du Carbon 13 |
| EPA | : Environmental Protection Agency, USA |
| ETM | : Eléments Traces Métalliques |
| FA | : Acides Fulviques |
| FTIR | : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier |
| GC/MS | : Chromatographie en phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse |
| HA | : Acides Humiques |
| PAEs | : Esters d'Acides Phthaliques ou phthalates |
| PAHs | : Hhydrocarbures Aromatiques Polycycliques |
| TMAH-GC/MS | : Couplage Thermochemiolyse/ Chromatographie en phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse |
| UV | : Spectrométrie Ultraviolet-Visible |

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | |
| I-Traitement des eaux usées | 4 |
| I.1. Les filières de traitements des eaux usées..... | 4 |
| I.2. Situation du traitement des eaux usées au Maroc | 5 |
| II- Composition et traitement des boues résiduaires..... | 6 |
| II.1. Composition des boues résiduaires..... | 6 |
| II.1.1. Matière organique..... | 6 |
| II.1.2. Eléments fertilisants et amendements..... | 6 |
| II.1.3. Contaminants chimiques inorganiques et organiques | 6 |
| II.1.4. Les micro-organismes pathogènes..... | 7 |
| II.2. Les différentes filières de traitement des boues..... | 7 |
| II.2.1. La mise en décharge contrôlée | 8 |
| II.2.2. L'incinération | 9 |
| II.2.3. Utilisation agricole des boues..... | 9 |
| II.2.3.1. Epanchage direct des boues résiduaires | 10 |
| II.2.3.2. Utilisation des boues traitées..... | 10 |
| III- Compostage..... | 11 |
| III.1. Généralités sur le compostage..... | 11 |
| III.2. Paramètres du compostage..... | 13 |
| III.3. Détermination de la stabilité et la maturité d'un compost..... | 15 |
| III.4. Compostage et processus d'humification | 17 |
| III.4.1. Evolution de la matière organique et formation des substances humiques..... | 17 |
| III.4.2. Structure des substances humiques | 20 |
| III.4.3.1. Théorie de la lignine (voie 1)..... | 21 |
| III.4.3.2. Théorie des polyphénols (Voies 2 et 3)..... | 22 |
| III.4.3.3. Théorie de la condensation amino-saccharidique (voie 4)..... | 24 |
| III.4.3.4. Structure supra-moléculaire des substances humiques..... | 24 |
| IV- Micropolluants métalliques et organiques | 26 |
| IV.1. Eléments traces métalliques (ETM)..... | 26 |
| IV.1.1. Valeurs limites et admissibles des ETM du compost en agriculture..... | 26 |
| IV.1.2. Détermination des concentrations des ETM dans le sol et les compost | 29 |
| IV.1.2.1. Extraction simple | 30 |
| IV.1.2.2. Extraction séquentielle « spéciation » des ETM | 30 |

| | |
|---|-----------|
| IV.1.2.3. Validité des méthodes d'extraction séquentielles | 32 |
| IV.1.2.3.1. Validité expérimentale | 32 |
| IV.1.2.3.2. Validité d'extrapolation | 32 |
| IV.1.2.4. Le compostage et les éléments traces métalliques | 33 |
| IV.1.2.4.1. Le devenir des ETM lors du compostage | 33 |
| IV.1.2.4.2. Devenir des ETM de boues et de compost dans le sol..... | 35 |
| IV.2. Micropolluants organiques | 36 |
| IV.2.1. Phthalates ou esters d'acide phthalique | 36 |
| IV.2.1.1. Généralités sur les phthalates | 37 |
| IV.2.1.2. Structure et caractéristiques physico-chimiques des phthalates..... | 38 |
| IV.2.1.2.1. Structure des esters phthaliques | 38 |
| IV.2.1.2.2. Propriétés physico-chimiques des esters phthaliques | 38 |
| IV.2.1.3. Devenir des phthalates dans l'environnement | 41 |
| IV.2.1.3.1. La biodégradation des phthalates | 41 |
| a- Voies de biodégradation | 42 |
| b- Facteurs contrôlant la biodégradation | 44 |
| b.1. Nombre d'atomes de carbone et longueur des chaînes alcoyles | 44 |
| b.2. Paramètres biologiques et physico-chimiques du milieu | 45 |
| IV.2.1.3.2. Adsorption des phthalates | 46 |
| IV.2.2. Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques..... | 47 |
| IV.2.2.1. Les Généralités sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques | 47 |
| IV.2.2.2. Structure et caractéristiques physico-chimiques des HAP..... | 48 |
| IV.2.2.2.1. Structure des HAP étudiés..... | 48 |
| IV.2.2.2.2. Propriétés physico-chimiques des HAP étudiés | 49 |
| IV.2.2.3. Devenir des HAP dans l'environnement | 51 |
| IV.2.2.3.1. Biodégradation des HAP..... | 51 |
| a- Mécanismes de dégradations des HAP..... | 51 |
| b- Conditions physico-chimiques de la dégradation des HAP..... | 54 |
| c- Co-compostage de matrices contenant des HAP..... | 55 |
| IV.2.2.3.2. Adsorption, séquestration et formation de résidus des HAP..... | 57 |
| Références bibliographiques | 60 |

RESULTATS ET DISCUSSION

Partie I :

Compostage de boues de station d'épuration et devenir des micropolluants métalliques et organiques

Chapitre 1 :

Article 1 : Valorisation de boues de stations d'épuration des eaux usées par un bio-procédé aérobie "compostage"85

Chapitre 2 :

Article 2 : Sequential extraction of heavy metals during composting of sewage sludge.....92

Chapitre 3 :

Article 3 : Fate of phthalic acid esters during composting of both lagooning and activated sludges.....117

Chapitre 4 :

Article 4 : Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of lagooning sewage sludge138

Partie II.

Caractérisation des substances humiques lors du compostage de boues (chromatographie sur gel de sephadex, UV Visible, IRTF, RMN ¹³C, Analyse élémentaire, thermochimioolyse/GC/MS).

Chapitre 1 :

Article 5 : Characterization of Humic Acids extracted from Sewage Sludge during Composting and of their Sephadex[®] gel Fractions.....159

Chapitre 2 :

Article 6 : Elemental analysis, FTIR and ¹³ C-NMR of humic acids from sewage sludge composting178

Chapitre 3 :

Article 7 : Structural changes in lipid-free humic acids during composting of sewage sludge.....196

Chapitre 4 :

Article 8 : Structural characterization of fulvic acids during composting of sewage sludge214

Chapitre 5 :

Article 9 : Structural characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting by Thermochemolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry234

Chapitre 6 :

Article 10 : Structural characterization of fulvic acids extracted from sewage sludge during composting by Thermochemolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry265

SYNTHESE, CONCLUSION GENERALE294

PERSPECTIVES.....302

ANNEXES

Annexe 1 : Dispositif expérimental de la station des boues de lagunage de la ville du Marrakech.....304

Annexe 2 : Données sur les composts suisses307

Annexe 3 : Evaluation de la valeur agronomique du compost des boues étudiés308

Références bibliographiques.....309

INTRODUCTION GENERALE

Les accroissements démographiques, économiques et urbains sont à l'origine de différentes sources de pollution environnementale (pollution atmosphérique, pollution des eaux de surfaces et profondes, pollution du sol...), et ce, en particulier dans les pays en développement moins préoccupés et moins sensibilisés par les risques sanitaires concomitants. Parmi ces sources de pollution la production d'eaux usées souvent rejetées dans le milieu récepteur (mer, rivières, sols) sans traitement préalable génère de nombreuses maladies hydriques et une propagation des épidémies (OMS, 1989; Prost, 1991).

Au Maroc, les volumes d'eaux usées rejetés ont été estimés à 470 Mm³ par an en 1994 et atteindraient 900 Mm³ par an à l'horizon 2020 (Ministère de l'Agriculture et de la Mise en Valeur Agricole, Maroc, 1998). A l'instar des pays en développement, l'essentiel des eaux usées sont déversées dans le milieu naturel sans traitement. Néanmoins, ces dernières années, l'accroissement de la demande en eau pour la consommation humaine, industrielle, agricole et les sécheresses répétées qui sévissent au Maroc ont sensibilisé les décideurs à considérer les eaux usées comme une ressource hydrique appréciable, d'où la nécessité de réfléchir à un programme national d'épuration des eaux usées. De nombreuses stations d'épuration ont été construites, mais rares sont encore fonctionnelles en raison de problèmes de suivi, d'entretien ou d'inadaptation de la filière de traitement.

En 1985, la Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech a lancé un programme de recherches expérimentales sur l'épuration des eaux usées afin de définir les techniques de traitement les plus performantes, en tenant compte des contraintes climatiques, économiques et sanitaires de notre pays. Le système de lagunage peut être considéré comme convenable pour le traitement des eaux usées de Marrakech puisqu'il a montré de bonnes performances épuratoires du point de vue abatement des pollutions microbienne (Boussaid, 1987), parasitaire (Bouhoum, 1987) ou métallique (Mazlani, 1988), et sur les problèmes engendrés par les matières organiques, azotées ou phosphatées (Ouazzani, 1987 ; Bouarab, 1988, Bousselhaj, 1996).

Quelque soit le système d'épuration adopté, le traitement des eaux usées s'accompagne d'une production de quantités de boues non négligeables dont il faut se débarrasser. Plusieurs filières existent pour l'élimination de ces boues, mais le choix doit être tributaire du coût d'installation, de l'origine de boues, de la valeur ajoutée du produit qui en résulte et de l'impact que pourrait avoir la filière retenue sur l'environnement. La mise en décharge (appelée aussi stockage) s'avère une technique peu valorisante et est légalement interdite dans de nombreux pays (directive 1999/31/CE). L'incinération de boues a un coût prohibitif et présente un risque lié à l'impact de gaz toxiques sur l'environnement tel que celui de la

dioxine (ADEME, 1999). La valorisation énergétique (production de biogaz comme source de chaleur et d'électricité) et la valorisation biologique ou agricole (production d'engrais et de compost) constituent des technologies vertes permettant de transformer les boues en produits à haute valeur ajoutée en minimisant les risques de pollution (Prevot, 2000 ; ADEME, 2001 ; Aubain et al., 2002). Le recyclage ou valorisation agricole des boues après compostage contribue à une réintégration des éléments minéraux et organiques dans les sols, ce qui permet de se rapprocher des cycles naturels (de Bertoldi et al., 1983). Néanmoins, l'épandage des composts obtenus ne doit pas se faire sans s'être assuré de leur hygiénisation, de leur stabilisation et de leur maturité. De plus, le compost de boues doit être exempt de phytotoxicité, avec des teneurs en métaux lourds (Cu, Zn, Cd, Hg, Cr...) et des teneurs en micro-polluants organiques (phthalates, PCB, HAP...) inférieures aux normes internationales en vigueur.

Le présent travail oeuvre pour la détermination des conditions optimales de compostage des boues résiduelles de lagunage expérimental de Marrakech (voir annexe 1). Il contribuera ainsi à une meilleure compréhension des phénomènes d'évolution de la matière organique au cours du compostage, en particulier ceux de la fraction humique. La détermination du degré de maturité du produit final sera abordée en utilisant différents indices physico-chimiques et spectroscopiques en vue de déterminer les indices qui intègrent mieux les transformations du substrat et qui reflètent la maturité réelle du produit final. Enfin, le devenir de différentes fractions de micropolluants métalliques (Zn, Cu, Pb, Ni, Cd) et organiques (phthalates, HAP), susceptibles d'induire une toxicité, a été suivi.

La première approche de ce travail consiste à déterminer les conditions optimales de compostage des boues de lagunage. Le suivi des transformations des déchets est effectué par les différentes méthodes d'analyses physico-chimiques et d'évaluation de l'humification. Afin de mesurer le risque écotoxicologique des boues, un suivi analytique des contaminants métalliques et organiques a été effectué à différents stades de compostage. L'étude a recherché les teneurs des ETM (Zn, Pb, Cu, Ni, Cd) et leur répartition chimique en fonction des compartiments constituant le compost, ce qui permet d'évaluer leur mobilité potentielle et les variations de spéciation qui s'effectuent lors du compostage. Le travail développé sur les polluants organiques a porté sur l'analyse de 6 phthalates et de 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques désignés par l'USEPA comme polluants prioritaires. L'étude a suivi l'effet du compostage sur le devenir et l'état chimique de ces polluants.

La deuxième approche de ce travail englobe une recherche sur les biotransformations structurales des acides humiques et fulviques lors de l'humification due au processus de

compostage en se basant sur un ensemble de techniques diverses et complémentaires, telles que l'analyse élémentaire (CHNOS), les analyses spectroscopiques (IR-TF, UV, ¹³C-RMN) et chromatographiques (gel de sephadex, TMAH-GC/MS). Une attention particulière a été accordée au rôle de la délipidation dans les structures humiques purifiées.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I-Traitement des eaux usées

L'épuration des eaux usées consiste à décanter les éléments polluants particuliers et à extraire les éléments dissous qui sont transformés en matière sédimentable suite à un traitement approprié. Ainsi, à la sortie de la station il en résulte d'une part une eau épurée rejetée dans le milieu naturel, et d'autre part, il reste des sous-produits désignés sous le terme des boues résiduaires (Werther et Ogada, 1999). Les divers procédés d'épuration des eaux usées actuels entraînent une production plus ou moins importante de boues résiduaires. La matière solide de ces résidus contient à la fois des éléments naturels valorisables et des composés toxiques en relation avec la nature des activités raccordées au réseau d'assainissement, industrielles ou domestiques. L'épandage direct de ces boues se heurte à de fortes résistances de l'opinion concernant les risques sanitaires éventuels qu'implique cette pratique du fait de la présence d'agents pathogènes, d'éléments traces métalliques et de composés organiques toxiques. Afin de préserver les productions agricoles et l'environnement, l'innocuité des boues passe par le respect de normes d'épandage ou par l'utilisation de produits dérivés de celles-ci par voie chimique ou biologique.

I.1 Les filières de traitements des eaux usées

Il existe plusieurs filières, mais le choix d'un procédé de traitement doit être adéquat du point de vue climatique, des applications attendues et de l'investissement (ADEME, 1996; Werther et Ogada, 1999; CEE, 2001). Ce procédé nécessite un ensemble cohérent de traitements effectués après des prétraitements tels que le dégrillage, le dessablage et le dégraissage. Parmi ces filières, on trouve :

- **Traitement primaire** : Décantation simple ou renforcée par des additifs chimiques.

- **Traitement secondaire** :

- **Traitement physico-chimique** : utilisation d'adjuvants chimiques pour éliminer les matières en suspension. Il comporte une phase de coagulation (agglomération des colloïdes par addition par exemple de sels de fer ou d'aluminium), une phase de floculation et une phase de décantation pour assurer la séparation entre solide et liquide suite à l'injection des agents floculants tel le charbon actif en poudre. Ces traitements acceptent les variations brutales de charges polluantes, mais ils sont très coûteux en exploitation selon les adjuvants chimiques utilisés.

- **Traitement biologique** : il permet la biodégradation des matières organiques des eaux usées grâce à des bactéries aérobies ou anaérobies dans des systèmes suivants :

- **Système intensif** à cultures fixes telles que les lits bactériens et les disques biologiques ou à cultures libres telles que les boues activées.
- **Système extensif** dont le plus répandu et le plus classique est le lagunage surtout dans les pays à climat chaud et où le terrain est disponible à coût raisonnable. Il consiste en un lent écoulement de l'affluent dans un ou plusieurs réservoirs plus ou moins profonds.
- **Traitement tertiaire ou les traitements complémentaires** : désinfection, dénitrification, déphosphatation.

I.2 Situation du traitement des eaux usées au Maroc

Depuis 1958, une soixantaine de stations d'épuration des eaux usées (STEP) ont été construites au Maroc, mais en 1994 la grande majorité est hors service ou n'a pas été raccordée au réseau pour des raisons diverses : inadaptation de la filière de traitement aux conditions locales, défaut de conception des ouvrages, manque d'entretien, problèmes de gestion (absence de budget, manque de cadres techniques compétents), absence de planification à court et long terme. Seuls 8 % des eaux usées sont épurés, le reste est déversé directement dans la mer (52 %), dans le réseau hydrographique (32 %) et les fosses septiques, ce qui entraîne une pollution importante du littoral, des cours d'eau (Oued Sebou) et des nappes phréatiques. Le tableau 1 présente la situation et les différents type de stations d'épuration au Maroc (Bahij et Soudi, 2003).

Tableau 1. Situation et différents type de stations d'épuration au Maroc (Bahij et Soudi, 2003).

| STEP | Nombre | En fonction | Hors Service | Non Raccordée | Pourcentage en fonction |
|--------------------------|--------|-------------|--------------|---------------|-------------------------|
| Boues activées | 20 | 12 | 5 | 3 | 60 |
| Lits bactériens | 11 | 5 | 6 | 0 | 45,5 |
| Décanteurs-Digesteurs | 17 | 2 | 13 | 2 | 11,8 |
| Egouttage | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| Lagunage | 13 | 7 | 5 | 1 | 53,8 |
| Infiltration-percolation | 2 | 2 | 0 | 0 | 100 |
| Chenal Algal | 3 | 1 | 1 | 1 | 33,3 |
| Total | 69 | 29 | 33 | 7 | 42,0 |

En France où il existe environ 15000 stations d'épuration aujourd'hui, seulement 49 % des eaux usées sont en fait épurées (source : centre d'information sur l'eau, [http :www.cieu.com](http://www.cieu.com)). L'objectif fixé par la loi pour l'an 2005 (décret n°92-3 du 3 janvier 1992, décret n°94-469 du 3 juin 1994) est de dépolluer 65 % des eaux usées.

II. Composition et traitement des boues résiduaires

II.1 Composition des boues résiduaires

La composition exacte des boues varie en fonction de l'origine des eaux usées, de la période de l'année et du type de traitement et de conditionnement pratiqué dans la station d'épuration (Werther et Ogada, 1999 ; Jarde et al., 2003 ; Singh et al., 2004). Les boues résiduaires représentent avant tout une matière première composée de différents éléments (Matière organique, éléments fertilisants (N et P ...), d'éléments traces métalliques, d'éléments traces organiques et d'agents pathogènes) .

II.1.1 Matière organique

La concentration en matière organique peut varier de 30 à 80 %. La matière organique des boues est constituée de matières particulaires éliminées par gravité dans les boues primaires, des lipides (6 à 19 % de la matière organique), des polysaccharides, des protéines et des acides aminés (jusqu'à 33 % de la matière organique), de la lignine, ainsi que des produits de métabolisation et des corps microbiens résultant des traitements biologiques (digestion, stabilisation) (Kakii et al., 1986 ; Inoue et al., 1996 ; ADEME, 2001 ; Jarde et al., 2003).

II.1.2 Eléments fertilisants et amendements

Selon la dose appliquée, les boues peuvent couvrir, en partie ou en totalité, les besoins des cultures en azote, en phosphore, en magnésie, calcium et en soufre ou peuvent aussi corriger des carences à l'exception de celle en potassium (Zebarth et al., 2000 ; Su et al., 2004 ; Warman et al., 2005). Les éléments en traces tels que le cuivre, le zinc, le chrome et le nickel présents dans les boues sont aussi indispensables au développement des végétaux et des animaux.

II.1.3 Contaminants chimiques inorganiques et organiques

Ces mêmes éléments traces métalliques (cuivre, le zinc, le chrome et le nickel) indispensables au développement des végétaux et des animaux peuvent se révéler toxiques à trop fortes doses

(Chang et al., 1992 ; Cripps et al., 1992). D'autres, tels que le cadmium et plomb sont des toxiques potentiels (Alloway, 1995; McBride, 2003). Ainsi, un polluant peut être défini comme un élément ou un composé chimique ordinaire dont la nocivité n'apparaît qu'à partir d'une certaine concentration. Aussi, dans les boues, une multitude de polluants organiques (HAP, Phthalates, PCB, etc) peut se trouver en concentrations en général de l'ordre de $\mu\text{g}/\text{kg}$ MS (Lega et al., 1997; Pérez et al., 2001).

La nature et la concentration des eaux usées en polluants organiques et inorganiques sont très dépendantes des activités raccordées au réseau. L'essentiel des contaminations chimiques vient des rejets industriels et dans une moindre mesure des rejets domestiques (utilisation de solvants, déchets de bricolage...). Du fait de la décantation lors du traitement, ces contaminants chimiques se retrouvent dans les boues à de très grandes concentrations par rapport aux eaux usées (Klöpffer, 1996).

II.1.4 Les micro-organismes pathogènes

Les boues contiennent des milliards de microorganismes vivants qui jouent un rôle essentiel dans les processus d'épuration. Seul une infime partie est pathogène (virus, bactéries, protozoaires, champignons, helminthes, etc.) et provient en majorité des excréments humains ou animaux (Sahlström et al., 2004).

La concentration d'une eau usée en germes pathogènes dépend du secteur d'activité d'origine: les eaux provenant d'abattoirs ou de toute industrie traitant de produits d'animaux sont très largement contaminées (Ecrin, 2000). Ainsi, par mesure de précaution, et afin d'éviter de propager la maladie de la vache folle, il est interdit d'utiliser les boues d'épuration provenant des eaux usées des abattoirs ou des équarrissages pour fabriquer de la fumure ou du compost (arrêté n°2210 du 30 avril 2004: Abattoirs). D'une façon générale, les boues doivent subir un prétraitement avant leur utilisation en agriculture (Garrec et al., 2003).

II.2 Les différentes filières de traitement des boues

Les boues résiduaires se présentent sous une forme liquide et avec une forte charge en matière organique hautement fermentescible. Ces deux caractéristiques sont gênantes et posent beaucoup de problèmes techniques pour leur évacuation « quelle que soit la destination », parmi lesquels leur transport et leur stockage qui conduisent souvent à des problèmes de manipulation et des nuisances olfactives. Ceci impose le choix d'une filière de traitement dès l'installation de la STEP.

Généralement, le traitement des boues a deux objectifs :

La **stabilisation** pour empêcher ou réduire les problèmes de fermentation et d'éviter ainsi les nuisances olfactives. La stabilisation peut être **biologique** par voie aérobie (compostage) ou anaérobie (méthanisation) ou **chimique** (chaulage ou autres traitements) (Office International de l'Eau, 2001). La stabilisation biologique présente l'avantage de limiter l'évolution ultérieure de la composition des boues.

La **déshydratation** et la concentration des boues qui a pour objectif de réduire leur volume (plus de 97 % d'eau) par épaissement et/ou par déshydratation pour faciliter par la suite leur transport et leur stockage. Un conditionnement est souvent utilisé en amont pour favoriser la séparation liquide-solide à l'aide de flocculants organiques de synthèse ou minéraux, et autoclavage. Selon la puissance du procédé de séchage utilisé, épaissement, déshydratation ou séchage thermique, on obtient des boues à différents pourcentages de siccité : Boues liquides (4 à 10 %), Boues pâteuses (10 à 25), Boues solides (25 à 50 %), Boues granulées ou en poudre pour une siccité supérieure à 85 % (ADEME, 1996).

II.2.1 La mise en décharge contrôlée

La mise en décharge contrôlée consiste en un enfouissement des boues (souvent mélangées avec les ordures ménagères) en tenant en compte de certaines conditions : compactage des résidus, site étanche, récupération et traitement des jus de décharges (lixiviats), équipement et gestion du site (El-Fadel et Khoury, 2000 ; Allen, 2001). Les boues doivent être préalablement stabilisées et déshydratées (humidité maximale de 70 %).

Cette solution a perdu progressivement de son intérêt et se retrouve actuellement interdite pour des raisons financières (procédure de fermeture...) et pour des problèmes environnementaux tels que les odeurs nauséabondes, pullulation de moustiques, entraînement d'éléments fertilisants (nitrates, phosphates) et de produits toxiques par les eaux superficielles et contamination des nappes d'eaux souterraines (Looser et al., 1999; Kjeldsen et al., 2002; Marttinen et al., 2003). Les décharges ne doivent plus accepter que des déchets qui ne peuvent plus être raisonnablement valorisés ou à caractère non dépolluables ou dangereux appelés aussi déchets ultimes. La directive européenne du 26 avril 1999 impose une diminution d'au moins 65 % de la quantité de déchets organiques mis en décharge d'ici 2015.

II.2.2 L' incinération

Elle réalise la destruction de la matière organique des déchets par combustion à haute température (+ de 500 °C) produisant des fumées et des matières minérales résiduelles nommées cendres. Dans l'objectif d'une valorisation énergétique des déchets, la chaleur produite est récupérée sous forme de vapeur ou d'électricité pour le fonctionnement du four lui même, pour le chauffage urbain ou industriel (Prevot, 2000). Les résidus de l'incinération (mâchefer) sont utilisables pour les travaux publics (Werther et Ogada, 1999). En France, 14 à 16 % des boues urbaines sont incinérés. En Europe, le pourcentage varie de 0 à 55 % selon les pays. Au Maroc, un traitement par incinération n'a pas encore été effectué.

Cependant, malgré l'intérêt de ce procédé pour une réduction importante des volumes de déchets, il présente des contraintes principalement liées à un investissement très coûteux. Les boues seules ne sont pas autocombustibles, elles nécessitent des fours spéciaux et un mélange avec d'autres déchets tels les déchets ménagers. L'élimination des cendres et des mâchefers exigent une décharge contrôlée de classe 1 ou une unité d'inertage. Cette technique reste aussi néfaste de point de vue écologique et environnementale puisqu'elle contribue en plus du gaspillage de matières organiques utiles pour le sol à la diffusion de gaz très toxiques (NO, NO₂, CO, SO, dioxine, etc) (Mininni et al., 2004 ; Nammari et al., 2004) qui ont fait l'objet de réglementations spécifiques. En 1995, l'incinération des déchets était à l'origine de 45 % de la dioxine produite et rejetée dans l'air en France. La directive européenne du 4 décembre 2000 est plus sévère et fixe des concentrations maximales admissibles pour certains produits toxiques dans la fumée (CE, 2000/76/EC). Depuis, les incinérateurs sont modernisés ou fermés, entraînant un coût supplémentaire d'une dizaine d'euros par tonne de déchets incinérés.

II.2.3 Utilisation agricole des boues

La valorisation agricole des boues résiduaires peut être considérée comme le mode de recyclage le plus adapté pour rééquilibrer les cycles biogéochimique (C, N, P ..), pour la protection de l'environnement et d'un très grand intérêt économique. Elle vise à ménager les ressources naturelles et à éviter tout gaspillage de matière organique dû à l'incinération ou à l'enfouissement dans les décharges (Lambkin et al. 2004). Les boues résiduaires peuvent ainsi remplacer ou réduire l'utilisation excessive d'engrais coûteux.

II.2.3.1 Epandage direct des boues résiduaires

A l'heure actuelle, l'épandage agricole des boues reste en Europe la principale filière d'élimination. En 2002 environ 62 % des boues d'épuration domestiques étaient valorisés en agriculture en France par ce biais. L'épandage de boues ne peut être pratiqué que si celles-ci respectent le principe "d'intérêt agronomique" et soient exemptes de grandes teneurs en polluants inorganiques ou organiques. L'application des boues doit suivre des règles d'épandage décrites par l'arrêté du 08 janvier 1998. Cet arrêté impose des distances minimales :

- d'épandage vis à vis des berges, des sources, des puits, des habitations en évitant une percolation rapide vers les eaux superficielles ou souterraines ou tout ruissellement.
- d'isolement d'au moins 3 mètres vis-à-vis des routes et fossés.

Il interdit l'épandage :

- sur des sols gelés, de forte pente
- pendant les périodes de forte pluviosité et doit être en dehors des terres régulièrement travaillées (maraîchages).

Il définit des délais minima

- avant la remise à l'herbe des animaux, et de cultures maraîchères.
- la durée du dépôt (inférieure à 48 heures), et seules sont entreposées les quantités de boues nécessaires à la période d'épandage considérée.

Cependant, des problèmes et des obstacles économiques ou techniques à l'application des règles d'épandage surgissent, ceux-ci comprennent les possibilités de stockage et de transport, l'insuffisance ou l'inadéquation des techniques de stabilisation et de déshydratation. D'autre part, du point de vue hygiénisation, la capacité d'épuration des sols est limitée dans certaines conditions. Ainsi, l'utilisation des boues sans hygiénisation préalable constitue en quelque sorte un retour à la pratique ancestrale de l'épandage des eaux usées brutes (Bengtsson et al., 2004).

II.2.3.2 Utilisation des boues traitées

La réduction du pouvoir fermentescible des boues et leur hygiénisation des germes pathogènes dépend des performances des procédés de stabilisation.

Les techniques de stabilisation chimique par chaulage ou autres telles que le traitement aux nitrites à pH acide, se basent sur un blocage de l'activité biologique. La stabilisation par chaulage a connu un développement soutenu depuis plusieurs années en raison de son efficacité vis à vis de la maîtrise des nuisances olfactives et de l'intérêt calcique des boues

chaulées pour les sols acides (ADEME, 1996 ; Dousset et al., 1999). Cependant, la consommation en réactifs chimiques de ce procédé peut le rendre rédhibitoire par ce coût ainsi que par la nécessité de prendre des précautions en terme d'hygiène et de sécurité.

Les procédés de stabilisation biologique sont des techniques relativement peu onéreuses dans leur mise en œuvre. Le principe général des traitements biologiques est d'exploiter certaines activités microbiennes en les stimulant de manière contrôlée afin de réduire les nuisances potentielles des déchets (odeurs, caractère polluant au sens large du terme) et de les valoriser sous forme énergétique ou sous forme de matériau.

La méthanisation ou digestion anaérobie poursuit le double objectif de valorisation énergétique par récupération de méthane (CH₄) et de stabilisation des déchets organiques. Cependant, la valorisation agricole directe du digestat est rarement pratiquée car elle rencontre bon nombre de problèmes (Gourdon, 2001). D'une part, la recherche d'une productivité élevée en méthane privilège une réduction du temps de séjour au détriment du rendement d'épuration. La matière organique du digestat ne possède pas de bonnes propriétés agronomiques, car il ne s'agit pas d'une matière humifiée. De plus, un certain nombre de risques sanitaires peuvent exister (présence potentielle de germes pathogènes), car l'effet thermique d'hygiénisation (comme dans le cas du compostage) n'a pas lieu en anaérobiose.

Le compostage permet de poursuivre plusieurs objectifs en même temps : stabilisation du déchet pour réduire les pollutions ou nuisances associées à son évolution biologique, diminution du volume des boues due à la dégradation des composés organiques et au séchage induit par la nature exothermique du procédé et production en fin d'un compost riche en substances humiques valorisable comme amendement organique des sols (Komilis et al., 1999; Semple et al., 2001)

III- Compostage

III.1 Généralités sur le compostage

Le compostage est un processus de décomposition et de transformation « contrôlées » de déchets organiques sous l'action de populations microbiennes diversifiées évoluant en milieu aérobie (Sharma et al., 1997). Des communautés différentes de micro-organismes se succèdent lors du compostage, elles sont constituées majoritairement de Bactéries, d'Actinomycètes, de Champignons (ou Mycètes), de Protozoaires ou d' Algues (Tuomela et al., 2000, Hassen et al., 2001). Elles sont déjà présentes dans tous les substrats destinés à être compostés : le processus de compostage démarre donc généralement tout seul. Il reproduit en

accélération des étapes de transformation des résidus végétaux en humus dans un sol : composter correspond donc essentiellement à la production des substances humiques stables dans le produit final et à un recyclage d'une matière organique dont le trajet naturel a été modifié (Mustin, 1987 ; Inbar et al., 1990; Ciavatta et al. ; 1993; Chefetz et al., 1998 a; Ouatmane, 2000).

Biochimiquement, le compostage est un processus continu au cours duquel différentes réactions se produisent parallèlement et consécutivement. Dans les phases biologiques, différentes enzymes permettent la biodégradation de macromolécules facilement décomposables par des réactions de coupures et d'oxydations. Les phases finales font surtout appel à des phénomènes de polymérisation et de polycondensation des molécules néoformées. (Chefetz et al., 1998 ; Tuomela et al., 2000; Tiquia et al., 2002 ; Mondini et al., 2004). Ainsi, l'obtention d'un produit mature riche en substances humiques très polymérisées sans risque de générer une fermentation accidentelle une fois dans le sol (Sanchez-Monedero et al., 2004). Grâce à ses caractéristiques chimiques, le compost peut assurer en même temps la fertilité et l'équilibre du sol. Il combat efficacement l'érosion et le lessivage des éléments fertilisants en reconstituant la structure de la terre grâce à sa composition en humus qui lui confère à la fois la fonction d'amendement organique et d'engrais minéral (Magdi et al., 2004 ; Zorpas et al., 2003). Son apport régule l'humidité et l'alimentation en substances nutritives de la plante (Cegarra et al., 1993; Wong et al., 1999; Ouédraogo et al., 2001).

Suivant leurs origines, les composts peuvent avoir des différences dans leur qualité fertilisante, mais les caractéristiques standard d'un compost proposées par Brinton (2000) ou Scotland (2004) sont : un pH de l'ordre de 7,0-8,5, une humidité de 35-55 %, une teneur en matière organique supérieure à 25 %, une teneur en azote total (Kjeldahl) de l'ordre de 8,1 Kg/tonne de matière fraîche, en calcium (CaO 50 Kg/tonne de matière fraîche), en potassium (6,7 K₂O Kg/tonne de matière fraîche), en phosphore (3,4 P₂O₅ Kg/tonne de matière fraîche), Magnésium (2 Kg/tonne de matière fraîche) et Soufre (1 Kg/tonne de matière fraîche).

En France, cette technique se pratique dans une trentaine de stations d'épuration d'eaux usées et traite actuellement 2 % des boues produites, sans toutefois atteindre l'échelle industrielle.

Dans l'évolution du contexte réglementaire, la démarche de l'homologation d'un compost consiste à faire passer les composts de boues de station d'épuration du statut de déchet à celui de produit fertilisant et support organique de culture [arrêté du 21 décembre 1998 et guide du 22 mars 1999]. Cette homologation présuppose une homogénéité et une constance de la composition du compost final, son innocuité et son efficacité agronomique. Les futures

normes européennes visent à faire du compost un produit de type industriel. Au Maroc, les rares essais réalisés sont à l'échelle expérimentale (Amir et al., 2000; Jouraiphy et al., 2003).

III.2 Paramètres du compostage

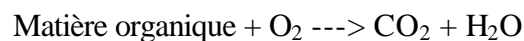
Les conditions de bon développement des activités micro-biologiques doivent être optimisées et leur suivi est indispensable pour évaluer la bonne conduite du compostage et l'obtention d'un produit final de bonne qualité. Ces paramètres majeurs interviennent en même temps au cours du compostage et non pas séparément (Jiménez et García, 1992 a; Bernal et al., 1996). La composition chimique du substrat à composter doit avoir un équilibre trophique estimé généralement par le rapport carbone sur azote C/N en début de compostage qui se situe dans l'intervalle 20 à 30, l'optimum étant l'ordre de 30 (Huang et al., 2004). Un rapport élevé lié à une teneur faible en azote (source nutritionnelle) conduit à un ralentissement de l'activité ou de la croissance des populations microbiennes. A l'inverse, un rapport C/N très bas lié à un excès d'azote conduit à une production d'azote ammoniacal caractérisé par une odeur nauséabonde.

Le pH est un paramètre qui intervient essentiellement par son rôle sélectif sur la microflore responsable de la décomposition des déchets initiaux. Le pH optimal est de 5,5-8,0 (Zorpas et al., 2003, Sundberg et al., 2004). Au cours du compostage, le pH peut subir des modifications, soit une acidification par formation de certains acides organiques liés à la dégradation des sucres simples et la production de CO₂ en début de compostage, soit une alcalinisation par production du gaz ammoniac (Bernal et al., 1996). Une déviation du pH vers des valeurs acides (cas d'anaérobiose) peut être corrigée par aération. L'ajout de chaux ou de magnésie peut contrôler l'acidité, alors que l'ajout de soufre peut corriger l'alcalinité (Roig et al., 2004).

La présence d'oxygène à un seuil minimal de l'ordre de 5 % d'oxygène est indispensable au bon déroulement du compostage (Tomati et al., 1995). Il est en effet consommé d'une part par les micro-organismes au cours de leur respiration et d'autre part par les réactions d'oxydation (Tremier et al., 2005). Le taux d'oxygène est directement lié au pourcentage d'espaces lacunaires (porosité ou vides) dans les matières à composter, à la granulométrie des particules présentes et à l'humidité du compost (Van Ginkel et al., 2002). Si la granulométrie est trop fine, elle provoque un « étouffement », si elle est trop grossière elle provoque un dessèchement dû à des circulations d'air importantes. Par ailleurs, la texture des matières

premières et leur porosité conditionnent la capacité d'un mélange à se composter. Une bonne porosité garantit un processus aérobie, alors qu'une surface de contact maximale (particules fines) permet une attaque microbienne plus complète (Kulcu et Yaldiz, 2004).

La teneur en eau et la nature de sa liaison avec les constituants du compost conditionnent la capacité de démarrage du processus de compostage et la création d'un biotope favorable au déroulement des processus biologiques (Van Ginkel et al., 2002). Une teneur en eau trop faible limite le développement microbien, et dans le cas d'une humidité trop élevée, l'eau sature les espaces lacunaires et étouffe les micro-organismes dans le tas du mélange à composter (Kulcu et Yaldiz, 2004). En règle générale, l'humidité des déchets à composter doit être ajustée à une valeur comprise entre 50 et 70 % selon la nature des déchets. L'évolution de l'humidité au cours du processus est variable (Inbar et al., 1988). Elle peut augmenter suite à la production d'eau liée aux réactions d'oxydation de la matière organique :



Elle peut diminuer suite au dessèchement associé aux températures atteintes lors de la phase de stabilisation, et suite à l'évaporation par aération forcée ou par retournement.

Un compostage bien mené avec une température élevée située entre 40 et 70° C sur tout le produit pendant un temps suffisant est létal pour la totalité des graines adventices et réduit la quasi-totalité des pathogènes (Klamer et Baath, 1998, Hassen et al., 2001). Cette «hygiénisation» du compost est le résultat du contrôle des différentes conditions : retournement, aérobose, durée suffisante et humidité (Liang et al., 2003).

L'Agence de Protection de l'Environnement recommande dans le cas d'un compost conduit en andain et réalisé avec une aération par retournement une température de 55°C pendant au minimum 15 jours : PFRP (USEPA, 1993).

Généralement, le compostage se déroule en deux phases : une phase de stabilisation dominée par une intense activité microbiologique qui s'accompagne d'une élévation de température (phase thermophile) dès les premiers jours, par la suite la température baisse progressivement pour se stabiliser à des températures inférieures à 40 ° C, indiquant l'épuisement du milieu en molécules simples et dominée par les processus d'humification (phase de maturation) et pouvant durer des mois (Klamer et Baath, 1998, Hassen et al., 2001).

III.3. Détermination de la stabilité et la maturité d'un compost

La stabilité et la maturité du compost sont essentielles pour une utilisation optimale du compost comme amendement du sol et source de nutriments pour les plantes (CCME, 1996 ; Magdi et al., 2004). Un compost non stable et non mature va poser des problèmes de stockage et de transport dus à des dégagements gazeux ou mal-odorants, infestation de mouches et moustiques, et des problèmes de phytotoxicité ou de pollution après épandage au sol (Mathur et al., 1993; Tiquia et al., 1998).

Un compost stable et mature conduira à une minéralisation réduite du carbone apporté en parallèle d'un relargage régulier de l'azote organique associé contrairement à un compost immature trop riche en carbone facilement assimilable qui provoquerait une surconsommation d'azote par les bactéries du sol ou « faim d'azote » (Bernal et al., 1998). D'autres effets dépressifs sur le sol sont liés à un épandage de compost immature : la diminution du taux d'oxygène et du potentiel oxydo-réducteur du sol qui peut provoquer la création d'un milieu anaérobie et réducteur. Ces conditions vont favoriser la mobilisation des métaux lourds ou conduire à des réactions inhibitrices ou phytotoxiques, liées à la production d'ammoniac, d'oxyde d'éthylène ou d'acides organiques (Jiménez et Garcia., 1989; Wang et al., 2004a).

Différents paramètres (Tableau 2) peuvent être utilisés pour déterminer la stabilité et maturité du compost. Actuellement, il n'existe encore aucun test officiel ou standard pour évaluer chacun des deux critères. Iannotti et al. (1993) ont distingué entre la stabilité du compost estimée en terme d'activité microbienne (taux de respiration ou libération d'énergie) et la maturité du compost qui est déterminée par l'odeur, la germination des plantes tests ou la composition chimique. Herrmann et Shann (1993) suggèrent qu'un compost stable ne signifie pas nécessairement qu'il soit mature puisqu'il peut encore avoir un effet inhibiteur ou phytotoxique sur la croissance du plante. Mathur et al. (1993) ont décrit dans une étude bibliographique 25 tests habituellement utilisés pour vérifier la stabilité et maturité du compost. De nombreuses études ont proposé un nombre de critères et paramètres communs comme bases au suivi de l'évolution et de la transformation du mélange à composter (Tableau 2) (Jiménez et Garcia 1992 b, Senesi et al., 1996; Ouatmane, 2000; Brinton, 2000; NSDEL, 2001). Ces paramètres permettent de déterminer des indices de stabilité et maturité du compost final.

Tableau 2 : Récapitulatif des différents critères de stabilité et de maturité d'un compost

| | |
|---|--|
| Critères physiques | odeur, couleur, aspect (terreau homogène), absence de reste végétal ou autres débris non bien décomposés), température. |
| Critères chimiques | rapport C/N, capacité d'échange cationique CEC, NO_3^- , NO_2^- , rapport $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, pH, analyse des substances facilement biodégradables (sucres, acides aminés, phénols etc) et des fibres. |
| Critères microbiologiques et enzymatiques | activité de phosphatase alcaline, indicateurs des microorganismes : phospholipides, mesure de biomasse, métabolisme latent évalué par le taux respiratoire et la capacité d'auto-chauffage. |
| Test de germination | évaluation de la phytotoxicité résiduelle (taux germination des graines, longueur des racines) sur Cresson « <i>Lepidium sativum</i> L. » et Ray grass « <i>Lolium perenne</i> L. » ou d'autres plantes tests. |
| Critères spectroscopiques et analytiques | des composts ou de leurs substances humiques (acides humiques et fulviques): Analyse Élémentaire, Spectroscopies Infrarouges FTIR et Résonances Magnétiques Nucléaires RMN, Chromatographie sur gel de Séphadex, Thermochemolyse / Chromatographie Phase Gazeuse / Spectroscopie de Masse, Rayons X, Spectrométrie UV, de fluorescence, etc. |

Vu les différences dues aux origines des matières initiales à composter, des méthodes de compostage utilisées et des conditions d'obtention du compost, ces différents paramètres ne sont pas souvent cohérents et ainsi tous les auteurs suggèrent que nul critère n'est adéquat isolément et recommandent une combinaison entre les différentes techniques (Mathur et al., 1993; Senesi et al., 1996, Wang et al., 2004a).

III.4 Compostage et processus d'humification

Le degré de conversion de la matière organique brute ou fraîche en composés humiques est considéré par de nombreux auteurs à la fois comme un indice de stabilité et de maturité du compost (Inbar et al., 1990 ; Sanchez-Monedero et al., 1999 ; Ouatmane et al., 2000 ; Wu et Ma, 2002; Ait Baddi et al., 2004). La teneur en matières humiques et la structure de celles-ci contribuent à l'appréciation de la qualité agronomique d'un compost (Valdrighi et al., 1996 ; Madejón et al., 2001; Spaccini et al., 2002). Cependant, comme pour les substances humiques du sol, leur formation et leurs structures restent complexes (Leinweber et Schulten, 1999 ; Koivula et Hänninen, 2001).

III.4.1 Evolution de la matière organique et formation des substances humiques

D'une façon générale, la matière organique (MO), composée de molécules complexes et diverses, subit d'abord une décomposition microbienne qui libère les composés simples le plus souvent solubles (Tiquia, 2002). Une partie facilement assimilable (sucres, acides aminés, etc.) subit une minéralisation complète et libère différents composés minéraux solubles ou gazeux. Une autre partie plus résistante ou moins biodégradable telle que la lignine échappe à la minéralisation et après certaines biotransformation sert de matériau de base à l'édification de molécules nouvelles qui deviendront les substances humiques (Stevenson, 1994 ; Chefetz et al., 1998 c; Kögel-Knabner, 2002).

Dans les études de chimie structurale, la subdivision de la matière organique est simplifiée habituellement en substances non-humiques et structures humiques. Les structures non-humiques incluent des structures facilement biodégradables tels les carbohydrates, protéines, lipides, cires, etc. alors que les structures humiques qui constituent la majeure partie de la MO constituent une famille chimique complexe (Schulten et Leinweber, 1996).

III.4.2 Structure des substances humiques

L'hétérogénéité des structures humiques présente un grand obstacle à la détermination de leur structure chimique exacte ainsi qu'à celle du processus de leur formation (Hayes et al., 1989). Les matières humiques se composent d'une très large variété de noyaux aromatiques (phénoliques ou quinoniques) interliés ou reliés par des groupements fonctionnels à caractère acide ou par des chaînes périphériques aliphatiques (saccharides, peptides...) et regroupés dans des arrangements moléculaires différents pour former les édifices des substances humiques (Swift et al., 1979; Duchaufour, 1991 ; Schulten et Leinweber, 1996 ; Hertkorn et al., 2002 ; Piccolo et al., 2002; Jarde et al., 2003). Cette hétérogénéité comme celle des

substances humiques du sol se retrouve amplifiée dans le cas du compost du fait de la diversité des matières premières issues des déchets organiques, des communautés microbiennes développées lors du processus, des techniques d'aération, des conditions climatiques et d'autres facteurs qui influencent le processus de dégradation et d'humification (Pal, 1992).

Les substances humiques dont le poids moléculaire varie entre 1 000 et 300 000 daltons (Wolf et al., 2001) sont subdivisées généralement en trois fractions suivant leur solubilité dans l'eau ajustée à différentes conditions acido-basiques :

L'humine : insoluble dans l'eau quelque soit le pH. Elle correspond à la partie non-extractible de la fraction humifiée (Duchaufour, 1991). Elle se compose de macro-structures organiques très grandes et très complexes intimement liées à la fraction minérale (Almendros et al., 1996).

Les acides humiques : ils précipitent à partir d'un pH inférieur à 2. Ce sont des polymères à haut poids moléculaire (10.000 à 300.000 da), très hétérogènes, chargés négativement, de couleur noire à brun foncé, résultant d'un processus de condensation oxydative des composés phénoliques (Stevenson, 1994) et liés à des acides aminés, des peptides et des polysaccharides (Martin et Haider, 1971). Ils sont riches en carbone aromatique et moins riches en oxygène que les acides fulviques (figure 1) (Senesi et al., 1996 ; Gonzalez-Vila et al., 2001).

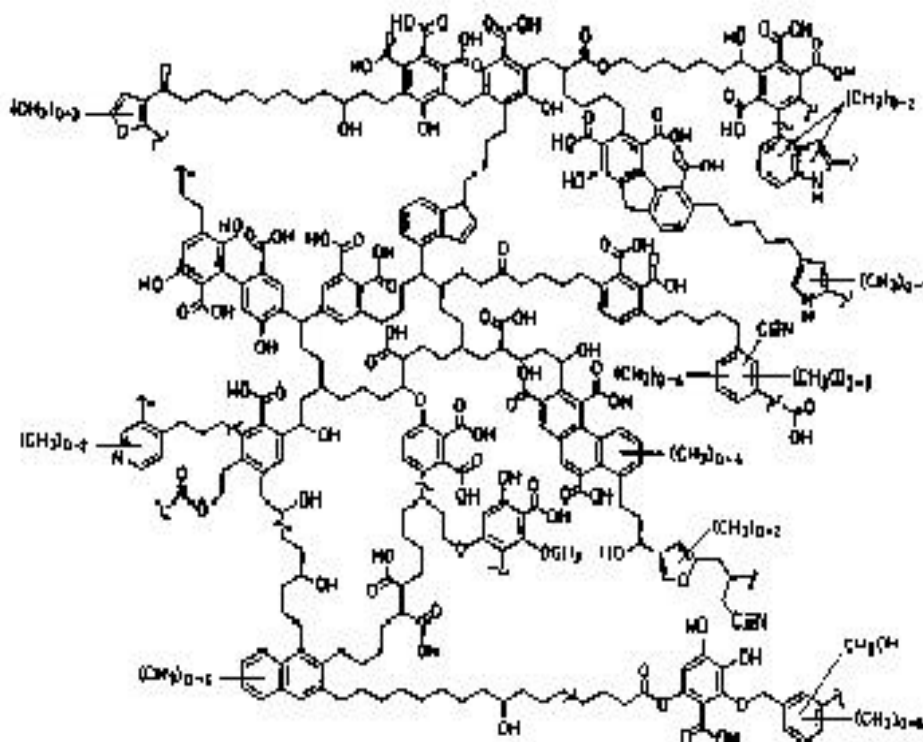


Figure 1. Modèles de structure des acides humiques selon Schulten and Leinweber (1996)

Les acides fulviques : solubles dans l'eau quelque soit le pH (acide, neutre et alcalin). Ce sont des polymères de taille plus petite (1000 à 10.000 da). Ils possèdent un taux de carbone relativement faible. L'oxygène, présent sous forme de groupes carboxyliques libres est abondant (figure 2) (Chien et al., 2003). Ils sont formés de composés phénoliques à faible poids moléculaire, liés à des polysaccharides (Duchaufour, 1991, Gonzalez-Vila et al., 2001).

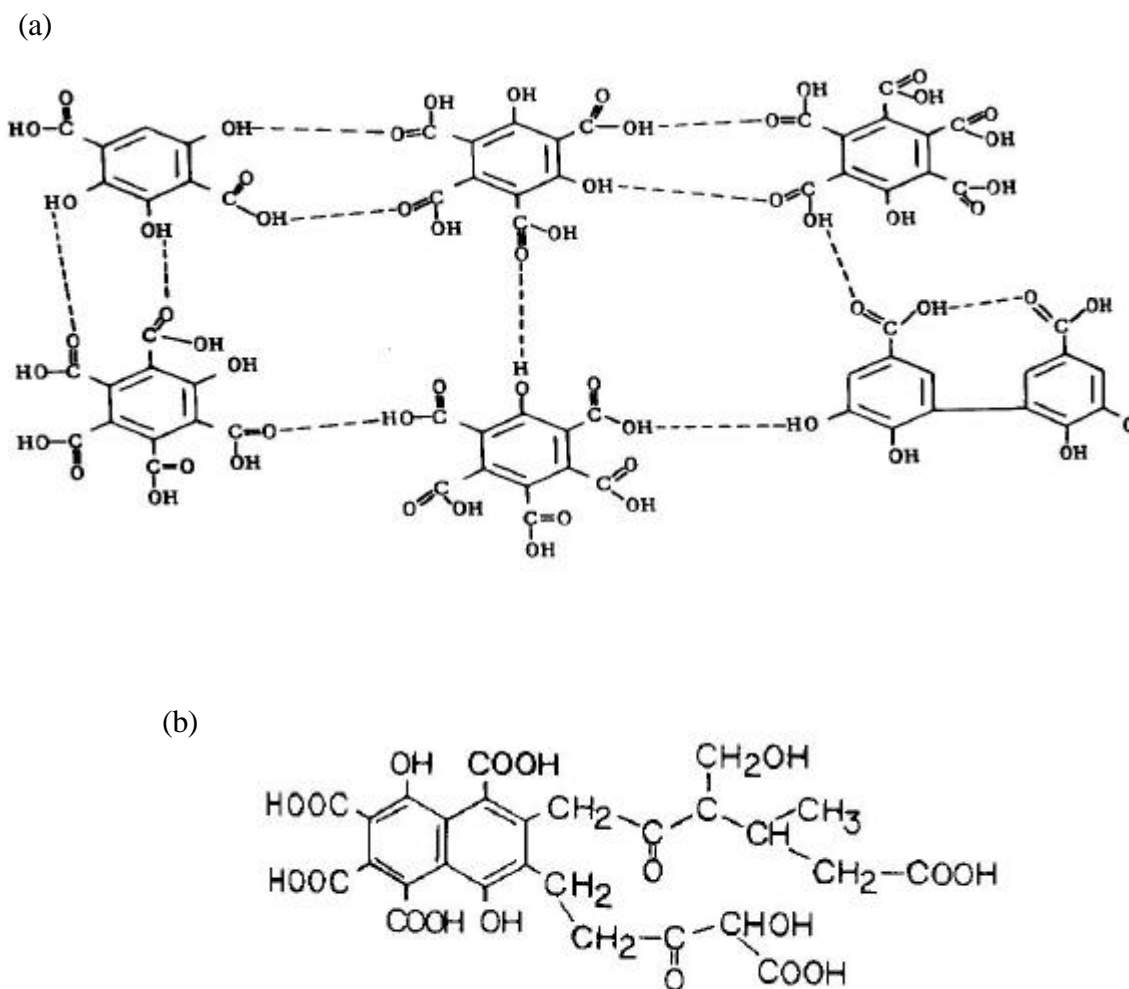


Figure 2. Modèles de structure des acides fulviques selon a) Stevenson (1994), (b) Buffle (1977).

Les principales propriétés des acides fulviques et humiques sont récapitulées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Classification et propriétés générales des substances humiques
(Stevenson et Code, 1999)

| Acide Fulvique | | Acide Humique | |
|--|---|---------------|-------------|
| Acide Crenique | Acide apocrenique | AH bruns | AH Gris |
| Jaune clair | Marron jaune | Marron foncé | Noir - gris |
| — Augmentation du degré de polymérisation —> | | | |
| 2000 | — Augmentation de la masse moléculaire —> | 800 000 | |
| 45 % | — Augmentation du taux de carbone —> | 62 % | |
| 48 % | — Diminution du taux d'oxygène —> | 30% | |
| 1400 | — Diminution de l'acidité —> | 500 | |

La masse moléculaire est en g/mol (dalton)

L'acidité est en mmoles/g

III.4.3 Mécanismes et voies de formation des substances humiques

Les substances humiques présentes dans le compost peuvent être considérées comme le produit de la re-synthèse réalisée à partir des composés organiques simples issus de la décomposition microbienne du substrat initial (Wu et Ma, 2002). Durant la phase de stabilisation du processus de compostage, les substances organiques facilement assimilables sont dégradées. La phase de maturation laisse le temps nécessaire à une biotransformation des structures organiques restantes et à la recombinaison ou à la polymérisation de celles-ci afin de former ces substances humiques (Zbytniewski et Buszewski, 2005). Ces biotransformations observées dans le compostage sont proches de celles se déroulant naturellement dans le sol lors de la transformation de la matière organique fraîche ou litière par les micro-organismes telluriques pour former de l'humus (Chefetz et al., 1998 b).

Différentes voies ont été proposées pour expliquer la formation des substances humiques à partir de la décomposition de matières organiques fraîches (schéma 1). La théorie classique de Waksman est basée sur la formation des substances humiques à partir de lignine modifiée

(voie 1), mais récemment la majorité des chercheurs favorisent un mécanisme impliquant les quinones (voie 2 et 3). Parallèlement, il existe une quatrième voie : la condensation amino-saccharidique (voie 4) (Chefetz et al., 1998 b,c). Les quatre voies peuvent fonctionner simultanément avec un poids respectif éventuellement différent (Jokica et al., 2004).

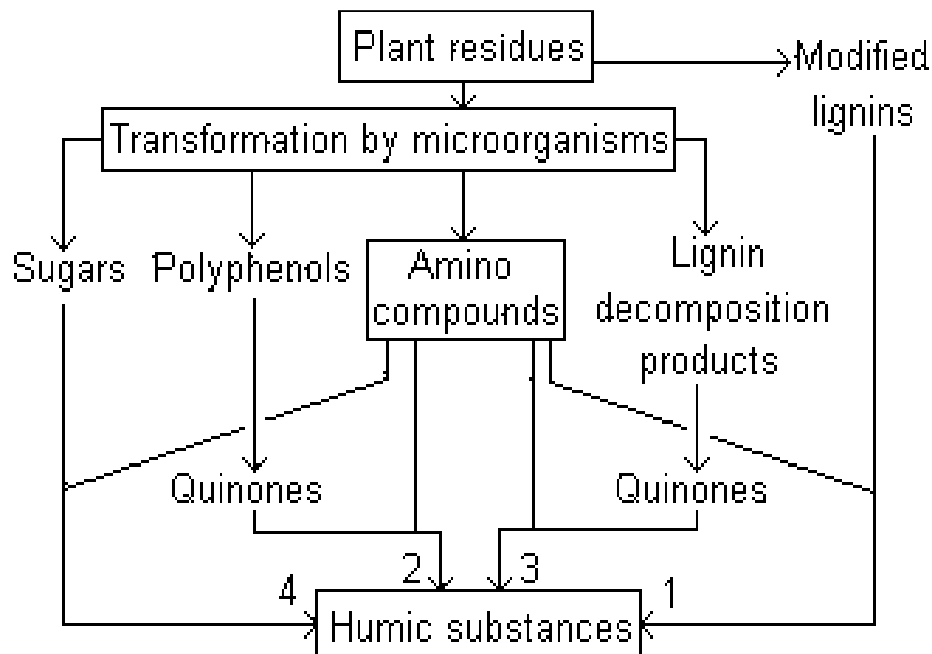


Schéma 1. les mécanismes et voies de formation des substances humiques (Stevenson, 1982)

III. 4.3.1 Théorie de la lignine (voie 1)

Pendant plusieurs années, la formation des substances humiques a été attribuée principalement à une modification de lignine. La lignine est un bio-polymère difficilement biodégradable constitué d'un assemblage de trois types d'unités phénylpropanoïdes reliés entre elles par différents types de liaisons C-C, et éther oxydes (Figure 3 a,b).

Selon cette théorie, la lignine est incomplètement utilisée par les microorganismes et son résidu devient la partie constituante de l'humus du sol (Saiz-Jimenez et al., 1989; Veeken et al., 2000). La modification de la lignine consiste en la perte des groupements méthoxyles (OCH₃), en la production d'ortho-hydroxyphénols et en l'oxydation des chaînes aliphaliques périphériques pour former les groupements carboxyliques libres (COOH) (Tuomela et al., 2000). Ce matériel modifié est soumis à d'autres changements inconnus pour former d'abord les acides humiques et ensuite les acides fulviques.

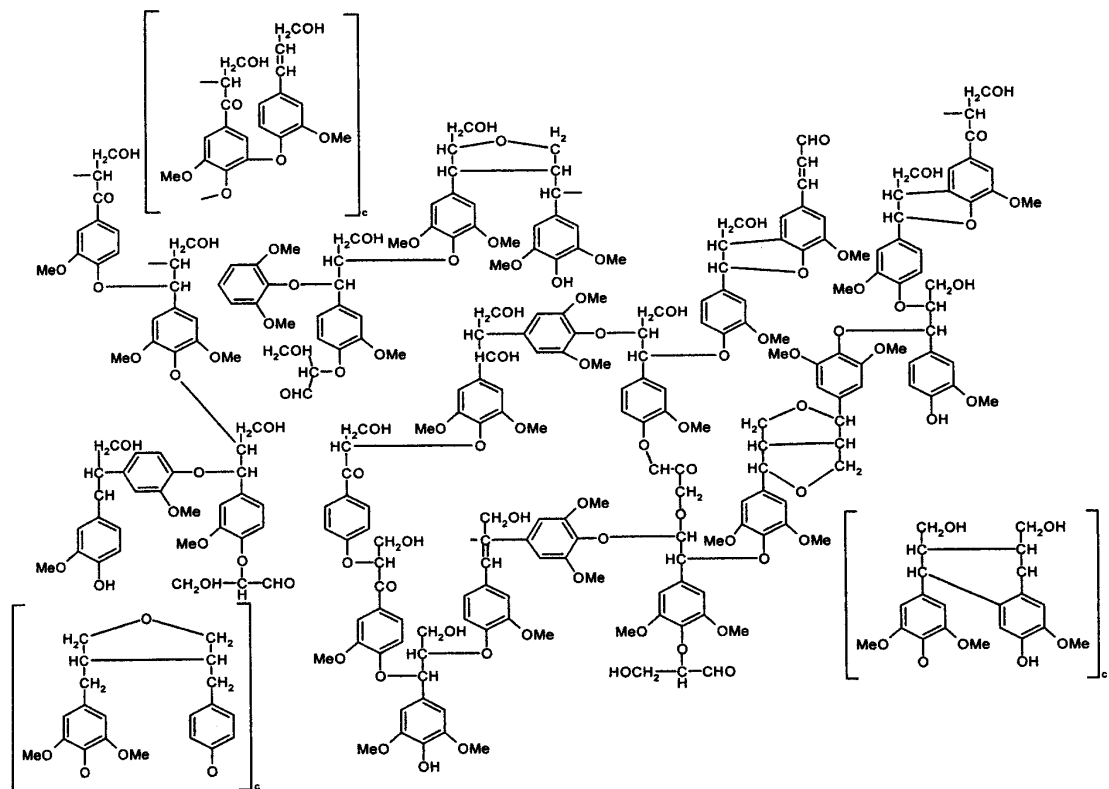


Figure 3 a : Structure moléculaire de la lignine (Nimz, 1974)

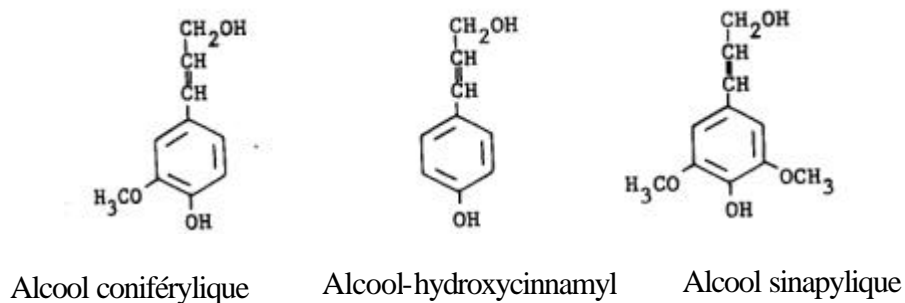


Figure 3 b. Les trois unités phénylpropanoïdes de la lignine

Cette voie constitue la théorie ligno-protéique de Waksman (1932) justifiée par des similitudes entre la lignine et les acides humiques telles qu'une biodégradabilité faible par la majorité des champignons et des bactéries, la solubilité dans les alcalins et différents solvants, la présence de groupements méthoxyles.

III.4.3.2 Théorie des polyphénols (Voies 2 et 3)

Dans la voie 3, les acides et les aldéhydes phénoliques issus de la lignine pendant l'attaque microbienne sont convertis en quinones par des enzymes spécifiques (Chefetez et al., 1998b).

Ceux-ci sont ensuite auto-polymérisés ou recombinaés avec des composés azotés pour former des macromolécules humiques (Pal et al., 1994; Huang, 2000).

La voie 2 est semblable à la voie 3 sauf que dans ce cas les polyphénols sont synthétisés par les microorganismes à partir des composés organiques non-ligneux principalement cellulosiques (Schéma 2). Dans le concept de Flaig (1964), c'est la synthèse des quinones quelque soit leur voie, dégradation de la lignine ou synthèse de polyphénols à partir des composés non ligneux, qui est l'étape primordiale dans la formation des substances humiques. La lignine libérée de son lien avec la cellulose pendant la décomposition des résidus végétaux est soumise à une oxydation intramoléculaire conduisant à une formation d'unités primaires structurelles (dérivés du phénylpropane). Les chaînes latérales des unités de la lignine sont oxydées, une déméthylation se produit et les polyphénols résultants sont convertis en quinones par des polyphénoloxydases. On retrouve le rôle des microorganismes comme source de polyphénols déjà mentionné par Kononova qui a présenté le rôle des myxobacteries dans la synthèse des acides humiques en décomposant préférentiellement la cellulose avant la lignine.

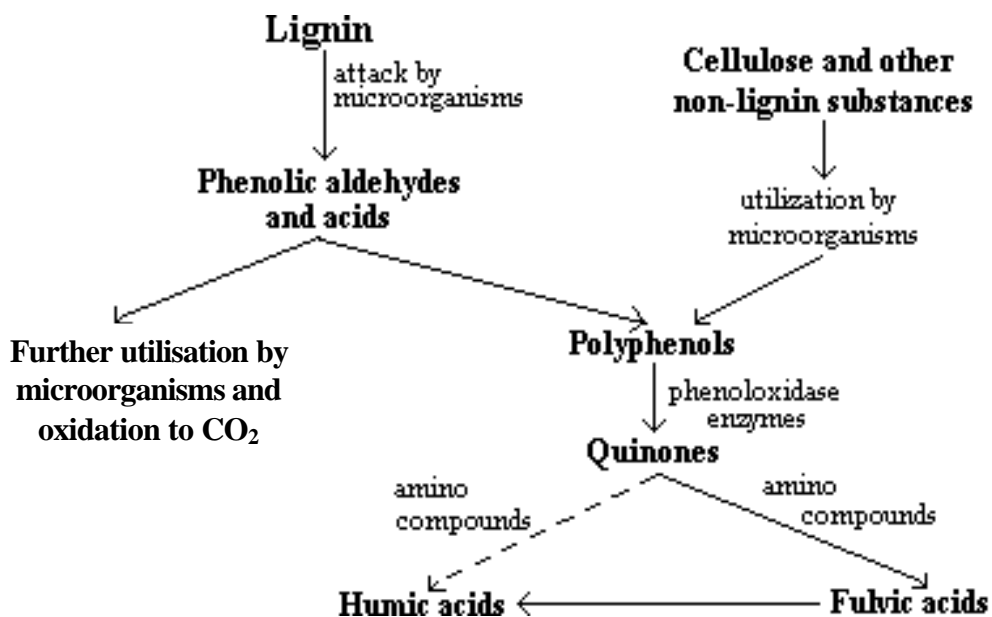


Schéma 2 : théorie de polyphénols de formation de l'humus (Stevensen, 1982)

III.4.3.3 Théorie de la condensation amino-saccharidique (voie 4)

Selon ce concept, les sucres réduits et les amines, sous-produits du métabolisme microbien, subissent une polymérisation non enzymatique pour former les polymères bruns et azotés (Anderson et al., 1989, Ikan et al., 1996; Jokic et al., 2001).

La réaction initiale de la condensation sucre/amine implique l'addition de l'amine au groupement aldéhydique du sucre pour former une glycosylamine N-substituée. Cette glycosylamine se fragmente en N-1-amino-deoxy-2-cetose conduisant à la formation d'aldéhydes et de cétones à 3-carbones, comme l'acétol, le diacétyl etc..., ou par déshydratation, conduit à la formation des réductones et d'hydroxyméthyl furfurals. Tous ces composés sont fortement réactifs et polymérisent spontanément en présence de composés aminés pour former des produits de couleur brune ou «réaction de Maillard» (Maillard,1913) (Schéma 3).

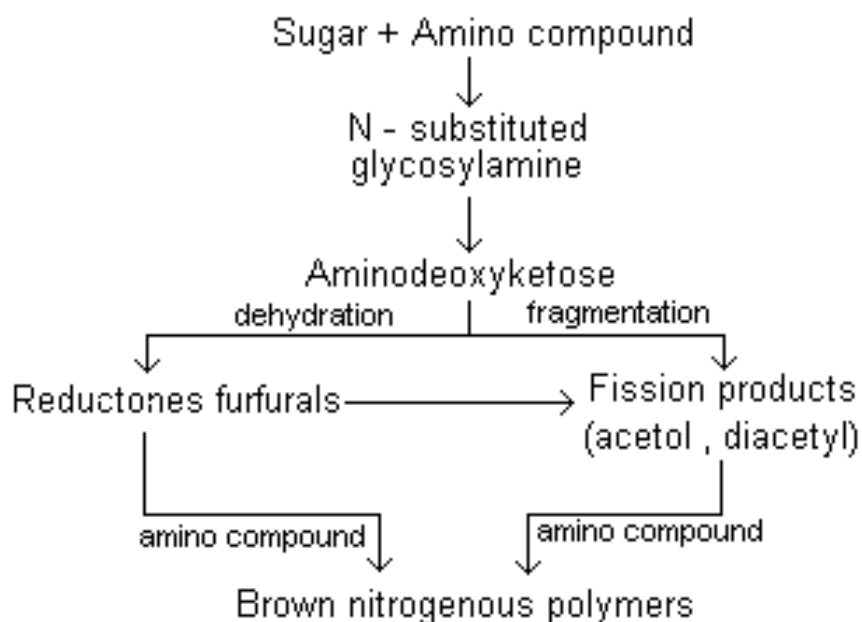


Schéma 3 : voie de condensation de sucres et acides aminés (Stevenson, 1982)

III.4.3.4 Structure supra-moléculaire des substances humiques

Jusqu'à maintenant, certains auteurs attribuaient aux substances humiques une structure polymérique (Schulten et Schnitzer, 1993; Stevenson, 1994). Dans ce modèle, les réarrangements structuraux se produisent comme dans les autres macromolécules biologiques telles que les protéines, polysaccharides, acides nucléiques, ou la lignine (Swift, 1989). Cependant, Wershaw (1986, 1993) montre que les substances humiques sont constituées d'un

certain nombre de différents oligomères et de composés simples qui résultent de la décomposition partielle des résidus de plantes pour former des agrégats mixtes. D'après ces auteurs les agrégats humiques sont retenus entre eux par des liaisons faibles tels les ponts hydrogène et les interactions hydrophobes. En prenant en considération un concept micellaire, Tanford et al. (1991) suggèrent que l'intérieur des micelles humiques soit constitué par une zone hydrophobe, les composés très chargés ou polaires se trouvant à la surface extérieure.

Parallèlement, Schnitzer et Khan (1972), et plus récemment Schulten et Leinwebe (1996) et Schulten (1999) proposent l'existence de vides dans la structure tridimensionnelle des substances humiques (figure 4), qui peuvent être d'excellents sites d'absorption de composés hydrophobes tels les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Engebretson et Wandruska, (1997) utilisant un pyrène marqué par fluorescence ont apporté expérimentalement des preuves en faveur de ce modèle micellaire.



Figure 4. structure tridimensionnelle des substances humiques (Schulten et Leinwebe, 1996)

Piccolo et al. (1996, 2002) et Kenworthy et Hayes (1997) montrent quant à eux que l'assemblage macromoléculaire des substances humiques n'est pas entièrement dépendant des structures polymériques. Une taille moléculaire élevée est considérée comme issue de l'association de molécules plus petites interliées par des forces faibles ou facilement annihilables.

IV- Micropolluants métalliques et organiques

IV.1 Micropolluants inorganiques : Eléments traces métalliques (ETM)

Dans le cas des éléments traces métalliques, il faut différencier la part qui résulte de la contamination d'origine humaine (anthropogène) liée aux activités minières et industrielles et la part naturelle (géogène), qui constitue le fond pédo-géochimique local, et provient de la dégradation des roches ou des émissions volcaniques. Les métaux provenant d'apports anthropiques sont présents sous des formes chimiques assez réactives et entraînent de ce fait des risques très supérieurs aux métaux d'origine naturelle qui sont le plus souvent immobilisés sous des formes relativement inertes (Khalis et al., 1997 ; Caussy et al., 2003 ; Sekhar et al., 2004).

Dans ces apports, les boues résiduaires ne sont qu'une source de risques parmi d'autres (Wong et al., 1985 ; Nicholson et al., 2003). La présence des métaux dans les boues résiduaires provient de la phase de séparation liquide-solide par décantation due à une rétention par adsorption sur la matière organique, à la formation de complexe insoluble entre cette dernière et la fraction minérale et à la précipitation d'hydroxydes métalliques à partir d'un certain pH (Guibaud et al., 2003, Karvelas et al., 2003). Les teneurs des métaux dans les boues montrent toujours un niveau plus élevé que celui des eaux usées entrant dans l'unité d'épuration (Fars, 1994 ; Karvelas et al., 2003). Ainsi, pour préserver les teneurs naturelles du sol en ETM lors de l'utilisation de boues en agriculture, des réglementations ont été mises en place (Tableau 4) car, incorporés au sol, les ETM contenus dans les boues peuvent être absorbés par les plantes et s'incorporer ainsi dans la chaîne alimentaire ou bien migrer vers les nappes d'eau souterraines (Moreno et al., 1996 ; Wong et al., 1996 ; Gove et al., 2001).

Toutefois, les appréciations varient selon les pays, le tableau 5 illustre une comparaison entre les flux en éléments traces admissibles en Europe et aux USA.

IV.1.1 Valeurs limites et admissibles des ETM du compost en agriculture

Actuellement, les nouveaux projets ou pré-projets sur les concentrations maximales autorisées tendent à prescrire des niveaux encore plus bas pour le compost de boues résiduaires ou pour d'autres amendements à destination usage agricole.

Tableau 4. Teneurs et flux des éléments traces pour les boues et pour les sols en France selon l'arrêté du 8 janvier 1998.

| ETM | Teneur dans les boues | | Teneur dans le sol | |
|-------------|---------------------------|---|---------------------------|------------------------|
| | Valeurs limites (mg/KgMS) | Flux maximum cumulé en 10 ans (g/m ²) | Valeurs limites (mg/KgMS) | Flux maximum (g/ha/an) |
| Cd | 20* | 0,03** | 2 | 15 |
| Cr | 1000 | 1,5 | 150 | 1200 |
| Cu | 1000 | 1,5 | 100 | 1200 |
| Hg | 10 | 0,015 | 1 | 12 |
| Ni | 200 | 0,3 | 50 | 300 |
| Pb | 800 | 1,5 | 100 | 900 |
| Zn | 3000 | 4,5 | 300 | 3000 |
| Cr+Cu+Ni+Zn | 4000 | 6 | - | 4000 |

* 10 mg/k gMS à compter du 1^{er} janvier 2004

** 0,015 g/m² à compter du 1^{er} Janvier 2001

Tableau 5. Flux en éléments traces admissibles, kg/ha/an dans les sols- Comparaison Europe / USA^a (Brinton, 2000)

| ETM | As | Cd | Cr | Cu | Hg | Ni | Pb | Zn |
|---------------------|-----|------|-----|----|------|----|----|-----|
| Europe ^b | 0,7 | 0,15 | 2,0 | 12 | 0,1 | 3 | 15 | 30 |
| U.S.A. ^c | 2,0 | 1,9 | 150 | 75 | 0,85 | 21 | 15 | 140 |

^a les concentrations totales limites admissibles dans le sol sont approximativement 10x pour les deux

^b basé sur le règlement allemand de la protection du sol, sol argileux (BodSch, 1998)

^c Pour APLR des biosolides avec des concentrations > EQ mais moins que les concentrations maximales limites

Le tableau 6 rassemble les valeurs limites statutaires ou arbitraires dans les composts décidées dans plusieurs pays. Par ailleurs, d'autres normes ont été définies à partir de certaines propriétés physico-chimiques ainsi que du fond géochimique des sols susceptibles de recevoir ces épandages. Les teneurs limites selon le type de sol dans certains pays sont présentés dans le tableau 7. Pour le Maroc aucune norme en terme d'épandage de boues ou de compost n'existe actuellement.

Tableau 6. Valeurs limites dans les composts (mg/kg MS) destinés particulièrement à l'épandage agricole selon le pays (Amlinger, 2004).

| Pays | Règlement | Cd | Cr | Cu | Hg | Ni | Pb | Zn | |
|-----------|---|----------------|-----|------|-----|-----|-----|-------|-----|
| Autriche | Classe A, «décret » | Usage agricole | 0,7 | 70 | 70 | 0,4 | 25 | 45 | 200 |
| | | Jardin | 1 | 70 | 150 | 0,7 | 60 | 120 | 500 |
| | Classe B aménagement de paysage | 3 | 250 | 500 | 3 | 100 | 200 | 1800 | |
| Allemagne | Assurance qualité RALGZ-QAS volontaire | 1,5 | 100 | 100 | 1 | 50 | 150 | 400 | |
| France | NF U44 061 Préprojet (2004) | 1 | 120 | 300 | 2 | 60 | 180 | 600 ? | |
| Italie | 1 ^{ière} classe, Projet de décret MBTC | 3 | | 300 | 3 | 100 | 280 | 1000 | |
| Espagne | Classe AA, Projet décret espagnol | 2 | 250 | 300 | 2 | 100 | 150 | 400 | |
| | classe A, Projet décret de catalogne | 2 | 100 | 100 | 1 | 60 | 150 | 400 | |
| Suisse | (N°814.013 ;1986/ Révisé 2001) | 1 | 100 | 100 | 1 | 30 | 120 | 400 | |
| UK | Compost déchets ménagères (EC Reg 2092/91) | 0,7 | 70 | 70 | 0,4 | 25 | 45 | 200 | |
| Canada | CCME (1993) | 3 | 210 | 100 | 0,8 | 60 | 150 | 500 | |
| USA | EPA CFR40/503 :Boue | 39 | | 1500 | 17 | 420 | 300 | 2800 | |
| | Compost qualité Rodale | 4 | 100 | 300 | 0,5 | 50 | 150 | 400 | |

Tableau 7. Concentrations limites des éléments traces selon le type du sol, au dessus desquelles l'application du compost est limitée ou interdite (mg/kg) (Brinton, 2000).

| Pays | Type sol | Cd | Pb | Cr | Cu | Hg | Ni | Zn |
|------------------------|----------|-----------------------|--------|-------|-----------------|-----------------------|------|-------------------|
| Allemagne ^a | Argile | 1,5 | 100 | 100 | 60 | 1 | 70 | 200 |
| | Limon | 1 | 70 | 60 | 40 | 0,5 | 50 | 150 |
| | sable | 0,4 | 40 | 30 | 20 | 0,1 | 15 | 60 |
| Hollande ^b | | 0,4 +0,007 (T+ 3H) | 50+T+H | 50+2T | 15+0,6 (T+H) | 0,2+ 0,0017 (2T+H) | 10+T | 50 +1,5 (2T+H) |
| Italie | | 1,0 | 50 | 50 | 75 | 1,0 | 50 | 150 |
| Canada ^d | | 4 | 100 | - | - | 1 | 36 | 370 |

^a Ministère allemand de l'environnement (1998);

^b Bavnick (1989) : T = argile %; H = Humus%

^c Conseil canadien de Ministère de l'environnement (1998)

Cependant, ces considérations sur les teneurs totales en métaux lourds ne donnent aucune indication sur leur comportement réel dans le sol du fait de leur solubilité, de leur mobilité et de leur biodisponibilité pour les plantes et pour l'environnement (Petruzzelli, 1989; Horn et al., 2003).

IV.1.2 Détermination des concentrations en ETM dans le sol et les composts

Les techniques chimiques admettent que l'absorption d'un métal peut être simulée par sa faculté à passer en solution en utilisant un extractant bien défini (Kabala et Singh, 2001). Elle est fonction de la solution d'extraction (nature et concentration), des conditions opératoires suivies (rapport sol/solution, durée et mode d'agitation, température, méthode de centrifugation et de filtration, etc.), de la matrice étudiée, de l'élément en question et de son état chimique dans la matrice (Hooda et Alloway, 1993; Gomez Ariza et al., 2000 ; Shiowatana et al., 2001).

Les techniques d'extraction appliquées sont basées sur deux démarches soit par utilisation d'un seul réactif soit par des extractions séquentielles avec une série de réactifs ou « spéciation » (Rauret et al., 1998).

IV.1.2.1 Extraction simple

Dans les procédures avec un seul extractant, seule la fraction potentiellement disponible aux plantes est ciblée. Différents réactifs d'extraction ont été utilisés, soit des complexants (EDTA, DPTA, ..) soit des sels ($MgCl_2$, $BaCl_2$, $CaCl_2$, KNO_3 , $NaNO_3$, ...) ou des acides dilués (HCl dilué, CH_3COOH , ..) (Ure, 1996). Plusieurs chercheurs ont démontré que les teneurs extraites par ces électrolytes présentent une bonne corrélation avec la quantité assimilée par les plantes tests (He et Singh, 1995; Rada, 1996; Boukhars, 1997). Cependant, l'utilisation d'extractants seuls ne peut être utile que pour évaluer la biodisponibilité de l'ETM, et elle ne fournit pas les informations nécessaires pour comprendre les mécanismes responsables des augmentations ou des diminutions de l'extractabilité de l'ETM.

IV.1.2.2 Extraction séquentielle « spéciation » des ETM

Par l'emploi d'une procédure séquentielle, les ETM présents dans le sol peuvent se distribuer dans les différentes fractions suivant leur solubilité et leur mobilité, définissant ainsi leur spéciation (Rauret, 1998). La spéciation est la caractérisation de la répartition d'un élément dans les différents compartiments du sol et de l'état chimique dans lequel il se trouve dans ces différents compartiments (ionique, complexé, lié par covalence, etc). Dans les schémas séquentiels, l'utilisation des extractants avec une capacité d'extraction croissante peut être intéressante pour déterminer les distributions chimiques des ETM. Les réactifs sont choisis en fonction de leur sélectivité vis-à-vis de certaines formes physico-chimiques particulières (Gómez Ariza et al., 2000). Ainsi, on peut accéder à la compréhension de la transformation des différentes formes et des mécanismes de biodisponibilité et mobilité dans le sol (McGrath et Cegarra, 1992; McBride et al., 1997).

Plusieurs protocoles d'extraction sélective ont été mis au point dans de nombreux travaux qui comprennent généralement cinq à six fractions (Tableau 8).

Tableau 8. Les différents procédures d'extractions séquentielles les plus utilisés

| Référence | Extractant utilisé | Forme extraite |
|---|--|---|
| Tessier et al. 1979 Gomez Ariza et al. 2000 | MgCl ₂ 1 M NaOAc 1 M NH ₂ OH.HCl 0,04 M H ₂ O ₂ 8,8 M HF/HClO ₄ pH 7 pH 5 HOAc 25% HOAc HNO ₃ /NH ₄ OAc | Echangeable Liée aux carbonates Oxydes de Fe et Mn Liée à la matière organique et aux sulfures Résiduelle, phase de silicate |
| Sposito et al. 1982 Sims et Sklin, 1991 Pichtel et Anderson, 1997 | KNO ₃ (0,5 M) H ₂ O distillée NaOH (0,5 M) EDTA (0,05 M) HNO ₃ (4 M) | Echangeable Soluble Liée à la matière organique Liée aux carbonates Liée aux sulfures |
| Elenbogen et al. 1993 Granato et al. 1993 | H ₂ O distillée KNO ₃ (1M) Na ₄ P ₂ O ₇ (0,1 M) EDTA (0,1 M) HNO ₃ (1M) HNO ₃ concentré | Soluble Facilement échangeable Liée à la matière organique Liée aux carbonates Liée aux sulfures Résiduelle |
| Ure et al. 1993 | H ₂ O NaNO ₃ 0,1 M KNO ₃ 0,1 M MgCl ₂ 1 M CaCl ₂ 0,05 mol l ⁻¹ Ca(NO ₃) ₂ 0,1 M NH ₄ OAc 1 M pH = 7 HOAc 0,5 M HOAc/NaOAc 1 M pH = 5 NH ₂ OH.HCl 0,04 M Dans l'acide acétique ou nitrique NH ₄ Ox Ditionite, citrate ou bicarbonate de sodium H ₂ O ₂ NaOCl | Soluble Echangeable Liée aux carbonates Oxydes et hydroxydes de Fe et Mn Liée à la matière organique |
| Rauret et al. (1989) Ramos et al. (1994) | MgCl ₂ 1 M NaOAc/ HOAc, pH 5 NH ₂ OH.HCl 0,1 mol l ⁻¹ Ac. Acétique (25 %) H ₂ O ₂ (30%) pH = 2 avec HNO ₃ HClO ₄ + HNO ₃ | Echangeable Liée aux carbonates Oxydes de Fe et Mn Liée à la matière organique et aux sulfures Résiduelle |
| Rauret (1998) Bacon et al. (2005) , Procédure BCR, Standard CE | HOAc, 0,11 M NH ₂ OH.HCl 0,1 mol l ⁻¹ (pH = 2 with HNO ₃) H ₂ O ₂ 8,8 mol l ⁻¹ (pH = 2–3 avec HNO ₃) | Soluble Réductible oxydable |

IV.1.2.3 Validité des méthodes d'extraction séquentielles

Ces méthodes séquentielles représentent seulement une division arbitraire entre les différentes formes chimiques des métaux, leur principe de fonctionnement physico-chimique reste contesté et sujet à controverse pour leur validité lors de l'expérimentation et/ou l'extrapolation (Quevauviller, 1998a).

IV.1.2.3.1 Validité expérimentale

En absence d'un échantillon de référence, les différents protocoles d'extraction n'ont pas pu être évalués sur les critères suivants :

- Spécificité : plusieurs chercheurs ont démontré qu'une solution d'extraction est susceptible d'agir sur plusieurs fractions de la matrice étudiée et non plus sélectivement (Bermond, 2001). Le problème est de trouver des réactifs assez sélectifs pour dissoudre une phase sans attaquer les autres phases.
- Redistribution éventuelle des ETM : l'ETM extrait dans une phase peut se réadsorber sur une ou plusieurs phases présentes du fait de réactions concurrentielles (Nirel et Morel, 1990 ; Lo et Yang, 1998).
- Possibilité d'une sursaturation du système extractant-ETM si la quantité de ETM est très importante.
- Formes chimiques non prises en compte comme certains complexes organo-minéraux (McGrath et Cegarra, 1992 ; Lo et Yang, 1998).

Cependant, certains auteurs comme Belzile et al. (1989) et Tessier et Campbell (1991), suggèrent que l'erreur ainsi introduite serait négligeable dans la plupart des cas.

IV.1.2.3.2 Validité d'extrapolation

Comme les différents protocoles d'extraction peuvent conduire à des résultats différents pour un même échantillon, les extrapolations réalisées sur ces résultats peuvent être divergentes. Pour un même extractant, des études de corrélation ont mis en évidence des domaines de validité portant soit sur les teneurs en ETM considérés et soit sur les plages de pH (Patrick et Verloo, 1998). Ne disposant pas de méthodes consistantes pour les mesures ou pour les formes chimiques des ETM concernés, les distributions de ceux-ci ne peuvent être correctement simulées par des modèles en vertu de la complexité d'un milieu comme le sol (Quevauviller, 1998b).

Néanmoins, les extractions sélectives restent informatives pour comprendre les transitions des espèces métalliques observées en fonction des conditions du milieu. De plus, les formes chimiques des métaux lourds et leurs associations avec les différentes phases constitutives du sol conditionnent leur biodisponibilité pour les végétaux, ce malgré qu'il n'y ait pas de relation directe avec les proportions des métaux assimilées par les plantes ou par les autres organismes.

Des essais de standardisation sont actuellement en cours en particulier sur des échantillons du BCR (Bureau Communautaire de Référence) (Uré, 1996; Quevauviller, 1998a).

IV.1.2.4 Le compostage et les éléments traces métalliques

La détermination de la biodisponibilité des métaux dans le compost même et les variations de distribution de ceux-ci générées par les changements des propriétés physico-chimiques lors du compostage sont importantes pour la qualité agronomique du produit final (Petruzzelli, 1989 ; Planquart et al., 1999 ; Hsu et Lo., 1999).

IV.1.2.4.1 Le devenir des ETM lors du compostage

Canaruto et al. (1991) ont rapporté une réduction des concentrations en métaux solubles dans les composts matures des déchets municipaux. Leita et De Nobili (1991) ont montré une grande diminution de la fraction soluble de Pb et Zn durant les premiers jours du compostage de déchets municipaux qui peut être reliée à une décomposition des substances non-humiques solubles (polysaccharides, peptides et acides aminés, etc.) représentant plus de 90 % du carbone soluble de ce compost. Paré et al. (1999) ont démontré qu'au cours du co-compostage de biosolides et de déchets municipaux, les formes résiduelles de certains métaux (Zn, Cr, Cu, et Pb) augmentent respectivement de 145 ; 124 ; 73,6 et 26,3 %. alors que celle du Ni reste relativement constante et que celle du Co diminue de 60 %. Ils ont observé que la diminution des fractions des métaux facilement extractibles et échangeables (Cr, Ni, et Zn) est reliée à une augmentation de la concentration de groupements carboxyles COO^- . Ainsi, ils suggèrent une diminution de l'extractibilité et l'échangeabilité des métaux due à l'association des ions métalliques avec des groupements carboxylates de la matière organique.

Echab et al. (1998) ont démontré que le traitement des boues par compostage a un effet notable sur la diminution de la fraction échangeable extractible par CaCl_2 pour les éléments tels que Pb, Cu, Zn, Cd. Ces auteurs ont attribué ces variations à une complexation des métaux aux substances humiques néoformées. Toutefois, cette distribution est réversible pour

certaines métaux comme le Zn et le Cd qui présentent une réaugmentation de l'extractabilité au cours de la maturation des composts.

Zorpas et al. (2003) ont mis en évidence de fortes teneurs de Cr et Cu dans les fractions organiques et résiduelles dans des boues résiduaires non compostées, alors que moins de 2 % des métaux soient présents dans la fraction échangeable et carbonates. Dans ces mêmes boues, environ 83 % du Pb est lié à la fraction réductible et résiduelle et seuls le Zn et le Ni présentent des quantités significatives dans toutes les fractions (autre qu'échangeable). Ces auteurs montrent que le compostage de ces déchets n'affecte pas la distribution d'éléments tels que Cd, Fe et Zn, alors qu'une immobilisation du Cr est observée à partir des fractions réductible et organique en faveur de la fraction résiduelle et que le Pb passe de la fraction réductible à la fraction résiduelle. Le Cu est apparemment transféré des fractions organiques aux autres fractions, la fraction résiduelle et la fraction échangeable en particulier. Ces auteurs ont expliqué que les changements produits au cours du compostage sont le résultat de nombreux phénomènes :

- Dans la phase thermophile de compostage les fractions échangeables et carbonates sont principalement affectées suite au changement du pH du milieu. Ce changement de pH est attribué à une formation éventuelle d'acide acétique ou d'autres acides lors de la décomposition de la matière organique des boues et à la variation de la teneur en ammonium liée à l'action des bactéries protéolytiques (Zorpas et al., 2000).
- Des conditions oxiqes et anoxiques en liaison avec la formation d'acide acétique et d'ammonium (Wagner et al., 1990) et ayant une grande influence sur la fraction réductible et organique.

Ces conditions mettent en évidence le rôle de la biomasse microbienne qui a été examiné dans nombreuses études pour sa capacité d'adsorbance (De siloniz et al., 2002). Ainsi, les différentes variétés d'activité microbienne et surtout celles de la phase thermophile contribuent aux modifications chimiques ou physiques, en particulier celles concernant l'augmentation des surfaces d'adsorption qui conduisent au changement de la distribution des métaux dans les différents compartiments du compost.

La distribution des métaux dans les différentes fractions varie très significativement d'une étude à l'autre en fonction des propriétés chimiques de la matrice étudiée, de son origine, de l'élément en question, de la nature des extractants utilisés, de leur succession et des paramètres expérimentaux de la méthode d'extraction utilisée. Généralement de grandes teneurs en métaux lourds se retrouvent dans la fraction résiduelle sous une forme inerte et qui représente 70 à 80 % des teneurs totales en métaux selon nombreux travaux. Les fractions

échangeables ne représentent que moins de 2%, le restant se distribue dans les autres fractions résistantes (Zorpas et al., 2000; Zorpas et al., 2003; Soumaré et al., 2003).

IV.1.2.4.2 Devenir des ETM de boues et de compost dans le sol

Face au même risque d'accumulation des ETM dans le sol réglementé par le USEPA Clean Water Act 503 Regulations, USEPA, (1993) et par l'arrêté du 8 janvier 1998, l'épandage de compost de boues ou des boues elles-mêmes reste très dépendant de la spéciation des ETM, des quantités, ainsi que des changements physico-chimiques et biologiques entraînés dans le sol suite à l'application de ces résidus organiques.

Si l'impact des ETM issus des composts de boues ou des boues elles-mêmes sur le sol est bien référencé, peu de travaux portent sur la spéciation comparative entre composts de boues et boues initiales. Sposito et al. (1982) montrent que l'accumulation des métaux lourds est inférieure dans les parcelles de sol qui reçoivent des boues liquides que celles qui reçoivent du compost de ces boues et ils expliquent ce phénomène par une probable réduction de la densité de la structure du sol suite à une application du compost de boues. Pour un même apport de métaux lourds, l'application de compost de boues introduit une grande quantité de solides organiques induisant une diminution importante de la densité de structure du sol.

Sposito et al. (1984) montrent aussi par ailleurs que dans des sols traités par un compost de boues, les fractions fines des sols et principalement celles extractibles à l'EDTA et à l'acide nitrique sont les plus sujettes à l'augmentation en ETM. Ils ont conclu à la formation de carbonates des ETM étudiés présents dans la fraction EDTA suite à une minéralisation progressive de la matière organique appliquée au sol. Sims et Kline (1991) et Pichtel et Anderson (1997) confirment que l'application du compost de boues résiduaires dans des sols entraîne une augmentation des teneurs totales en ETM surtout dans leurs fractions extractibles à la soude NaOH et à l'EDTA. Tessier et al. (1979) suggèrent que les métaux lourds puissent être liés à différentes formes de matières organiques qui peuvent être dégradées sous des conditions oxydantes entraînant une libération de ces métaux lourds sous des formes solubles. Lors de l'application d'un compost de boues dans un sol, Pichtel et Anderson (1997) constatent une réduction de la production d'avoine et expliquent ces variations par une augmentation de la fraction biodisponible des éléments Cu, Pb, Zn.

Cependant, d'autres auteurs refusent l'argument d'une minéralisation lente des matières organiques dans les boues qui pourrait libérer les métaux lourds sous des formes solubles. A l'opposé, ils suggèrent que le résidu de décomposition des boues peut potentiellement maintenir la solubilité à un niveau très bas (McBride, 1995). L'apport de matières

organiques et surtout en substances humiques par le compost peut augmenter la quantité d'ETM fixés à la phase solide en fournissant des sites supplémentaires (Harter et Naidu, 1995; Murphy et Zachara, 1994; Kaemerer et al., 1999; Halim et al., 2003).

Petruzzelli et al. (1994) relatent que, suite à une expérience de sorption et une caractérisation analytique de l'extrait des boues résiduaire par spectroscopie infrarouge et chromatographie HPLC, certains composés organiques dérivés des boues sont adsorbés sur le sol en premier, et fournissent ainsi de nouveaux sites aux métaux lourds, contribuant par la suite à une augmentation de la capacité d'absorption du sol. Logan et Chaney (1983) mentionnent que la capacité d'adsorption des boues peut excéder celle du sol surtout celle d'un sol chargé en métaux lourds,

Logan et al. (1997) suggère que la contamination potentielle par les ETM apportés au sol par un compost de boues peut être déterminée par leur biodisponibilité dans le sol, et que celle-ci, à son tour, est déterminée par les formes chimiques de l'élément présentes dans le compost.

Taylor et al. (1995) remarquent que les teneurs en ETM dans les fractions soluble et échangeable mises en jeu sont très faibles (< 1 % du total) quelles que soient les quantités apportées. Pichtel et Anderson (1997) montrent d'après des modèles de régressions multiples, que la fraction $\text{KNO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ n'est pas la seule fraction potentiellement biodisponible, une partie infime des autres fractions NaOH ; EDTA ; HNO_3 peuvent être aussi biodisponibles. Ces auteurs proposent d'utiliser une démarche combinée fractionnement des métaux / modèles de régression pour une prédiction de la biodisponibilité de certains métaux lourds dans les sols traités au compost de boues. D'autres recherches montrent que l'addition d'autres paramètres physico-chimiques de la matrice dans ces modèles s'avère nécessaire pour améliorer les équations de régression, parmi ceux-ci sont retenus la teneur en matière organique, le pH, la teneur en oxydes de fer, etc... (Tsadilas et al., 1995).

IV.2 Micropolluants organiques

Parmi les différentes familles de micro-polluants organiques couramment recherchées (les hydrocarbures aromatiques polycycliques aromatiques HAP, les polychlorobiphényles PCB, les chlorophénols, les phthalates, les dioxines, etc...) (Eljarrat et Barcelo, 2003), cette étude a retenu les HAP et les phthalates en raison de leur présence potentielle dans les boues résiduaire (Marttinen et al., 2003).

IV.2.1. Phthalates ou esters de l'acide phthalique

IV.2.1.1. Généralités sur les phthalates

Les phthalates sont des composés utilisés comme agent de souplesse dans un certain nombre de matières plastiques comme le poly chlorure de vinyle ou PVC, les acétates de polyvinyle, les résines cellulosiques ou les polyuréthanes (Staples et al., 1997).

Il existe une vingtaine de composés industriels avec des longueurs de chaînes alkylées qui varient de 1 à 13 carbones. Les plus couramment utilisés sont le BBP (phthalate de benzylbutyle), le DBP (phthalate de dibutyle), le DEP (phthalate de diéthyle), le DEHP (phthalate de di-2-éthylhexyle) et le DINP (phthalate de di-isononyle) (USDHHS, 2003).

Beaucoup de produits de consommation courante contiennent des phthalates : huiles lubrifiantes, condensateurs électriques, détergents, solvants, fils et les câbles électriques, vêtements, jouets d'enfants, produits para-pharmaceutiques et produits cosmétiques (parfums, déodorants, lotions après rasage, shampoings, aérosols pour cheveux, vernis à ongles). Actuellement, la production mondiale de phthalates a atteint 3 millions tonnes dont 1/4 pour le DEHP (Fromme et al., 2002).

L'exposition aux phthalates peut provenir du contact direct avec l'air, l'eau ou les aliments. La libération des phthalates dans ces divers milieux est due au faible lien covalent de ces composés avec les polymères auxquels ils sont inclus comme les dérivés du vinyle. Ainsi, la présence des phthalates dans les urines est expliquée par leur ingestion avec les aliments (lait, fromages, poissons, viandes) provenant de la migration des phthalates présents dans les containers ou emballages (Falcu et al., 2004).

Ainsi, la présence de grandes concentrations des phthalates dans les eaux usées s'avère logique, et leur transfert aux boues résiduaires est lié à leur grande sédimentation suite à leur caractère hydrophobe. Marttinen et al. (2003) ont démontré que l'adsorption des phthalates aux boues primaires et secondaires est considérée une principale voie de leur élimination dans les stations d'épuration. Dans le cas du DEHP, le pourcentage d'élimination atteint 94% de la teneur initiale en DEHP de l'intrant. Ainsi, lors du traitement des eaux usées ils se concentrent dans les boues et présentent par la suite des teneurs très supérieures à celles des effluents d'origine. Selon Fromme et al. (2002), la répartition du DEHP (di éthyl hexyl phthalate) est la suivante : atmosphère (0,3-77 ng/m³), eaux de surface (0,3-98 µg/l), sédiments (0,2-8,4 mg/kg PS). Pour les boues de STEP la teneur de DEHP est de 55,1 à 163,3 mg/kg (USA); 28-154 mg/kg PS (Allemagne); 27-1115 mg/kg (Norvège); 25-661 mg/kg (Suède) et 24,5 mg/kg (Danemark). Alors que la teneur des boues de STEP en DBP (phthalate de dibutyle) est de 0,2-1,7 mg/kg PS (Allemagne); <0,2-0,69 mg/kg PS (Autriche) et 0,02-260 mg/kg PS (Danemark) (Langenkamp et al., 2001).

Dans le cadre de la réglementation européenne 93/793 (CEE, 1993), un certain nombre de phthalates, le DEHP, le DBP, le BBP, le DIDP, le DINP ont été évalués sur le plan du risque pour la santé humaine et pour l'environnement. Le niveau de toxicité des phthalates varie selon le type de composé. Le DEHP possède un potentiel de toxicité plus élevé que les autres phthalates incluant le DBP (USDHHS, 2003).

En raison de la présence de phthalates dans de nombreux produits de consommation courante, plusieurs pays ont pris d'avance diverses mesures pour diminuer l'exposition de la population à ces substances. Certains pays ont adopté des valeurs limites d'exposition professionnelle (DINP : Royaume-Uni : 5 mg/m³, 8h ; Suède : 3 mg/m³, 8h) (Bazin et al. 2004). Les industriels recherchent les moyens de remplacer le DEHP par d'autres phthalates de plus haut poids moléculaire (encore moins solubles le DINP ou DIDP) ou par autres familles de plastifiants tel que le citrate et l'adipate de di-2-éthylhexyle. Cependant, l'assurance de l'innocuité de ces produits de substitution doit être elle-même confirmée.

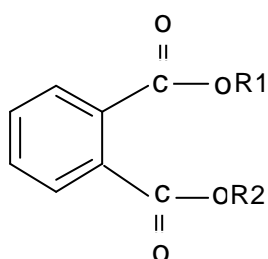
Seule la teneur en DEHP est actuellement régie par des réglementations vu les quantités et le risque cancérogène. Peu de pays ont décrété des valeurs limites :

CE, 2000 : 100 (mg/kg dm); Danemark : 50 (mg/kg dm) (Langenkamp et al., 2001).

IV.2.1.2 Structure et caractéristiques physico-chimiques des phthalates

IV.2.1.2.1 Structure des esters phthaliques

Les phthalates constituent une famille de produits chimiques composés d'un noyau benzénique et de deux groupements carboxyliques formant une structure diester (figure 5).



R1 et R2 correspondent à des chaînes hydrocarbonées aliphatiques de longueur variable

Figure 5. Structure des esters phthaliques

IV.2.1.2.2 Propriétés physico-chimiques des esters phthaliques

L'étude des propriétés physico-chimiques des esters phthaliques ou d'autres composés organiques tel les HAPs est très utile pour comprendre leur comportement et leur devenir dans l'environnement (tableau 9).

Tableau 9. Critères d'appréciation du comportement des composés organiques (Lemière et al., 2001).

| Paramètre | Critères (à 20 –25 °C) | interprétation |
|--|--|--|
| Solubilisation | | |
| Solubilité dans l'eau (mg/l) : S | S < 150 150 < S < 10000 S > 10000 | insoluble à peu soluble peu soluble à soluble soluble à très soluble |
| Volatilisation | | |
| Pression de vapeur (Pa) : Pv | Pv < 133 Pv > 133 | non volatil volatil |
| Point d'ébullition (°C) : Te | Te < 80 80 < Te < 200 Te > 200 | indicatif |
| Constante de Henry (Pa.m ³ /mol) : Hc | Hc < 100 100 < Hc < 500 Hc > 500 | faiblement volatil volatil très volatil |
| Piégeage (Par adsorption) dans la phase solide | | |
| Coefficient de partage octanol-eau K _{ow} Coefficient de partage carbone organique/eau K _{oc} | Log K _{ow/oc} < 2 2 < Log K _{ow/oc} < 4 Log K _{ow/oc} > 4 | compose hydrophile hydrophile a hydrophobe compose hydrophobe |

Les phthalates sont des liquides organiques visqueux, transparents qui n'émettent dans l'atmosphère que très peu de vapeurs dans les conditions usuelles (très faible tension de vapeur). Les phthalates sont très peu solubles dans l'eau et ont une forte affinité pour les graisses et les alcools lourds. Ces composés sont insérés entre les chaînes des polymères de PVC sans lien covalent, ce qui facilite leur libération et migration dans l'eau et dans divers milieux. Staples (1997) montre qu'avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle de 1 à 13 atomes de carbone, le coefficient de partage octanol-eau (log K_{ow}) augmente de 8 fois et la tension de vapeur diminue de 4 fois. Presque tous les phthalates ont des points de fusion inférieures à -25 °C (sauf les DMP, DUP et Di n-Hexyl, Di n-Octyl, Di n-Decyl Phthalate). Ils ont des points d'ébullition qui varient de 230 °C à 486 °C.

Pour les esters phthaliques avec un faible poids moléculaire (DMP, DEP, DAP, DPP, DnBP, DIBP et BBP), la constante d'Henry varie de $1,2 \times 10^{-7}$ à $8,8 \times 10^{-7}$ atm-m³/mole. Les composés avec une constante H de l'ordre de $1,0 \times 10^{-7}$ atm-m³/mole sont généralement considérés comme ayant une volatilité négligeable (Howard et al., 1985).

Pour tous les autres dérivés ayant un poids moléculaire élevé sauf le BOP, les valeurs de la constante d'Henry calculées sont de l'ordre de $1,7 \times 10^{-5}$ à $5,5 \times 10^{-4}$ atm-m³/mole. Les propriétés physico-chimiques et les structures chimiques des phthalates les plus répandus figurent dans la figure 6 et le tableau 10.

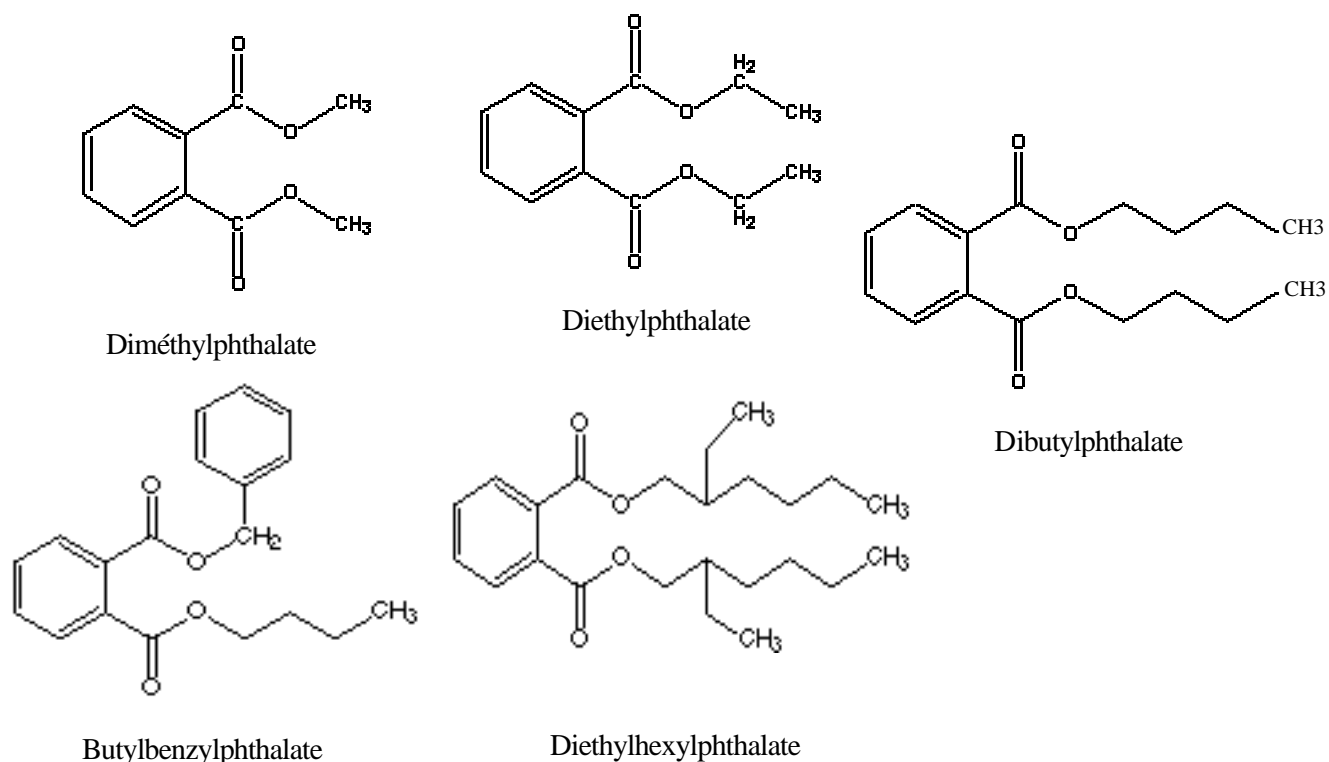


Figure 6. Structures des phthalates étudiés

Tableau 10 : Propriétés physico-chimiques des phthalates étudiés (Staples et al., 1997).

| Esters d'acides phthaliques | Abréviations | Formule | Nombre de C p. chaîne R | Poids Moléculaire (g/mole) | S | Pv (mmHg) | Hc | Log Kow | Log Koc |
|-----------------------------|--------------|--|-------------------------|----------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|---------|-------------|
| Diméthylphthalate | DMP | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | 1 | 194,2 | 4,2x10 ⁶ | 2 x10 ⁻³ | 1,22 x10 ⁻⁷ | 1,6 | 1,74 à 2,55 |
| diethylphthalate | DEP | C ₁₂ H ₁₄ O ₄ | 2 | 222,2 | 1,1x10 ⁶ | 1x10 ⁻³ | 2,66x10 ⁻⁷ | 2,38 | 1,83 à 3,23 |
| Dibutylphthalate | DBP | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ | 4 | 278,4 | 1,1x10 ⁴ | 2,7 x10 ⁻³ | 8,83x10 ⁻⁷ | 4,45 | 3,14 à 4,17 |
| Butylbenzyl phthalate | BBP | C ₁₉ H ₂₀ O ₄ | 4,6 | 312,4 | 2,7x10 ³ | 5 x10 ⁻⁶ | 7,61x10 ⁻⁷ | 4,59 | 3,95 à 4,2 |
| Diethylhexyl phthalate | DEHP | C ₂₄ H ₁₈ O ₄ | 8 | 390,6 | 3 | 1x10 ⁻⁷ | 1,71x10 ⁻⁵ | 7,5 | 4,94 à 5,7 |

Solubilité dans l'eau (mg/l) ; Pv : Pression de vapeur (Pa); Hc : Constante de Henry (Pa.m³/mol) ; Kow Coefficient de partage octanol-eau ; KOC : Coefficient de partage carbone organique/eau

IV.2.1.3 Devenir des phthalates dans l'environnement

Les esters de l'acide phthalique sont des composés stables chimiquement et peu stables photochimiquement. Leur bioaccumulation dans les chaînes alimentaires aquatiques et terrestres est limitée par leur biotransformation, qui augmente progressivement avec le niveau trophique. Cette biotransformation dépend du degré de leur biodégradation et/ou de leur adsorption.

IV.2.1.3.1 La biodégradation des phthalates

De nombreuses études ont suivi la biodégradation des esters phthaliques par une grande variété de bactéries et d'actinomycètes dans différentes conditions : en aérobiose (Chang et al., 2004), en milieu réducteur de nitrates (Jianlong et al., 1999), en méthanogénèse (Kleerebezem et al., 1999), en cultures mixtes ou pures dans différents milieux comme le sol, les sédiments, les boues résiduaires, les eaux usées, les eaux naturelles dans les rivières, lacs et mers (Johnson et al., 1984 ; Davey et al., 1990 ; Staples et al., 1997 ; Wang et al., 1997b). Leur biodégradabilité est assez bonne dans des conditions naturelles normales comme le montre le tableau 11.

Tableau 11. Teneur indicative des phthalates dans les boues et leurs demi-vies dans le sol (ADEME, 1995b)

| Composé | Teneur indicative dans les boues (mg/Kg MS) | demi-vie dans les sols |
|---------------------------------|---|------------------------|
| di-n-méthylphthalate | 10 | 1-7j |
| di-n-éthylphthalate | 30 | 3-60j |
| di-n-butylphthalate | 10 | 2-20j |
| di-n-octylphthalate | 4 | 7-30j |
| butylbenzylphthalate | 20 | 1-7j |
| phthalate de di (2-éthylhexyle) | 100 | 5-30j |

Cette biodégradation suit généralement une cinétique de premier ordre (Staples et al., 1997; Wang et al., 2003; Gavala et al., 2003). Dans les eaux superficielles et maritimes, le temps de demi-vie varie de moins d'un jour à 2 semaines. Dans les sols, la demi-vie est de moins d'une semaine à plusieurs mois. Le temps de demi-vie devient plus long dans des conditions anaérobies, pauvres en nutriments, et froides alors que, dans des conditions microbiennes très

actives et biodiverses, telles que les boues résiduaire, les processus métaboliques peuvent être plus performants. Des essais de biodégradation standard réalisés avec des inoculum de boues résiduaire ont montré que les esters phthaliques subissent une dégradation supérieure à 50 % de la teneur initiale en 28 jours et qui peut généralement atteindre un taux d'abattement de 90 % (Staples et al., 1997).

a- Voies de biodégradation

De nombreux chercheurs ont identifié les monoesters et l'acide phthalique comme seuls métabolites de la biodégradation des phthalates. Ainsi, l'hydrolyse microbienne successive des deux liaisons esters des phthalates ou « des-estérification » a été suggérée comme étant une des principales voies métaboliques des phthalates (Niazi et al., 2001 ; Jonsson et al., 2003). Lors d'une biodégradation de BBP, Chatterjee et Dutta (2003) ont caractérisé par GC/MS et RMN-C¹³ deux métabolites le mono-n-butyl phthalate (MBuP) et le monobenzyl phthalate (MBzP) en plus de l'acide phthalique. Jianlong et al. (1999) ont identifié lors de la biodégradation de DBP une libération de MBP dans un premier temps, celui-ci disparaît ultérieurement avec une apparition de l'acide phthalique qui disparaît à son tour.

D'autres auteurs comme Cartwright et al. (2000) ont signalé la présence d'une autre voie métabolique lors de la biodégradation du DEP (Di-éthyl phthalate). En plus du monoester MEP (Mono éthyle phthalates) et de l'acide phthalique, ils ont identifié la présence de trois autres métabolites caractérisés par GC-MS et RMN-C¹³ qui apparaissent dans l'ordre : EMP (Ethyl méthyle phthalate), DMP (Di-méthyl phthalate) et MMP (Mono-méthyl phthalate). Ces auteurs ont démontré que cette deuxième voie de dégradation est bien de nature biologique suite à un effet négatif de l'azide de sodium (inhibiteur respiratoire) sur la présence du EMP et du DMP. Ainsi, ils ont proposé deux voies de biodégradation des esters phthaliques (Schéma 4). La première (voie 1) entraîne une hydrolyse séquentielle des deux liaisons esters (C-O), formant le monoester (MEP) dans une première étape et l'acide phthalique (AP) ensuite, après hydrolyse de la deuxième liaison ester.

La deuxième voie qui conduit à la formation de l' EMP, du DMP et du MMP peut comporter deux réactions différentes soit :

- une destruction de la liaison covalente C-C du groupement éthyle, entraînant une déméthylation séquentielle de chaque groupement éthyle pour former le composé EMP et ensuite le DMP.

- une substitution du groupement éthyle par un groupement méthyle suite à la rupture de la liaison C-O faible qui conduit à la formation d'EMP et de DMP ensuite (processus de transestérification)

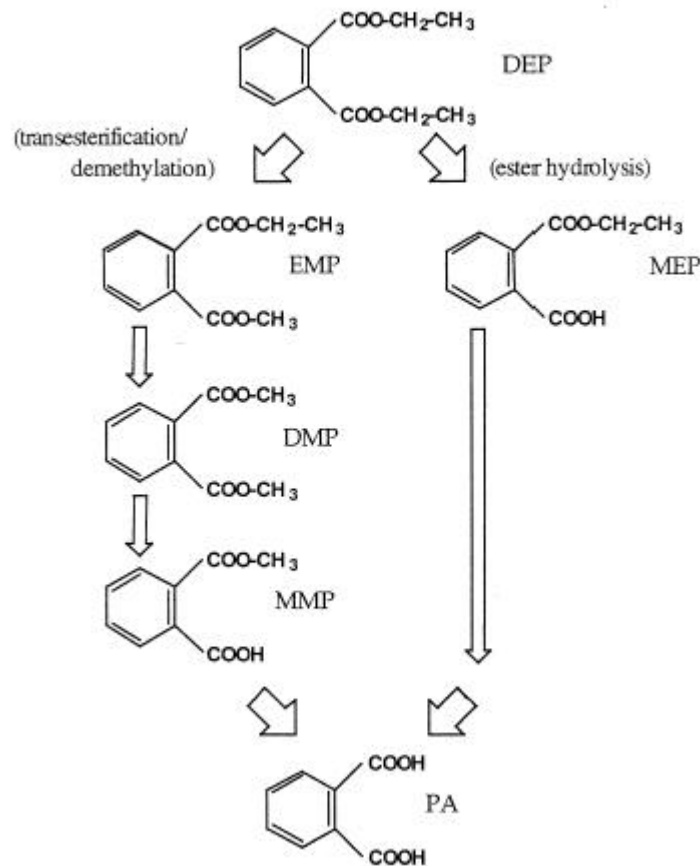


Schéma 4. Voies de biodégradation de di éthyle phtalate (Cartwright et al., 2000)

Dans les deux cas, le DMP pourrait se transformer en MMP et ultérieurement en acide phtalique AP.

L'acide phtalique peut aussi subir une série de biotransformations qui aboutit à une ouverture du cycle aromatique et à la libération de CO₂ et H₂O (minéralisation) (Schéma 5).

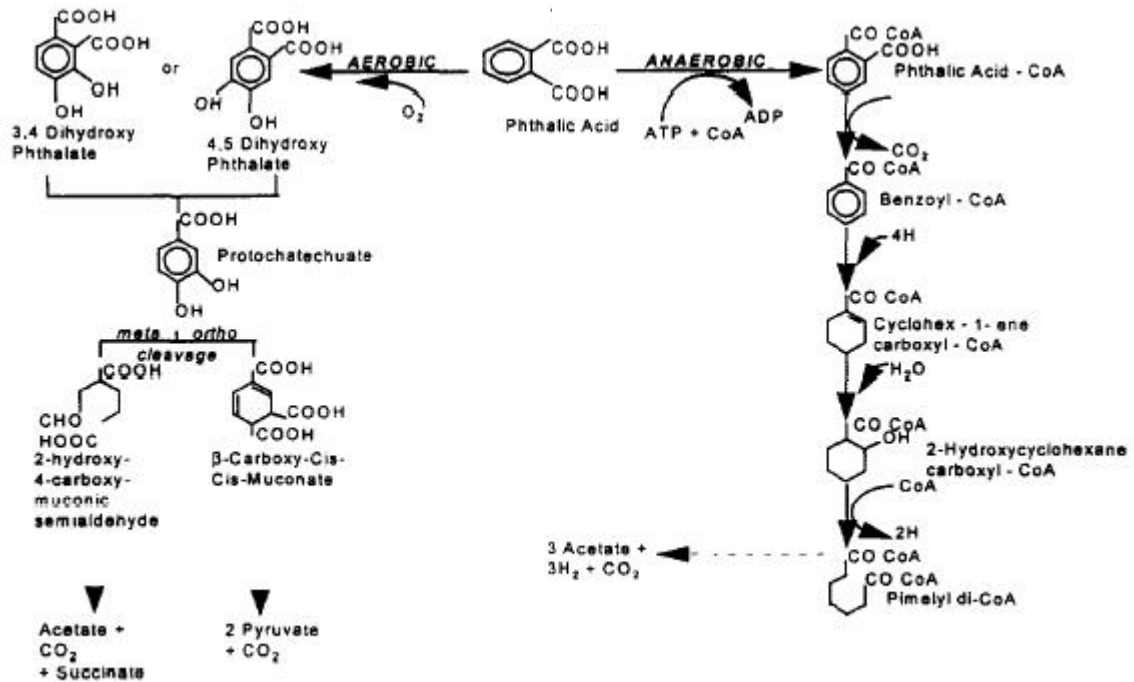


Schéma 5. biodégradation de l'acide phtalique dans l'environnement (Staples et al. 1997)

b- Facteurs contrôlant la biodégradation

b.1 Nombre d'atomes de carbone et longueur des chaînes alcoyles

La biodégradation des phthalates est très dépendante de la longueur des chaînes alcoyles (Ejlertsson et al., 1997). Alatrisme-Mondragon et al. (2003) montrent que les esters d'acides phtaliques (EAP) avec des chaînes courtes sont plus facilement biodégradables et minéralisables que les EAP à chaînes plus longues qui sont moins sensibles à la dégradation et qui peuvent être considérés comme récalcitrants. Ziogou et al. (1989) trouvent des constantes de cinétique de dégradation pour le DEP et le DBP respectivement de l'ordre de $14,40 \times 10^{-2}$ et $25,44 \times 10^{-2} \text{ j}^{-1}$ dans des conditions méthanogènes. Jianlong et al. (2004) ont estimé que la demi-vie du DMP est de l'ordre de 2,29 jours alors que celle de DOP est d'environ 28,4 jours. Jianlong et al. (2004) ont démontré une bonne corrélation entre le taux de dégradation des EAP ou leur temps de demi-vie liés à la longueur de la chaîne alcoyle et les coefficients de partage octanol-eau (Kow). Ils ont suggéré que la dégradation des esters phtaliques diminue avec l'augmentation du nombre de carbone dans la chaîne alcoyle. Le même ordre de grandeur est obtenu pour les deux phthalates suivants DEP et DBP dans des conditions mésophiles et anaérobies soit $8,04 \times 10^{-2} \text{ j}^{-1}$ et $13,69 \times 10^{-2} \text{ j}^{-1}$ respectivement (Gavala et al., 2003), alors que le DEHP suit des cinétiques de biodégradation très faibles qui varient entre $0,35 \times 10^{-2}$ à $3,59 \times 10^{-2} \text{ j}^{-1}$. Certains auteurs ont montré que les différentes structures des EAS et leurs intermédiaires de dégradation font appel à la spécificité de certaines enzymes comme les estérases impliquées (Wang et al., 2003; Gu et al., 2004; Wang et al., 2004b). Xu et al.

(2004) montrent que le DMP (isomère ortho) et le diméthyl téréphthalate (DMT) (isomère para) nécessitent la présence de deux bactéries *Klebsiella oxytoca* Sc et *Methylobacterium mesophilium* sr. pour une hydrolyse complète des deux liaisons esters, alors que le DBP peut être minéralisé totalement en présence de *Pseudomonas fluorescens* B-1 seulement.

b.2 Paramètres biologiques et physico-chimiques du milieu

- activation microbienne

La biodégradation des phthalates peut être améliorée par des conditions biologiquement activées. Chatterjee et Dutta, (2003) notent que certains organismes peuvent sélectivement hydrolyser une seule liaison ester d'un di-alkyl phthalate, alors que d'autres sont capables de minéraliser à la fois le mono-alkyl et le dialkyl phthalate. Alatrisme-Mondragon et al. (2003) ont observé une demi-vie du DBP dans des boues en anaérobiose de 5 jours environ, soit une dégradation totale estimée à 50 jours environ. Jianlong et al. (1999) signalent que 1,25 mM de DBP peuvent être complètement dégradés en 100 heures par une bactérie dénitrifiante isolée à partir de boues activées. Marttinen et al. (2003) ont démontré une forte biodégradation du DEHP dans les boues activées.

- paramètres physico-chimiques du milieu

La présence d'oxygène dans le milieu a un effet très net sur l'amélioration de la biodégradation des phthalates. Madsen et al. (1999) ont démontré que la constante de cinétique de dégradation du DEHP dans des sols traités par des boues et incubés dans des conditions anaérobies est de l'ordre de $0,23 \times 10^{-2} \text{ j}^{-1}$, alors qu'elle varie entre $0,23 \times 10^{-2}$ et $1,27 \times 10^{-2} \text{ j}^{-1}$ dans le cas de sols traités par les boues résiduelles et incubées dans des conditions aérobies. D'autres paramètres physico-chimiques ont été testés par Xu et al. (2004) lors de la biodégradation du DBP par *Pseudomonas fluorescens* B-1. Ces auteurs ont démontré qu'en augmentant la concentration du DBP de 2,5 à 10 mg, le temps de demi-vie estimé augmente de 14 à 24 h. Une augmentation de la température de 20 à 37 °C, un pH de l'ordre de 7 et une bonne aération permettant d'optimiser la biodégradation du DBP par *Pseudomonas fluorescens* B-1. Zeng et al. (2004) ont considéré que les conditions optimum pour la biodégradation de 6 phthalates par *Pseudomonas fluorescens* FS1 sont une température de 20-30°C, un pH de 6,5 à 8,0, l'âge et la concentration de l'inoculum étant respectivement de 18-24 h et 4-8 %.

D'autres auteurs remarquent que les structures humiques solubles du sol peuvent complexer largement les esters phthaliques en diminuant leur degré d'adsorption au sol et en augmentant ainsi leur solubilité, et leur biodisponibilité à la décomposition microbienne (Di Toro et al.,

1991; Staples, 1997). L'influence des conditions nutritionnelles a été aussi évoquée dans certains travaux, en particulier celle de la concentration optimale en azote dans le cas de la métabolisation du DBP par des bactéries dénitrifiantes (Jianlong et al., 1999).

- Toxicité des EAPs et des leur métabolites de biodégradation

Certains auteurs considèrent que les monoesters des EAP sont responsables des propriétés toxicologiques et écotoxicologiques des diesters correspondants. N'étant pas synthétisés commercialement, leur présence dans l'environnement est liée strictement à la biodégradation microbienne ou abiotique des diesters. Scholz (2003) a démontré dans une étude réalisée pour tester la toxicité et la biodégradation de différents mono-esters de l'acide phthalique synthétisés que ces composés ne constituent pas des intermédiaires stables. Ils sont complètement et rapidement biodégradés. Cet auteur montre ainsi que la toxicité des monoesters est moins prononcée que celle du diester correspondant plus stable, la toxicité du monoester n-butyl phthalate peut être 30 à 300 fois inférieure à celle du di n-butyl phthalate. Ejlertsson et al. (1997) ont démontré un effet négatif du 2-éthyl hexanol autre métabolite de biodégradation de DEHP dans la méthanogénèse de celui-ci.

Gavala et al. (2003) ont démontré dans une étude de cinétique de biodégradation des EAP dans des conditions méthanogéniques (production de biogaz) que l'accumulation de grandes concentrations de DEHP (plus que 60 mg/l) dans le digesteur anaérobie a des effets négatifs sur la biodégradation du DBP et du DEHP ainsi que sur la production de biogaz. Ils suggèrent une action inhibitrice du DEHP sur des récepteurs membranaires des cellules microbiennes.

IV.2.1.3.2 Adsorption des phthalates

L'adsorption des phthalates au sol, aux sédiments et aux déchets solides est partiellement gouvernée par leur lipophilie. Ils sont principalement adsorbés à la matière organique associée au solide. La sorption au sol, sédiment ou solides n'est pas toujours linéaire avec la concentration des composés, et varie considérablement avec le type de matrice solide. Schulten et al. (2001) ont démontré que la complexation de di-éthylphthalate peut être biphasique, si les concentrations de DEP sont faibles, l'adsorption se fait à l'intérieur des vides des structures humiques, et quand les concentrations augmentent, l'adsorption se fait à la surface externe de ces structures humiques. Marttinen et al. (2003) ont considéré l'adsorption comme un facteur réduisant leur biodisponibilité à la biodégradation microbienne.

IV.2.2 Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques

IV.2.2.1 Les Généralités sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les feux de forêt, les éruptions volcaniques et la matière organique en décomposition représentent les sources naturelles d'HAP. Les sources anthropogènes sont issues des procédés industriels de traitement de matière carbonée dans des conditions pyrolytiques par chauffage ou par combustion incomplète en milieu déficitaire en oxygène. Toutes les grandes industries utilisant des combustibles fossiles produisent des HAP. Les chaufferies et les moyens de transport sont aussi une source de pollution atmosphérique (Lemieux et al., 2004). Les HAP constituent un composant important des huiles usées des moteurs. Il existe une production domestique liée à la cuisine dans la fumée de cuisson et de friture. Les HAP sont aussi retrouvés dans la fumée de cigarette (Baek et Jenkins, 2004).

Dans les eaux usées des stations urbaines, les micropolluants organiques présents sont issus soit d'une source domestique, soit d'une contamination éventuelle par des effluents industriels ou soit d'une contamination secondaire par les eaux de ruissellement. Ces eaux pluviales peuvent entraîner des dépôts atmosphériques contaminés, des résidus de substances utilisés en construction et en voirie (peintures, solvants..) et des produits spécifiques au fonctionnement des véhicules motorisés (hydrocarbures, fluides hydrauliques, résidus de gaz d'échappement) (Pérez et al., 2001). Lors des filières de traitement des eaux usées, les polluants les moins volatiles, les moins solubles ou les moins biodisponibles à la dégradation microbienne se trouvent reconcentrés dans les boues suite à un mécanisme de sorption principalement au niveau des matières organiques en suspension (Moretti et al., 1989 ; Pérez et al., 2001). Plus les polluants sont apolaires et peu solubles dans l'eau, plus ils seront éliminés des eaux usées et seront accumulés dans les boues (cas des HAP). Ces polluants peuvent présenter un facteur de concentration de 25 à 150 % (environ 65 % en moyenne dans les boues primaires) et de 10 % environ dans les boues activées ; le naphthalène étant le moins retenu, alors que les composés lourds (pyrène) sont pratiquement totalement concentrés dans les boues (ADEME, 1995 b). Ainsi, dans un but de protéger l'environnement et la santé humaine, certains pays ont édicté des règlements sur les concentrations limites en HAP dans les boues résiduaires et sur les flux maximum destinés aux sols à usage agricole ou en pâturage (Tableaux 12, 13).

Tableau 12. Valeurs limites des concentrations des HAP recommandés dans les boues résiduaires (Langenkamp et al., 2001)

| Etats | U.E. 2000 ¹ | Danemark ^{1,2} | Suède ³ |
|-----------------|------------------------|-------------------------|--------------------|
| HAPs (mg/kg MS) | 6 | 3 | 3 |

¹ Somme de acenaphthene, phenanthrene, fluorene, fluoranthene, pyrene, benzo(b+J+K)fluoranthene, benzo(a)pyrene, benzo(ghi)perylene, indeno(1, 2, 3-c, d)pyrene.

² (Ministère Danois, 1996 cité dans Madsen et al. (1997)

³ somme de 6 composés

Tableau 13. Valeurs limites françaises de concentration en HAP dans les boues résiduaires et flux maximum dans les sols cultivés et pâturages (arrêté du 8 janvier, 1998).

| Composés | Valeur limite dans les boues (mg/kg MS) | | Flux maximum cumulé, apporté par les boues en 10 ans (g/m ²) | |
|----------------------|---|------------------------|--|------------------------|
| | Cas général | Epandage sur pâturages | Cas général | Epandage sur pâturages |
| Fluoranthène | 5 | 4 | 7,5 | 6 |
| Benzo(b)fluoranthène | 2,5 | 2,5 | 4 | 4 |
| Benzo(a)pyrène | 2 | 1,5 | 3 | 2 |

IV.2.2.2 Structure et caractéristiques physico-chimiques des HAP

IV.2.2.2.1 Structure des HAPs étudiés

Les HAP constituent une catégorie de produits chimiques qui comprend environ une centaine de composés distincts et sont constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène formant des cycles à cinq ou six atomes de carbone. Parmi eux, 16 hydrocarbures aromatiques largement étudiés sont retenus comme des polluants prioritaires par l'USEPA et la Communauté Européenne (Figure 7).

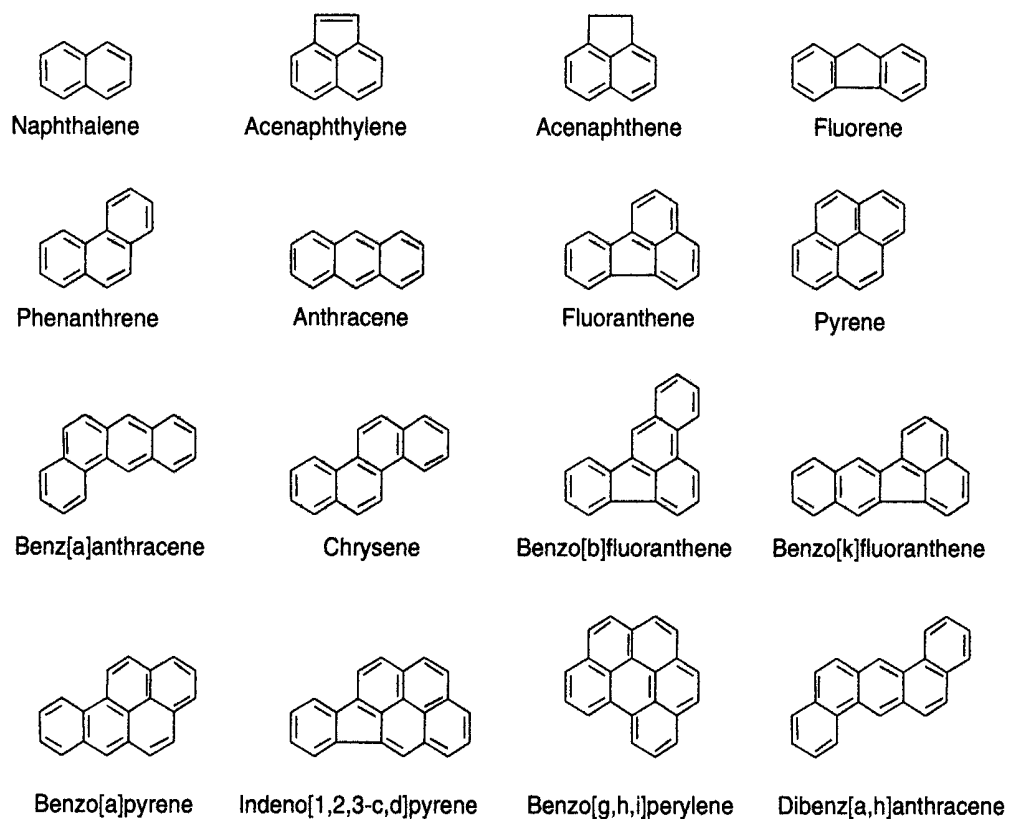


Figure 7. Les 16 HAP reconnus par l'USEPA comme polluants prioritaires

Toutefois, il existe d'autres structures polyaromatiques actuellement reconnues comme ayant un risque environnemental comme les hydrocarbures polycycliques ayant des substituants alkylés (méthyle en particulier) et des hydrocarbures hétérocycliques (CAH) où un noyau benzénique est remplacé par un hétérocycle azoté, soufré ou oxygéné (ADEME, 1995b).

IV.2.2.2.2. Propriétés physico-chimiques des des HAP étudiés

Les propriétés physico-chimiques suivantes sont responsables de la répartition et de la persistance de ces molécules dans les différents compartiments environnementaux (Tableau 14).

Les HAPs sont des composés non-polaires, hydrophobes, peu ionisables. Hormis le cas du naphthalène, leur solubilité dans l'eau est faible à très faible et leur pression de vapeur, de faible à modérément élevée. Leur coefficient de partage octanol/eau (K_{oe}) est relativement élevé, ce qui représente un important potentiel d'adsorption sur le sol et sur les matières particulaires en suspension dans l'air ou dans l'eau ainsi qu'un fort potentiel de bioconcentration dans les organismes (ADEME, 1995b).

Tableau 14. Différentes propriétés physico-chimiques des 16 HAP

| HAP | Formule | Poids Moléculaire (g/mole) | S | Pv | Te | Hc | Log Kow | Log Koc |
|---------------------------|---------|----------------------------|--|-----------------------|-------|------------------------------------|---------|---------|
| Naphtalène | C10H8 | 128 | 31,69 | 11,9 | - | - | 3,37 | 2,97 |
| Acénaphthylène | C10H8 | 154 | 3,93 | 9×10^{-1} | 280 | - | 4,07 | 1,4 |
| Acénaphthène | C12H10 | 156 | 3,93 | 3×10^{-1} | 279 | - | 3,98 | 3,66 |
| Fluorène | C13H10 | 166 | 1,68 à 1,98 | 9×10^{-2} | 295 | - | 4,18 | 3,86 |
| Phénanthrène | C14H10 | 178 | 1 à 1,6 | $9,1 \times 10^{-2}$ | 340 | 0,61 à 4,56 | 4,45 | 4,15 |
| Anthracène | C14H10 | 178 | 0,0446 | 1×10^{-3} | 342 | - | 4,45 | 4,15 |
| Fluoranthène | C16H10 | 202 | 0,206 | $1,2 \times 10^{-3}$ | 375 | 1,17 à 1,63 | 4,9 | 4,58 |
| Pyrène | C16H10 | 202 | 0,129 à 0,165 | 6×10^{-4} | 393 | - | 4,88 | 4,58 |
| Benzo(a)anthracène | C18H12 | 228 | $5,7 \times 10^{-3}$ | $2,8 \times 10^{-5}$ | 400 | - | 5,6 | - |
| Chrysène | C18H12 | 228 | $1,5 \times 10^{-3}$ à $2,2 \times 10^{-3}$ | $5,7 \times 10^{-7}$ | 448 | - | 5,6 | 5,30 |
| Benzo(b)fluoranthène | C20H12 | 252 | $1,2 \times 10^{-3}$ | $6,7 \times 10^{-5}$ | 481 | - | 6,04 | 5,74 |
| Benzo(k)fluoranthène | C20H12 | 252 | $4,3 \times 10^{-3}$ | $2,6 \times 10^{-12}$ | 480 | 0,06 à 0,08 | 6,06 | - |
| Benzo(a)pyrène | C20H12 | 252 | $1,6 \times 10^{-3}$ | 7×10^{-7} | 496 | - | 6,3 | - |
| Indéno(1,2, 3-c, d)pyrène | C22H12 | 278 | - | $1,3 \times 10^{-8}$ | 536 | 2,43 $\times 10^{-3}$ à 0,16 | 6,4 | - |
| Dibenzo(a, h)anthracène | C22H12 | 276 | $0,5 \times 10^{-3}$ | $3,7 \times 10^{-8}$ | 524 | - | - | - |
| Benzo(g,h,i)pérylène | C22H14 | 276 | $0,26 \times 10^{-3}$ | | > 500 | - | - | - |

Sources : ATSDR (1990); IARC (1994); ADEME (1995b); WGPAH (2001)

S : Solubilité dans l'eau (mg/l) ; Pv : Pression de vapeur (Pa) ; Te : Point d'ébullition (°C) ;

Hc : Constante de Henry (Pa.m³/mol) ; Kow Coefficient de partage octanol-eau ;

KOC : Coefficient de partage carbone organique/eau

Les molécules avec un arrangement structural linéaire ont tendance à être moins solubles que des molécules angulaires ou coronaires. Par exemple, l'anthracène est moins soluble que le phénanthrène.

IV.2.2.3 Devenir des HAPs dans l'environnement

La biodisponibilité d'un HAP dans un compartiment environnemental est liée à ses caractéristiques physico-chimiques qui déterminent la quantité de cet HAP présente dans le compartiment considéré après lixiviation ou volatilisation, les individus les plus légers étant les plus mobiles et donc les plus facilement exportés.

IV.2.2.3.1 Biodégradation des HAPs

a- Mécanismes de dégradations des HAPs

Parallèlement à la dégradation abiotique composée des réactions de photolyse, d'hydrolyse et d'oxydation qui concerne préférentiellement les HAPs les plus légers (2 à 18 % des pertes de naphthalène, anthracène et phénanthrène), la dégradation biologique peut s'effectuer dans des conditions aérobies ou anaérobies (Grishchenkov et al., 2000 ; Quantin et al., 2005).

Les études de bioremédiation de sol contaminé par compostage du sol ou par application des champignons ligninocellulosiques permettent de mettre en évidence les principaux schémas métaboliques. Juhasz et Naidu, (2000) ont démontré qu'une grande variété de bactéries et de champignons ligninolytiques ou non-ligninolytiques possède la capacité d'oxyder les HAP (Tableaux 15, 16). Ils dégradent les HAP par co-métabolisme. Les champignons ligninolytiques possèdent des peroxydases de lignine, des peroxydases Mn-dépendantes et des laccases. Ces enzymes sont non-spécifiques et peuvent oxyder une large variété de composés organiques tels que les HAP (Hammel, 1992). Ces réactions d'oxydation non-spécifiques mènent à la formation d'une variété de HAP-quinones et de composés aromatiques hydroxylés (Hammel, 1992). Certaines bactéries oxydent les HAP en HAP cis-dihydrodiols dans une première étape (Juhasz et Naidu, 2000) (Schéma 6).

Guerin et al. (1988) ; Mahaffey et al. (1988) ont démontré l'accumulation d'acides aromatiques ortho-hydroxy qui peuvent être retrouvés dans l'environnement. Ainsi, l'acide hydroxy-naphthoïque, l'anthraquinone et l'acide phthalique ont été identifiés comme les métabolites microbiens typiques de l'anthracène (Richnow et al., 1998).

La dégradation microbienne s'effectue par une attaque successive des anneaux aromatiques. Les acides aromatiques ortho-hydroxy peuvent se former après la dégradation de chaque cycle. Par la suite, les HAP sont oxydés ultérieurement en phénols par d'autres microorganismes. Dans le cas de la dégradation du benzo [a] pyrène par des bactéries (Schéma 6), les cis-7,8- et 9,10-BaP dihydrodiols ont été isolés après incubation du benzo[a] pyrène avec une souche de *Beijerinckia B836* (Gibson et al., 1975). Schneider et al. (1996) quant à

eux ont isolé les cis-4,5- et 9,10-BaP dihydrodiols, après un isolement de l'acide dicarboxylique 4,5-chrysène et acide cis-4-(8-hydroxypyren-7-yl)-2-oxobut-3-énoïque.

Tableau 15 : Les HAPs oxydés par différentes espèces de bactéries (Juhász et Naidu, 2000)

| Organisms | Reference |
|---|---|
| Naphthalene | |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Brevundimonas vesicularis</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Corynebacterium renale</i> , <i>Moraxella</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>B. cereus</i> , <i>P. marginalis</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. saccharophila</i> , <i>Neptunomonas naphthovorans</i> , <i>Cycloclasticus</i> sp. | Ryu et al. (1989), Weissenfels et al. (1990, 1991), Kelly et al. (1991), Dunn and Gunsalus (1973), Davies and Evans (1964), Foght and Westlake (1988), Jeffrey et al. (1975), Mueller et al. (1990a), Kuhm et al. (1991), Walter et al. (1991), Dua and Meera (1981), Tagger et al. (1990), Garcia-Valdes et al. (1988), Trower et al. (1988), Grund et al. (1992), Barnsky (1975a); Barnsley (1983a), Yang et al. (1994), Burd and Ward (1996), Allen et al. (1997), Stringfellow and Aitken (1995), Filonov et al. (1999), Hedlund et al. (1999), Geiselbrecht et al. (1998), Foght and Westlake (1996), Goyal and Zylstra (1996) |
| Acenaphthene | |
| <i>Beijernickia</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Bu. cepacia</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Cycloclasticus</i> sp., <i>Neptunomonas naphthovorans</i> , <i>Alcaligenes eutrophus</i> , <i>Alcaligenes paradoxus</i> | Chapman (1979), Schocken and Gibson (1984), Ellis et al. (1991), Geiselbrecht et al. (1998), Hedlund et al. (1999), Selifonov et al. (1993) |
| Phenanthrene | |
| <i>Aeromonas</i> sp., <i>A. faecalis</i> , <i>A. denitrificans</i> , <i>Arthrobacter polychromogenes</i> , <i>Beijernickia</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Vibrio</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>S. griseus</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. saccharophila</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Cycloclasticus</i> sp., <i>P. fluorescens</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Acidovorax delafieldii</i> , <i>Gordona</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Cycloclasticus pugetii</i> , <i>Sp. yanokuyae</i> , <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Burkholderia</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Nocardioïdes</i> sp., <i>Flavobacterium gondwanense</i> , <i>Halomonas meridiana</i> | Kiyohara et al. (1976, 1982, 1990), Weissenfels et al. (1990, 1991), Keuth and Rehm (1991), Jerina et al. (1976), Colla et al. (1959), West et al. (1984), Kiyohara and Nagao (1978), Heitkamp and Cerniglia (1988), Guerin and Jones (1988a, 1989), Treccani et al. (1954), Evans et al. (1965), Foght and Westlake (1988), Mueller et al. (1990b), Sutherland et al. (1990), Ghosh and Mishra (1983), Savino and Lollini (1977), Trower et al. (1988), Barnsley (1983b), Yang et al. (1994), Kohler et al. (1994), Stringfellow and Aitken (1995), Boonchan (1998), Juhász (1998), Geiselbrecht et al. (1998), Foght and Westlake (1996), Kastner et al. (1998), Lal and Khanna (1996), Shuttleworth and Cerniglia (1996), Mahro et al. (1995), Goyal and Zylstra (1996), Dyksterhouse et al. (1995), Allen et al. (1999), Aitken et al. (1998), Romero et al. (1998), Iwabuchi et al. (1998), Churchill et al. (1999), Juhász (1991) |
| Anthracene | |
| <i>Beijernickia</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Bu. cepacia</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>P. marginalis</i> , <i>Cycloclasticus</i> sp., <i>P. fluorescens</i> , <i>Sp. yanokuyae</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Gordona</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Cycloclasticus pugetii</i> | Colla et al. (1959), Akhtar et al. (1975), Jerina et al. (1976), Evans et al. (1965), Ellis et al. (1991), Weissenfels et al. (1991), Foght and Westlake (1988), Walter et al. (1991), Mueller et al. (1990a), Savino and Lollini (1977), Tongpin and Pickard (1996), Burd and Ward (1996), Geiselbrecht et al. (1998), Foght and Westlake (1996), Kim et al. (1997), Lal and Khanna (1996), Mahro et al. (1995), Goyal and Zylstra (1996), Dyksterhouse et al. (1995), Allen et al. (1999) |
| Fluoranthene | |
| <i>A. denitrificans</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Bu. cepacia</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Acidovorax delafieldii</i> , <i>Gordona</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>P. saccharophila</i> , <i>Pasteurella</i> sp. | Kelly and Cerniglia (1991), Walter et al. (1991), Weissenfels et al. (1991), Foght and Westlake (1988), Barnsley (1975b), Mueller et al. (1990a, 1990b), Ye et al. (1996), Kelly et al. (1993), Boonchan (1998), Juhász (1998), Lal and Khanna (1996), Shuttleworth and Cerniglia (1996), Mahro et al. (1995), Willumsen and Karlson (1998), Sepic et al. (1998), Willumsen et al. (1998), Churchill et al. (1999), Chen and Aitken (1999) |
| Pyrene | |
| <i>A. denitrificans</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Gordona</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>Bu. cepacia</i> , <i>P. saccharophila</i> | Heitkamp et al. (1988a), Walter et al. (1991), Weissenfels et al. (1991), Grosser et al. (1991), Schneider et al. (1996), Ye et al. (1996), Boonchan (1998), Juhász (1998), Kastner et al. (1998), Lal and Khanna (1996), Mahro et al. (1995), McNally et al. (1999), Jimenez and Bartha (1996), Churchill et al. (1999), Juhász et al. (1997), Chen and Aitken (1999) |
| Chrysene | |
| <i>Rhodococcus</i> sp., <i>P. marginalis</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Burkholderia</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. saccharophila</i> | Walter et al. (1991), Burd and Ward (1996), Ye et al. (1996), Boonchan (1998), Lal and Khanna (1996), Aitken et al. (1998), Chen and Aitken (1999) |
| Benz[a]anthracene | |
| <i>A. denitrificans</i> , <i>Beijernickia</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Burkholderia</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. saccharophila</i> | Gibson et al. (1975), Mahaffey et al. (1988), Weissenfels et al. (1991), Schneider et al. (1996), Ye et al. (1996), Boonchan (1998), Juhász (1998), Aitken et al. (1998), Chen and Aitken (1999) |
| Dibenz[a,h]anthracene | |
| <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | Ye et al. (1996), Boonchan (1998), Juhász (1998) |

Tableau 16. Les HAP oxydés par différentes espèces des algues (Juhasz et Naidu, 2000)

| Organism | Reference |
|--|---|
| Naphthalène <i>Absidia glauca</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Basidiobolus ranarum</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Choanephora campineta</i> , <i>Circinella</i> sp., <i>Claviceps paspali</i> , <i>Cokeromyces</i> <i>poitrassii</i> , <i>Conidiobolus gonimodes</i> , <i>C. bairdii</i> , <i>C. elegans</i> , <i>C. japonica</i> , <i>Emerizellopsis</i> sp., <i>Epicoccium nigrum</i> , <i>Gilbertella persicaria</i> , <i>Gliocladium</i> sp., <i>Helicostylum piriforme</i> , <i>Hyphochytrium catenoides</i> , <i>Linderina pennispora</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Panaeolus cambodgimensis</i> , <i>Panaeolus</i> <i>subbauteatus</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Pestalotia</i> sp., <i>Phlyctochytrium</i> <i>reinholdiae</i> , <i>Phycomyces blakesleeanus</i> , <i>Phytophthora cinnamomi</i> , <i>Psilocybe</i> <i>cubensis</i> , <i>Psilocybe strictipes</i> , <i>Psilocybe stantzi</i> , <i>Psilocybe subaeruginascens</i> , <i>Rhizophlyctis harderi</i> , <i>Rhizophlyctis rosea</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Rhizopus</i> <i>stolonifer</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Saprolegnia parasitica</i> , <i>Smittium caducis</i> , <i>Smittium</i> <i>cadisetae</i> , <i>Smittium simidii</i> , <i>Sordaria fimicola</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Thamnidium anomaham</i> , <i>Zygorhynchus moelleri</i> | Cerniglia and Gibson (1977), Cerniglia et al. (1978, 1982a), Smith and Rosazza (1974), Cerniglia and Crow (1981), Ferris et al. (1973) |
| Aconaphthène <i>C. elegans</i> , <i>T. versicolor</i> | Pothuluri et al. (1992a), Johannes et al. (1998) |
| Phenanthrène <i>C. elegans</i> , <i>P. chrysosporium</i> , <i>P. laevis</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>Bjerkandera adjusta</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Cylindrocladium simplex</i> , <i>Monosporium olivaceum</i> , <i>Curvularia lanata</i> , <i>Curvularia tuberculata</i> , <i>Laetiporus</i> <i>sulphureus</i> , <i>Daedalea quercina</i> , <i>Flamulina velutipes</i> , <i>marasmiellus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Kuehneromyces mutabilis</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Agrocybe</i> <i>aegerita</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> | Cerniglia and Yang (1984), Cerniglia et al. (1989), Morgan et al. (1991), Sutherland et al. (1991), Bumpus (1989), Hammel et al. (1992), Bezael et al. (1996), Brodtkorb and Legg (1992), Schutzendubel et al. (1999), Lisowska and Dlugonski (1999), Bogan and Lamar (1996), Sack and Gunther (1993), Sack et al. (1997a), Collins and Dobson (1996), Casillas et al. (1996), Sutherland et al. (1993) |
| Anthracène <i>Bjerkandera</i> sp., <i>Bjerkandera adjusta</i> , <i>C. elegans</i> , <i>P. chrysosporium</i> , <i>P. laevis</i> , <i>Ranaria</i> sp., <i>R. solani</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Cylindrocladium simplex</i> , <i>Monosporium olivaceum</i> , <i>Curvularia lanata</i> , <i>Curvularia tuberculata</i> , <i>Cryphonectria parasitica</i> , <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> , <i>Oxysporus</i> sp., <i>Cladsporium herbarum</i> , <i>Drechslera spicifera</i> , <i>Verticillium</i> <i>lecanii</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Rhizopus arrizus</i> , <i>Coriokopsis polyzona</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Daedalea quercina</i> , <i>Flamulina velutipes</i> , <i>marasmiellus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp. | Cerniglia (1982), Cerniglia and Yang (1984), Hammel et al. (1991), Sutherland et al. (1992), Field et al. (1992), Collins et al. (1996), Schutzendubel et al. (1999), Lisowska and Dlugonski (1999), Krivobok et al. (1998), Andersson and Henrysson (1996), Johannes et al. (1996), Bogan et al. (1996), Bogan and Lamar (1996), Vyas et al. (1994), Sack and Gunther (1993) |
| Fluoranthène <i>C. elegans</i> , <i>C. blackeaeana</i> , <i>C. echinulata</i> , <i>Bjerkandera adjusta</i> , <i>Pleurotus</i> <i>ostreatus</i> , <i>Sporormiella australis</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Cicinobolus cesatii</i> , <i>Pestalotia palmarum</i> , <i>Beauveria alba</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Mortierella</i> <i>ramantiana</i> , <i>Rhizopus arrizus</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Daedalea quercina</i> , <i>Flamulina velutipes</i> , <i>marasmiellus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp. | Pothuluri et al. (1990, 1992b), Schutzendubel et al. (1999), Salicis et al. (1999), Sack and Gunther (1993) |
| Pyrcène <i>C. elegans</i> , <i>P. chrysosporium</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>P. janthinellum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>P.</i> <i>ostreatus</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Bjerkandera adjusta</i> , <i>Pleurotus</i> sp., <i>Dichomitus squalens</i> , <i>Flamulina velutipe</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Kuehneromyces mutabilis</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Agrocybe aegerita</i> | Cerniglia et al. (1986), Hammel et al. (1986), Launen et al. (1995), Bezael et al. (1996), Schutzendubel et al. (1999), Martens and Zadrazil (1998), Sack et al. (1997b), Wunder et al. (1997), Sack and Fritsche (1997), Lang et al. (1996), Stanley et al. (1999), Boonchan (1998) |
| Benz[a]anthracène <i>C. elegans</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>P. laevis</i> , <i>P. janthinellum</i> | Cerniglia et al. (1980a), Andersson and Henrysson (1996), Bogan and Lamar (1996), Stanley et al. (1999), Boonchan (1998) |
| Chrysène <i>P. janthinellum</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Penicillium</i> sp. | Kiehlmann et al. (1996), Stanley et al. (1999), Boonchan (1998) |
| Dibenz[a,h]anthracène <i>Trametes versicolor</i> , <i>P. janthinellum</i> | Andersson and Henrysson (1996), Stanley et al. (1999), Boonchan (1998) |

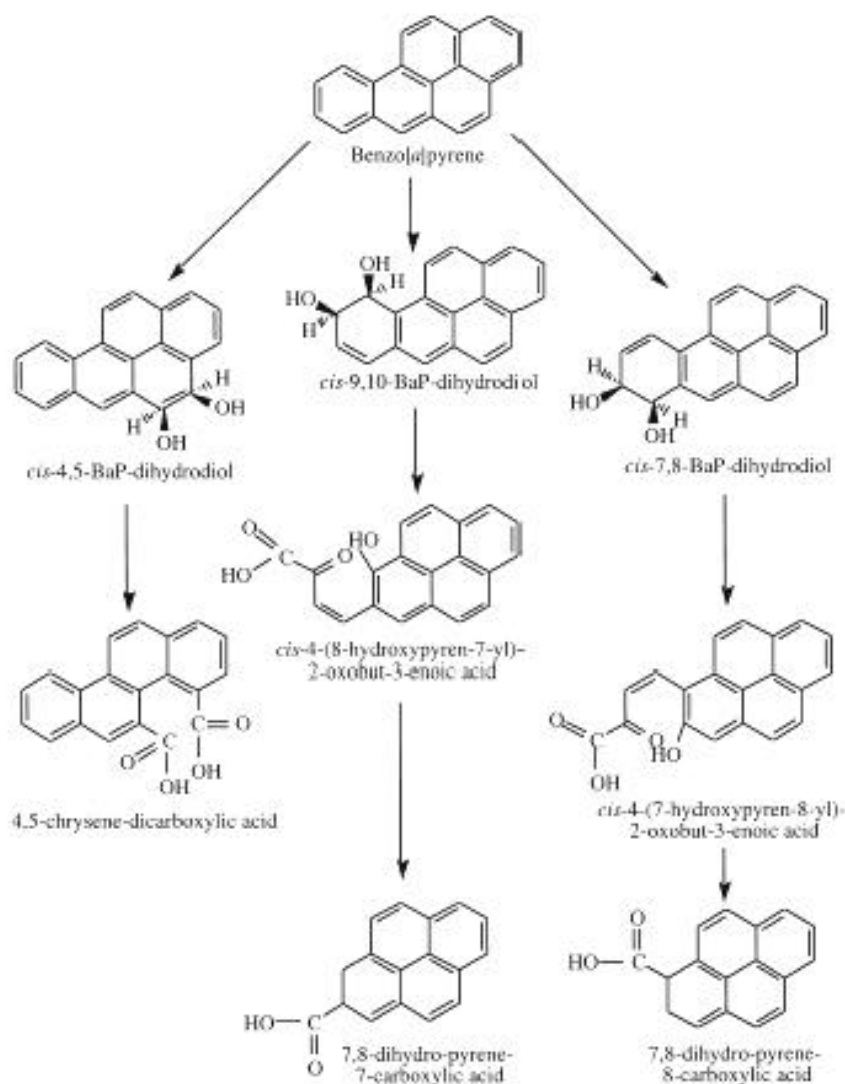


Schéma 6. Voies de biodégradation du benzo [a]pyrène par des bactéries (Juhasz et Naidu, 2000).

b- Conditions physico-chimiques de la dégradation des HAPs

Hogan (1997) retient que la température est un facteur important dans la biodégradation des HAP. La solubilité des HAP dans l'eau augmente en fonction de l'augmentation de la température de 5 à 45 °C tandis que le coefficient de partage des HAP diminue de 20-30% par 10 degrés (Luers et al., 1996 ; Piatt et al., 1996 ; Bonten et al., 1999). Les dérivés les plus légers disparaissent pour des températures de l'ordre de 35 à 55 °C. Les dérivés lourds ont besoin d'une période de 20 jours à 45 °C pour se dissiper, à l'exception du chrysène qui disparaît très rapidement à 60°C.

Quantin et al. (2005) ont démontré l'importance de l'aérobiose dans l'oxydation des HAP et qu'un déficit en oxygène diminuait le taux de biodégradation des HAP. McMillen et Gray

(1994) considèrent qu'un rapport C:N:P de 100:5:1,7 est favorable à la biodégradation de déchets de pétrole. Bogan et Trbovic (2003) montrent que pour des sols ayant moins de 5 % de taux de carbone, la porosité est un facteur plus important que l'oxydation. Cependant l'importance de ces deux paramètres taux de carbone et porosité varie avec le temps de séquestration et le temps de vieillissement de l'HAP. L'effet de porosité est plus rapide et plus significatif pour les HAP de faible poids moléculaire (3 à 4 noyaux aromatiques) que pour ceux de poids moléculaire élevé et plus hydrophobes.

c- Co-compostage de matrices contenant des HAP

Dans les conditions naturelles (sols, sédiments, etc.), les HAP sont à l'origine de pollutions persistantes, en raison de leur faible biodégradabilité, ainsi que leur mobilité limitée par leur faible solubilité dans l'eau (Johnsen et al., 2005). Le tableau 17 présente les teneurs indicatives de certains HAP dans les boues et leur demi-vie dans les sols

Tableau 17. Teneurs indicatives de certains HAP dans les boues et leur demi-vie dans les sols (ADEME, 1995b).

| Composé | Teneur indicative dans les boues (mg/kg MS) | Demi-vie dans les sols |
|---------------------------|---|------------------------|
| Naphtalène | 10 | 20-50 jours |
| Fluorène | 2 | 30-60 jours |
| Phénanthrène | 5 | 20-200 jours |
| Anthracène | 5 | 2-20 mois |
| Fluoranthène | 3 | 5-20 mois |
| Pyrène | 3 | 1-5 ans |
| Chrysène | 2 | 1-3 ans |
| Benzo(b)fluoranthène | 2 | 1-2 ans |
| Benzo(k)fluoranthène | 2 | 2-6 ans |
| Benzo(a)pyrène | 4 | 2-20 mois |
| Indéno(1,2, 3-c, d)pyrène | 1 | 1-2 ans |
| Benzo(g,h,i)pérylène | 0,7 | 1-2 ans |

L'intérêt du compostage réside dans la possibilité offerte par un grand nombre de niches écologiques ayant une grande diversité métabolique et pouvant assurer des séquences métaboliques complètes. Lieu et Colet (1996) ont remarqué que, lors du compostage, la biorémédiation exploite la diversité génétique et la polyvalence métabolique des microorganismes. L'amélioration des populations initiales peut mener à une meilleure capacité de dégradation du pétrole dans des sols (Vecchioli et al., 1990).

Atagana (2004) ont montré que le co-compostage du lisier de volaille avec des sols contaminés en HAP contribue à une élimination de fortes teneurs en HAP de poids moléculaire élevé jusqu'à un niveau inférieur à 1 mg kg^{-1} dans une période de 19 mois. Wong et al. (2002) constatent que le co-compostage du sol avec du lisier de porc (25 % poids sec) peut réduire le taux initial de certains HAP jusqu'au 90 % des teneurs initiales (phénanthrène, anthracène et pyrène).

Miller (1996) a suggéré que la complexité et l'environnement physique d'une matrice telle que le compost sont les inducteurs de l'oxydation enzymatique. La succession de microorganismes peut être vue comme une réponse énergétiquement efficace à récupérer la plus large proportion d'énergie disponible dans un tel substrat organique (Slater et Lovatt, 1984). Ces substrats complexes ne sont souvent pas entièrement dégradés par un seul organisme, mais ils sont dégradés par un ensemble de microorganismes, chacun remplissant une étape de dégradation différente. Morris et al. (1995) pensent que des populations mixtes soient nécessaires pour dégrader significativement le pétrole brut.

Dans le cas de la biodégradation des HAP par compostage du sol, celle-ci dépend des propriétés physico-chimiques de chaque HAP. Wan et al. (2003) ont montré que la dégradation du pyrène dans un compost est relativement lente et est plus longue que celle du phénanthrène ou de l'anthracène. Joyce et al. (1998) constatent que le benz[a]anthracène présente plus de résistance à la biodégradation que l'anthracène, le phénanthrène et le pyrène qui connaissent un excellent abattement durant les premiers 15 jours de la phase active du processus de compostage. Ces auteurs ont expliqué que cette résistance à la biodégradation est liée à un poids moléculaire plus élevé et à une valeur $\log K_{ow}$ supérieure.

La solubilité d'un HAP est considérée par certains auteurs comme la clé à leur disponibilité aux bactéries en tant qu'une source d'alimentation ou d'énergie. Ainsi, certains auteurs ont montré que les techniques d'amélioration de la biodisponibilité par des adjuvants sont d'un grand avantage dans la biorémédiation des sols (Grimberg et al., 1996, Sabatini et al., 1996), d'autres suggèrent le contraire (Wilson et al., 1996). Deziel et al. (1996) ont montré que de nombreux microorganismes peuvent produire des biosurfactants qui peuvent augmenter la

biodisponibilité des composants du pétrole. Le développement de ce type de microorganismes a été retrouvé au cours de compostages.

Kästner et al. (1999) montre que, dans un sol témoin, 43,8 % d'anthracène apporté et marqué [^{14}C en position 9] sont minéralisés par la microflore autochtone et que 45,4 % sont transformés en résidus liés en 176 jours. L'apport de compost accroît le métabolisme (67,2 % d'anthracène minéralisé) et la formation de résidu lié diminue (20,7 % de l'anthracène transformé).

IV.2.2.3.2 Adsorption, séquestration et formation de résidus des HAPs

Plusieurs études ont montré que la biodisponibilité des polluants peut être limitée par la séquestration des molécules par le sol ou par le compost (Means et al., 1980; Wershaw et al., 1991; Nielsen et al., 1997). Les contaminants liés au sol sont plus résistants à l'attaque biologique que les contaminants en solution. En fait, la formation de résidus d'hydrocarbures polycycliques aromatiques marqués ^{14}C attachés non-extractibles a été observée pendant deux décennies dans les recherches sur la biodisponibilité et la biodégradation de ces composés dans les sols. L'adsorption est un phénomène important dans l'interaction entre les polluants organiques et les constituants des boues ou du sol (matières organiques, les argiles, oxydes de fer et d'aluminium) (Murphy et al., 1994; Schlautman et al., 1993). Ainsi, l'adsorption peut limiter la biodisponibilité des polluants vers les eaux souterraines ou vers les plantes. Ce phénomène est réversible s'il n'est pas couplé à des transformations chimiques parallèles.

Certains auteurs comme Karimi-Lotfabad et al. (1996) montrent que les argiles peuvent oligomériser les HAP dans des formes non extractibles avec une biodisponibilité très faible avec des taux de l'ordre de 100 % en quelques semaines. Hogan (1997) trouve que les HAP peuvent aussi former avec la matière organique des complexes qui deviennent non extractibles et non disponibles. Aussi les modèles proposés pour décrire les processus de séquestration d'un polluant par les sols mettent en jeu les coefficients de partage sur la matière humique liée à la surface des particules de sol (Chiou, 1983) ou la diffusion à travers les micropores tridimensionnels. Des études récentes montrent que la structure hétérogène de la matière organique permet à ces deux mécanismes de contribuer chacun à cette séquestration d'HAP (Weber et al., 1992, 1996 ; Xing et Pignatello, 1997).

Les interactions entre un sol et des polluants comme les HAP font appel à un processus à deux niveaux : Premièrement l'adsorption sur le matériel hydrophobe, deuxièmement la diffusion dans les pores (Weber et al., 1992, 1996 ; Xing et Pignatello, 1997). Dans ce modèle, le piégeage dans les micropores d'humine ne serait maximal qu'après le passage du polluant à

travers une couche frontière d'acides humiques et fulviques AH/AF (Xing et Pignatello, 1997; White et al., 1999). Les résultats obtenus par Bogan et Trbovic (2003) sont en faveur du premier modèle car les effets apparents de la porosité sur la biodisponibilité des HAP par piégeage dans des micropores d'humine sont faibles au départ et qu'ils ne concernent que des molécules à faible poids moléculaire. En fait il existe une différence de cinétique de diffusion entre les molécules à faible poids moléculaire et celles à haut poids moléculaire à travers la couche frontière AH/AF jusqu'à l'humine.

Un autre mécanisme impliquant la complexation des HAP aux substances humiques doit être aussi pris en compte surtout dans le cas des HAP à poids moléculaire élevé (De Paolid et Kukkonen, 1997). Dans des expériences de marquage d'HAP [^{14}C], Kästner, et al. (1999) ont observé deux phases de formation de résidus d'HAP: Dans la première phase, le composé original a été séquestré dans le sol, phénomène caractérisé par une extractibilité faible. Dans la deuxième phase, les métabolites sont incorporés dans les substances humiques après une dégradation microbienne de l'HAP (résidu biogénique de formation). Les métabolites des HAP subissent des réactions d'appariement oxydatif avec les composés phénoliques de la matière organique pour former des macromolécules humiques non hydrolysables. L'interaction des HAPs et de leurs métabolites avec la matière organique peut être réalisée simultanément par des liaisons non-covalentes (adsorption hydrophobe, complexes de transfert de charge, complexes d'échange ionique, ponts hydrogène et des liaisons covalentes (ester, éther, liaison carbone-carbone) (Richnow et al., 1994).

En général, les voies probables de mécanisme de formation de résidu à partir d'HAP marqués [^{14}C] dépendent des HAP parentaux, des métabolites obtenus, de l'activité de la biomasse ou du CO_2 libéré ainsi que de la matrice de complexation. Des études utilisant le carbone [^{14}C] ont montré qu'une grande partie du ^{14}C marqué des HAPs était presque inversiblement immobilisée dans des résidus non extractibles (Kästner, 1995). La réactivité chimique ou le niveau de formation de résidus liés peut varier de 7 à 90 % sur la base de la quantité d'HAP [^{14}C] apporté (Bollag et Loll, 1983, Kästner, et al 1999). Des études structurales impliquant des techniques de dégradation chimique ont donné des indications sur la présence de liaisons éther, ester et de liaison carbone-carbone entre les composés xénobiotiques et le résidu d'attachement (Richnow et al., 1997). La grande stabilité de ces résidus suggère que les métabolites liés à la matrice organique par des liaisons éther-, C-C- ou multivalentes deviennent des parties intégrantes de la matière humique (Bollag et Loll., 1983).

Ces liaisons covalentes exigent une réactivité spécifique des composés impliqués, une activation par des enzymes ou par des réactions d'oxydation chimique aboutissant à une perte

de l'identité chimique initiale des molécules liées. En fait, les acides hydroxynaphthoïques ou les autres métabolites d'HAP hydroxylés sont capables de donner des réactions de fusion oxydative avec d'autres composés organiques formant ainsi des molécules ayant les caractéristiques d'acides humiques telles que la solubilité alcaline, la précipitation par un acide, et un haut poids moléculaire. Ce résidu issu du processus d'humification est souvent appelé résidu biogénique puisque ce type de résidu provient d'une métabolisation microbienne. Kästner et al. (1999) suggèrent que le terme "carbone lié" au lieu de résidu lié doit être utilisé pour ce type de participation à la matière organique du sol.

Le schéma 7 présente les produits de dégradation microbienne de l'anthracène et leur contribution estimée à la formation des résidus non-extractibles dans la partie organique du sol.

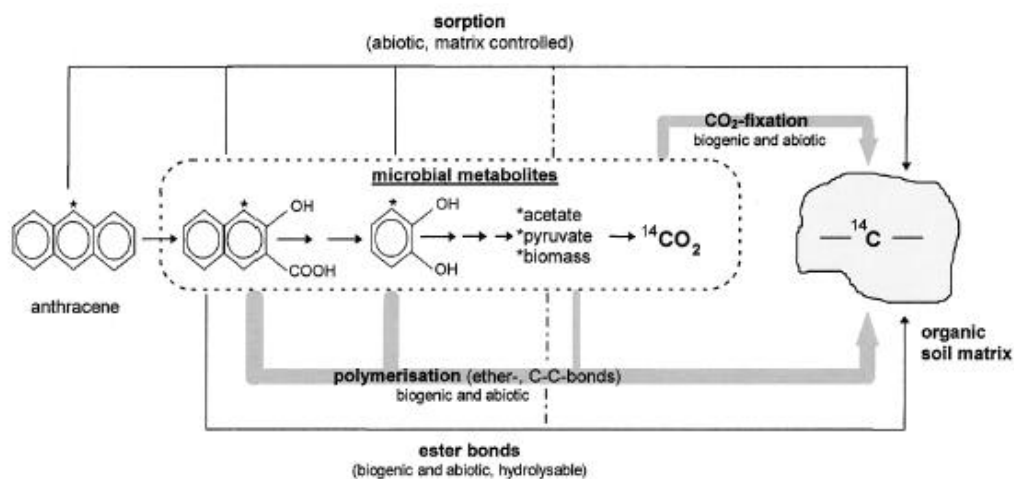


Schéma 7 : Devenir de l'anthracène et de ces métabolites de biodégradation dans le sol (Kästner et al., 1999).

Références bibliographiques

- ADEME, 1995a. Les micropolluants métalliques dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines, 209 p.
- ADEME, 1995b. Les micropolluants organiques dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines, 221 p.
- ADEME, 1996. La valeur azotée des boues résiduares des stations d'épuration urbaines, 336 p.
- ADEME, 1999. L'incinération des déchets et la santé publique : bilan des connaissances récentes et évaluation du risque - janvier, SFSP.
- ADEME. 2001. Les boues d'épuration municipales et leur utilisation en agriculture - dossier documentaire. p. 30.
- Ait Baddi, G., Albuquerque, J.A., González, J., Cegarra, J., Hafidi, M., 2004. Chemical and spectroscopic analyses of organic matter transformations during composting of olive mill wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, 1, 39-44.
- Alatrisme-Mondragon, F., Iranpour, R., Ahring, B.K., 2003. Toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate on the anaerobic digestion of wastewater sludge. *Water Research*, 37, 6, 1260-1269.
- Allen, A., 2001. Containment landfills: the myth of sustainability. *Engineering Geology*, 60, 1-4, 3-19.
- Alloway, A. 1995. Heavy metals in soils. Edition blackie academic&professional, 368 p.
- Almendros, G., Guadalix M.E., Gonzalez-Vila F.J., Martin F., 1996. Preservation of aliphatic macromolecules in soil humins. *Org. Geochem.* 24, 6/7, 651-659.
- Amir, S., Hafidi, M. Valorisation des boues de station d'épuration des eaux usées par un bio-procédé aérobie « compostage ». Troisième Symposium International Environnement, Catalyse et Génie des Procédés ECGP'3. 13-14 novembre 2000 à Fès, Maroc.
- Amlinger D., 2004. Heavy metals and organic compounds from wastes used as organic fertilisers, ENV.A.2./ETU/2001/0024, Compost-Consulting & Development, Perchtoldsdorf.
- Anderson, H.A., Bick, W., Hepburn, A., Stewart, M., 1989. Nitrogen in Humic Substances. In: Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S. (Eds.), *Humic Substances II. In Search of Structure*. Wiley-Interscience, Chichester, pp. 223-253.
- Atagana, H.I., 2004. Co-composting of PAH-contaminated soil with poultry manure. *Biotech. Appl. Microb.* 39, 2, 163-168.

ATSDR, 1990. «Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons», ATSDR/TP-90-20.

Bacon J.R., Hewitt, I.J. Copper, P. 2005. Reproducibility of the BCR sequential extraction procedure in a long-term study of the association of heavy metal with soil components in an upland catchment in Scotland. *Sci. Total Environ*, 337, 191-205.

Baek, S-O, Jenkins, R.A., 2004. Characterization of trace organic compounds associated with aged and diluted sidestream tobacco smoke in a controlled atmosphere—volatile organic compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmospheric Environment*, 38, 38, 6583-6599.

Bahij, J., Soudi B. 2003. Réutilisation des eaux usées épurées en agriculture aux Maroc : Bilan de plusieurs années de recherche. Réutilisation des eaux usées traitées et des sous-produits de l'épuration: Optimisation, Valorisation & Durabilité. Séminaire international. Tunis, 24-25 Septembre 2003.

Bavnick, H.F., 1989. Dutch Reference Values for Soil Quality. in Behrens & Wiesner. Frankfurt. Germany.

Bazin, B.H., Hesbet, A.L., Mahieu, C., Dornier, G., 2004. Point de connaissances ED 5010, INRS : Institut National de recherche et sécurité pour la prévention des accidents de travail et des maladies professionnelles, <http://www.inrs.fr>.

Belzile, N, Lecomte, P, Tessier, A, 1989. Testing readsorption of trace elements during partial chemical extractions of bottom sediments, *Environ. Sci. Technol.*, 23, 1015-1020.

Bengtsson, M., Tillman, A.M., 2004. Actors and interpretations in an environmental controversy: the Swedish debate on sewage sludge use in agriculture. *Resources, Conservation and Recycling*, 42, 1, 65-82.

Bermond. A., 2001. Limits of sequential extraction procedures re-examined with emphasis on the role of H⁺ ion reactivity. *Analytica Chimica Acta*, 445, 79–88.

Bernal, M.P. Sánchez-Monedero, M. A., Paredes, C., Roig, A., 1998. Carbon mineralization from organic wastes at different composting stages during their incubation with soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 69, 175-18.

Bernal, M.P., Navarro, A.F., Roig, A., Cegarra, J., Garcia, D., 1996. Carbon and nitrogen transformation during composting of sweet sorghum bagasse, *Biol. Fertil. Soil.*, 22, 141-148.

BodSch, 1998. Bundes-Bodenschutzverordnung. (Federal Soil Protection Rule) in Bodenschutz (Soil Protection) Erich Schmidt Verlag Berlin.

Bogan, B.W., Trbovic, V. 2003. Effect of sequestration on PAH degradability with Fenton's reagent: roles of total organic carbon, humin, and soil porosity. *Journal of Hazardous Materials*, 100, 1-3, 27, 285-300.

- Bollag, J.-M., Loll, M.J., 1983. Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experientia* 39, 1221–1231.
- Bonten, L.T.C., Grotenbuis, T.C., Rulkens, W.H., 1999. Enhancement of PAH biodegradation in soil by physicochemical pretreatment. *Chemosphere*, 38, 15, 3627-3636.
- Bouarab, L., 1988. Contribution à l'étude des différentes formes du phosphore dans le lagunage naturel: Station expérimentale de Marrakech. Thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 125 p.
- Bouhoum K, 1987. Devenir des œufs d'helminthes au cours d'un traitement expérimental d'épuration par bassin de stabilisation -Marrakech- Thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 95 p.
- Boukhars, L, 1997. effet de l'utilisation de différentes sources de métaux lourds (eaux usées brutes et traitées, boues, sels métalliques) sur leur transfert aux plantes-Rapport avec la salinité du sol. Thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 150 p.
- Boussaid A., 1987. Evolution des bactéries pathogènes: Salmonella et Aeromonas en comparaison avec les bactéries témoins de contamination fécale dans les bassins expérimentaux d'épuration par lagunage sous climat aride de Marrakech, thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Cadi, Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 95 p.
- Bousselhaj, K., 1996. Etude du potentiel fertilisant (N et P) de deux boues de stations d'épuration par lagunage anaérobie et par boues activées. Thèses de 3^{ème} cycle, Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 171 p.
- Brinton, W.F., 2000. Compost Quality in America, compost quality standards and guidelines. Woods End Research Laboratory, Inc.
- Buffle, J.F., Greter, L., Haerdi, W., 1977. Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrode. *Anal. Chem.* 49, 216–222.
- Canarutto, S., Petruzzelli, G., Lubrano, L., Guidi, G.V., 1991. How composting affects heavy metal content. *BioCycle*, 32, 48–50.
- Cartwright, C.D., Owen, S.A., Thompson, I.P., Burns, R.G., 2000. Biodegradation of diethyl phthalate in soil by a novel pathway. *FEMS Microbiology Letters*, 186, 1, 1, 27-34.
- Caussy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C. Ruedel, H. 2003. Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 1, 45-51.
- CCME (Canadian Council of the Ministers of the Environment), 1996. Guidelines for compost quality. CCME 106E, CCME Documents, Winnipeg, 11 pp.

CE, 2000. prolonging for the second time the validity of Decision 1999/815/EC concerning measures prohibiting the placing on the market of toys and childcare articles.

CEC, Council of the European Community, Working Document on Sludge, 3^d Draft, Brussels, 27 April, 2000, 20 p.

CEE N° 793/93 du 23 mars 1993. Evaluation et contrôle des risques présentés par les substances existantes (Mémorial A N°95, 16.12.93, p. 1750).

CEE, 2001. Disposal and recycling routes for sewage sludge. Part 3 – Scientific and technical report. <http://europa.eu.int>.

Cegarra, J., Paredes, C., Roig, A., Bernal, M.P., Garcia, D., 1996. Use of Olive Mill Wastewater Compost for Crop Production. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38, 3-4, 193-203.

Chang, A.C., Granato, T.C., Page, A.L., 1992. A methodology for establishing phyto-toxicity criteria for Cr, Cu, Ni, and Zn in agricultural land application of municipal sewage sludges. *J. Environ. Qual.*, 21, 521–536.

Chang, B.V.C., Yang, M., Cheng, C.H., Yuan, S.Y., 2004. Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains. *Chemosphere*, 55, 4, 533-538.

Chatterjee, S., Dutta, T.K., 2003. Metabolism of butyl benzyl phthalate by *Gordonia* sp. strain MTCC 4818. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309, 1, 12, 36-43.

Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y., 1998 b. Purification and Characterization of Laccase from *Chaetomium thermophilum* and Its Role in Humification. *Appl. Environ. Microb.*, 64, 9, 3175-3179.

Chefetz, B., Hadar, Y., Chen, Y., 1998 c. Dissolved Organic Carbon Fractions Formed during Composting of Municipal Solid Waste: Properties and Significance. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 26, 3, 172-179.

Chefetz, B., Hatcher, P.G., Hadar, Y. Chen, Y. 1998 a. Characterization of Dissolved Organic Matter Extracted from Composted Municipal Solid Waste. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 62, 326–332.

Chien, S-W.C. Huang, C.C. Wang, M-C. 2003. Analytical and spectroscopic characteristic of refuse compost-derived humic substances. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 1, 1, 62-71.

Chiou, C.T., Porter, P.E., Schmedding, D.W., 1983. Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. *Environ. Sci Technol.*, 17, 227-231.

Ciavatta, C., Govi, M., Pasotti, L., Sequi, P., 1993. Changes in organic matter during stabilization of compost from municipal solid waste. *Bioresource Technol.*, 43, 141-145.

Cripps, R.W., Winfree, S.K., Reagan, J.L., 1992. Effects of sewage sludge application method on corn production. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 23, 1705–1715.

Davey, E.W., Perez, K.T., Soper, A.E., Lackie, N. F., Morrison, G. E., Johnson, R.L., Heltsh, J.F., 1990. Significance of the surface microlayer to the environmental fate of di (2-ethylhexyl) phthalate predicted from marine microcosms. *Marine Chemistry*, 31, 1-3, 231-26.

de Bertoldi, M., Vallini, G., Pera, A., 1983. The biology of composting: a review. *Waste Mngmt Res.* 1, 157-176.

De Paolid, F., Kukkonen, J., 1997. Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids: influence of pH and the structure of humic material. *Chemosphere*, 34, 8, 1693-1704.

de Silóniz, M.I., Payo, E.M., Callejo, M-A., Marquina, D. Peinado, J.M., 2002. Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. *Research in Microbiology*, 153, 3, 173-180.

Déziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F. Bisailon, J-G., 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1908–1912.

Di Toro, D.M., Zarba, C.S. Hansen, D.J. Berry, W.J. Swanz, R.C., Cowan, C.E., Pavlou, S.P., Allen, H.E., Thomas, N.A., Paquin., P.R., 1991. Technical Basis for Establishing Sediment Quality Criteria for Nonionic Organic Chemicals by Using Equilibrium Partitioning. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 12, 1541-1586.

Directive 1999/31/CE du Conseil du 26 avril 1999 concernant la mise en décharge des déchets.

Dousset, S., Morel, J.L., Wiart, J. 1999. Influence du chaulage sur la biodisponibilité des ETM incorporés au sol lors de l'épandage de boues de traitement. *Etudes et gestion des sols.* 6, 2, 105-114.

Duchaufour, P., 1991. *Pédologie, sol, végétation, environnement*, 3^{ième} édition, Masson Co.

EC, European Commission. 2001. Extensive wastewater treatment processes adapted to small and medium sized communities. Office of publications of the European Community. Luxembourg, 40 pp.

Echab, A., Nejmeddine A, Hafidi, M., Kaemmerer, M., Guiresse, M., Revel, J.C., 1998. Evolution de la fraction échangeable des éléments métalliques traces (Pb, Cu, Zn et Cd) lors du compostage des boues de lagunage. *Agrochimica*, XLII–6.

Ecrin, 2000. Que faire des boues ? (What doing with sludge?), Club Environnement et société. December 2000 - www.ecrin.asso.fr.

- Ejlertsson, J., Alnervik, M., Jonsson, S., Svensson, B.H., 1997. Influence of water solubility, side-chain degradability and side-chain structure on the degradation of phthalic acid esters under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2761–2764.
- Elenbogen, G., Sawyer, B., Lue-Hing, C., Zenz, D.R., 1993. Sludge metal species as determined by their solubilities in different reagents phase I report “Research and development department, Report N°83-31”, The Metropolitan Water Reclamation District of Greater Chicago.
- El-Fadel, M., Khoury, R., 2000. Modeling Settlement in MSW Landfills: a Critical Review. *Critical Reviews in Environ. Sci. Technol.* 30, 3, 327-361.
- Eljarrat, E., Barcelo, D., 2003. Priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 10, 655-665.
- Engebretson, R.R., Wandruszka, R.V. 1997. The effect of molecular size on humic acid associations. *Org. Geochem.* 26, 11-12, 759-767.
- EU-directive (2000/76/EC) of the European Parliament and of the Council of 4 December 2000. on the Incineration of Waste.
<http://www.Scotland.gov.uk/library5/environment/iecda.pdf>
- Falcy, M. Jargot, D. Laudet-Hesbert, A. Miraval, S., Pasquier, E., Protois, J.C. (2004). Phthalate de bis(2-éthylhexyle). Fiche Toxicologique N°161.
- Fars, S., 1994. Etude de l'élimination des métaux lourds (Cu, Zn, Pb et Cd) contenus dans les eaux usées de Marrakech par quatre systèmes expérimentaux : Lagunage anaérobie, Lagunage aéro-anaérobie, Sur-irrigation drainage et infiltration-percolation. Thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 157 p.
- Flaig, W., 1964. Effects of microorganisms in the transformations of lignin to humic substances. *Geochim. Cosmochem. Acta*, 28, 1523-1535.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., Wenzel, A., 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research.* 36,1429–1438.
- Garrec, N., Picard-Bonnaud, F., Pourcher, A.M., 2003. Occurrence of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 35, 3, 275-28.
- Gavala, H.N., Alatrisme-Mondragon, F., Iranpour, R., Ahring, B.K., 2003. Biodegradation of phthalate esters during the mesophilic anaerobic digestion of sludge. *Chemosphere*, 52, 4, 673-682.

- Gibson, D.T., Mahadevan, V., Jerina, R.M., Yagi, H., Yeh, H.J.C., 1975. Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science* 189, 295-297.
- Gómez Ariza, J.L., Giráldez, I., Sánchez-Rodas, D., Morales, E., 2000. Selectivity assessment of a sequential extraction procedure for metal mobility characterization using model phases. *Talanta*, 52, 3, 545-554.
- Gonzalez-Vila, F.J., Lankes, U., Ludemann, H.D., 2001. Comparison of the information gained by pyrolytic techniques and NMR spectroscopy on the structural features of aquatic humic substances. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 58–59, 349–359.
- Gourdon, R., 2001. Traitement biologique des déchets, *Techniques de l'Ingénieur, traité Environnement G2*, 16 p.
- Gove, L., Cooke, C.M., Nicholson, F.A., Beck, A.J., 2001. Movement of water and heavy metals (Zn, Cu, Pb and Ni) through sand and sandy loam amended with biosolids under steady-state hydrological conditions. *Bioresource Technol.*, 78, 2, 171-179.
- Granato, T.C., Sauyer, B., Elenbogen, G., Zenz, D.R., Rao, K.C., Lue-Hing, C., 1993. Effect of sludge type, total soil metal concentration, and the concentration of metal in chemical fractions of sludge amended soil on the accumulation of Cd, Cr, Ni and Zn in spinach leaf. Report n° 93-11. Metropolitan water reclamation district of greater Chicago, Research and Development Department, June 1993.
- Grimberg, S.J., Stringfellow, W.T., Aitken, M.D., 1996. Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant, *Appl., Environ., Microbiol.*, 62, 2387-2392.
- Grishchenkov, V.G., Townsend, R.T., McDonald, T.J., Autenrieth, R.L., Bonner, J.S., Boronin, A.M., 2000. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochemistry*, 35, 9, 889-896.
- Gu, J.-D., Li, J., Wang, Y., 2004. Degradation of the endocrine-disrupting dimethyl phthalate ester isomers by aerobic microorganisms isolated from mangrove sediment. In: W. Verstraete (Ed.) *European Symposium on Environmental BioTechnol.*, A.A. Balkema Publishers, The Netherlands, pp. 557–561.
- Guerin, W.F., Jones, G.E., 1988. Two stage mineralisation of phenanthrene by estuarine enrichment cultures. *Appl. Environ. Microb.* 54, 929-936.
- Guibaud, G., Tixier, N., Bouju, A., Baudu, M., 2003. Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere*, 52, 10, 1701-1710.

Halim, M., Conte, P., Piccolo, A., 2003. Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. *Chemosphere*, 52, 1, 265-275.

Hammel, K.E., Gai, Z.G., Green, B., Moen, M.A., 1992. Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microb*, 58, 1831-1838.

Harter, R.D., Naidu, R., 1995. Role of metal-organic complexation in metal sorption by soils. *Adv. Agron.*, 55, 219–261.

Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, A., Cherif, M., Boudabous, A., 2001. Microbial characterisation during composting of municipal solid waste. *Bioresource Technol.*, 80, 217-225.

Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L. 1989. *Humic Substances II - In Search of Structure*. Swift, R. S. (eds.), Wiley, Chichester.

He, Q.B., Singh, B.R., 1995. Cadmium availability to plants as affected by repeated applications of phosphorus fertilizers. *Acta Agric. Scand. B* 45, 22–31.

Herrmann, R., Shann. J.R., 1993. Enzyme activities as indicators of MSW compost maturity. *Compost Sci. Util.*, 1, 4, 54-63.

Hertkorn, N., Permin, A., Perminova, I., Kovalevskii, D., Yudov, M., Petrosyan, V., Kettrup, A., 2002. Comparative Analysis of Partial Structures of a Peat Humic and Fulvic Acid Using One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Environ. Qual.* 31, 375–387.

Hogan, J.A., 1997. Composting for soil remediation. In *Biological treatment of hazardous wastes*. Edited by G.A. Lewandowski and L.J. De Filippi. John Wiley & Sons, New York, N.Y., pp. 373–395.

Hooda, P.S., Alloway, B.J., 1993. Effects of time and temperature on the bioavailability of Cd and Pb from sludge-amended soils. *J. Soil Sci.* 44, 97-110.

Horn, A.L., Düring, R-A. Gäth, S., 2003. Comparison of decision support systems for an optimised application of compost and sewage sludge on agricultural land based on heavy metal accumulation in soil. *The Sci. Total. Environ.* 311, 1-3, 35-48.

Howard, P.H., Banerjee, S., Robillard, K.H., 1985. Measurement of Water Solubilities, Octanol/Water Partition Coefficients and Vapor Pressures of Commercial Phthalate Esters. *Environ. Tox. Chem.*, 4, 5, 653-661.

- Hsu, J.H., Lo, S.L., 1999. Recycling of separated pig manure: characterization of maturity and chemical fractionation of elements during composting. *Water Science and Technol.*, 40, 1, 121-127.
- Huang, F., Wong, J.W.C., Wu Q.T., Nagar, B.B., 2004. Effect of C/N on composting of pig manure with sawdust. *Waste Management*. 24, 8, 805-813.
- Huang, P.M., 2000. Abiotic catalysis. In: Sumner, M.E. (Ed.), *Handbook of Soil Science*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. B303–B332.
- Iannotti, D.A., Pang, T., Toth, B.L., Elwell, D.L., Keener, H.M., Hoitink. H.A.J., 1993. A quantitative respirometric method for monitoring compost stability. *Compost Sci. Util.* 1, 52-65.
- IARC, 1994. International Agency for Research on Cancer Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Monograph N° 60, 389-435.
- Ikan, R., Rubinsztain, Y., Nissenbaum, A., Kaplan, I.R., 1996. Geochemical aspects of the Maillard Reaction. In: Ikan, R. (Ed.), *The Maillard Reaction: Consequences for the Chemical and Life Sciences*. John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 1–25.
- Inbar, Y., Chen, Y., Hadar, Y., Verdonck, O., 1988. Composting of agricultural wastes for their use as container media: Simulation of the composting process. *Biological Wastes*, 26, 4, 247-25.
- Inbar, Y., Chen, Y., Hadar, Y., 1990. Humic substances formed during the composting of organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54, 1316-1323.
- Inoue, S. Sawayama, S. Ogi, T., Yokoyama, S-Y. 1996. Organic composition of liquidized sewage sludge. *Biomass and Bioenergy*, 10, 1, 37-40.
- Jarde, E., Mansuy, L., Faure, P., 2003. Characterization of the macromolecular organic content of sewage sludges by thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography-mass spectrometer (THM-GC/MS). *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 68-69, 331-350.
- Jianlong, W., Ping, L., Yi, Q., 1999. Microbial metabolism of di-butyl phthalate (DBP) by a denitrifying bacterium. *Process Biochemistry*, 34, 6-7, 745-749.
- Jianlong, W., Xuan Z., Weizhong, W., 2004. Biodegradation of phthalic acid esters (PAEs) in soil bioaugmented with acclimated activated sludge. *Process Biochemistry*, 39, 12, 1837-1841.
- Jiménez, E.I., Garcia, V.P., 1992 a. Composting of domestic refuse and sewage sludge. I. Evolution of temperature, pH, C/N ratio and cation-exchange capacity. *Bioresource Technol.*, 41, 3, 265-272.

Jiménez, E-I., Garcia, V-P., 1989. Evaluation of city refuse compost maturity: a review. *Biological Wastes*, 27, 2, 115-142.

Jiménez, E-I., Garcia, V-P., 1992 b. Composting of domestic refuse and sewage sludge. II. Evolution of carbon and some "humification" indexes. *Resources, Conservation and Recycling*, 6, 3, 243-257.

Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133, 1, 71-84.

Johnson, B.T., Heitkamp, M.A., Jones, J.R., 1984. Environmental and chemical factors influencing the biodegradation of phthalic acid esters in freshwater sediments. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, 8, 2, 101-118.

Jokic, A., Frenkel, A.I., Vairavamurthy, M., Huang, P.M., 2001. Birnessite catalysis of the Maillard reaction: its significance in natural humification. *Geophysical Research Letters* 28, 3899–3902.

Jokic, A., Wang, M.C., Liu, C., Frenkel, A.I., Huang, P.M., 2004. Integration of the polyphenol and Maillard reactions into a unified abiotic pathway for humification in nature: the role of d-MnO₂. *Org. Geochem.* 35, 747–762.

Jonsson, S. Ejlertsson, J. Ledin, A. Mersiowsky I., Svensson, B.H. 2003. Mono- and diesters from o-phthalic acid in leachates from different European landfills. *Water Research*, 37, 3, 2003, 609-617.

Jouaraiphy, A., Amir, S., El Gharous, M., Hafidi, M. Traitement de boues de station d'épuration des eaux résiduaires par compostage (Cas de la Station de boues activées de Khouribga, Maroc). 5^{ème} Colloque sur la Matière Organique Naturelle, 26-28 Mars, 2003, Clermont-Ferrand, France.

Joyce, J.F., Sato, C., Cardenas, R., Surampali, R., 1998. Composting of polycyclic aromatic hydrocarbons in simulated municipal solid waste. *Water Environ. Res.*, 70, 356–361.

Juhasz, A.L., Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45, 1-2, 57-88.

Kabala, C., Singh, B.R., 2001. Fractionation and Mobility of Copper, Lead, and Zinc in Soil Profiles in the Vicinity of a Copper Smelter. Technical Report : Heavy Metals in the Environment. *J. Environ. Qual.*, 30, 485-492.

Kaemmerer, M., Guiresse, M., Revel, J.C., Koetz, P., Facal, P., Rey, F. 1999. Conductimetric behaviour of humic acids with Cu(II) ions. *Analisis*, 27, N° 5.

- Kakii K., Kitamura, S. Shirakashi, T. Kuriyama, M. 1986. Comparison of mucilage polysaccharides extracted from sewage activated sludge. *J. Ferment. Technol.*, 64, 1, 51-56.
- Karimi-Lotfabad, S., Pickard, M., Gray, M., 1996. Reactions of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons on Soil. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 1145-1151.
- Karvelas, M., Katsoyiannis, A. Samara, C. 2003. Occurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment process. *Chemosphere*, 53, 10, 1201-1210.
- Kästner, M., Lotter, S. Heerenklage, J. Breuer-Jammali, M. Stegmann, R., Mahro, B., 1995. Fate of ¹⁴C-labeled anthracene and hexadecane in compost manured soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1128–1135.
- Kästner, M., Streibich, S., Beyrer, M., Richnow, H.H., Fritsche, W., 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of [¹⁴C] anthracene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1834-1842.
- Keeling, A.A., McCallum, K.R., Beckwith, C.P. 2003. Mature green waste compost enhances growth and nitrogen uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.) through the action of water-extractable factors. *Bioresource Technol.*, 90, 127–132.
- Kenworthy, I.P. Hayes, M.H.B. 1997. Investigations of some structural properties of humic substances by fluorescence quenching. In M.H.B. Hayes and W.S. Wilson (eds), *Humic Substances, Peats, and Sludges. Health and Environmental Aspects.* The Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 39-45.
- Khalis, M., Sekkaki, A., Irigaray, J.L., Revel, C.F.G., 1997. Etude de l'influence du milieu environnant sur la composition minérale d'une rivière marocaine en utilisant l'activation neutronique et l'ICP/MS: Environmental control of Boufekrane river water basins by neutron activation analysis and ICP/MS. *Water Research*, 31, 11, 2930-2934.
- Kjeldsen, P., Barlaz, M.A., Rooker, A.P., Baun, A., Ledin, A., Christensen, T.H., 2002. Present and Long-Term Composition of MSW Landfill Leachate: A Review. *Critical Reviews in Environ. Sci. Technol.* 32, 4, 297-336.
- Klamer, M, Baath, E. 1998. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis *FEMS Microbiology Ecology*, 27, 9-20.
- Kleerebezem, R., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G., 1999. Anaerobic degradation of phthalate isomers by methanogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3, 1152–1160.
- Klöpffer, W., 1996. Environmental hazard assessment of chemicals and products. Part V. Anthropogenic chemicals in sewage sludge. *Chemosphere*, 33, 1067-1081.

- Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter, *Soil Biol. Biochem.* 34, 139-169.
- Koivula, N. Hänninen, K., 2001. Concentrations of monosaccharides in humic substances in the early stages of humification. *Chemosphere.* 44, 271-279.
- Komilis, D.P., Ham, R.K., Stegmann, R., 1999. The effect of municipal solid waste pretreatment on landfill behavior: a literature review. *Waste Management and Research*, 17 1, 10–19.
- Kononova, M.M., 1966. *Soil Organic Matter*. Elmsford, NY: Pergamon.
- Kulcu, R., Yaldiz, O. 2004. Determination of aeration rate and kinetics of composting some agricultural wastes. *Bioresource Technol.*, 93, 49–57.
- Lambkin, D., Nortcliff, S., White, T., 2004. The importance of precision in sampling sludges, biowastes and treated soils in a regulatory framework *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 10-11.
- Langenkamp, H. Part, P. W. Erhard, A. Prüß. Organic contaminants in sewage sludge for agricultural use, 73 p. <http://www.umeg.de>.
- Lega, R., Ladwig, G., Meresz, O, Clement, R.E., Crawford, G., Salemi, R., Jones, Y., 1997. Quantitative determination of organic priority pollutants in sewage sludge by GC/MS. *Chemosphere*, 34, 1705-1712.
- Leinweber, P., Schulten, H.R., 1999. Advances in analytical pyrolysis of soil organic matter. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 49, 359-583.
- Leita, L., De Nobili, M., 1991. Water-soluble fractions of heavy metals during composting of municipal solid waste. *J. Environ. Qual.* 20, 73–78.
- Lemière, B., Seguin, J.J., Le Guern, C., Guyonnet, D., Baranger, Ph., Darmendrail, D., Conil, P., 2001. Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. Applications dans un contexte d'évaluation détaillée des risques pour les ressources en eau. Eds. BRGM 300. Orléans.
- Lemieux, P.M., Lutes, C.C., Santoianni. D.A., 2004. Emissions of organic air toxics from open burning: a comprehensive review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 30, 1, 1-32.
- Liang, C., Das, K.C., McClendon, R.W., 2003. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. *Bioresource Technol.*, 86, 131–137.

- Liu, X., Cole, M.A., 1996. "Minimum Effective Compost Addition for Remediation of Pesticide contaminated Soil." In *The Science of Composting*, by M. de Bertoldi, P. Bert, and P. Tiziano, 903-912. London: Blackie Academic and Professional.
- Lo, I.M.C., Yang, X.Y., 1998. Removal and redistribution of metals from contaminated soils by a sequential extraction method. *Waste Management*, 18, 1, 1-7.
- Logan, T.I., Chaney, R.L. 1983. Utilization of municipal wastewater and sludge on land-Metals. In: Page, A.L. et al., eds. *Proc workshop on utilization of municipal wastewater and sludge on land*. Riverside, CA: University of California.
- Logan, T.J., B.J. Harrison, L.E. Goins, and J.A. Ryan. 1997. Field assessment of biosolids metal bioavailability to crop: Sludge rate response. *J. Environ. Qual.* 26, 534-550.
- Looser, M.O., Parriaux, A., Bensimon, M., 1999. Landfill underground pollution detection and characterization using inorganic traces. *Water Research*, 33, 17, 3609-3616.
- Luers, F., Hulscher, E.M., 1996. Temperature effect of the partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons between natural organic matter and water, *Chemosphere*, 33, 643-657.
- Madejón, E., López, R., Murillo, J.M., Cabrera, F., 2001. Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 84, 55-65.
- Madsen, P., Thyme, J., Henriksen, K., Moldrup, P., Roslev, P., 1999. Kinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate mineralization in sludgeamended soil. *Environ. Sci. Technol.* 33, 15, 2601-2606.
- Madsen, T., Kristensen, P., Samsö-Petersen, L., Törslöv, J. Rasmussen, J. O., 1997. Application of sludge on farmland - quality objectives, level of contamination and environmental risk assessment.-Specialty conference on management and fate of toxic organics in sludge applied to land. Copenhagen, 30 April - 2 may 1997.
- Magdi, T.A., Horiuchi, T., Oba, S., 2004. Composting of rice straw with oilseed rape cake and poultry manure and its effects on faba bean (*Vicia faba* L.) growth and soil properties. *Bioresource Technol.*, 93, 2, 183-189.
- Mahaffey, W.R., Gibson, D.T., Cerniglia, C.E., 1988. Bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz [a]anthracene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2415-2423.
- Maillard, L.C., 1913. Formation de matieres humiques par action de polypeptides sur sucres. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 156, 148-149.

- Martin, J.P., Haider, K., 1971. Microbial activity in relation to soil humus formation. *Soil Sci.*, 111, 54-63.
- Marttinen, S.K., Kettunen, R.H., Rintala, J.A., 2003. Occurrence and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates. *The Science of the Total Environment*, 301, 1-12.
- Marttinen, S.K., Kettunen, R.H., Sormunen, K.M., Rintala, J.A., 2003. Removal of bis(2-ethylhexyl) phthalate at a sewage treatment plant. *Water Research*. 37, 6, 1385-1393.
- Mathur, S.P., Downen, G., Dinel, H., Schnitzer, M., 1993. Determination of compost biomaturity. I. Literature review. *Biol. Agri. Horticult.* 10, 65-85.
- Mazlani, S., 1988. Présence et évaluation de l'écotoxicité par bioessai des métaux lourds dans les eaux usées de la ville de Marrakech (Maroc). Suivi de l'épuration par lagunage naturel. Thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 111 p.
- McBride, M.B., 1995. Toxic metal accumulation from agricultural use of sludge: Are the USEPA regulations protective?. *J. Environ. Qual.*, 24, 5-18.
- McBride, M.B., 2003. Toxic metals in sewage sludge-amended soils: has promotion of beneficial use discounted the risks?. *Advances in Environmental Research*, 8, 5-19.
- McBride, M.B., Richards, B.K., Steehuis, T., Russo, J.J., Sauve, S., 1997. Mobility and solubility of toxic metals and nutrients in soil fifteen years after sludge application. *Soil Sci.* 162, 487-500.
- McGrath, S.P., Cegarra, J., 1992. Chemical extractability of heavy metals during and after long-term applications of sewage sludge to soil. *J. Soil Sci.*, 43, 313-321.
- McMillen, S.J., Gray, N.R., 1994, "Biotreatment of Exploration and Production Wastes," SPE 27135, presented at the Second International Conference on Health, Safety & Environment in Oil & Gas Exploration and Production, Jakarta, Indonesia, January, 25-27.
- Means, J.C., Wood, S.G., Hassett, J.J., Banwart, W.L., 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.*, 14, 1524-1528.
- Miller, F.C., 1996. Composting of municipal solid waste and its components. In *Microbiology of solid waste*. Edited by Palmisano, A.C., and Barlaz, N.A. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 115-154.
- Mininni, G, Sbrilli, A, Guerriero, E, Rotatori, M., 2004. Dioxins and furans formation in pilot incineration tests of sewage sludge spiked with organic chlorine. *Chemosphere*, 54, 1337-1350.

- Mondini, C., Fornasier, F., Sinicco, T., 2004. Enzymatic activity as a parameter for the characterization of the composting process. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1587–1594.
- Moreno, J.L., García, C., Hernández, T., Pascual, J.A., 1996. Transference of heavy metals from a calcareous soil amended with sewage-sludge compost to barley plant. *Bioresource Technol.*, 55, 3, 251-258.
- Moretti, C.J., Neufeld, R.D., 1989. PAH partitioning mechanisms with activated sludge. *Water Research*, 23, 1, 93-102.
- Morris, P.J., Shelton, M.E., Chapman, P.E., In *Bioremediation of Recalcitrant Organics*, Hinchee, R.E., Hoepfel, R.E., Anderson, D.B., Eds., Battelle Press: Columbus, OH, 1995, pp 123-130.
- Murphy, E.M., Zachara, J.M., Smith, S.C., Phillips, J.L., Wietsma, T.W., 1994. Interaction of hydrophobic organic compounds with mineral-bound humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 1291-1299.
- Mustin, M., 1987. *Le Compost, gestion de la matière organique*. Ed. François Dubusc, Paris, 954 p.
- Nammari, D.R., Hogland, W., Marques, M., Nimmermark, S., Moutavtchi, V., 2004. Emissions from a controlled fire in municipal solid waste bales. *Waste Management*, 24, 9-18.
- Niazi, J.H., Prasad D.T., Karegoudar, T.B., 2001. Initial degradation of dimethylphthalate by esterases from *Bacillus* species. *FEMS Microb Lett.*, 196, 2, 15, 201-205.
- Nicholson, F.A., Smith, S.R., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C., Chambers, B.J., 2003. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Sci. Total Environ*, 311, 1-3, 205-219.
- Nielsen, T., Siigur, K., Helweg, C., Jørgensen, O., Hansen, P.E., Kirso, U. 1997. Sorption of polycyclic aromatic compounds to humic acid as studied by high-performance liquid chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 1102-1108.
- Nimz, H. 1974. Beech lignins : proposal of a constitutional scheme. *Angew. Chem. Int. Ed.* (13) : 313-321.
- Nirel, P.M.V., Morel, F.M.M., 1990. Pitfalls of sequential extractions. *Water Res.*, 24, 1055-1056.
- NSDEL, Nova Scotia Department of Environment and Labour 2001. Report on Assessing Compost Maturity.

Office International de l'Eau, 2001. développer les compétences pour mieux gérer l'eau la stabilisation des boues de station d'épuration : techniques de mesure du procédé.

OMS (Organisation Mondiale de la Santé). 1989. Technical Report Series No 778. Health guidelines for the Use of Wastewater in Agriculture and Aquaculture, Rapport d'un Groupe Scientifique de l'OMS. Genève: Organisation Mondiale de la Santé, 74 p.

Ouatmane A., 2000. Etude du compostage de quelques déchets organiques : I– Approche physico-chimique, calorimétriques et spectroscopique de l'étude de l'état de maturation des composts. II-Analyse qualitative et quantitative de la fraction humique, Thèse de Doctorat d'Etat es-science, Faculté de Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc, 170 p.

Ouatmane A., Dorazio V, Hafidi M., Revel J.C., Senesi N., 2000. Elemental and spectroscopic characterization of humic acids fractionated by gel permeation chromatography, *Agronomie*, 20 491-504.

Ouazzani, N., 1987. Lagunage expérimental à Marrakech. Variations des paramètres physico-chimiques. Thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 84 p.

Ouédraogo, E., Mando, A. Zombré, N.P., 2001. Use of compost to improve soil properties and crop productivity under low input agricultural system in West Africa. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 84, 259-266.

Pal, S., 1992. Nature and properties of soil humic acid as influenced by incorporation of different plant materials. *Plant and soil*. 16, 11-15.

Pal, S., Bollag, J.-M., Huang, P.M., 1994. Role of abiotic and biotic catalysts in the transformation of phenolic compounds through oxidative coupling reactions. *Soil Biol. Biochem.* 26, 813–820.

Paré, T., Dinel, H., Schnitzer, M., 1999. Extractability of trace metals during co-composting of biosolids and municipal solid wastes. *Biol. Fertil. Soils*, 29, 31–37.

Patrick, W.H., Verloo, M., 1998. Distribution of soluble heavy metals between ionic and complexed forms in a saturated sediment as affected by pH and redox conditions. *Water Science and Technol.*, 37, 6-7, 165-173.

Pérez, S., Farré, M., Garcia, M.J., Barceló, D., 2001. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge and their contribution to its toxicity in the ToxAlert[®]100 bioassay. *Chemosphere*, 45, 705-712.

Pérez, S., Guillamón, M., Barceló, D., 2001. Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from wastewater treatment plants. *Journal of Chromatography A*, 938, 1-2, 57-65.

- Petruzzelli, G., 1989. Recycling wastes in agriculture: heavy metal bioavailability. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 27, 1-4, 493-503.
- Petruzzelli, G., Ottaviani, L., Lubrano, L., Veschetti, E., 1994. Characterization of heavy metal mobile species in sewage sludge for agricultural utilisation. *Agrochimica* 38. 277-284.
- Piatt, J.J., Backhus, D.A., Capel, P.D., Eisenreich, S.J., 1996. Temperature-dependent sorption of naphthalene; phenanthrene; and pyrene to low organic carbon aquifer sediments, *Environ. Sci. Technol.* 30, 751-760.
- Piccolo, A., 2002. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.*, 75, 57-134.
- Piccolo, A., Nardi, S., Concheri, G., 1996. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size-exclusion chromatography. *Chemosphere*, 33, 595-602.
- Pichtel, J., Anderson, M., 1997. Trace metal bioavailability in municipal solid waste and sewage sludge composts. *Bioresource Technol.* 60, 223-229.
- Planquart, P., Bonin, G., Prone, A., Massiani, C., 1999. Distribution, movement and plant availability of trace metals in soils amended with sewage sludge composts: application to low metal loadings. *Sci. Total Environ.*, 241, 1-3, 161-179.
- Prevot H. La récupération de l'énergie issue du traitement des déchets. Rapport du Conseil général des mines. Juillet 2000. <http://www.environnement.gouv.fr/telch/2001-t3/010731-rapport-prevot-dechets-energie.pdf>.
- Prost, A., 1991. L'évolution des normes d'hygiène pour l'emploi des eaux résiduaires, Session Spéciale N° 5, Réutilisation des eaux usées, VIIème Congrès Mondial des Ressources en Eau, 13 - 18 mai 1991, Rabat, Maroc, pp. 21-26.
- Quantin, C., Joner, E.J., Portal, J.M., Berthelin, J., 2005. PAH dissipation in a contaminated river sediment under oxic and anoxic conditions. *Environmental Pollution*, 134, 2, 315-322.
- Quevauviller, Ph., 1998 a. Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis. I. Standardization. *trends in analytical chemistry*, 17, 5, 289-298.
- Quevauviller, Ph., 1998 b. Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis II. Certified reference materials. *trends in analytical chemistry*, 17, 10. 632-642.
- Rada, A., 1996. Etude de la contamination métalliques des sols de la zone d'épandage des eaux usées de la ville de Marrakech (Maroc): contribution du fond géochimiques et des apports anthropogéniques dans le transfert du cadmium dans un système sol-plante. Thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 153 p.

- Ramos, G., Hernandez, L.M., Gonzalez, M.J., 1994. Sequential fractionation of copper, lead, cadmium, and zinc in soils from or near Donana National Park. *J. Environ. Qual.*, 23, 50-57.
- Rauret, G., 1998. Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. *Talanta*, 46, 449-455.
- Rauret, G., Rubio, R., Lopez-Sanchez, J.F., 1989. Optimization of Tessier procedure for metal solid speciation in river sediments. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 36, 69-83.
- Richnow, H.H., Eschenbach, A., Mahro, B., Seifert, R., Wehrung, P., Albrecht P., Michaelis, W., 1998. The use of ¹³C-labelled polycyclic aromatic hydrocarbons for the analysis of their transformation in soil. *Chemosphere*, 36, 10, 2211-2224.
- Richnow, H.H., Seifert, R., Hefter, J., Kästner, M., Mahro, B., Michaelis, W., 1994. Metabolites of xenobiotica and mineral oil constituents linked to macromolecular organic matter in polluted environments. *Org. Geochem.*, 22, 671-681.
- Richnow, H.H., Seifert, R., Hefter, J., Link, M., Francke, W., Schaefer, G., Michaelis, W., 1997. Organic pollutants associated with macromolecular soil organic matter - a mode of binding. *Org. Geochem.* 26, 745-758.
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sanchez-Monedero, M.A., 2004. The use of elemental sulphur as organic alternative to control pH during composting of olive mill wastes. *Chemosphere*, 57 1099-1105.
- Sabatini, D.A., Knox, R.C., Harwell, J.H., 1996. Surfactant-Enhanced DNAPL Remediation: Surrfactant Selection, Hydraulic Efficiency, and Economic Factors, U.S. EPA Environmental Research Brief number EPA/600/S-96/002.
- Sahlström, L., Aspan, A., Bagge, E., Tham M.L.D., Albihn, A., 2004. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Research*, 38, 1989-1994.
- Saiz-Jimenez, C., Senesi, N., de Leeum, J.W., 1989. Evidence of lignin residues in Humic acids isolated from vermicomposts. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 15, 121-128.
- Sanchez-Monedero, M.A., Mondini, C., de Nobili, M., Leita, L., Roig, A., 2004. Land application of biosolids. Soil response to different stabilization degree of the treated organic matter. *Waste Management.* 24, 325-332.
- Sanchez-Monedero, M.A., Roig, A., Cegarra, J., Bernal, M.P., 1999. Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting. *Bioresource Technol.*, 70, 193-201.

Schlautman, M.A., Morgan, J.J., 1993. Binding of a fluorescent hydrophobic organic probe by dissolved humic substances and organically-coated aluminum oxide surfaces. *Environ. Sci. Technol.*, 27, 2523-2532.

Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., Warshawsky, D., 1996. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 13-19.

Schnitzer, M., Khan, S.U., "Humic Substances in the Environment", Marcel Dekker, Inc., New York, 1972.

Scholz, N., 2003. Ecotoxicity and biodegradation of phthalate monoesters. *Chemosphere*, 53, 8, 921-926.

Schulten, H.R., 1999 . Interactions of Dissolved Organic Matter with Xenobiotic Compounds: Molecular Modeling in Water. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1643-1655.

Schulten, H.R., Leinwebe, P., 1996. Characterization of humic and soil particles by pyrolysis and computer modeling analytical. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 38, 1-53.

Schulten, H.R., Schnitzer, M., 1993. A State-of-the-Art Structural Concept for Humic Substances. *Naturwissenschaften* 80, 29-30.

Schulten, H-R., 2001. Marianne Thomsen and Lars Carlsen. Humic complexes of diethyl phthalate: molecular modelling of the sorption process. *Chemosphere*, 45, 3, 357-369.

Scotland, R., 2004. Factsheet on the benefits of using compost for scottish crops. http://www.remade.org.uk/Organics/organics_documents/compostbenefitsscottishcrops.pdf.

Sekhar, K.C., Chary, N.S., Kamala, C.T., Raj, D.S.S., Rao, A.S., 2004. Fractionation studies and bioaccumulation of sediment-bound heavy metals in Kolleru lake by edible fish. *Environment International*. 29, 7, 1001-1008.

Semple, K.T., Reid, B.J., Fermor, T.R., 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*, 112, 269-283.

Senesi N., Miano T.M., Brunetti G., Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances, in: A. Piccolo (Eds.), *Humic substances in terrestrial ecosystems*, 1996, 531-593.

Sharma, V. K., Caudatelli, M., Fortuna, F., Cornacchia, G., 1997. Processing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting: Review. *Energy Conversion and Management*, 38, 5, 453-478.

Shiowatana, J., Tantidanai, N., Nookabkaew, S., Nacapricha, D., 2001. A Novel Continuous-Flow Sequential Extraction Procedure for Metal Speciation in Solids. *J. Environ.Qual.* 30, 1195-1205.

Sims, J.T., Sklin, J., 1991. Chemical fractionation and plant uptake of heavy metals in soils amended with co-composted sewage sludge. *J. Environ. Qual.* 20, 387-395.

Singh, K.P., Mohan, D., Sinha S., Dalwani, R., 2004. Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere*, 55, 227–255.

Slater, J.H, Lovatt, D., 1984. Biodegradation and the significance of microbial communities, pp. 439-85. In: Gibson, DT (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker.

Soumaré, M., Tack, F.M.G., Verloo, M.G., 2003. Characterisation of Malian and Belgian solid waste composts with respect to fertility and suitability for land application. *Waste Management*. 23, 517-522.

Spaccini, R., Piccolo, A., Conte, P., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H., 2002. Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Soil Biol. Biochem.*, 34, 1839–1851.

Sposito, G., 1984. *The surface chemistry of soils*. Oxford University Press, Inc, New York, NY.

Sposito, G., Lund, L.J., Chang, A., 1982. Trace metal chemistry in arid- zone field soils amended with sewage sludge. I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in solid phases. *Soil sci. Soc. Am. J.* 46. 260-264.

Staples, C.A., Peterson, D.R., Parkerton, T.F. Adams, W.J., 1997. The environmental fate of phthalate esters : A literature review. *Chemosphere*, 35, 667-749.

Stevenson, F.J., 1994. *Humus chemistry*. John Wiley and Sons, New York, NY.

Stevenson, F.J., 1982. *Humus chemistry. Genesis, composition, reactions*. John Wiley and Sons, New York.

Stevenson, F.J., Code, M.M., 1999. *Cycles of soil*. John Wiley and sons Inc. : 427.

- Su, D.C., Wong, J.W.C., Jagadeesan, H., 2004. Implications of rhizospheric heavy metals and nutrients for the growth of alfalfa in sludge amended soil. *Chemosphere*, 56, 10, 957-965.
- Sundberg, C, Smars, S. Jonsson, H. 2004. Low pH as an inhibiting factor in the transition from mesophilic to thermophilic phase in composting. *Bioresource Technol.*, 95, 145–150.
- Swift, M.J., Heal, O.W., Anderson J.M., 1979. «Decomposition in terrestrial ecosystems». *Studies in ecology*, vol 5, University of California Press, Bekerley, 372 p.
- Swift, R.S., 1989. Molecular weight, size, shape and charge characteristics of humic substances: some basic considerations. In: M.H.B. Hayes, P. MacCarthy, R. Malcolm, R.Swift (eds.) *Humic substances II. In search of struture*, John Wiley & Sons, New York, pp 450-464.
- Tanford, C., 1991. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. Kruger Publishing Company.
- Taylor, R.W., Xiu, H., Mehadi, A.A., Shuford, J.W., Tadesse, W. 1995. Fractionation of residual cadmium, copper, nickel, lead, and zinc in previously sludge-amended soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 26, 2193-2204.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequentiel extraction procedure for the speciation of particulate trace metal. *Anal. Chem.* 51. 844-851.
- Tessier, A., Campbell. P.G.C., 1988. Comments on the testing of the accuracy of an extraction procedure for determining the partitioning of trace metals in sediments. *Anal. Chem.* 60, 1475–1476.
- Tiquia, S.M., Tam, N.F.Y., 1998. Elimination of phytotoxicity during co-composting of spent pig-manure sawdust litter and pig sludge. *Bioresource Technol.*, 65, 43-49.
- Tiquia., S.M., 2002. Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *J. Appl. Microb.* 92, 764-775.
- Tomati, U., Galli, E., Pasetti, L. Volterra, E. 1995. bioremediation of olive-mill wastewaters by composting, *Waste Management & Research*, 13, 6, 509-518.
- Tremier, A., de Guardia, A., Massiani, C., Paul, E., Martel, J.L., 2005. A respirometric method for characterising the organic composition and the temperature influence on the biodegradation kinetics, for a mixture of sludge and bulking agent to be co-composted. *Bioresource Technol.*, 96, 169–180.
- Tsadilas, C.D., Matsi, T., Barbayiannis, D., Dimoyiannis, D., 1995. Influence of sewage sludge application on soil properties and on the distribution and availability of heavy metal fractions, *Commun. Soil. Sci. Plant. Anal.*, 26, 2603-2619.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itavaara, M., 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technol.*, 72, 169-183.

Ure, A., Quevaullier, Ph, Muntau, H., Griepink, B., 1993. Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the CEC. *Int. J. Environ. Analyt. Chem.*, 51, 135–151.

Ure, A.M., 1996. Single extraction schemes for soil analysis and related applications. *Sci. Tot. Environ.* 178, 1-3, 3-10.

US EPA, US Environmental Protection Agency, 1993. Part 503-Standards for Use or Disposal of Sewage Sludge. *Federal Register* 58, 9387-9404.

USDHSS, 2003. Second National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals by the Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Environmental Health, Division of Laboratory Sciences, Atlanta, Georgia. NCEH Pub. No. 02. Available at <http://www.cdc.gov/exposurereport/>.

Valdrighi, M., Pera, A., Agnolucci, M., Frassinetti, S., Lunardi, D., Vallini, G., 1996. Effects of compost-derived humic acids on vegetable biomass production and microbial growth within a plant (*Cichorium intybus*)-soil system: a comparative study. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 58, 133-144.

Van Ginkel, J.T., Van Haneghem I.A., Raats, P.A.C., 2002. Physical Properties of Composting Material: Gas Permeability, Oxygen Diffusion Coefficient and Thermal Conductivity. *Biosystems Engineering*, 81, 1, 113-125.

Vecchioli, G.I., Del Panno, M.T., Paineira, M.T., 1990. "Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil". *Environmental Pollution*, 67, 249-258.

Veeken, A., Nierop K., de Wilde, V., Hamelers, B., 2000. Characterisation of NaOH-extracted Humic acids during composting of a biowaste. *Bioresource Technol.*, 72, 33-41.

Wagner, D.J., Bacon, G.D., Knocke, W.R., Switzenbaum, M.S., 1990. Changes and variability in concentration of heavy metals in sewage sludge during composting. *Environmental Technol.* 11, 949-960.

Waksman, S.A., 1932. *Humus, Origin, Chemical Compositions and Importance in nature.* Baltimore: Williams & Wilkins Co.

Wan, C.K., Wong, J.W.C., Fang, M., Ye, D.Y., 2003. Effect of organic waste amendments on degradation of pahs in soil using thermophilic composting. *Environmental Technology*, 1, 24, 23-30.

Wang, J., Liu, P., Shi, H. and Qian, Y. 1997. Kinetics of phthalic acid ester degradation by acclimated activated sludge. *Process biochemistry*, 32, 567-571.

- Wang, P., Chang, C.M., Watson, M.E, Dick, W.A., Chen Y., Hoitink, H.A.J., 2004 a. Maturity indices for composted dairy and pig manures. *Soil Biol. Biochem.*, 36, 767–776.
- Wang, Y., Fan, Y., Gu, J.-D., 2004 b. Dimethyl phthalate ester degradation by two planktonic and immobilized bacterial consortia. *International Biodeterioration & Biodegradation* 53, 93-101.
- Wang, Y., Fan, Y., Gu, J.-D., 2003. Aerobic degradation of phthalic acid by *Comamonas acidovorans* Fy-1 and dimethyl phthalate ester by two reconstituted consortia from sewage sludge at high concentrations. *World Journal of Microbiology and BioTechnol.*, 19, 811–815.
- Warman, P.R., Termeer, W.C. Evaluation of sewage sludge, septic waste and sewage sludge compost applications to corn and forage: Yields and N, P, and K content of crops and soils. *Bioresour. Technol.*, in press.
- Weber, W.J., Huang, W., 1996. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 4. Intraparticle heterogeneity and phase-distribution relationships under non-equilibrium conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 881–888.
- Weber, W.J., McGinley, P.M., Katz., L.E., 1992. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 1. Conceptual basis and equilibrium assessments. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1955–1962.
- Wershaw, R.L., 1986. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil–water or sediment–water systems. *J. Contam. Hydrol.* 1, 29-45.
- Wershaw, R.L., 1991. The importance of humic substance–mineral particle complexes in the modeling of contaminant transport in sediment–water systems. In: Baker R.A., ed. *Organic substances and sediments in water. 1. Humics and Soils.* Chelsea, MI: Lewis, 23-34.
- Wershaw, R.L., 1993. Model for humus in soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 27, 814-816.
- Werther J., Ogada T., 1999. Sewage sludge combustion. *Progress in Energy and Combustion Science*, 25 55–116.
- WGPAH (Working Group on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), 2001. *Ambient Air Pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH).*
- White, J.C., Hunter, M. Nam, K. Pignatello, J.J., Alexander, M., 1999. Correlation between the biological and physical availabilities of phenanthrene in soils and soil humin in aging experiments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18,1720-1727.

- Wilson, M.S., Madsen, E.L., 1996. Field extraction of a transient intermediary metabolite indicative of real time in situ naphthalene biodegradation. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 2099-2103.
- Wolf, M., Buckau, G., Gekeis, H., Thang, N.M., Hoque, E., Szynczak, W., Kim, J.I., 2001. Aspect of measurement of the hydronamic size and molecular mass distribution of humic and fulvic acids. In Ghabour E.A. Davies G. (Eds.) *Humic substances: Structures, Models and Functions*. Royal Society of Chemistry. UK. p. 51-61.
- Wong, J.W.C. Wan, C. K., Fang M., China, P.R. 2002. Pig Manure as a Co-Composting Material for Biodegradation of PAH-Contaminated Soil. 23, 1, *Environ. Technol.* 23, 15-26.
- Wong, J.W.C., Li, G.X., Wong, M.H., 1996. The growth of *Brassica chinensis* in heavy-metal-contaminated sewage sludge compost from Hong Kong. *Bioresource Technol.*, 58, 3, 309-313.
- Wong, J.W.C., Ma, K.K., Fang, K.M., Cheung, C., 1999. Utilization of a manure compost for organic farming in Hong Kong. *Bioresource Technol.*, 67, 1, 43-46.
- Wong, M., 1985. Heavy metal contamination of soils and crops from auto traffic, sewage sludge, pig manure and chemical fertilizer. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 13, 2, 139-149.
- Wu, L., Ma., L.Q., 2002. Relationship between Compost Stability and Extractable Organic Carbon. *J. Environ. Qual.* 31, 1323–1328.
- Xing, B., Pignatello, J.J., 1997. Dual-mode sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinyl chloride) and soil organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 792–799.
- Xu, X.R., Li, H.B., Gu, J.D., 2004. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical di-n-butyl phthalate ester by *Pseudomonas fluorescens* B-1. *International Biodeterioration & Biodegradation*, In Press, Available online sciencedirect.com.
- Zachara, J.M, Resch, C.T. Smith, S.C., 1994. Influence of humic substances on Co^{2+} sorption by a subsurface mineral separate and its mineralogical components. *Geochim. Cosmochim. Acta.*, 58, 553-566.
- Zbytniewski, R. Buszewski, B. 2005. Characterization of natural organic matter (NOM) derived from sewage sludge compost. Part 1: chemical and spectroscopic properties, *Bioresource Technol.* 96, 471- 478.
- Zebarth, B.J., McDougall, R., Neilsen, G., Neilsen, D., 2000. Availability of nitrogen from municipal sewage sludge for dryland forage grass. *Can. J. Plant Sci.* 80, 575–582.
- Zeng, F., Cui, K., Li, X., Fu J., Sheng, G., 2004. Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescences* FS1 *Process Biochemistry*, 39, 9, 1125-1129.

Ziogou, K., Kirk, P.W.W., Lester, J.N., 1989. Behaviour of phthalic acid esters during batch anaerobic digestion of sludge. *Water Research*, 23, 6, 743-748.

Zorpas, A.A., Arapoglou, D., Panagiotis, K., 2003. Waste paper and clinoptilolite as a bulking material with dewatered anaerobically stabilized primary sewage sludge (DASPSS) for compost production. *Waste Management*. 23, 27-35.

Zorpas, A.A., Constantinides, T., Vlyssides, A.G., Haralambous, I., Loizidou, M., 2000. Heavy metal uptake by natural zeolite and metal partitioning in sewage sludge compost. *Bioresource Technol.* 72, 113-119.

RESULTATS ET DISCUSSION

Partie I.

Compostage de boues de station d'épuration et devenir des micropolluants métalliques et organiques

Cette première partie est composée de 4 articles :

Article 1 :

Valorisation de boues de stations d'épuration des eaux usées par un bio-procédé aérobie « compostage ».

Auteurs : Amir, S., Hafidi, M.

Journal : Ann. Chim. Sci. Mat., 26, S 409-S 414, 2001.

Article 2 :

Sequential extraction of heavy metals during composting of sewage sludge

Auteurs : Amir S., Hafidi M., Merlina G., Revel J.C.

Journal : Chemosphere 59, 6, 801-810, 2005.

Available online at [www. sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).

Article 3 :

Fate of phthalic acid esters during composting of both lagooning and activated sludges

Amir S., Hafidi M., Merlina G, Hamdi H., Jouraiphy A., EL Gharous M., Revel J.C.

Journal : Process Biochemistry 40, 6, 2183-2190, 2005.

Available online at www. sciencedirect.com.

Article 4 :

Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of lagooning sewage sludge

Amir S., Hafidi M., Merlina G, Hamdi H., Revel J-C.

Journal : Chemosphere 58, 449-458, 2005.

Available online at www. sciencedirect.com.

Chapitre 1 :

Valorisation de boues de stations d'épuration des eaux usées par un bio-procédé aérobie « compostage »

Valorization of sewage sludges by an aerobic bio-process "composting"

Amir, S., Hafidi, M.

Unité Sol et Environnement (Lab. Ecol. Végét.), Faculté des Sciences Semlalia, Dépt. de

Biologie. BP/2390, Marrakech, Morocco.

Corresponding author : e-mail : hafidi@ucam.ac.ma

Résumé :

Les résultats préliminaires des analyses physico-chimiques du compost obtenu à partir du mélange boues-paille, après 9 mois de compostage mettent en évidence:

- une bonne évolution de la température durant le processus de compostage
- une réduction du rapport C/N de 24 à 15 après 9 mois.
- un taux de décomposition qui atteint 42 %.
- un enrichissement du compost en substances humiques.
- des concentrations faibles en métaux lourds.

A la lumière de ces résultats, le compost obtenu est un produit stable, hygiénique, riche en éléments fertilisants (N, P) et en substances humiques. Ceci ouvrira la voie à une valorisation agricole des boues.

Mots clés: boues résiduaires, valorisation, compostage, éléments minéraux, substances humiques, métaux lourds.

Abstract :

The preliminary results of the physico-chemical analysis of a compost obtained from the mixture sludges-straw after 9 months of composting, show :

- A good evolution of the temperature during the process of composting
- a reduction of the ratio C/N from 24 to 15 after 9 months.
- a decomposition rate reaches 42 %.
- an enrichment of the compost in humic substances.
- low concentrations in heavy metals

According to these results, the obtained compost is a stable, hygienic product, rich in fertilizing elements (N, P) and in humic substances. This will permit an agricultural valorization of sewage sludges.

Key words: sludges, valorization, composting, mineral elements, humic substances, heavy metals.

1. Introduction

Le traitement des eaux usées dans les stations d'épuration s'accompagne d'une production importante de boues résiduelles. Ces boues renferment des matières organiques et des éléments minéraux qui sont susceptibles de constituer un apport intéressant pour les sols de culture [1.2].

L'utilisation directe de ces résidus présente de nombreux risques et contraintes liés à leur manipulation et à leur emploi, en raison d'une présence éventuelle des agents pathogènes. Ces résidus doivent donc être conditionnés chimiquement et/ou biologiquement avant toute utilisation en agriculture.

Selon plusieurs expériences (USA, EUROPE), le compostage constitue une technique biologique simple, qui permet une valorisation de ces déchets en agriculture à condition de s'assurer de devenir des éléments traces.

Dans cette optique, nous avons traité les boues de stations d'épuration expérimentale de Marrakech par le processus de compostage.

Au cours du processus, nous avons suivi les différents paramètres physico-chimiques qui influencent la qualité et la maturité d'un compost, ainsi que le devenir de certains métaux lourds (Cu, Zn, Pb, Cd).

2. Matériels et Méthodes

2.1. procédure expérimentale

Le mélange boues (165 kg) et paille (20 kg) caractérisé par une humidité de 54 % et un rapport C/N de 24 a été mis à composter en tas pendant 9 mois. Pour aérer le mélange un brassage est effectué tout les 15 jours.

L'activité microbiologique a été déterminée par mesure de la température du tas durant 9 mois. Sur des prélèvements effectués à différentes périodes de compostage: T0= mélange initial, T1 = après 1 mois, T3= après 3 mois, T6= après 6 mois, T9 = après 9 mois, nous avons réalisé l'ensemble des analyses physico-chimiques suivants: pH, taux de cendres, taux de décomposition, azote kjeldahl, azote inorganique, carbone organique, substances humiques (acides humiques, acides fulviques), phosphore assimilable, métaux lourds.

2.2. méthodes analytiques.

Le pH est déterminé sur une suspension échantillon-eau (10g/15ml), l'azote total par la méthode kjeldahl, et l'azote inorganique d'après BREMNER [3]. Le phosphore assimilable est

déterminé selon la méthode olsen [4].

Le taux de cendres et le taux de décomposition sont calculés après calcination d'échantillon sec à 550°C (16h).

Le dosage de Carbone organique est effectué selon la méthode ANNE [5]. L'extraction des substances humiques est réalisée par NaOH (0,1 N ; agitation 2h), l'expérience est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un extrait clair. Une extraction à l'eau est réalisée au préalable, dans les mêmes conditions, pour éliminer certaines molécules solubles (sucres, acides aminés...). La séparation des acides humiques et fulviques est réalisée par précipitation des premiers dans un milieu acide (pH = 2; 4°C; 24 h). Le dosage de différentes fractions humiques est effectué après oxydation du carbone par KMnO₄ en milieu alcalin [6]. Les différents indices humiques sont déterminés:

Degré d'humification (%) = Carbone total humique / Carbone organique total extractible

Taux d'humification (%) = Carbone total humique / Carbone organique total

Indice d'humification = Carbone des acides fulviques / Carbone des acides humiques

L'extraction sélective des fractions des métaux lourds a été réalisée selon un protocole mis en point par Sposito [7]: 1) KNO₃ (0,05M, 16 h) «fraction échangeable» ; 2) H₂O (distillée, 2h, 3fois) «fraction soluble », (1+2) = fraction labile; 3) NaOH (0,5M, 16h) «fraction organique»; 4) EDTA (0,05M, 6h) «formes précipitées inorganiques (carbonates..) », (3 + 4) = fractions moyennement labiles; 5) HNO₃ (4M, 16h à 80°C) «fractions plus résistantes », forme extractible = 1 +2+ 3+4+5. Les concentrations totales sont dosées selon AFNOR N° 131-51 modifiée.

Forme non extractible = concentration totale - forme extractible

3. Resultats et Discussion

L'évolution de la température (figure 1), traduit une bonne évolution du processus de compostage, par succession de deux phases d'activité microbiologique :

- Phase de stabilisation: caractérisée par une élévation de la température jusqu'à une température maximale de 52°C, et correspond à la dégradation des composés organiques simples.
- Phase de maturation: caractérisée par une diminution de la température et correspond à la dégradation des molécules lignocellulosiques, et au processus d'humification.

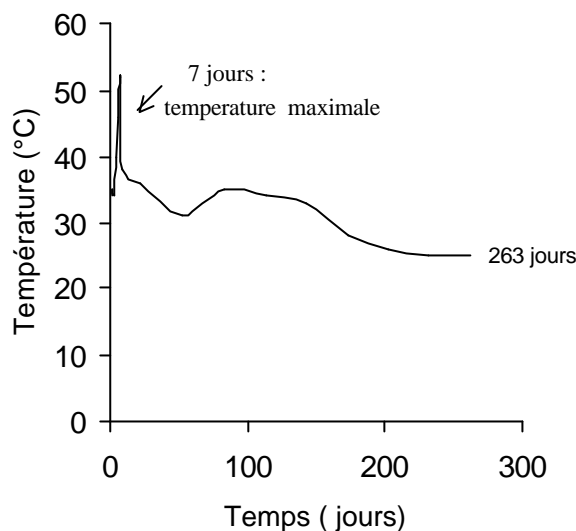


Figure 1: Evolution de la Température au cours du compostage

Ceci montre la compostabilité de ces boues résiduelles. En effet dans nos conditions expérimentales, le taux de décomposition enregistré est de 41,5; avec un rapport C/N voisin de 15 (tableau 1), après 9 mois de compostage.

Tableau 1. Evolution des paramètres physico-chimiques au cours du processus de compostage

| Temps (mois) | pH | C.org (%) ⁽¹⁾ | M.O. (%) ⁽¹⁾ | Cendres (%) ⁽¹⁾ | DEC (%) ⁽¹⁾ | NKT (mg/g) ₍₁₎ | N.org (mg/g) ₍₁₎ | NH ₄ ⁺ -N (mg/g) | NO ₃ ⁻ -N (mg/g) ₍₁₎ | C/N |
|--------------|------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------------|--|---|-------|
| 0 | 7,30 | 17,74 | 30,60 | 65,90 | - | 7,42 | 4,72 | 2,70 | 2,20 | 24,00 |
| 1 | 7,40 | 16,18 | 27,90 | 70,70 | 20,00 | 7,56 | 5,31 | 2,25 | 1,95 | 21,40 |
| 3 | 6,80 | 15,01 | 25,87 | 75,30 | 36,50 | 8,12 | 6,32 | 1,80 | 0,65 | 18,48 |
| 6 | 6,73 | 14,26 | 24,58 | 76,30 | 40,00 | 8,68 | 7,33 | 1,35 | 0,05 | 16,40 |
| 9 | 6,77 | 13,45 | 23,18 | 76,78 | 41,50 | 8,82 | 7,47 | 1,35 | 0,05 | 15,24 |

(1) : Résultats exprimés par rapport à la matière sèche.

M. O. = Matière organique ; DEC = Taux de décomposition , NTK = Azote total kjeldahl

L'évolution de pH, du taux de décomposition, du rapport C/N, et de teneur en NH₄⁺, après 9 mois de compostage (tableau 1), témoignent de la stabilité et de la maturité du compost obtenu [8 ;9 ;10].

De même le compost est caractérisé par un enrichissement en acides humiques et fulviques (tableau 2), ce qui indique des conditions favorables à l'humification.

Tableau 2. Evolution de différentes fractions humiques et les différents indices correspondants au cours du processus de compostage

| Temps (mois) | SH (mg/g MS) | AF (mg/g MS) | AH (mg/g MS) | MOS (mg/g MS) | TH (%) | DH (%) | IH |
|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------|--------|------|
| 1 | 17,45 | 8,64 | 8,80 | 0,37 | 6,25 | 97,9 | 0,98 |
| 3 | 20,0 | 9,10 | 11,0 | 0,36 | 7,77 | 98,06 | 0,83 |
| 6 | 20,8 | 9,22 | 11,60 | 0,36 | 8,97 | 98,26 | 0,79 |
| 9 | 22,8 | 10,0 | 12,70 | 0,35 | 9,82 | 98,46 | 0,79 |

MS : Matière sèche ; SH : Substances humiques ; AF: Acides fulviques ;
 AH : Acides humiques ; MOS : Matière organique soluble dans l'eau ;
 TH : Taux d'humification ; DH : Degré d'humification ; IH : Indice d'humification

La détermination de différents indices d'humification (TH, IH, DH), a permis d'obtenir des valeurs (tableau 2), proches de celles obtenues par d'autres auteurs [11 ;12], ce qui permet de confirmer la maturité de ce compost après 9 mois de compostage.

Dans ces conditions on peut envisager d'utiliser ce compost des boues résiduaires pour un épandage agricole, à condition de s'assurer de sa concentration en métaux lourds et de leur biodisponibilité.

D'après une comparaison entre les concentrations totales de ce compost des boues en métaux lourds (Zn, Cu, Pb, Ni, Cd) . avec les valeurs de référence dans la norme AFNOR (NFU 44-041, juillet 1981) pour l'utilisation agricole des boues, on constate qu'ils sont *très* loin d'être polluants, sachant que chacun de ces métaux n'excède le double de la teneur de référence correspondante.

De plus, le résultat d'une extraction sélective appliquée sur ce compost, nous a permis de signaler une grande concentration des métaux lourds dans les fractions les plus résistantes: non extractible > HNO₃ > EDTA > NaOH, avec des quantités négligeables dans la fraction labile: échangeable + soluble. On peut suggérer une grande immobilisation des métaux par les fractions les plus résistantes, donc une grande réduction de leur biodisponibilité pour la plante.

4. Conclusion:

Le traitement de boues de stations d'épuration des eaux résiduaires par le procédé du compostage, a permis d'obtenir un compost stable et mature, après 9 mois de compostage. Dans nos conditions expérimentales, ce compost présente des concentrations totales faibles en métaux lourds, et un pouvoir fertilisant (azote, phosphore, substances humiques...), valorisables en agriculture.

Remerciements : Travail financé en partie par le Projet de Recherche Agricole pour le Développement Franco-Marocain (PRAD 99/10).

Références:

- 1 Juste c., (1979) Valorisation agricole des boues issues du traitement des eaux urbaines. Trib. Cebedeau ; 432, 461-467.
- 2 Vellaud J P., (1981) La valorisation agricole des boues de stations d'épuration. Tech. Eau Assain ; 411, 27-36.
- 3 Bremner J M., (1965) Inorganic forms of nitrogen. In: BLACK C A, EVANS. DE, . WHITE IL, ENSMINGER LE, CLARK FE (eds) Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9 Am Soc Agron., Madison, Wis ; pp 1179-1237.
- 4 Hafidi M., Badri w., kaemmerer M. et Revel J C., (1994) Comparaison des méthodes d'extraction chimique et biologique pour la détermination du phosphore assimilable. Actes Inst, agron.vet. (Maroc) ;Vol 14 (3), 43-48.
- 5 Aubert G., (1978) Méthodes d'analyse des sols. Edition C.R.D.P, Marseille, 360 p.
- 6 Chaminade R., (1944) Les formes du phosphore dans le sol. Nature et rôle des complexes phospho-humiques. Ann. Agron; 14 (1), 1-53.
- 7 Sposito G., Lund L 1. and Chang A., (1982) Trace metal chemistry in arid- zone field soils amended with sewage sludge. 1. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in solid phases. Soil sci. Soc. Am. J ; 46 : 260-264.
- 8 Bernat M P., Navarro A F., Roig A., Cegarra J and Garcia D., (1996) , Carbon and nitrogen transformation during composting of sweet sorghum bagasse. Biol Fertil Soils; 22: 141-148.
- 9 Echab A., (1998) Réutilisation des boues de stations d'épuration des eaux usées en agriculture: Impact des métaux lourds. Thèse de 3ème cycle. Univ. Cadi Ayyad, Marrakech.
- 10 Ouatmane A., Provenzano M R., Hafidi M. and Senesi N., (2000) Compost maturity assessment using calorimetry, spectroscopy and chemical analysis. Compost Science and Utilisation; Vol 8, N° 2, 124 - 134.
- 11 Roletto E., Barberis R., Consiglio M. and Joomce R., (1985) Chemical parameters for evaluating compost maturity. Biocycle ; vol. 26, pp.46-47.
- 12 Tomati U., Madejon E. and Galli E., (2000) Evolution of Humic Acid Molecular weight as an Index of Compost Stability. Compost Science and Utilisation; vol.8, N° 2, 108.

Chapitre 2 :

Sequential extraction of heavy metals during composting of sewage sludge

Soumia AMIR¹, Mohamed HAFIDI^{1*}, Georges MERLINA², Jean-Claude REVEL²

¹ Unité Sol et Environnement (Lab. Ecol. Végét.), Faculté des Sciences Semlalia, Dépt. de
Biologie. BP/2390, Marrakech, Morocco.

² Equipe Agronomie Environnement Ecotoxicologie, Ecole Nationale Supérieure
Agronomique de Toulouse, Auzeville-Tolosane, BP/ 107, 31326, Castanet, Tolosan, France

* Corresponding author : e-mail : hafidi@ucam.ac.ma

Présentation :

L'utilisation agricole du compost des boues n'implique pas seulement la détermination de son degré de stabilité et de maturité, il est nécessaire de déterminer son contenu en éléments traces métalliques (ETM) puisque se sont des éléments non biodégradables et qui ont tendance à s'accumuler le long des chaînes alimentaires. De plus, les teneurs totales ne donnent pas des informations suffisantes sur leur mobilité et leur comportement dans l'environnement, ce sont les formes chimiques qui déterminent leur biodisponibilité dans le système sol-plante. Cette étude a pour objectif le suivi de l'évolution des teneurs totales et formes chimiques des ETM au cours du compostage du mélange boues-paille. De même, l'influence des changements des propriétés physico-chimiques du mélange au cours du compostage sur le devenir des ETM, particulièrement Cu, Zn, Pb et Ni, a été étudié.

Pour le contrôle d'une bonne conduite du processus de compostage, un ensemble d'analyses chimiques et spectroscopiques a été réalisé. Les analyses des paramètres physico-chimiques ont été effectuées selon des méthodes à usage très courant décrites dans le 1^{ier} chapitre. L'analyse par spectroscopie FTIR a été réalisée sur des pastilles de 2 mg de l'échantillon sec à chaque stade de compostage avec 400 mg de bromure de potassium (KBr), en utilisant un spectrophotomètre FTIR Perkin Elmer 1600 à une fréquence allant de 400 cm⁻¹ à 4000 cm⁻¹ et avec une vitesse de 16 nm s⁻¹.

Les teneurs totales du compost en ETM à différents stades de traitement ont été déterminées selon la méthode AFNOR (AFNOR NF X 31-151). 1 g de chaque échantillon est minéralisé à 550 °C pendant 4 h, et après une attaque par l'acide hydrofluorodrique (5 ml) jusqu'à sec, le résidu est solubilisé avec un mélange HNO₃/HCl (1:1) concentré, par la suite des dilutions ont été effectuées pour le dosage. Les valeurs obtenues sont corrigées par rapport à la diminution du poids du tas en se référant aux teneurs des cendres :

$$C_{\text{corrigée}} = C_m \times (a_0 / a_t) \quad ; \quad C_m: \text{valeur mesurée } (\mu\text{g kg}^{-1} \text{ poids sec})$$

a_0 : taux des cendres dans l'échantillon initial (0 jours); a_t : taux des cendres à chaque stade de compostage (30, 60, 90 et 180 jours).

La détermination des formes chimiques des ETM a été réalisée selon un protocole décrit par Sposito (1982) en suivant cinq étapes d'extractions séquentielles selon des conditions expérimentales précises cités dans le tableau 1 : le nitrate de potassium (KNO₃) permet d'extraire la fraction échangeable; l'eau (H₂O) pour les formes solubles; la soude (NaOH)

pour les formes organiques ; l'EDTA pour les formes carbonates et HNO_3 pour les formes sulfures.

L'ensemble des résultats obtenus sur les paramètres physico-chimiques ont montré une bonne conduite du processus de compostage et sont de bons indicateurs de stabilité et maturité du compost à 6 mois de traitement (tableau 2). Cette stabilité a été vérifiée par l'analyse Spectroscopie (FTIR) du compost à différents stades d'évolution (figure 1).

Au cours du compostage, les spectres ont montré une diminution de l'absorbance (2922 et 2855 cm^{-1}), (1540 cm^{-1}), ($1140-1090 \text{ cm}^{-1}$) qui correspond respectivement à des structures aliphatiques, lipidiques, peptidiques et carbohydrates. En parallèle se produit une augmentation de l'intensité des structures aromatiques riche en groupements fonctionnels phénoliques ou carboxylates (1384 cm^{-1}) ou étherifiés ($1034-1027 \text{ cm}^{-1}$). Ceci implique qu'au cours du compostage, les populations microbiennes commencent par une utilisation de structures facilement assimilables tels les lipides, les protéines et les carbohydrates, ce qui a contribué à une augmentation relative de l'intensité de structures aromatiques et oxydées stables et plus résistantes à la décomposition microbienne. Les teneurs totales et assimilables en éléments minéraux P, Ca, K, Mg, Na, Fe et Mn sont appréciables (tableau 2), ce qui permet de qualifier ce compost d'un fertilisant et amendement organique, après avoir s'assurer de son innocuité vis à vis des ETM.

L'analyse des ETM dans le mélange boues-paille à différents stades de compostage a montré des teneurs totales faibles en Zn, Pb, Cu et Ni. Ces teneurs présentent une diminution au cours du compostage (figure 2) attribuée à un lessivage de ces métaux suite à leur libération par décomposition de structures organiques durant la phase thermophile, favorisé par une augmentation de l'humidité de 54 à 70,8 %. Les teneurs totales se stabilisent en phase de maturation et à fin de compostage, ce qui indique que le compostage a contribué à une élimination des formes les plus labiles des métaux et leur passage vers des formes plus stables. Les teneurs totales en ETM dans le compost sont inférieures aux normes internationales dans le compost des boues acceptable pour un usage agricole (tableau 3).

Une comparaison entre la somme des teneurs de cinq formes chimiques des ETM et les teneurs totales AFNOR indique que 70 à 80 % sont sous des formes non extractibles liés principalement aux silicates et nommée fraction résiduelle. 12-29 % sont sous des formes résistantes XNaOH , XEDTA , XHNO_3 , ce qui implique que la quasi-totalité des métaux sont sous des formes stables, et seulement moins de 2 % des métaux pourrait être biodisponibles $\text{X-(KNO}_3+\text{H}_2\text{O)}$.

Un suivi de l'évolution des formes mobiles X-KNO₃ et X-H₂O des métaux Zn, Cu et Ni sauf Ni-H₂O, a montré une tendance de diminution au cours du compostage (figure 3). Le Pb ne s'est jamais présenté en forme mobile quelque soit le stade de compostage.

Pour les autres fractions mobilisables (figure 4 a, b, c, d), la distribution des ETM a montré certains changements au cours du compostage qui dépend de métal en question et les propriétés physico-chimiques du milieu. Au cours du compostage se produit dans le cas du Zn et particulièrement le Cu, une diminution de la fraction sulfures X-HNO₃ avec une augmentation des formes carbonate X-EDTA et organique X-NaOH. A l'opposé du cas de Pb où la forme sulfure X-HNO₃ présente une légère augmentation avec une diminution des formes NaOH et EDTA. Ni montre une diminution significative de sa forme organique NaOH avec une augmentation de la forme carbonate EDTA. En fait, au cours de la phase thermophile du compostage, la décomposition de structures organiques conduit à une libération des métaux Pb et Ni de leur formes organiques. Ces métaux présente plus d'affinité aux structures sulfures et carbonates, alors que le Zn et plus particulièrement le Cu présentent plus d'affinité aux fractions organique et carbonates.

Les matrices de corrélation de différentes fractions de métaux avec les autres paramètres physico-chimiques du milieu tel que le pH, taux de cendres, substances humiques et matière organique ont présenté des coefficients parfois très significatifs impliquant l'influence de transformation du mélange au cours du compostage sur la distribution des formes chimiques des métaux (table 4).

Les équations de régression linéaire « stepwise » pour déterminer les teneurs mobiles des métaux de leurs teneurs totales ont montré des coefficients faibles (table 5). Les valeurs sont mieux estimées en rajoutant d'autres paramètres du milieu comme la quantité de matière organique (OM) et pH. Ceci implique l'influence des autres facteurs de milieu à part la concentration totale des métaux sur leur biodisponibilité dans le système sol-plante.

Abstract :

The major limitation of soil application of sewage sludge compost is the total heavy metal contents and their bioavailability to the soil-plant system. This study was conducted to determine the heavy metal speciation and the influence of changing the physico-chemical properties of the medium in the course of composting on the concentrations, bioavailability or chemical forms of Cu, Zn, Pb and Ni in sewage sludge. Principal physical and chemical properties and FTIR spectroscopical characterization of sludge compost during treatment show the stability and maturity of end product. The total metal contents in the final compost were much lower than the limit values of composts to be used as good soil fertilizer. Furthermore, it was observed by using a sequential extraction procedure in sludge compost at different steps of treatment, that a large proportion of the heavy metals were associated to the residual fraction (70-80%) and more resistant fractions to extraction X-NaOH, X-EDTA, X-HNO₃ (12-29%). Less than 2% of metals bound to bioavailable fractions X-(KNO₃+H₂O). Heavy metal distribution and bioavailability show some changes during composting depending on the metal itself and the physico-chemical properties of the medium. Bioavailable fractions of all elements tend to decrease except Ni-H₂O. Zn and mainly Cu present more affinity to organic and carbonate fractions. In contrast, Pb is usually preferentially bound to sulfide forms X-HNO₃. Nickel shows a significant decrease of organic form. Significant degrees of correlation were found between heavy metal fractions and changes of some selected variables (e.g. pH, ash, organic matter, humic substance) during the course of composting. Mobile fractions of metals are poorly predictable from the total content. The R² value was significantly increased by the inclusion of other variables such as the amount of organic matter (OM) and pH.

Key words. Composting; Sewage sludge; Stabilisation; Heavy metals; Bioavailability.

1. Introduction

The agricultural use of sewage sludge compost implies knowing its degree of stability, as well as its content and biogeochemical forms of the heavy metals present. Not only are these elements not biodegradable and become toxic at some concentrations, they tend to accumulate along the food chain where man is the last link (Dudka and Miller, 1999). The determination of total heavy metal content does not provide useful information about the risks of bioavailability, the capacity for remobilisation and the behaviour of the metals in the environment (Sims and Sklin, 1991; Hsu and Lo, 2001). While, the chemical forms of a metal or speciation allows the estimation of heavy metal bioavailability and is related to the different natures of the metals, their bonding strength, either in free ionic form or complexed by organic matter, or incorporated in the mineral fraction of the sample.

Many studies have been carried out on the speciation of heavy metals in soils, and soils amended with composted sewage sludge or raw sludge (Tessier et al., 1979; Sposito et al., 1982; Sims and Sklin, 1991; Pichtel and Anderson, 1997). Petruzzelli et al. (1994) suggest that the speciation of each metal in the sewage sludge compost depends on its initial chemical state in the sewage, the adsorption and precipitation mechanisms in sludge, and the effect of stabilization of the material and the humification process that occurs during composting on the chemical form of the metal.

The treatment by composting leads to the development of microbial populations, which cause numerous physico-chemical changes within mixture. These changes could influence the metal distribution through release of heavy metals during organic matter mineralization or the metal solubilization by the decrease of pH, metal biosorption by the microbial biomass or metal complexation with the newly formed humic substances (HS) or other factors (Brauckman, 1990; Hsu and Lo, 2001; Zorpas et al., 2003). Hsu and Lo (2001) show the increase of metal concentrations during composting of swine manure and suggest that the types of composting and raw materials are of major importance to metal condensation.

Accordingly, the objective of this work was to determine agronomic value of Moroccan sludge compost and the evolution of the bioavailability of heavy metals in course of composting by following their chemical forms. The main physico-chemical analyses and Fourier-transformed infrared (FTIR) spectroscopical characterization were carried out and a sequential extraction was applied on sludge compost in the course of different steps of treatment.

2. Material and methods

2.1. Composting

Samples of sewage sludge were taken from an anaerobic lagoon in the experimental wastewater treatment plant of Marrakech city (Morocco). This sludge is characterized by a C/N ratio of 14 and metal contents of 275; 71; 135; 24 mg kg⁻¹ respectively for Zn, Cu, Pb, Ni (the Cd concentration was below the limit of detection). The mixture of sludge (89%) with straw (11%), increased the C/N ratio to 23.9.

Composting, on a purpose-built platform, was followed for 180 d (days), and the mixture was turned every 15 d for aeration. The microbial activity was followed daily by measuring the temperature in the compost (Amir and Hafidi, 2001).

2.2. Chemical Analysis

To obtain the representative samples and results for the sequential extraction of heavy metals and other analyses, A good homogenizing of compost pile was made and sub-samples (500 g) were taken from 10 different point of compost heap (bottom, surface, side, centre) at each stage of composting: raw sludge mixture = 0 d, sludge mixture after 30, 90, 180 d of composting.

On aliquots of these representative samples the following physico-chemical analyses were made: the pH was determined on a suspension of sample in water (10 g/15 ml), the Total Organic Carbon (TOC) was measured according to the ANNE method (Aubert, 1978), the total nitrogen (Kjeldahl method), inorganic nitrogen (Bremner, 1965), the humic carbon extracted by 0.1 M NaOH solution was measured after oxidation by KMnO₄ (Bernal et al., 1996). The rate of decomposition was calculated after ignition of the dry sample at 550 °C (16 h). For P available the Oken method was used (Hafidi et al., 1994). Available Ca, Na, K, Mg were determined using ammonium acetate. Total P, Ca, Na, K, Mg, Fe and Mn were determined after ashing. P was measured colorimetrically and other elements were analysed in the extracts using atomic adsorption and flame photometry (De Souza, 1998).

Fourier-transformed infrared (FTIR) spectra were recorded on a FTIR Perkin Elmer 1600 spectrophotometer, on potassium bromide (KBr) pellets, which were prepared by pressing a mixture of a 2 mg sample with 400 mg KBr under vacuum. To limit moisture interference, both samples and KBr were separately dried at 105 °C before making pellets. Spectra were determined by exposing samples to a frequency ranging from 400 cm⁻¹ to 4000 cm⁻¹ at a rate of 16 nm s⁻¹.

According to french association of normalizations (AFNOR NF X 31-151), to obtain the total Zn, Cu, Pb and Ni content; 1 g of each sample was mineralised for 4 h at 550 °C, and then dissolved in 5 ml of hydrofluoric acid. The solution obtained was evaporated to dryness, the residue was then dissolved with concentrated HNO₃/HCl (1:1) solution and the acid solution was diluted to analysis.

Heavy metal fractionation was carried out according to Sposito's procedure, which is widely applied in various studies of sludge-amended soil (Sposito et al., 1982; Sims and Sklin, 1991; Petruzzelli et al., 1994; Pichtel and Anderson, 1997). On the samples taken from the sludge mixture at different times of composting, a series of reagents was applied with a compost / extractant ratio of about (1/4) (Table 1).

Table 1. Extractants and experimental conditions used to determine various extractable heavy metal forms (Sposito's procedure).

| Extractant | Duration of shaking | Heavy metal form |
|-----------------------------|---------------------|--|
| 1) KNO ₃ (0.5 M) | 16 h | Exchangeable "mobile" |
| 2) H ₂ O | 2 h , 3 times | Soluble "mobile" |
| 3) NaOH (0.5 M) | 16 h | Organically bound "mobilisable" |
| 4) EDTA (0.05 M) | 6 h | Organically complexed or carbonates "mobilisable" |
| 5) HNO ₃ (4 M) | 16 h in 80 °C | Sulfides "mobilisable" |

However, due to fact that the final reagent (4 M HNO₃) still did not extract all of the residual metal, standard test AFNOR NF X 31-151 was applied on ashed residue obtained from the last step of the extraction. The amount dosed represent "residual fraction" (Ma and Rao, 1997). All filtered supernatants were directly analyzed by atomic absorption spectrometry "Unicam 929".

2.3. Statistical Analysis

All the physico-chemical analyses were repeated three times and the statistical analyses were performed with the Statistix Program (1998).

Correlation (Pearson correlation) was explored between all metal fractions and selected variables: pH, ash, organic matter (OM) and humic substance (HS) content, and between the various metal fractions among themselves.

The stepwise regression model was used to predict the amount of mobile metal from the linear combination of total metal content and the change of all selected variables.

3. Results and Discussion

3.1. Compost Properties

The main physico-chemical properties of the raw and composted sludge at different times of the process are presented in Table 2. pH is parameter which greatly affects the composting process. The pH values were within the optimal range for the development of bacteria 6-7.5 and fungi 5.5-8.0 (Zorpas et al., 2003). Two phases of the composting process were recorded: a phase of stabilization (about 30 d), where temperature peaked at 52 °C after 7 d of processing and pH was slightly increased (7.4); a phase of maturation (about 150 d), characterized by a temperature plateau at 35 °C and slight acidification of the medium (6.7) (Amir and Hafidi, 2001).

The change in the C/N ratio from 23.9 to 16.4 and the amount of ash reflect microbial decomposition of OM and stabilisation during composting (Table 2). The increase of total nitrogen during composting was caused by the decrease of substrate carbon resulting from CO₂ loss (Soumaré et al., 2002; Zorpas et al., 2003). Inorganic nitrogen N-NH₄⁺ and N-NO₃⁻ are usually affected by the action of proteolytic bacteria and partly incorporated into stable organic forms such as amide and heterocyclic nitrogen. Organic matter is decomposed and transformed to stable humic compounds (Amir et al., 2004a, 2004b). Humic substances had a capacity to interact with metal ions, and the ability to buffer pH and to act as a potential source of nutrients for plants. Electrical conductivity in a water extract of final product did not exceed the salinity limit value of 3 mS cm⁻¹ to be used in good fertilizers (Soumaré et al., 2003). Available and total P, Ca, K, Mg, Na as well Fe and Mn were more important to use this material as mineral fertilizers (Soumaré et al., 2003). Therefore, application of material will increase the stable organic N and humic carbon and improve mineral elements necessary for plant growth.

Table 2. Physico-chemical properties of raw sludge (S) and sludge mixture at different times of composting (results expressed in dry basis).

| properties | S | 0 d | 30 d | 90 d | 180 d |
|--|-------------|-------------|------------|------------|-------------|
| Moisture | 56.7 ± 0.3 | 54.1 ± 0.1 | 70.9 ± 0.5 | 65.3 ± 1.3 | 64 ± 0.28 |
| pH | 7.4 ± 0.1 | 7.5 ± 0.05 | 7.4 ± 0.03 | 6.8 ± 0.1 | 6.7 ± 0.06 |
| Conductivity (mS cm ⁻¹) | 2.1 ± 0.07 | 2 ± 0.02 | 1.8 ± 0.05 | 1.7 ± 0.17 | 1.9 ± 0.04 |
| OM % | 31.3 ± 0.17 | 30.6 ± 0.3 | 27.9 ± 0.6 | 25.9 ± 0.4 | 24.6 ± 0.13 |
| COT % | 18.1 ± 0.2 | 17.7 ± 0.16 | 16.2 ± 0.3 | 15 ± 0.1 | 14.3 ± 0.08 |
| TKN % | 1.3 ± 0.07 | 0.7 ± 0.02 | 0.8 ± 0.01 | 0.8 ± 0.04 | 0.9 ± 0.04 |
| C/N | 14 | 23.9 | 21.4 | 18.5 | 16.4 |
| ash | 68.8 ± 3.2 | 65.9 ± 1.5 | 70.7 ± 2.4 | 75.3 ± 0.5 | 76.3 ± 1.1 |
| RD | / | / | 20.0 | 36.5 | 40.0 |
| HS | / | 18.2 | 17.5 | 20.00 | 20.8 |
| N-NH ₄ ⁺ (mg g ⁻¹) | / | 2.7 | 2.3 | 1.8 | 1.4 |
| N-NO ₃ ⁻ (mg g ⁻¹) | / | 2.2 | 2 | 0.7 | 0.05 |
| N.org (mg g ⁻¹) | / | 4.7 | 5.3 | 6.3 | 7.3 |
| P total (g kg ⁻¹) | 2.6 ± 0.15 | 1.8 ± 0.08 | 1.5 ± 0.02 | 2.1 ± 0.24 | 1.8 ± 0.12 |
| P available (g kg ⁻¹) | 0.7 ± 0.02 | 0.4 ± 0.05 | 0.4 ± 0.03 | 0.5 ± 0.06 | 0.4 ± 0.04 |
| Ca available (g kg ⁻¹) | 15.7 | 13.1 | 11.8 | 18.4 | 13.9 |
| Ca total (g kg ⁻¹) | 90.3 ± 0.7 | 77.2 ± 0.9 | 64.1 ± 0.4 | 80.6 ± 1.1 | 71.7 ± 1.2 |
| Mg available (g kg ⁻¹) | 2.05 | 1.55 | 1.31 | 1.43 | 1.20 |
| Mg total (g kg ⁻¹) | 9.6 ± 0.6 | 7.8 ± 0.2 | 6.9 ± 0.6 | 8.6 ± 0.17 | 8.1 ± 0.1 |
| Na available (g kg ⁻¹) | 3.7 | 4.5 | 5 | 4.7 | 4 |
| Na total (g kg ⁻¹) | 6.5 ± 0.2 | 5.4 ± 0.2 | 5 ± 0.07 | 4.8 ± 0.14 | 4.5 ± 0.05 |
| K available (g kg ⁻¹) | 3.4 | 2.1 | 1.8 | 3.1 | 2.6 |
| K total (g kg ⁻¹) | 5.4 ± 0.14 | 6.1 ± 0.28 | 5.6 ± 0.27 | 7.1 ± 0.3 | 6.1 ± 0.4 |
| Mn total (mg kg ⁻¹) | 58.6 | 71.5 | 45.7 | 79.3 | 59.9 |
| Fe total (mg kg ⁻¹) | 3768 | 3845 | 3257 | 4484 | 3768 |

OM : organic matter, TOC : total organic carbon, TKN : total kjelahl nitrogen,
RD : rate of decomposition, HS : humic substances, P. : phosphorus

Infrared spectra of the compost at various stages of treatment are illustrated in Fig. 1. FTIR spectra exhibit the same absorbance aerea at different stages of composting, but they

differ in the intensity of some peaks, such as a remarkable decrease of aliphatic structures and lipids (2922, and 2855 cm^{-1}), peptidic structures (1540 cm^{-1}), and carbohydrates (1140-1090 cm^{-1}); In parallel the increase of intensity of aromatic structures occurred with phenolic OH and carboxylates extrimity $-\text{COO}^-$ around 1384 cm^{-1} , and sharply of etherified aromatic structures around 1034-1027 cm^{-1} .

This shows that sludge decomposition during composting begins by the lipid, protein, and carbohydrate components, with a relative increase of more resistant and stable aromatic structures such as oxidized lignin degradation products and etherified/esterified aromatic structures (Amir et al., 2003, 2004a, 2004b). Likewise, Hsu and Lo (1999) found an increase in aromaticity and a decrease in carbohydrates as composting of swine manure proceeded.

Accordingly, all these physico-chemical changes and spectroscopic characteristics are similar to the results of other studies and could reflect the stability and maturity of the final product (Echab et al., 1998; Hsu and Lo, 1999; Ouatmane et al., 2000).

3.2. Heavy metal speciation during composting

Composting can concentrate or dilute heavy metals present in sewage sludge (Lazarri et al., 2000; Zorpas et al., 2003). Lowering the amounts of heavy metal present depends on metal loss through leaching. The increase of metal level is due to weight loss in the course of composting following organic matter decomposition, release of carbon dioxide and water and mineralization processes (Wagner et al., 1990; Canaruttto et al., 1991). To correct this increase of metal concentrations during composting, all measurements were normalized by referring to the amount of ash. The corrected values at each step of composting are obtained from the following formula :

$$C_{\text{ash}} = C_m \times (a_0 / a_t) \quad (\mu\text{g kg}^{-1})$$

C_m : measured value expressed as μg of metal per kg of dry compost ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

a_0 : level of ash in the initial sample (0 d); a_t : level of ash in sample at each selected time of composting (30, 60, 90 and 180 d).

Absorbance

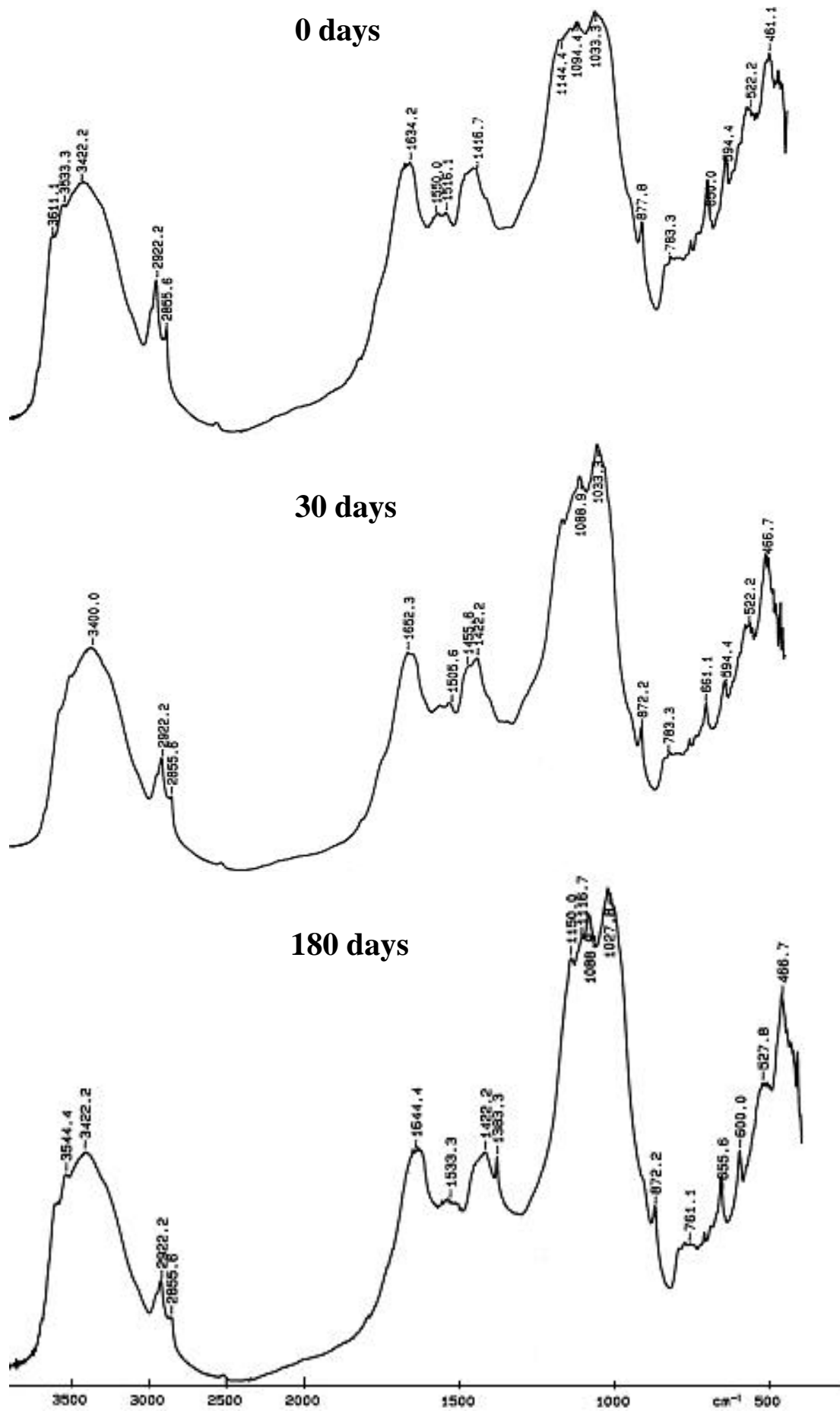


Figure 1. FTIR spectra of sludge mixture at different steps of composting

Fig. 2 illustrates the total concentration of metals (Zn, Pb, Cu, Ni) during composting. The order of total metal content in the composted sludge was $Zn > Pb > Cu > Ni$. During composting, all total metal amounts decreased except for Ni. This could be explained by metal loss through leaching in the course of composting. This loss mainly occurred during the thermophilic phase and could be related to metal release from decomposed organic matter, an increase of moisture from 54 to 70.8%, change of other oxidic and anionic conditions in the medium increasing so the solubility of metals (Zorpas et al., 2000; Hsu and Lo, 2001; Soumaré et al., 2003; Zorpas et al., 2003). Although, some authors suggest that where the potential toxic metal concentrations of a compost are high, the leachability of metal associated with compost is of concern (Hsu and Lo, 2001). It should consider the role of composting as important environmental sink to eliminate the most labile fraction of metal, mainly during active decomposition phase. Indeed, after stabilisation phase, metal total concentration is steady indicating that leachability are stopped, this demonstrate the interest of land application of mature compost.

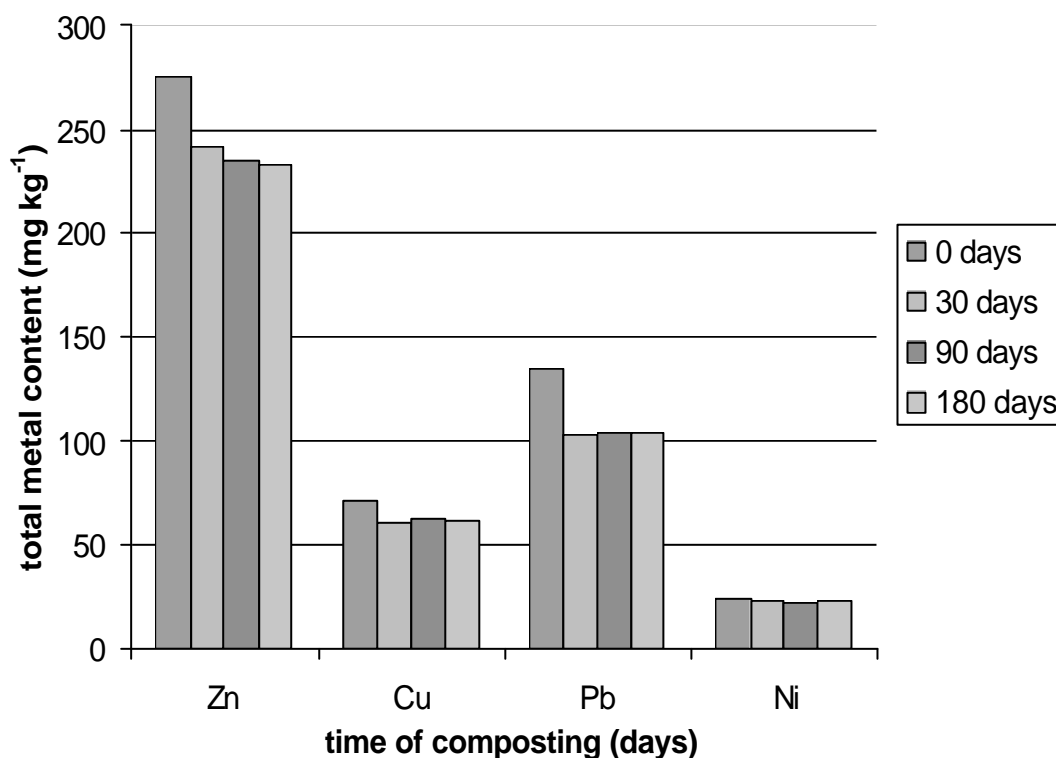


Figure 2. Total heavy metals content (Zn, Cu, Pb, Ni) during sludge composting.

For each metal, the sum of the amounts extracted by sequential extractions is almost four times lower than the total amount of metal extracted by the AFNOR method. Therefore, even 4 M HNO₃ digestion at 80 °C was not effective to extract total metal content, especially from the silicate phase. Try HCl/HNO₃/HF as the extraction agent described in the AFNOR method remedies this and allows the extraction of residual forms (AFNOR, 1993). Almost, 70 to 80% of metals were bound to this residual fraction occurred as silicate forms.

The total metal content of the final compost was lower than values of sludge composts which have no restrictions of use and are considered as soil fertilizer with good quality according to the normalisation of the Canadian Council of Ministers of the Environment (Table 3) [CCME., 1993; as available recommendation for sludge compost], as well as from the values obtained for other sludge composts (Zorpas et al., 2003).

Table 3. Heavy metal contents in the final compost (180 days) and limit values for class A of composts “which have no restrictions in use” and class B of compost “which can be used on forest lands and road sides and for other landscaping purposes”, according to Canadian normalisation CCME (1995).

| Metal | Final compost content (mg.kg ⁻¹ dry wt) | Limit values Class A (mg.kg ⁻¹ dry wt) | Limit values Class B (mg.kg ⁻¹ dry wt) |
|-------|---|--|--|
| Zn | 233 | 500 | 1850 |
| Cu | 62 | 100 | 757 |
| Pb | 101 | 150 | 500 |
| Ni | 23 | 62 | 180 |
| Cd | nd* | 3 | 20 |

* nd : non-detectable

Furthermore, the largest proportion of metal was found associated to the residual fraction (70-80%) and fractions more resistant to extraction X-NaOH, X-EDTA, X-HNO₃ (12-29%). This indicates that the metals were in more stable forms and can consequently be considered unavailable for plant uptake. A less than 2% of metals were bound to bioavailable fractions

X-(KNO₃+H₂O). Similar results have been reported in previous studies (Zorpas et al., 2000; Zorpas et al., 2003; Soumaré et al., 2003).

A good correlation coefficient (R= 0.98***) was found at each stage of composting between total metal amount and total amounts extracted by sequential extractions, in spite of the later is about 4 times lower than the former wherever the metal and step of composting.

To follow up the metal distribution during composting, each metal fraction was reported to % of total extractible amounts.

$$\% \text{ of total extractible metal} = (\text{X-fraction} / \text{Total extractible metal}) \times 100$$

(X-fraction = amount of metal in form KNO₃ or X-H₂O or X-NaOH or X-EDTA or X-HNO₃)

(Total extractible metal = X-KNO₃+ X-H₂O+ X-NaOH+ X-EDTA + X-HNO₃)

During composting, the mobile fractions X-KNO₃ and X-H₂O of Zn, Cu and Ni tended to decrease except Ni-H₂O, which increased (Fig. 3). The element Pb was not detected in the easily mobile class at any time of composting, indeed Pb is known to be almost insoluble in water (Petruzzelli et al., 1994).

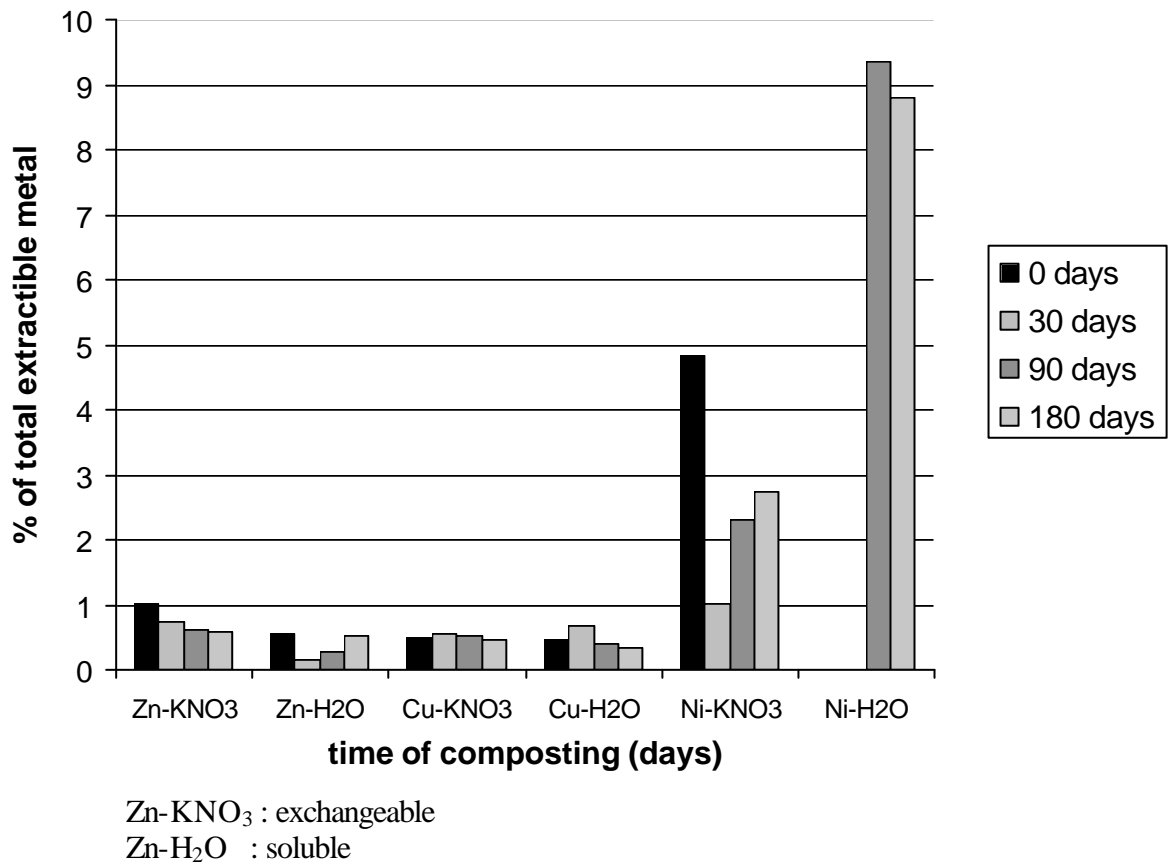


Figure 3. Change of % of extractible metal forms (X-KNO₃ and X-H₂O) during sludge composting.

For mobilisable fractions (Fig. 4 a, b), of Cu and Zn during composting there was a decrease of the X-HNO₃ fraction with an increase of X-EDTA, and X-NaOH forms. The changes were more significant in the case of Cu.

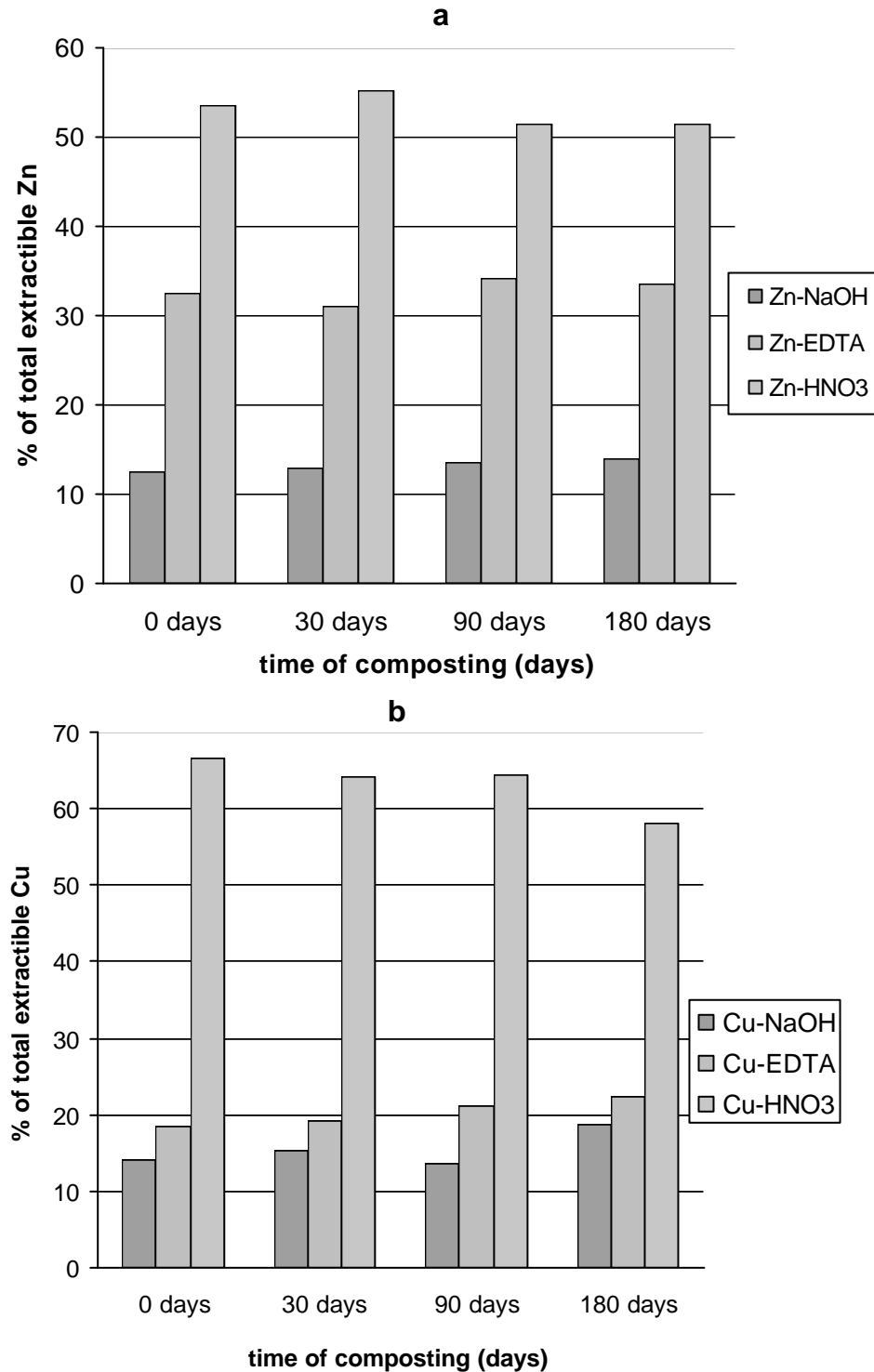


Figure 4 a, b. Change of % of extractible metal forms (X-NaOH; X-EDTA and X-HNO₃) during sludge composting (a: Zn; b: Cu).

In contrast, Pb presented a slight increase of X-HNO₃ with a decrease of NaOH and EDTA soluble forms. Ni showed a significant decrease of the NaOH fraction with an increase in the EDTA form (Fig. 4 c, d),.

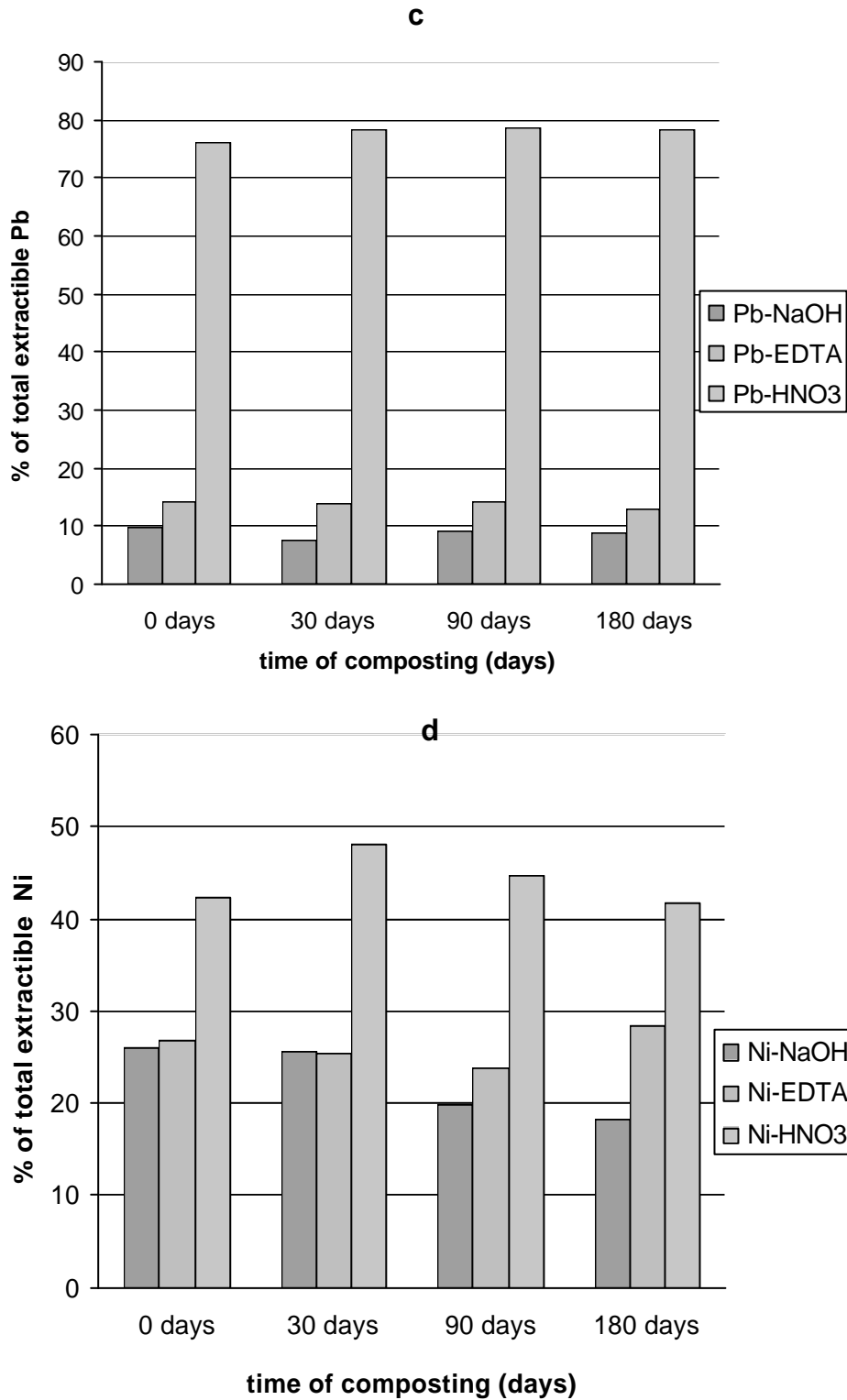


Figure 4 c, d. Change of % of extractible metal forms (X-NaOH; X-EDTA and X-HNO₃) during sludge composting (c: Pb; d: Ni).

In the course of composting, in the thermophilic phase, intense microbial decomposition of organic matter was achieved, and could involving the release of Ni and Pb from organic sites. These elements are later bound in less extractible forms in EDTA and HNO₃ fractions respectively. Pb was preferentially bound to sulfide forms X-HNO₃, and Ni to the carbonate fraction X-EDTA. In contrast, during composting the formation of humic substances seems to transform Zn and particularly Cu from sulphide fractions to organic fractions X-NaOH and X-EDTA. Hsu and Lo (2001) found that during composting of swine manure, Cu was primarily in the organically bound fraction and Zn was concentrated in the organically complexed fraction.

3.3. Statistical analysis and influence of change of selected variables on metal distribution

Correlation matrices of metal fractions with pH, ash, humic substances and organic matter content were explored to determine the influence of these selected variables on the changes of metal distribution during composting (Table 4). The metal redistribution between the fractions could also be approached by the correlation between the changes of metal fractions during composting.

The decrease of Zn KNO₃ was significantly positively correlated with the decrease of organic matter content ($R = 0.86^{**}$) and the increase of ash ($R = -0.86^{**}$), and Zn-NaOH and Zn-EDTA were well correlated with humic substances. Therefore, the transformation of raw organic matter to stable humic substances during composting process allows the transformation of Zn from exchangeable to stable organic forms.

For Cu, there were good correlations between the decrease of Cu-H₂O and the increase in humic substances ($r = -0.90^{**}$), and the decrease of pH ($R = 0.98^{***}$), this is consistent with the known affinity of Cu to organic acids which contribute to the formation of humic substances (Leita and De Nobili, 1991). Cu-EDTA also shows a good correlation with humic substances ($R = 0.93^{**}$). This supports the high affinity of Cu for functional groups OH or COO⁻ of humic substances (Prasad and Sinha, 1980; Senesi et al., 1992; Evangelou et al., 2002). The exchangeable Cu-KNO₃ and humic substances present a good correlation coefficient ($R = 0.93^{**}$).

The Ni-H₂O fraction shows a significant increase highly correlated with the decrease of pH ($R = -0.99^{***}$), the decrease of organic matter content ($R = -0.89^{**}$) and the increase of

the amount of ash ($R=0.90^{**}$). It should be noted that the increase of Ni in soluble forms could mainly be attributed to the great proportion of Ni in the raw material in an organic form readily biodegradable during composting (Fig. 4d). According to Henry and Harrison (1997), Ni is recognised as a relatively mobile and water-soluble metal. Kiekens (1990) suggests that a large percentage of Ni could be leached in the organic form. Chirenge and Ma (1999) suggested the high affinity of Ni to dissolved organic matter. Indeed, the decrease of Ni-NaOH shows a good correlation with the decrease of organic matter ($R = 0.96^{***}$) and the increase of ash ($R = - 0.90^{**}$), while the increase of Ni-EDTA presents a good correlation to humic substances and pH. The Ni seems so to have less affinity for newly formed humic substances during the maturation phase, or could be attached to organic compounds not contributing to the humic substances network. Tsadilas et al. (1995) found that the application of sewage sludge caused an increase of Ni-EDTA in the soil.

For Pb, mainly Pb-HNO₃ presented a good correlation with the increase of humic substances, which confirms the high affinity of Pb to HNO₃ form, although in the presence of humic substances (Zorpas et al., 2003). Indeed, Bodok et al. (1996) found that Pb was mainly present in the most resistant fractions such as residual and sulphide fractions of the soil. Unlike Pb and Ni, total Zn and Cu present a significant degree of correlation during composting with organic matter.

The linear correlations between the metal fractions during composting show that Cu-H₂O has a good inverse correlation with the increase of Ni-H₂O ($R= - 0.96^{***}$). The decrease of Cu-HNO₃ presents a good relationship with the decrease of Pb-NaOH ($R= 0.96^{***}$) and with Pb-EDTA ($R= 0.91^{***}$). For Zn, significant correlations were found between the increase of Zn-NaOH and Pb-HNO₃ ($R = 0.99^{***}$) or between the decrease of Zn-HNO₃ and Pb-NaOH ($R= 0.95^{***}$).

Thus, the observed affinities of heavy metals to the various fractions after treatment by composting could be ranked as follows: KNO₃+H₂O; Ni >> Cu = Zn; NaOH, Cu > Zn > Pb > Ni; EDTA, Ni > Cu > Zn > Pb; HNO₃, Pb > Ni > Cu > Zn.

Table 4. Linear correlation coefficients of heavy metal fractions and total content with ash, humic substance (HS), pH and organic matter contents (OM) of sewage sludge during treatment by composting.

| Heavy metal fraction | Ash | Humic substances | pH | OM |
|----------------------|---------|------------------|-----------|----------|
| Zn-KNO ₃ | -0.86** | 0.09ns | 0.48ns | 0.86** |
| Zn-H ₂ O | -0.26 | 0.72* | -0.21ns | 0.21ns |
| Zn-NaOH | 0.31 | 0.98*** | -0.74* | - 0.30ns |
| Zn-EDTA | 0.09 | 0.90** | -0.58 | - 0.06ns |
| Zn-HNO ₃ | -0.38 | 0.67 | -0.14ns | 0.39ns |
| Zn-total | -0.93** | -0.07ns | 0.62 | 0.93** |
| Cu-KNO ₃ | 0.09 | 0.93** | - 0.56ns | - 0.12ns |
| Cu-H ₂ O | -0.75* | -0.90** | 0.98*** | 0.73* |
| Cu-NaOH | 0.45 | 0.73* | -0.62* | -0.53ns |
| Cu-EDTA | 0.59 | 0.93** | -0.86** | - 0.63 |
| Cu-HNO ₃ | -0.05 | 0.88** | -0.46ns | 0.03ns |
| Cu-total | -0.81* | 0.09ns | 0.40ns | 0.83* |
| Pb-NaOH | -0.10 | 0.84* | -0.42ns | 0.12ns |
| Pb-EDTA | -0.06 | 0.82* | -0.46ns | 0.09ns |
| Pb-HNO ₃ | 0.16 | 0.96** | -0.64 | - 0.17ns |
| Pb-total | 0.52 | 0.51ns | 0.01ns | 0.55 ns |
| Ni-KNO ₃ | -0.43 | 0.64 | - 0.1 ns | 0.42ns |
| Ni-H ₂ O | 0.90** | 0.74* | - 0.99*** | - 0.89** |
| Ni-NaOH | -0.90** | -0.02ns | 0.53ns | 0.90** |
| Ni-EDTA | 0.34 | 0.91** | -0.68 | - 0.4 ns |
| Ni-HNO ₃ | 0.69 | 0.92** | -0.96*** | -0.67 |
| Ni-total | -0.62 | -0.03ns | 0.44ns | 0.53ns |

*, **, ***, ns : Statistically significant at the probability level 0.05, 0.01 and 0.001 and non significant respectively.

The influence of the selected variables on the bioavailable forms of metals Zn, Cu, Ni is illustrated by the stepwise linear regression equations (Table 5). Only, the mobile fraction of Zn could be predictable from the total amount of Zn in compost ($R^2 = 0.73^*$). For the all elements, the R^2 value was significantly increased by the inclusion of other variables such as amount of organic matter and pH. This confirms the influence of other factors of the medium, besides total concentrations, on the bioavailability of metals to the soil-plant system.

Table 5. Stepwise linear regression equations for the mobile form ($\text{KNO}_3 + \text{H}_2\text{O}$) of metal in relation to the total content, pH, humic substance (HS) or organic matter contents (OM).

| Equation | R^2 |
|---|---------|
| $\text{Zn-(KNO}_3 + \text{H}_2\text{O)} = - 1.62 + 0.87 \times 10^{-2} \text{ Zn Tot}$ | 0.73* |
| $\text{Zn-(KNO}_3 + \text{H}_2\text{O)} = - 1.98 + 0.022 \text{ Zn Tot} - 1.07 \times 10^{-4} \text{ MO}$ | 0.99*** |
| $\text{Cu-(KNO}_3 + \text{H}_2\text{O)} = 0.06 + 0.14 \times 10^{-2} \text{ Cu Tot}$ | 0.59 |
| $\text{Cu-(KNO}_3 + \text{H}_2\text{O)} = 8.17 \times 10^{-4} \text{ Cu Tot} + 2.54 \times 10^{-7} \text{ OM} + 0.013 \text{ pH}$ | 0.99*** |
| $\text{Ni-(KNO}_3 + \text{H}_2\text{O)} = 2.17 - 8.2 \times 10^{-2} \text{ Ni Tot}$ | 0.14 |
| $\text{Ni-(KNO}_3 + \text{H}_2\text{O)} = 4.18 + 1.5 \times 10^{-2} \text{ Ni Tot} - 0.6 \text{ pH}$ | 0.97*** |

4. Conclusion

In the course of 180 d of sludge composting, physico-chemical analysis and FTIR spectroscopic characterisation show that all parameters evolved and reached relatively stable levels reflecting the stability and maturity of the final product. The C/N ratio reaches the optimal range of stable compost, inorganic nitrogen is transformed into stable organic forms. The readily biodegradable compounds as such lipids and polysaccharides are decomposed and replaced by stable humic substances with high level in etherified aromatic structures. The compost can supply all macro-nutrients necessary for plant growth. The total concentration of Zn, Cu, Ni and Pb is very low rendering final compost acceptable for agricultural use. Follow-up of heavy metal speciation during composting shows that mobility and bioavailability of heavy metals are dependent on other physico-chemical properties of the medium besides total

metal contents such as decomposition of organic matter, humic substance content, pH; as well as to the affinity of metals for various chemical forms. The largest proportion of metal was found in the residual fraction and fractions more resistant to extraction indicating that the metals were in more stable forms and are consequently considered unavailable for plant uptake. The amount of potentially bioavailable metals was less than 2%.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Moroccan French cooperation PRAD (02/10), JER 6013 associated to the AUPELF-UREF and Scholarship Program of Search Formation of the French-speaking university agency.

References

- AFNOR. French Association of Normalizations NF X 31-151, 1993. Sols – Sédiments – Boues de stations d'épuration. Mise en solution des éléments métalliques traces (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn) par attaques acides pp: 139-145.
- Amir, S., Hafidi, M., 2001. Valorisation de boues de stations d'épuration des eaux usées par un bioprocédé aérobie "compostage". *Ann. Chim. Sci. Mat.* 26, S 409 – S 414.
- Amir, S., Hafidi, M., Bailly, J.R., Revel, J.C., 2003. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex gel fractions. *Agronomie* 23, 269-275.
- Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Hamdi, H., Revel, J.C., 2004a. Elemental analysis, FTIR, ¹³C-NMR of humic acids from sewage sludge composting. *Agronomie* 24 13-18.
- Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Revel, J.C., 2004b. Structural characterization of fulvic acids during composting of sewage sludge. *Process Biochem.* (in press).
- Aubert, G., 1978. Méthodes d'Analyse des Sols. Edition C.R.D.P., Marseille, 360 p.
- Bernal, M.P., Navarro, A.F., Roig, A., Cegarra, J., Garcia, D., 1996. Carbon and nitrogen transformation during composting of sweet sorghum bagasse, *Biol. Fertil. Soil.* 22, 141-148.
- Bodog, I., Polyak, K., Hlavay, J., 1996. Determination of heavy metals in lake and river sediments by selective extraction leaching. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 66, 79-94.
- Brauckman, B.M., 1990. in: B. Volskey (Eds.). *Biosorption of Heavy Metals*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 51-61.

- Bremner, J.M., 1965. Inorganic forms of nitrogen: In Black C.A., Evans De wite J.L., Ensminger L.E., Clark FE (eds) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Agronomy 9A m Soc Agron*, Madison, Wis, pp 1179-1237.
- Canarutto, S., Petruzzelli, G., Lubrano, L., Guidi, G.V., 1991. How composting affects heavy metal content, *BioCycle*, 32, 48-50.
- CCME : Canadian Council of Ministers of the Environment, 1995. Proposed compost standards for Canada, 1993. Cited in the Composting Council of Canada, *Composting Technologies and Practices*.
- Chirenje, T., Ma, L.Q., 1999. Effects of acidification on metal mobility in a Papermill-ash amended soil, *J. Environ. Qual.* 28, 760-766.
- De souza, E.K., 1998. Contribution à la valorisation de la bagasse par transformation biologique et chimique. Valeur agronomique des composts et propriétés suppressives vis-vis du champignons phytopathogènes *Fusarium solanium*. Thèse de troisième cycle. Institut National Polytechnique de Toulouse. 386 p.
- Dudka, S., Miller, W.P., 1999. Accumulation of potentially toxic elements in plants and their transfer to human food chain. *J. Environ. Sci. Health. B.* 34, 681-708.
- Echab, A., Nejmeddine, A., Hafidi, M., Kaemmerer, M., Guiresse, M., Revel, J.C., 1998. Evolution de la fraction échangeable des éléments métalliques traces (Pb, Cu, Zn et Cd) lors du compostage des boues de lagunage, *Agrochimica*, XLII- 6.
- Hafidi, M., Badri, W., Kaemmerer, M., Revel, J.C., 1994. Comparaison des méthodes d'extraction chimique et biologique pour la détermination du phosphore assimilable. Actes Inst, Agron. Vet. (Maroc), 14, 3, 43-48.
- Henry, C.L., Harrison, R.B., 1997. Fate of trace metals in sewage sludge compost. In: *Biogeochemistry of trace elements*, Berkeley, CA, 23-26 June.
- Hsu, J.H., Lo, S.L., 2001. Effect of composting on characterization and leaching of copper, manganese, and zinc from swine manure. *Environ. Pollut.* 114, 119-127.
- Hsu, J.H., Lo, S.L., 1999. Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting of pig manure. *Environ. Pollut.* 104, 189-196.
- Kiekens, L., 1990. in : Alloway, B.J. (Eds.). *Heavy metals in soils*. Blackie USA and Canada, Halsted Press, New York, pp. 261-277.
- Lazzari, L., Sperti, L., Bertin, P., Pavoni, B., 2000. Correlation between inorganic (heavy metals) and organic (PCBs and PAHs) micropollutant concentrations during sewage sludge composting process. *Chemosphere* 41. 427-435.

- Leita, L., De Nobili, M., 1991. Water-soluble fractions of heavy metals during composting of municipal solid waste. *J. Environ. Qual.* 20. 73-78.
- Ma, L.Q., Rao, G.N., 1997. Chemical fractionation of Cadmium, Copper, Nickel, and Zinc in Contaminated Soils. *J. Environ. Qual.* 26. 259-264.
- Ouatmane, A., Provenzano, M.R., Hafidi, M., Senesi, N., 2000. Compost maturity assessment using calorimetry, spectroscopy and chemical analysis. *Compost Science and Utilisation.* 8, 124-134.
- Petruzzelli, G., Ottaviani, Lubrano, L., Veschetti, E., 1994. Characterization of heavy metal mobile species in sewage sludge for agricultural utilisation. *Agrochimica* 38. 277-284.
- Pichtel, J., Anderson, M., 1997. Trace metal bioavailability in municipal solid waste and sewage sludge composts. *Bioresource Technol.* 60, 223-229.
- Prasad, B., Sinha, M.K., 1980. Physical and chemical characterisation of soil and poultry litter humic and fulvic metal complexes. *Plant Soil.* 54. 223-232.
- Senesi, N., Saiz-Jimenez, C., Miano, T.M., 1992. Spectroscopic characterization of metal-humic acid-like complexes of earthworm-composted organic wastes. *Sci.Total. Environ.* 117/118, 111-120.
- Sims, J.T., Sklin, J., 1991. Chemical fractionation and plant uptake of heavy metals in soils amended with co-composted sewage sludge. *J. Environ. Qual.* 20, 387-395.
- Soumaré, M., Demeyer, A., Tack, F.M.G., Verloo, M.G., 2002. Chemical characteristics of Malian and Belgian solid waste composts. *Bioresource Technol.* 81. 97-101.
- Soumaré, M., Tack, F.M.G., Verloo, M.G., 2003. Characterisation of Malian and Belgian solid waste composts with respect to fertility and suitability for land application. *Waste Manage.* 23, 517-522.
- Sposito, G., Lund, L.J., Chang, A., 1982. Trace metal chemistry in arid- zone field soils amended with sewage sludge. I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in solid phases. *Soil sci. Soc. Am. J.* 46. 260-264.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metal. *Anal. Chem.* 51. 844-851
- Tsadilas, C.D., Matsi, T., Barbayiannis, D., Dimoyiannis, D., 1995. Influence of sewage sludge application on soil properties and on the distribution and availability of heavy metal fractions, *Commun. Soil. Sci. Plant. Anal.* 26, 2603-2619.
- Wagner, D.J., Bacon, G.D., Knocke, W.R., Switzenbaum, M.S., 1990. Changes and variability in concentration of heavy metals in sewage sludge during composting. *Environmental Technol.* 11, 949-960.

Zorpas, A.A., Constantinides, T., Vlyssides, A.G., Haralambous, I., Loizidou, M., 2000. Heavy metal uptake by natural zeolite and metal partitioning in sewage sludge compost. *Bioresource Technol.* 72, 113-119.

Zorpas, A.A., Arapoglou, D., Panagiotis, K., 2003. Waste paper and clinoptilolite as a bulking material with dewatered anaerobically stabilized primary sewage sludge (DASPSS) for compost production. *Waste Manage.* 23, 27-35.

Chapitre 3 :

Fate of phthalic acid esters during composting of both lagooning and activated sludges

Amir S^a., Hafidi M^a., Merlina G^b., Hamdi H^b., Jouraiphy A^c., El Gharous M^c., Revel J.C^b.

^a Unité Sol et Environnement (Lab. Ecol. Végét.), Faculté des Sciences Semlalia, Dépt. de Biologie. BP/2390, Marrakech, Morocco.

^b J. E. Agronomie, Environnement et Ecotoxicologie, ENSAT, 31326, Castanet-Tolosan, BP/107, Toulouse, France

^c Centre d'arido-culture, INRA, Settat, Maroc.

* Corresponding author : e-mail : hafidi@ucam.ac.ma

Présentation :

Les esters d'acides phthaliques ou phthalates (PAEs) sont une classe de composés organiques largement employés comme des additifs dans la fabrication de plastiques afin d'améliorer leur flexibilité. Ils sont liés par des bonds non covalentes à la résine, ce qui facilite leur extraction et migration dans l'environnement. Dans les stations de traitement des eaux usées, à cause de leur solubilité très faible, et leur résistance à la biodégradation, ces substances tendent à se concentrer dans les boues à travers leur précipitation à partir des eaux usées. La présence de ces polluants organiques dans les boues résiduelles pourrait gêner leur utilisation agricole puisque sont des composés soupçonner à effet cancérigène.

Ainsi, l'objectif de ce travail est la détermination des teneurs et devenir des Esters d'Acides Phthaliques (PAEs) lors du compostage des boues de lagunage et activées particulièrement les composés retenus par l'Agence de protection de l'Environnement des Etats-Unis USEPA (DMP, DEP, DBP, BBP et DEHP) comme polluants prioritaires.

Les boues de lagunage (LS) sont prélevées de la station expérimentale de la ville de Marrakech et les boues activées (AS) sont prélevées de la station municipale de la ville de Khouribga (Maroc). L'essai de compostage des boues de lagunage (LS) a été conduit sur un mélange boues (165 kg) et paille (20 kg) pendant 180 jours. L'essai de compostage des boues activées a été réalisé sur un mélange boues (5 tonnes) et déchets verts (2,5 tonnes) pendant 135 jours. L'échantillonnage est réalisé à différents stades de compostage des boues de lagunage (temps initial, après 30, 60, 90 et 180 jours) et des boues activées (temps initial, après 15, 30, 45, 75, 90 et 135 jours). Un échantillon représentatif est obtenu à chaque fois d'un mélange bien homogénéisé de sous échantillons prélevés à différents points du tas de compost.

L'extraction des PAE a été réalisée deux fois sur 10 g de chaque échantillon séché à l'air libre en utilisant un mélange de solvants : 10 ml de dichlorométhane et 20 ml de diéthyléther. Les mélanges sont agités pendant 30 min dans des tubes de verre et après centrifugation et filtration les deux extraits récupérés pour chaque échantillon sont rassemblés. Après un séchage par filtration aux Na_2SO_4 anhydre, l'analyse est réalisé en chromatographie phase gazeuse GC-MS Hewlett Packard HP-5890 séries II, couplé au détecteur de masse MSD HP-5971. La quantification est basée sur une comparaison avec un mélange des étalons externes mixte de cinq PAEs (DEHP, BBP, DBP, DEP et DMP) en utilisant le mode (SIM) pour les ions 225, 163, 149, 104, 91 et 76 m/z. Les valeurs mesurées sont corrigées (voir chapitre 2)

Les résultats obtenus ont montré que le di-éthyle-hexyl phthalate DEHP est le polluant prédominant avec 28,67 mg/kg dans les boues de lagunage (LS) et 6,26 mg/kg dans les boues activées (AS). Ces valeurs sont très bas comparées à celles rapportées dans les boues dans d'autres pays. D'autres acides phthaliques, comme le dibutyle phthalate DBP et le diméthyle phthalate DMP sont présents à des concentrations très faibles (tableau 2 et 3). De grandes teneurs en DEHP et relativement en DBP dans les boues de lagunage LS par rapport aux boues activées peuvent être attribués à leur faible biodégradation sous des conditions anaérobies dans la lagune de traitement des eaux usées.

Au cours du compostage des boues, après la phase de stabilisation, on voit l'apparition successive de DEP et ensuite de DMP (tableau 2 et 3). L'apparition de DEP peut être liée à β -oxydation des deux chaînes latérales alkyles de DBP. Alors que, le diméthylphthalate DMP peut être à l'origine d'une déméthylation des deux chaînes latérales alkyles des DEP par une rupture de liaison C-C à l'intérieur du groupement éthyle ou trans-estérification d'un éthyle par un méthyle par une rupture de liaison C-O (figure 2). Ainsi, l'apparition et l'accumulation de PAEs avec des chaînes alkyles latérales courtes dans les derniers stades de compostage des deux boues (LS et AS) pourraient provenir de la biodégradation des phthalates avec des chaînes alkyles latérales plus longues. Des données sur une biodégradation suprême des PAEs jusqu'à une rupture de cycle aromatique d'acide phthalique manque dans cette étude soit lié au protocole d'extraction non convenable ou l'analyse par GC-MS n'est pas adéquate.

L'apparition de BBP en phase finale peut être attribuée à une trans-estérification d'un butyle par un dérivé aromatique "benzyle" en présence de grande teneur en composés aromatiques en fin du processus de compostage. A l'opposé de ces PAEs à chaînes latérales courtes, le polluant industriel le plus répandu DEHP a montré une diminution continue lors du compostage qui suit une loi cinétique de premier ordre durant le compostage : $t_2 = \ln 2 / K_h$, mais avec des taux et des comportements différents dans les composts des deux boues (figure 3 et 4). Les demi-vies estimées et les taux de biodégradation du DEHP sont respectivement 45,4 jours et $(1,53 \times 10^{-2} \text{ jour}^{-1})$ pour LS et 28,9 jours et $(2,4 \times 10^{-2} \text{ jour}^{-1})$ pour AS. Un grand taux de biodégradation du DEHP dans le cas du compostage des boues activées peut être attribué à la présence d'une large classe de communautés indigènes microbiennes, développées pendant le traitement des eaux usées et dont l'activité continue pendant le compostage. De plus, une grande teneur en DEHP dans les boues de lagunage peut avoir un effet toxique ou d'inhibition sur la biodégradation microbienne. Le produit de métabolisation de DEHP désigné le mono (2-ethylhexyl) phthalate MEHP a été identifié par la bibliothèque NIST à un temps de rétention de 13,7 minutes. La présence de ce composé suggère la mise en

jeu d'une deuxième voie de métabolisme impliquant l'hydrolyse ou dé-alkylation successive de chacune des deux chaînes latérales.

A la lumière de l'ensemble de résultats, on peut suggérer le compostage comme un processus de détoxification pour l'élimination des PAEs (principalement le DEHP) dans les boues, mais après un temps suffisant de traitement.

Abstract :

Among the Phthalic Acid Esters (PAEs) targeted by the United States Environmental Protection Agency USEPA as priority pollutants, di-ethyl-hexyl phthalate DEHP is the major pollutant identified at high concentration level in Lagooning Sludge (LS), at about 28.67 mg/kg, and in Activated Sludge (AS), at about 6.26 mg/kg. Other phthalic acid esters, such as dibutyl phthalate DBP and dimethyl phthalate DMP show very low concentrations. During sludge composting, after the stabilization phase, the subsequent appearance of DEP and then DMP is occurred indicating that the microbial metabolism begins by alkyl side-chain degradation before aromatic ring-cleavage. The appearance and accumulation of PAEs with a short alkyl side-chain in the last stages of AS and LS composting is suggested originating from the degradation of phthalates with a much long side-chain. The DEHP showed a rate of biodegradation that follows a first-order kinetic model during composting of both AS and LS. The calculated DEHP half-lives are 45.4 days for LS and 28.9 days for AS. The better DEHP biodegradation rate ($2.4 \times 10^{-2} \text{ days}^{-1}$) have been observed in the case of AS composting compared to LS compost ($1.53 \times 10^{-2} \text{ days}^{-1}$). The mono-ethyl-hexyl phthalates MEHP has been shown followed the same order of biodegradation as DEHP indicating that the same mechanism is followed (hydrolysis or dealkylation of each DEHP side chain). The composting could be suggested as a detoxification process for the removal of PAEs (mainly DEHP) from sludges after a sufficient time of treatment to providing a safe end product.

Key words: Phthalic acid esters, DEHP, composting, lagooning sludges, activated sludges, biodegradation rate.

1. Introduction

Phthalic acid esters (PAEs) are a class of refractory organic compounds widely used as additives or plasticizers in the manufacture of plastics. In order to improve the mechanical properties of a plastic resin, particularly flexibility, phthalate plasticizers are not bound covalently to the resin and can therefore migrate into the environment [1]. Due to the global use of plasticized plastics, phthalates have been detected in all environments in which they have been searched, even in medical material and urine [2]. Some of them are suspected to be mutagens [3] and carcinogens [4]. Di-ethyl-hexyl phthalates DEHP is included in class B2 (probable human carcinogen) while butyl-benzyl phthalate BBP belongs to class C (possible human carcinogen). Other phthalates: di-butyl phthalates DBP, di-ethyl phthalates DEP and di-methyl phthalates DMP are included in class D (not classified as human carcinogens) [5]. However, questions about toxic effects of PAEs and their metabolites persist today [6]. The presence of PAEs mainly DEHP in sludge has been mentioned in numerous studies [7; 8; 9]. PAEs have been found in sewage sludge at levels of 12-1250 mg/kg [10]. In wastewater treatment plants, due to their low solubility, these substances tend to be concentrated in sludge through precipitation from the wastewater [7]. For this reason, the use of sewage sludge in agriculture could lead to human exposure either directly at the time of spreading or through the introduction of the compounds into the food chain. Therefore, it is required that sludge be exempt from such organic contaminants prior to its use. The reduction of PAEs content in sewage sludge is of great importance for further sludge disposal or agricultural utilization [11]. According to numerous studies, metabolic breakdown of PAEs by microorganisms under aerobic or anaerobic conditions is considered to be one of the major routes for the environmental removal of several PAEs from soil, natural water and wastewater [12; 13; 14; 15; 16; 17; 18]. Primary degradation half-lives range from less than 1 day to 2 weeks in surface and marine waters and from 1 week to several months in soil. Longer half-lives may occur in anaerobic conditions, oligotrophic or cold environments, or through the action of other limiting factors inhibiting biodegradation. Standardized aerobic biodegradation tests with sewage sludge inocula show that phthalate esters undergo more than 50 % ultimate degradation within 28 days [10]. Other studies demonstrate that compounds with short ester hydrocarbon chains are easily biodegraded and mineralized, and that PAEs with long ester chains are less susceptible to the degradation, some of them being considered recalcitrant [18; 19; 20]. Shelton et al. [21] found that DMP, DEP, DBP, BBP were mineralized in digested sludges whereas DEHP and di-n-octyl phthalates DOP were persistent. Banat et al. [11] show

the influence of the sludge temperature and aeration rate on the reduction of DEHP concentration. A reduction of 70 % was obtained for an air flow rate of $16\text{m}^3/\text{m}^3\cdot\text{h}$ and under a temperature of 63°C . Roslev et al. [22] and Madsen et al. [23] showed that the DEHP half lives in sludge-amended soil at 20°C ranged from 10 to 60 days, but could exceed 300 days at $5\text{-}10^\circ\text{C}$.

Accordingly, the purpose of this work is to determine the levels of the PAEs targeted as priority pollutants by USEPA (DMP, DEP, DBP, BBP and DEHP) in both lagooning and activated sludges in Morocco and to assess the potential efficiency of composting as an aerobic thermophilic treatment allowing the removal of PAEs or diminution of their concentration level.

2. Material and methods

2.1. Composting

Lagooning sludge (LS) was taken from the anaerobic lagoon of an experimental wastewater treatment plant in Marrakech city (Morocco). Activated sludge (AS) was taken from the municipal wastewater treatment plant in Khouribga city (Morocco). A semi-industrial trial has been conducted on the lagooning sludge. A mixture of sludge (165 kg) and straw (20 kg) was composted on a platform and monitored over 180 days. For the activated sludge, an industrial trial was conducted. A mixture of sludge (5 tons) and grass (2.5 tons) was composted on a platform and monitored for 135 days. For both trials, the mixture was turned over every 15 days to ensure aerobic conditions. The well progress of composting and microbial activities was followed by measuring daily the temperature in heaps of the compost.

2.2. Sampling

To obtain the representative samples and results of analysis, numerous samples from various point of the compost heaps were collected and mixed thoroughly at each stage of composting: The selected times of sampling were for lagooning sludge (initial mixture, after 30, 60, 90 and 180 days) and for activated sludge (initial mixture, after 15, 30, 45, 75, 90 and 135 days). The samples were kept deep frozen until analysis.

2.3. Compost parameters

Some physico-chemical characteristics of the composts at different stages of treatment are reported in Table 1: The pH is determined on a suspension sample - water (10g / 15 ml), the Total Organic Carbon (C. org) is measured according to ANNE method, the total nitrogen (N. tot) by Kjeldahl method, The rate of decomposition is calculated after ignition of the dry

sample at 550°C (16 h). The humic acid content was calculated after a freeze-drying of a known volume.

PAE extraction

For each sample, a homogenized air-dried quantity of about 10 g was used. PAE extraction was performed twice on this amount of matter with a mixture of 10 ml of dichloromethane and 20 ml of diethylether [8]. The mixture: solvents + sample was poured into a glass centrifugation tube with Teflon caps, shaken for 30 min and then centrifuged for 15 min at a rate of 2500 r.p.m. This procedure was repeated twice. The two extracts collected for each sample were pooled before being dried by filtration through anhydrous Na₂SO₄. The extracts were sufficiently clean to be directly analyzed.

GC-MS Analysis

GC-MS analysis was performed with a Hewlett-Packard gas chromatograph HP-5890 series II, equipped with a mass detector MSD HP-5971 and a data analysis station HP Chem. The column used for analysis was a 25 m HP-5 MS type (cross linked 5 % phenylmethylsilicone; 0.2 mm I.D., 0.33 µm film thickness). As carrier gas, high-grade helium N55 was used at a flow rate of 0.89 ml/min. Injection was made in split less mode. Injector temperature was 280°C and the purge time was set to 1 min.

The GC-MS oven temperature was maintained at 40°C for 1.5 min and then increased at a rate of 30°C/min until 160°C. The increase rate was then set to 5°C/min until the temperature reached 195°C. The next increase rate was then lowered to 3°C/min until 280°C. This final temperature was held for 23 min to eliminate all co-extracts. The detector temperature was 300°C, and the EMV sensitivity was set to 2600 V.

GC-MS analyses were compared with commercial standards and with library records from the National Institute of Standards (NIST).

Chemicals and standards

A standard solution was used containing a mix of five PAEs (DEHP, BBP, DBP, DEP and DMP) at 500 ng per µl in methanol supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). A standard of mono-ethyl-hexyl phthalate MEHP could not be obtained commercially. All other chemicals and solvents were of analytical grade.

Quantitation

Data acquisition was carried out in the selected ion monitoring mode (SIM) using the following ions 225, 163, 149, 104, 91 and 76 m/z. Quantitation was based on the external standard technique utilizing integrated peak areas of each selected ion. To take the weight variations of the sludge mixture pile during composting into account, all measurements were

expressed per unit ash. The latter constitutes the most chemically stable parameter during the composting process. The corrected values of the concentration at each step of composting were obtained from the following formula:

$$C = C_m \times (A_0 / A_T)$$

C_m : concentration measured by chromatography

A_0 : Level of ash in the initial sample T_0 ; A_T : Level of ash in sample at each step T of composting.

3. Results and discussion

3.1. Compost Processing

The change of some physico-chemical parameters between initial samples and final composts are presented in Table 1. pH is parameter which affects greatly the composting process. pH values were within the optimal range for development of bacterial 6-7.5 and fungi 5.5-8.0.

Table 1. Physico-chemical properties of initial samples and final compost of lagooning and activated sludge

| | Lagoning Sludge | | Activated Sludges | |
|------------------|-----------------|---------------|-------------------|---------------|
| | Initial sample | Final compost | Initial sample | Final compost |
| pH | 7.30 | 6.80 | 6.36 | 6.23 |
| C.org (%) | 17.74 | 13.45 | 35.7 | 20.55 |
| M.org (%) | 30.6 | 23.18 | 61.56 | 36.85 |
| N. tot (mg/g ps) | 7.42 | 8.82 | 12.00 | 16.90 |
| C/N | 24.00 | 15.24 | 29.75 | 12.16 |
| DEC (%) | / | 41.50 | / | 60.82 |
| HA (mg/g ps) | 18.12 | 22.8 | 26.47 | 39.5 |

All results expressed in dry basis

C. org : Organic carbon ; N. tot : azote total kjeldahl; DEC: Decomposition rate; H. A.: Humic acids

Two phases of composting process was recorded: a phase of stabilization (about 30 days), where temperature has peaked to 52° C after 7 days of lagooning sludge composting, and to 72 °C after 4 days of activated sludge composting (Fig. 1). The increase of temperature during

stabilisation phase is originated from a development of microbial activities, mainly thermophilic species. A second phase of maturation occurred after the first month of composting, is characterized by a decrease of temperature level into ambient temperature. This phase is characterised by a development of mesophilic communities. The succession during composting of these microbial communities thermophile and mesophile allow to biodegradation of raw materials. Since, a part of organic carbon was decreased and the other part was probably included to formation of humic structures (Table 1). The C/N ratio decreased from 24 to 15.4 and from 29.7 to 12.1 respectively in lagooning sludge and activated sludge. The rate of decomposition is recorded about 41.5 % in the case of lagooning sludge and achieved 60.8 % in the case of activated sludge. These variations allow to suggest the good processing of both trial of composting.

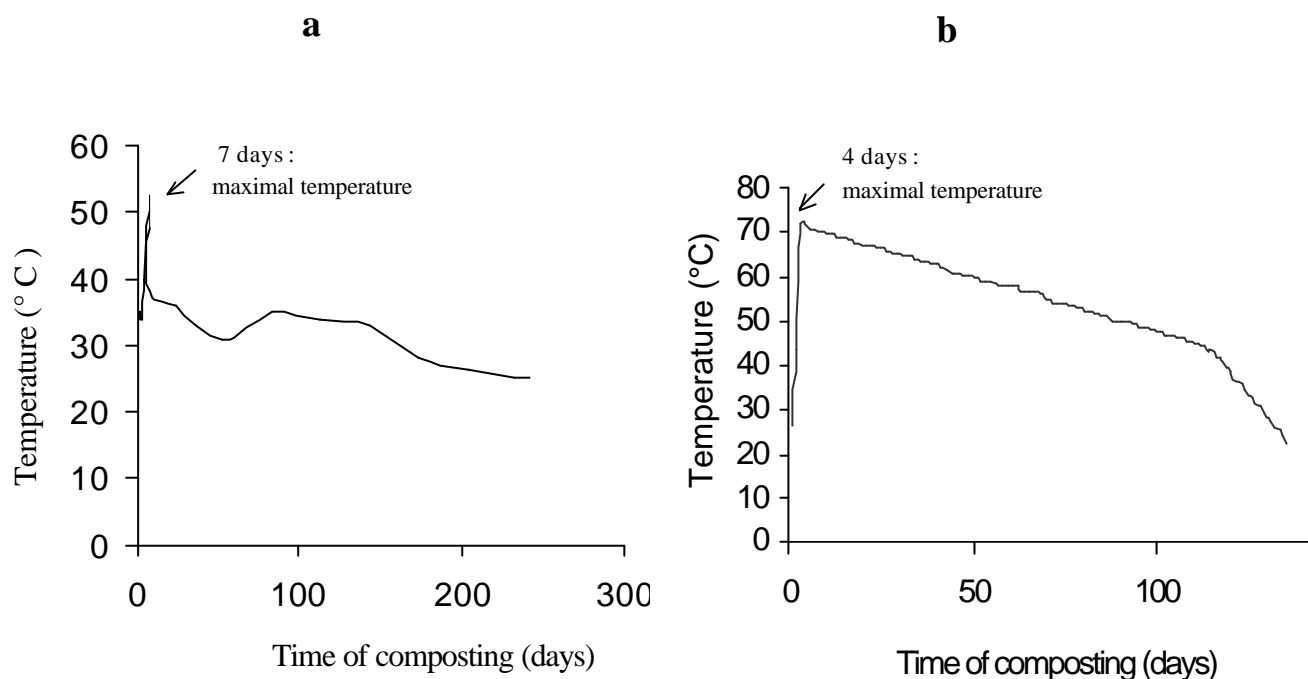


Figure 1: Variation of temperature during composting of lagooning and activated sludges (a, b respectively)

3.2. Levels of five common PAEs in lagooning and activated sludges

The occurrence of five common PAEs (DEHP, BBP, DBP, DEP and DMP) was investigated in both composted lagooning and activated sludges. Di-ethylhexyl phthalate DEHP was the main PAE identified at high concentration levels in the initial samples. It occurred at about 6.26mg/kg dry weight in AS sludge and at about 28.67 mg/kg dry weight in

LS sludge. These values are very low compared to those reported for the sludges of other countries, see the low industrial activities. The USA National Sewage Sludge Survey reported levels of DEHP ranging from 55.1 to 163.3 mg/kg dry weight [24]. Similar levels were reported in Canadian and Germany surveys [9; 25].

Di-butyl-phthalates DBP was present in both initial sludge mixtures and di-methyl-phthalate DMP was present only in AS at low concentrations (Table 2 and 3). The low concentration level of DEHP and DBP observed in the case of AS compared to LS could be attributed to high biological activity at the activated wastewater plant, in addition to the fact that the two sludges did not have the same origin. Otherwise, the high levels of DEHP and relatively high levels of DBP in LS sludges can be attributed to the weak biodegradation under the anaerobic or methanogenic conditions in the wastewater plant lagoon [20; 29; 30].

Subba –Rao et al. [26] and Battersby et al. [27] reported that primary and sometimes ultimate degradation of PAEs occurred during sludge treatment. PAEs with short alkyl side-chains are easily decomposed, and this may explain the low level of DMP, DEP and DBP in both sludges (AS and LS). In contrast, some proportion of PAEs adsorbed by the suspended organic matter, the recalcitrant PAEs as DEHP and others with long side chains, could escape microbial degradation during treatment in the wastewater plant [28].

3.3. Fate of PAEs with short side chains during composting

During composting of both sludges, after the stabilization phase (30 days of composting), DBP disappeared in parallel with the appearance in lagooning sludge of shorter alkyl side-chain phthalates such as di-ethyl-phthalates DEP and DMP. In the next step of composting, DEP disappeared and the level of DMP remained almost constant in both sludge composts (Tables 2 and 3). Biodegradation of PAEs by microorganisms under aerobic conditions has been demonstrated in other studies carried out in soil, natural water, wastewater and sludges [11; 14]. Therefore, the development of intense microbial activity during composting could be considered as the main factor leading to the biodegradation of the PAEs. Used as a source of energy, the microbial metabolism of the PAEs seems to begin by alkyl side-chain degradation before aromatic ring-cleavage

Table 2. Fate of phthalic acid esters PAEs with short alkyl side-chains during composting of lagooning sludge (LS)

| PAE | retention time (min) | characteristic ion (m/z) | initial sample | 30 days | 60 days | 90 days | 180 days |
|-------------|----------------------|--------------------------|----------------|---------|---------|---------|----------|
| DMP (mg/kg) | 8.06 | 163 | - | 0.31 | 0.37 | 0.6 | 0.33 |
| | | 104 | - | - | - | - | 1.16 |
| DEP (mg/kg) | 9.64 | 149 | - | 0.91 | - | - | 1.01 |
| | | 104 | - | - | - | - | 0.85 |
| | | 76 | - | - | - | - | 0.89 |
| DBP (mg/kg) | 15.65 | 225 | - | - | - | - | 3.09 |
| | | 149 | 1.66 | - | - | - | - |
| BBP (mg/kg) | 24.52 | 225 | - | - | - | - | 8.8 |

(- : non detected)

DMP: Dimethyl phthalate

DBP: Di-n-butyl phthalate

DEP: Diethyl phthalate

BBP: Benzyl butyl phthalate

Table 3. Fate of phthalic acid esters PAEs with short alkyl side-chains during composting of activated sludge (AS).

| PAE | retention time (min) | characteristic ion (m/z) | initial sample | 15 days | 30 days | 60 days | 75 days | 90 days | 135 days |
|-------------|----------------------|--------------------------|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|
| DMP (mg/kg) | 8.06 | 163 | 0.54 | 0.18 | 0.48 | 0.20 | 0.15 | 0.12 | - |
| DEP (mg/kg) | 9.64 | 149 | - | - | - | 0.9 | - | - | 2.07 |
| | | 76 | - | - | - | - | - | - | 1.55 |
| DBP (mg/kg) | 15.65 | 225 | - | - | - | - | 0.30 | 1.66 | 6.25 |
| | | 149 | 0.39 | - | - | 0.16 | - | - | - |
| BBP (mg/kg) | 24.52 | 225 | - | - | - | - | 2.64 | 14.17 | 13.94 |

(- : non detected)

DMP: Dimethyl phthalate

DBP: Di-n-butyl phthalate

DEP: Diethyl phthalate

BBP: Benzyl butyl phthalate

Figure (2) summarizes various catabolic pathways of PAEs biodegradation reported in previous studies [18; 31; 32; 33; 34; 35; 36].

The appearance of diethylphthalate DEP, during composting, is probably due to β -oxidation of both alkyl side-chains of DBP. While, dimethylphthalate DMP may originate as described by Cartwright et al. [35] through demethylation of both side chains of DEP implying the cleavage of a relatively strong C-C bond within the ethyl group. These authors have also suggested alternative pathways: the transesterification or the replacement of the ethyl group with a methyl group following the cleavage of the relatively weaker C-O ester bond.

The unappearance of DEP in AS compost may result from its stronger or more efficient biological activity compared to LS compost. A wide class of indigenous microbial communities has developed during treatment in the activated wastewater plant, and continue their activity during composting. Alatríste-Mondragón et al. [28] show that the half-life of DBP in anaerobic sludge is about 5 days. The estimated duration of ultimate degradation is then about 50 days. Wang et al. [37] reported that up to 1.25 mM of DBP could be completely degraded within 100 hours by a denitrifying bacterium isolated from activated sludge. Therefore, decomposition of DEP (DBP metabolite) may have been rapidly achieved in AS compost. However, information about if the PAEs are subjected ultimate biodegradation until ring cleavage of aromatic cycle is lacked in this study. Because, GC-MS technique or experimental conditions as extraction appear with not adequate recovery about phthalic acid level.

In the last step of composting, both LS and AS sludges exhibited a high concentration of BBP (Benzyl butyl phthalate), DBP and DEP after 180 days of composting for LS and 60 days of composting for AS (Table 2 and 3). DMP also occurred in much higher concentrations in the case of LS compost. The increase of DBP, DEP and DMP contents at this stage of composting could be attributed to the microbial attack of the side-chain of PAEs with longer alkyl side-chains, which appears more efficient in AS compost due to its high biological activity.

The possible presence of phthalates with a long side-chain may be justified by their resistance to microbial attack during sludge treatment in wastewater plant. These phthalates were not clearly identified in this study, except for DEHP, as well as dinonyl phthalate whose presence was revealed by comparison with data from the NIST library.

The appearance of BBP only in the final steps of composting could be explained through a transesterification mechanism proposed by Cartwright et al. [37], but in this case with an aromatic derivative "benzyl". This is in agreement with the high degree of aromaticity and polymerization observed in the last steps of composting, as shown in a previous study [38].

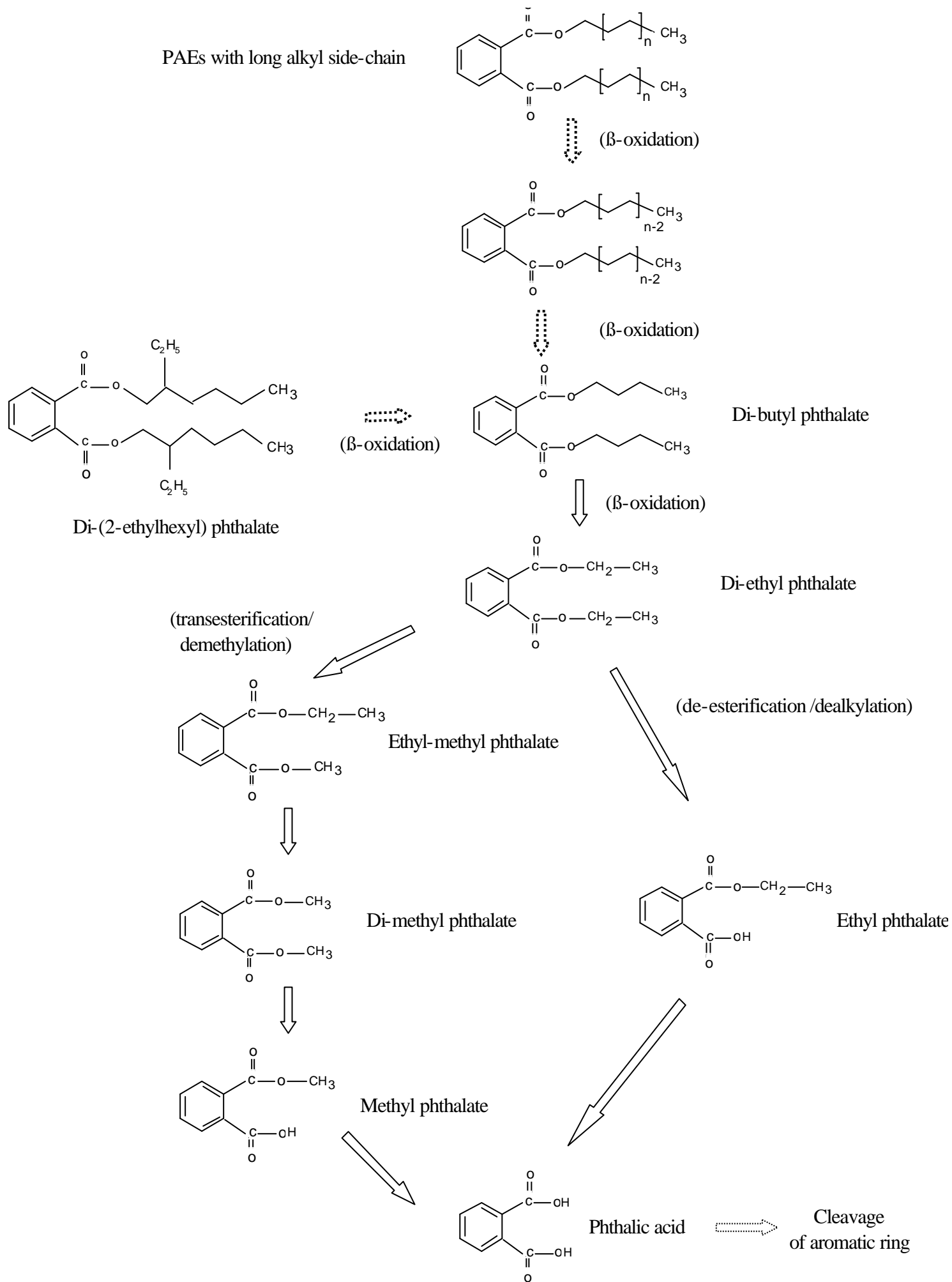


Figure 2: Major biodegradation pathways of phthalic acid ester (proposed in previous studies).

3.4. Biodegradation of DEHP during composting

In contrast to previous PAEs, the widespread industrial contaminant DEHP exhibited a continuous decrease during composting, but with different rates and behaviors in the two sludges (Fig. 3 and 4). First-order kinetics is frequently used to describe the biodegradation of a substrate at a low concentration and leads to the estimation of the biodegradation rates [10; 18; 30]. Therefore, the biodegradation rate of DEHP was calculated using a first-order kinetic model with a least squares fitting method. The half-lives of the first order reaction can be calculated according to the equation:

$$t_2 = \ln 2 / K_h$$

Table (4) summarizes the estimated values for kinetic constant, K_h , with its relative standard deviation, and the half-life of DEHP during the composting of both lagooning and activated sludges.

Composting appears to be efficient in both cases for removal of DEHP. Madeson et al. [23] found that the first order kinetics rate (K_h) for DEHP removal from sludge-amended soil incubated under aerobic conditions was between $0.23 \times 10^{-2} \text{ day}^{-1}$ and $1.27 \times 10^{-2} \text{ day}^{-1}$, while K_h for sludge-amended soil incubated under anaerobic conditions K_h was of about $0.23 \times 10^{-2} \text{ day}^{-1}$. Gavala et al. [30] found the same range of values for the biodegradation of DEHP during mesophilic anaerobic digestion of sludge: about $0.35 \times 10^{-2} \text{ day}^{-1}$. Therefore, the much high rates determined in this study could reflect the aerobic conditions of medium.

Comparison between the kinetic constants of biodegradation K_h and the half-lives of DEHP during composting of both AS and LS shows that the removal of DEHP is faster during AS composting compared to LS composting (Table 4). This may be justified by the presence of a wide class of indigenous microbial communities, developed during the treatment in the activated wastewater plant, and whose activity continues during the composting. In fact, the great rate of decomposition of raw organic material shown recorded in the case of activated sludge (Table 1). The temperature could also be proposed as a physical factor contributing to DEHP biodegradation, since higher temperatures were reached in the AS compost (about 70°C) than in LS compost (about 52°C) [39].

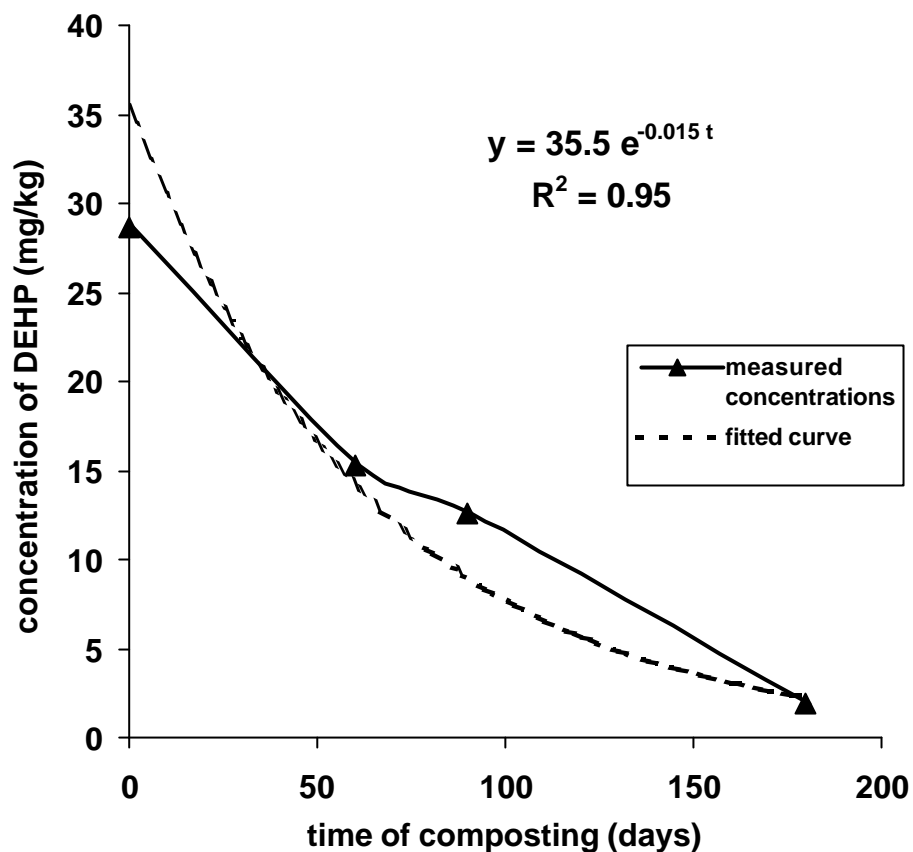


Figure 3. Change of the concentration level of di-(2-ethylhexyl) phthalate DEHP during composting of lagooning sludge (LS) [characteristic ion 149 m/z].

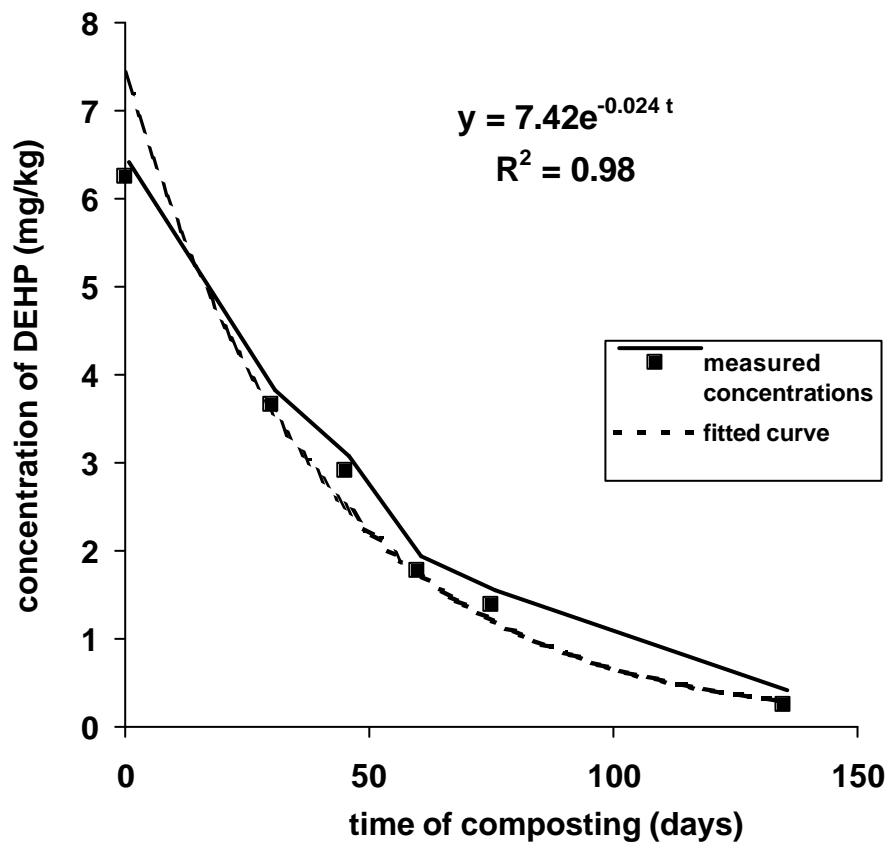


Figure 4. Change of the concentration level of di-(2-ethylhexyl) phthalate DEHP during composting of activated sludge (AS) [characteristic ion 149 m/z].

Table 4 : Values of the kinetic constant of biodegradation, K_h , and half-lives for di-(2-ethylhexyl) phthalate DEHP during composting of both lagooning and activated sludges (characteristic ions : 149, 104, 76 and 70 m/z).

| Sludge | Kinetic constant K_h (day^{-1}) | Correlation coefficient R^2 | Half-life $t_{1/2}$ (day) |
|--------|---|-------------------------------|---------------------------|
| LS | $1.53 \times 10^{-2} \pm 0.03 \times 10^{-2}$ | 0.95 | 45.4 |
| AS | $2.4 \times 10^{-2} \pm 0.08 \times 10^{-2}$ | 0.98 | 28.9 |

Moreover, the high initial level of DEHP in lagooning sludge may lead to an inhibition or toxic effect on the microbial biodegradation. Some studies show that high levels of DEHP or other recalcitrant PAEs in the medium compromise the removal of biodegradable PAEs [28; 30]. It has been hypothesized that DEHP affects the membrane of the microbial cells thus causing the inhibition. In fact, this toxic effect of DEHP may also explain the appearance of PAEs with short alkyl side-chains during the last step of composting, after 60 days of AS composting and after 180 days of LS composting (Table 2 and 3). This coincides with the removal of most DEHP from the medium; whose concentration level became less than 1.82 ± 0.05 mg/kg. So, the presence of high concentrations of DEHP in the early steps of treatment probably had an inhibition effect on the microbial decomposition of PAEs with longer alkyl side-chains into PAEs with short alkyl side-chains: BBP, DEP and DMP.

3.5. De-esterification kinetics of both side chains of DEHP

The occurrence of mono (2-ethylhexyl) phthalate MEHP has been occasionally identified in the degradation pathways of DEHP. A compound with a retention time of 13.7 min was identified as MEHP by the NIST library. The presence of this metabolite suggests the involvement of the second catabolic pathway (Fig. 2), as proposed in previous studies, through hydrolysis or de-esterification of di-alkyl phthalates like DEHP to monoesters such as MEHP, which can then be biotransformed into phthalic acid [21; 35]. On the basis of the variation of the peak area *v.s.* with composting time, the rates of MEHP biodegradation were of about 1.1×10^{-2} days^{-1} for LS compost and of about 2.5×10^{-2} days^{-1} for AS compost. The rates of MEHP degradation are of the same order as those of DEHP, meaning that the biological process involved is the same for the two molecules: de-alkylation and de-esterification.

4. Conclusion

The occurrence and the fate of some phthalic acid esters PAEs targeted as priority pollutants by USEPA, were investigated during composting of both lagooning and activated sludges.

Diethyl-hexyl phthalate DEHP was the main PAE identified at high levels mainly in lagooning sludge (LS) but also in activated sludge (AS). The other PAEs in both sludges are unidentified or showed very low concentrations. During composting, removal of PAEs is suggested occurred through a degradation by microbial communities, which intensely developed in course of process. The microbial metabolism seems begin by the decomposition of alkyl side-chains before aromatic ring-cleavage implying different catabolic pathways (β -oxidation, demethylation or transesterification). The accumulation of PAEs with shorter alkyl chains in the last step of composting that originating from microbial attack of PAEs with longer alkyl side-chains cannot be interpreted as an increase of toxicity but as an intermediate stage of detoxification. The DEHP show a biodegradation rate that followed a first-order kinetic model and is observed higher for AS composting compared to LS composting. This was explained by a high microbial activity in AS compost, but the inhibition effect of high concentration of DEHP on biodegradation could be also suggested in LS compost. The appearance of BBP in the last step of composting could be attributed to transesterification reaction with aromatic derivatives that are highly prevailed in the end of composting. The occurrence of mono-ethyl-hexyl phthalates MEHP and their similar biodegradation rate to DEHP support that hydrolysis or dealkylation of each alkyl side-chain follows the same mechanism. Therefore, composting could be suggested as an important detoxification process for the removal of PAEs mainly DEHP from sludge, but sufficient time of treatment must be provided to achieve a good stabilization and safety of end product.

Acknowledgements

This work was supported by JER 6013 associated to the AUPELF-UREF and a Scholarship Program of Research Training from the French-Speaking University Agency.

References

[1] CEFIC, Plasticisers. A consideration of their impact on health and the environment. Plasticisers Sector Group, European Chemical Industry Federation, Brussels, 1989.

- [2] Wahl, H.G, Hoffmann, A, Häring, H.U. and Liebich, H.M. Identification of plasticizers in medical products by a combined direct thermodesorption-cooled injection system and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1999 847 1-7.
- [3] Kozumbo, W.J, Kroll, R. and Rubin, R.J. Assessment of mutagenicity of phthalates esters. *Environ Health Perspect*, 1982, 45 103-110.
- [4] Huff, J.E. and Kluwe, W.M. Phthalate esters carcinogenicity in F344/N rats and B6C3F mice. *Prog Clin Biol Res*. 1984 141 131-154.
- [5] USEPA. List of substances on IRIS. In : United State Environmental Protection Agency. *Integrated Risk System Information*, 2000.
- [6] Doull, J., Cattley, R., Elcombe, C., Lake, B.G., Swenberg, J., Wilkinson, C., Williams, G. and van Gemert, M. A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl) phthalate: application of the new U.S.EPA Risk Assessment Guidelines. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*. 1999 29 327-357.
- [7] Bauer, M.J. and Herrmann, R. Estimation of the environmental contamination by phthalic acid esters leaching from house-hold wastes. *Sci Total Environ.*, 1997 208 49-57.
- [8] Lega, R., Ladwig, G., Meresz, O., Clement, R.E., Crawford, G., Salemi, R. and Jones, Y. Quantitative determination of organic priority pollutants in sewage sludge by GC/MS. *Chemosphere* 1997 34 1705-1712.
- [9] Schnaak, W., Kuechler, T., Kujawa, M., Henschel, K.P., Suessenbach, D. and Donau, R. Organic contaminants in sewage sludge and their ecotoxicological significance in the agricultural utilization of sewage sludge. *Chemosphere* 1997 35 5-11.
- [10] Staples, C.A., Peterson, D.R., Parkerton, T.F. and Adams, W.J. The environmental fate of phthalate esters : A literature review. *Chemosphere* 1997 35 667-749.
- [11] Banat, F.A., Prechtel, S. and Bischof, F. Experimental assessment of bio-reduction of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) under aerobic thermophilic conditions. *Chemosphere* 1999 39 2097-2106.
- [12] Inman, I.C., Strachan, S.D., Sommer, L.E. and Nelson, D.W. The decomposition of phthalates esters in soil. *J Environ Sci Health Ser B*, 1984 19 245-257.
- [13] Johnson, B.T., Heitkamp, M.A. and Jones, J.R. Environmental and chemical factors influencing the biodegradation of phthalic acid esters in fresh-water, sediments. *Environ Pollut* 1984 8 101-118.
- [14] Ribbons, D.W, Keyser, P., Kunz, D.A, Taylor, B.F., Eaton, R.W. and Anderson, B.N. Microbial degradation of phthalates. In Gibson DT, eds, *Microbial Degradation of Organic Compounds*, Marcel Dekker, New York, 1984, pp. 371-397.

- [15] Pujar, B.G. and Ribbons, D.W. Phthalate metabolism in *Pseudomonas fluorescens* PHK purification and properties of 4, 5-dihydroxyphthalate decarboxylase. *App Environ Microb* 1985 49 374-376.
- [16] Chauret, C., Mayfield, C.I. and Inniss, W.E. Biotransformation of di-n-butyl phthalate by a psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* (BGW) isolated from subsurface environment. *Can J Microbial* 1995 41 54-63.
- [17] Wang, J., Liu, P., Shi, H. and Qian, Y. Kinetics of phthalic acid ester degradation by acclimated activated sludge. *Process biochemistry*, 1997 32 567-571.
- [18] Wang, J., Chen, L., Shi, H. and Qian, Y. Microbial degradation of phthalic acid esters under anaerobic digestion of sludge. *Chemosphere* 2000 41 1245-1248.
- [19] O'Grady, D.P., Howard, P.H. and Warner, A.F. Activated-sludge biodegradation of 12 commercial phthalate-esters. *Applied and Environmental Microbiology* 1985 49 443-445.
- [20] Eljertsson, J., Alnervik, M., Jonsson, S. and Svensson, B.H. Influence of water solubility, side-chain degradability and side-chain structure on the degradation of phthalic acid esters under methanogenic conditions. *Environmental Science and Technology* 1997 31 2761-2764.
- [21] Shelton, D.R., Boy, S.A. and Tiedje, J.M. Anaerobic degradation of phthalic acid esters in sludge. *Environ Sci Technol* 1984 18 93-97.
- [22] Roslev, P., Madsen, P.L., Thyme, J.B. and Henriksen, K. Degradation of phthalate and di-(2-ethylhexyl)phthalate by indigenous and inoculated microorganisms in sludge-amended soil. *Appl Environ Microbiol* 1998 64 4711-4719.
- [23] Madsen, P.L., Thyme, J.B., Henriksen, K., Moldrup, P. and Roslev, P. Kinetics of di-(2-ethylhexyl)phthalate mineralisation in sludge-amended soil. *Environ Sci Technol* 1999 33 2601-2606.
- [24] USEPA. National Sewage Sludge Survey. *Fed Reg* 55 (218) 47210-83, 1990.
- [25] Webber, M.D. and Lesage, S. Organic contaminants in canadian municipal sludges. *Waste Manage Res*, 1989 7 63-82.
- [26] Subba -Rao, R.V., Rubin, H.E. and Alexander, M. Kinetics and extent of mineralization of organic chemicals at trace levels in freshwater and sewage. *Appl Environ Microbiol*, 1982 43 1139-1150.
- [27] Battersby, N.S. and Wilson, V. Survey of the anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge. *Appl Environ Microbiol*, 1989 55 433-439.
- [28] Alatraste-Mondragon, F., Iranpour, R. and Ahring, B.K. Toxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate on the anaerobic digestion of wastewater sludge. *Water Research*. 2003 37 1260-1269.

- [29] O'Connor, O.A., Rivera, M.D. and Young, L.Y. Toxicity and biodegradation of phthalic acid esters under methanogenic conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1989, 8 569-576.
- [30] Gavala, H.N., Alatrisme-Mondragon, F., Iranpour, R. and Ahring, B.K. Biodegradation of phthalate esters during the mesophilic anaerobic digestion of sludge. *Chemosphere* 2003 52 673-682.
- [31] Engelhardt, G., Wallnofer, P.R. and Hutzinger, O. Microbial metabolism of di-n-butyl phthalate and related dialkyl phthalates. *Bull Environ Contam Toxic* 1975 13 342-347.
- [32] Kurane, R., Suzuki, T. and Takahara, Y. Metabolic pathway of phthalate ester by *Nocardia erythropolis*. *Agric Biol Chem*, 1980 44 523-527.
- [33] Taylor, B.F. and Ribbons, D.W. Bacterial decarboxylation of o-phthalic acids. *Appl Environ Microbiol*, 1983 46 1276-1281.
- [34] Dutton, J.R., Venables, W.A. and Saint, C.P. *Comamonas acidovorans* UCC61 catabolizes o-phthalates via a 4, 5-oxygenation pathway that is encoded on 70 kb section of plasmid pOPH1 bounded by directly repeated sequences. *Microbiology*, 1995 141 1673-1682.
- [35] Cartwright, C.D., Owen, S.A., Thompson, I.A. and Burns, R.G. Biodegradation of diethyl phthalate in soil by a novel pathway. *FEMS Microbiology Letters* 2000 186 27-34.
- [36] Niazi, J.H., Prasad, D.T. and Karegoudar, T.B. 2001. Initial degradation of dimethylphthalate by esterases from *Bacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 2000 196 201-205.
- [37] Wang, J., Liu, P. And Qian, Y. 1999. Microbial metabolism of di-butyl phthalate (DBP) by a denitrifying bacterium. *Process biochemistry*, 1999 34 745-749.
- [38] Amir, S., Hafidi, M., Bailly, J.R. and Revel, J.C. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex gel fractions. *Agronomie* 2003 23 269-275.
- [39] Amir, S., Hafidi, M., Valorisation de boues de stations d'épuration des eaux usées par un bioprocédé aérobie "compostage". *Ann Chim Sci Mat* 2001 26 S 409 – S 414.

Chapitre 4 :

Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of lagooning sewage sludge

Amir S¹., Hafidi M^{1*}., Merlina G²., Hamdi H¹., Revel J.C².

¹ Unité Sol et Environnement (Lab. Eco. Végét.), Dépt. de Biologie. Faculté des Sciences
Semlalia, BP/2390, Marrakech, Morocco.

² Equipe Agronomie Environnement Ecotoxicologie, Ecole Nationale Supérieure Agronomique
de Toulouse, Auzeville-Tolosane, 31326 Castanet, Tolosan, France

*Corresponding author / e-mail: hafidi@ucam.ac.ma

Présentation :

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAHs) sont parmi les polluants organiques qui pourraient exister en grandes teneurs dans les boues résiduaires. En raison de leur solubilité très faible et leur résistance à la biodégradation, ils s'accumulent dans les boues résiduaires par principe de décantation suite à leur adsorption aux éléments en suspension. Les PAHs sont des composés organiques hydrophobes constituent de deux ou plusieurs anneaux aromatiques. Ils sont originaires en majorité des rejets industriels, domestiques, de la pollution des moyens de transport ou acheminés par un lessivage des chaussées par les eaux de pluies.

Vu leur persistance à la biodégradation et puisque ils sont des éléments à risque cancérigène, leurs teneurs doivent être vérifiées dans les boues résiduaires à usage agricole. Nombreuses normes ont été décrites par différentes organisations et pays sur les teneurs limites et la nouvelle directive de la Communauté européenne (CEC, 2000) a recommandé une valeur de l'ordre de 6 mg kg^{-1} pour la somme de teneurs totales de certains PAHs. Ainsi l'objectif de ce travail est la détermination des teneurs et devenir de PAHs lors du compostage des boues de lagunage particulièrement les 16 PAHs ciblés par l'USEPA comme polluants prioritaires (figure 2).

L'extraction de PAHs a été réalisée en deux fois sur 10 g d'un échantillon représentative séché et bien homogénéisé à chaque stade de compostage. Le solvant d'extraction utilisé est un mélange : 10 ml de dichlorométhane et 20 ml de diéthyléther. Les mélanges (échantillon + solvant) ont été agités pendant 30 min et après centrifugation et filtration, les surnageants sont déshydratés au Na_2SO_4 anhydre. L'analyse a été réalisée par chromatographie phase gazeuse GC-MS HP-5890 séries II couplée au détecteur de masse MSD HP-5971 (ISO 9000). L'acquisition des données a été basée sur le mode (SIM). La quantification est basée sur des étalons externes de 16 HAPs. Les valeurs mesurées sont corrigées (voir chapitre 2).

La figure 3 illustre l'évolution au cours du compostage de la somme de 15 PAH identifiés «TE-PAH : total des PAHs extractibles». Le TE-PAH dans le mélange initial est de l'ordre de $0,24 \text{ mg kg}^{-1}$. Cette valeur est très faible par rapport aux normes décrites pour les boues à destination usage agricole (CEC, 2000), et elle a montré de plus une diminution au cours du compostage. Cette diminution a atteint 88 % après 6 mois de compostage dont 75 % au bout de 30 jours ou phase de stabilisation, qui peut être liée à une intense biodégradation par les populations microbiennes thermophiles. Cependant, une certaine reaugmentation en fin de

cette phase de stabilisation signale la contribution aussi d'un mécanisme désorption de certains PAHs probablement adsorbés sur les déchets ligno-cellulosiques, suite à leur décomposition. En phase de maturation, la diminution des teneurs de TE-PAH peut être attribuer soit à une biodégradation par les populations microbiennes mésophiles ou incorporation par séquestration ou liaison de leurs métabolites oxydés avec les substances humiques néoformés au cours de cette phase de compostage.

Un suivi de l'évolution du teneur de chacun des 15 PAH montre les mêmes profiles que les teneurs totales (figures 4 et 5), cependant une ressemblance est très remarquable entre les individus avec un nombre de cycles aromatiques, masses ou structures moléculaires très proches. La diminution enregistrée au cours de la phase de stabilisation (D.st) est moins importante pour les PAHs avec un nombre de cycles aromatiques N inférieur à 3 et plus importante pour les PAHs avec N supérieur à 4 (tableaux 2 et 3). La grande diminution de ces derniers PAHs lourds peut être liée à leur grande adsorption aux matrices lignine-cellulose. En fait, en fin de phase de stabilisation, pour les PAHs avec un grand nombre de cycle aromatique (N = 5), plus acénaphthène et acénaphthylène, un maximum de désorption n'est observé qu'après 90 jours de compostage (figure 5) et les pourcentages de leurs teneurs restantes (Rm%) sont généralement élevés (tableau 3). A l'opposé, les PAHs avec (N = 4) sauf acénaphthène et acénaphthylène montrent un maximum de désorption après 60 jours de compostage (figure 4) et avec des pourcentages des teneurs restantes plus faibles (Rm%) (tableau 2). Cette tendance peut être expliquée par le fait que les PAHs avec un poids moléculaire bas sont légèrement adsorbés, ainsi facilement et rapidement désorbés à partir de 60 jours du compostage. Alors que, pour les PAHs avec un nombre de cycle aromatique = 5, ils sont fortement adsorbés, ainsi leur désorption est retardée et les teneurs restantes sont importantes puisqu'ils ont échappé à l'attaque microbienne par rapport aux légers.

En fin de phase de maturation, tous les PAHs ont montré une diminution de teneurs quelque soit leur nombre de cycles aromatiques ou poids moléculaire (figures 4 et 5). Les PAH avec (N = 4) montrent une grande diminution (D. tot %), qui peut être attribué à leur grande séquestration ou liaison aux substances humiques néoformées au cours de cette phase (tableaux 2 et 3). Ces résultats mettent en évidence que les mécanismes de biodégradation, adsorption et incorporation de PAHs aux substances humiques au cours du compostage sont très influencés par le nombre de cycles aromatiques, masses ou structures moléculaires. Le compostage pourrait être suggérer comme un processus de détoxification des boues résiduaire de PAHs suite à leur biodégradation, ainsi que une diminution de leur biodisponibilité suite à un couplage oxydatif de leurs métabolites oxydés aux substances humiques néoformées.

Abstract :

The fate of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), targeted by the USEPA agency, has been investigated during composting of lagooning sludge. Composting shows efficient decrease of the content and the bioavailability of each PAH. Biodegradation and sorption are suggested as the main mechanisms contributing to this decrease. During the stabilization phase of composting, extensive microbial degradation of PAHs, mainly those with a low number of aromatic rings, was achieved following development of intense thermophilic communities. However, partial sorption of PAH to non-accessible sites temporarily limits the mobility mainly of PAHs with a high number of aromatic rings plus acenaphthene and acenaphthylene, and allows them to escape microbial attack. During the maturation phase, the development of a mesophilic population could play an important role in the degradation of the remaining PAH. During this phase of composting, PAH sequestration and binding of their oxidative metabolites within new-formed humic substances might also explain PAH decrease at the end of composting. The tendency of change of content or bioavailability of various PAH compounds during composting is found to be strongly related to the number of their aromatic rings, their molecular weight and structure.

Key words: PAH, sewage sludge, composting, biodegradation, sorption.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are an important group of organic contaminants present in sewage sludge. Due to their low water solubility and their resistance to biodegradation, they are removed during the wastewater biological treatment from the water phase by adsorption onto suspended solids and they are hence accumulated in the sludge. PAHs constitute a group of hydrophobic organic contaminants composed of two or more aromatic rings. They originate from industrial and domestic waste. Atmospheric rainfall drains airborne pollutants and road surface dirt contributing to organic water pollution. PAHs can also be produced naturally in smaller amounts by forest fires (Pérez et al., 2001). Considering their persistence and carcinogenic potential, determination of their content in sewage sludge is necessary to assess the safety and the possibility for agricultural recycling of these organic wastes (IARC, 1983; Lega et al., 1997). Other limiting factors such as content of heavy metals and pathogenic organisms must be also considered. Among the many PAH compounds, 16 have been identified as “priority pollutants” by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) and seven of them are considered as probably carcinogenic (USEPA, 1997).

There are numerous legislations and regulations laid down by various organisations for sludge disposal. In the final regulations of USEPA, only metallic compounds are taken into account, since the levels of some organic compounds were not detectable and therefore had no significant effect on health and environment (Pérez et al., 2001). A new draft directive of the Council of the European Community has been issued (CEC, 2000) and provides the allowable content for some organic pollutants including PAHs for agricultural recycling of sewage sludge. The cut-off value of total PAHs is set to 6 mg kg^{-1} .

Prior to agricultural recycling of sludges, a treatment is needed to ensure their stability and increase their beneficial effect for soil. Composting is recognized to be the most useful treatment suppressing most pathogenic organisms, decreasing the bioavailability of heavy metals and stabilising the organic material in sludge before spreading on the land (Echab et al., 1998; Amir et al., 2004). Numerous studies have shown that composted material has an enormous potential for bioremediation through sustaining populations of a wide range of presumed microorganisms, which are able to degrade a variety of organic contaminants (Crawford et al., 1993; Kästner and Mahro, 1996; Semple et al., 2001; Reid et al., 2002; Lau et al., 2003). However, the knowledge of the effect of the composting process on the fate of PAHs is lacking. Composting is defined basically as biological processes occurring in

favorable conditions (good aeration, moisture, etc) and allowed to transform the raw initial material probably unsanitary or with phytotoxic properties to stable and mature end product. According to numerous previous studies, a wide variety of microorganisms demonstrated contribute in these processes classified among Bacteria, Actinomycetes, fungus, Protozoons, Algae, others. The identification of all microorganisms selecting those responsible of biodegradation is operationally difficult at the moment and consume much time, and with very expensive cost if followed at different periods of composting. Indeed, in the researchs in field of composting, the monitoring of some physico-chemical properties during composting has been considered as indirect indices whose their variations are resulted from the activities of the sets of microorganisms within compost pile. Among numerous methologies published for PAH analysis, Lega et al. (1997) has proposed a procedure permitting simultaneous determination of all classes of organic pollutants on sludge matrix. These authors has discussed the validity of methodology and reported the sufficient recoveries for all PAH compounds with average varied from 65-127 %; habitually a recovery ranged from 70 to 115 % is valid. Besides, The method detection limit (MDLs) demonstrates low level detection values for PAH ranging from 0.09 to 0.5 mg/kg.

The objective of this work is to apply this methology for determining the fate of 16 PAHs during composting. For this purpose, PAH contents were determined at different steps of composting of lagooning sludges.

2. Material and Methods

2.1. Composting

Lagooning sewage sludge (LS) was taken from an experimental wastewater treatment plant in Marrakech city. A composting trial was conducted on the mixture of sludge (165 kg) and straw (20 kg) in a heap on a purpose-built platform for 180 days. The mixture was turned every 15 days to provide aerobic conditions for the treatment. To monitor the progress of composting, the microbial activity was followed by the daily measurement of the temperature inside the heap of compost (Figure 1) (Amir and Hafidi, 2001).

2.2. Sampling

For analysis purposes, sub-samples were taken from 10 various points of the compost pile goodly homogenized (bottom, surface, side, centre). These sub-samples are pooled at each time of composting: initial mixture; end of stabilization phase after 30 d (days); 60; 90 d

(times representative of the beginning of the maturation phase) and 180 d (end of maturation phase). The samples were deep frozen until analysis.

Physico-chemical analysis

The following physico-chemical analyses were made on aliquots of the samples: the pH was determined on a suspension of sample in water (10 g in 15 ml), the Total Organic Carbon (C.org) was measured with the potassium bichromate method, the total nitrogen using the Kjeldahl method, the humic carbon extracted by 0.1 M NaOH solution was measured after oxidation by KMnO₄. After ignition of the dry sample at 550°C (16 h), the percentage of decomposition was calculated by following formula:

$$\text{DEC\%} = [100 \times (a_t - a_0) / ((100 - a_0) \times a_t)] \times 100$$

a₀: level of ash in the initial sample; a_t: level of ash in sample at each selected time of composting (30, 60, 90 and 180 d). (Amir and Hafidi, 2001)

2.3. PAH extraction

For each selected time of composting, a homogenized, dry (air) sample of about 10 g was used. PAH extraction was performed twice on this amount of matter with a mixture of: 10 ml of dichloromethane and 20 ml of diethylether (Lega et al., 1997). Analytical solvents obtained from Panreac grade E-08110 Martcada i Reixac, Spain.

The mixture: solvents + sample was poured in a centrifugation tube, shaken for 30 min and then centrifuged for 15 min at 2500 rpm. The procedure was repeated twice and the two extracts, collected for each sample, were pooled and dried by filtration through anhydrous Na₂SO₄. The extracts were sufficiently clean to be directly analyzed after a reconcentration step.

2.4. GC-MS Analysis

GC-MS analysis was performed with a Hewlett-Packard gas chromatograph HP-5890 series II, equipped with a mass detector MSD HP-5971 (ISO 9000) and a data analysis station HP Chem. The column used for analysis was a 25 m HP-5 MS type (crosslinked 5% phenylmethylsilicone; 0.2 mm I.D., 0.33 µm film thickness). As carrier gas, high grade helium N55 was used at a flow rate of 0.89 ml min⁻¹. Injection was made in splitless mode. The head column pressure was 62 hPa. Injector temperature was 280°C and the purge time was set to 1 min.

The GC-MS oven temperature was maintained at 60°C for 1.5 min and then increased at a rate of 30°C min⁻¹ up to 160°C. The increase rate was then set to 5°C min⁻¹ until the temperature reached 195°C. The next increase rate was then lowered to 3°C min⁻¹ until 280°C. This final temperature was held for 18 min to eliminate all co-extracts. The detector

temperature was 300°C, and the Electron multiplier voltage (EMV) sensitivity was set to 2600 V.

2.5. Quantification

Data acquisition was carried out in the selected ion monitoring mode (SIM). Quantification was based on the external standard technique utilizing integrated peak areas of each selected ion. The purity of all standards is superior to 99%. The standard range (100 to 1000 µg l⁻¹) was prepared from dilutions of certified solution containing the 16 PAH at 10 ng µl⁻¹ in acetonitrile (Mix 9, Dr Ehrenstorfer LS 209509, supplied by C.I.L.33220 Ste Foy la Grande, France). The values measured concern only the amount of solvent-extractible PAH for each point of measure.

To take into account the weight loss of the heap of sludge mixture during composting, due to release of carbon dioxide, water and mineralization processes; all measurements were corrected by referring to the amount of ash. The latter constitutes the most chemically stable parameter during the composting process. The corrected values at each step of composting are obtained from the following formula:

$$C_{\text{ash}} = C_m \times (a_0 / a_t) \quad (\mu\text{g kg}^{-1}*)$$

C_m: mean measured value expressed by µg of PAH per kg of dry compost (µgkg⁻¹)

a₀: level of ash in the initial sample; a_t: level of ash in sample at each selected time of composting (30, 60, 90 and 180 d).

3. Results and Discussion

3.1. Physico-chemical properties of sewage sludge during composting

The results obtained from physico-chemical analysis show that two phases occurred during composting: a phase of stabilization (about 30 d of composting), where temperature peaked to 52°C after 7 d of processing. The temperature then decreased to 30°C and followed by a temperature plateau of about 35°C after 60 d marking maturation phase, which is characterized by the development of mesophilic populations (Figure 1). Indeed, temperature has been considered as good indicator of microbial activities (thermophilic, mesophilic). The reactions of organic matter biodegradation yielded by native microorganisms within material to composted produce a calorific energy which cause the rise of temperature, and the grown so of wide class of microorganisms selectively with thermophilic character. With the decrease of temperature, mesophilic populations were set up in maturation phase.

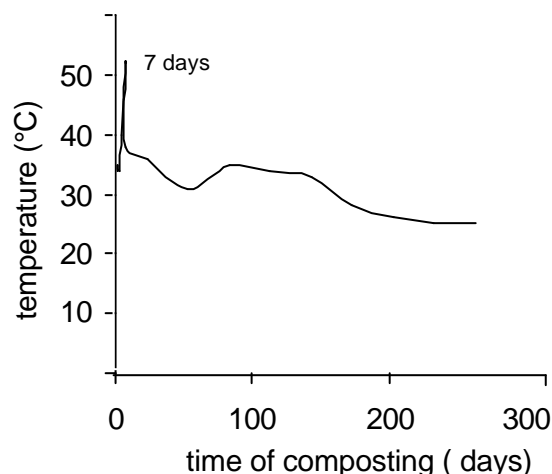


Figure 1. Temperature variation during composting of lagooning sludge.

The growth of these varieties of microbial communities involving the numerous biological and biochemical reactions lead to change of the chemical composition of the starting organic material. These changes are presented by the reduction of organic carbon and of C/N ratio in course of 180 days of composting (Table 1). The percentage of decomposition reached 40% and an enrichment of compost in humic substances occurred (Amir et al., 2004). These physico-chemical properties show a good biotransformation of initial organic material and that the final compost is stable and mature (Amir and Hafidi, 2001).

Table 1. Various physico-chemical characteristics of sewage sludge during composting.

| Time of composting (days) | pH | C/N | C. org % ^a | M. O. % ^a | H. S. (mg g ⁻¹) ^a | ash % ^a | DEC % |
|---------------------------|-----|------|-----------------------|----------------------|--|--------------------|-------|
| 0 | 7.3 | 24.0 | 17.7 | 30.6 | / | 65.9 | / |
| 30 | 7.4 | 21.4 | 16.2 | 27.9 | 17.5 | 70.7 | 19.9 |
| 90 | 6.8 | 18.5 | 15.0 | 25.9 | 20.0 | 75.3 | 36.6 |
| 180 | 6.7 | 16.4 | 14.3 | 24.6 | 20.8 | 76.3 | 40.0 |

^(a) Result expressed in dry weight

C. org : organic carbon

H. S. : Humic substances

M. O. : organic matter

DEC : decomposition percentage

3.2. Total PAH behaviour

The levels of 16 PAHs identified as “priority pollutants” (USEPA, 1997; Figure 2) were measured during the composting of lagooning sludge.

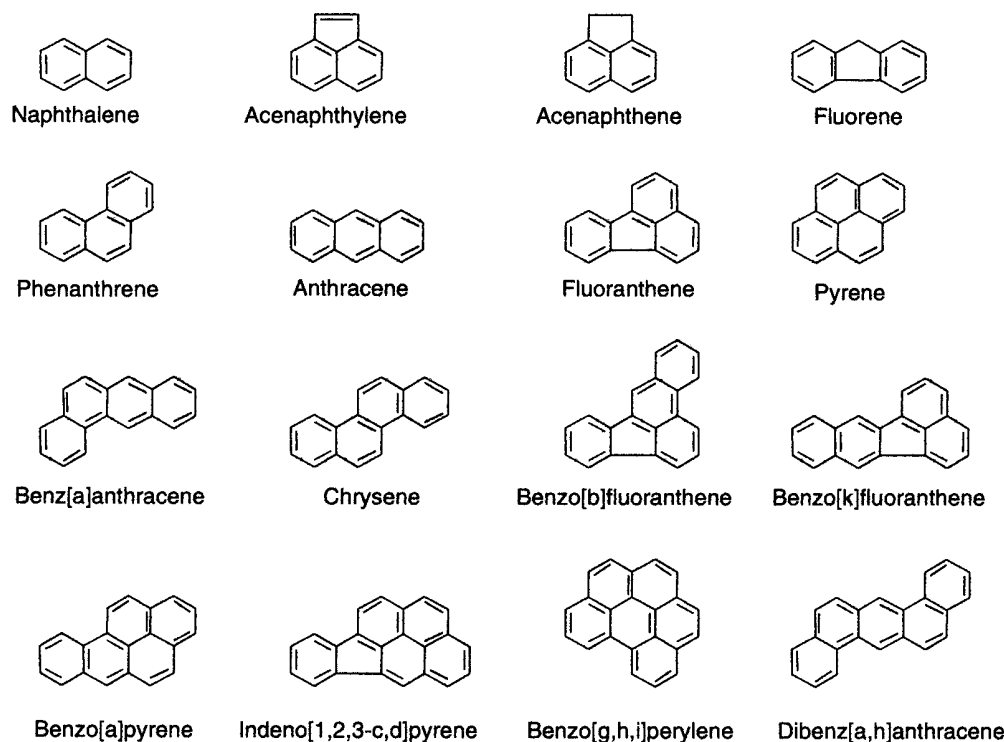
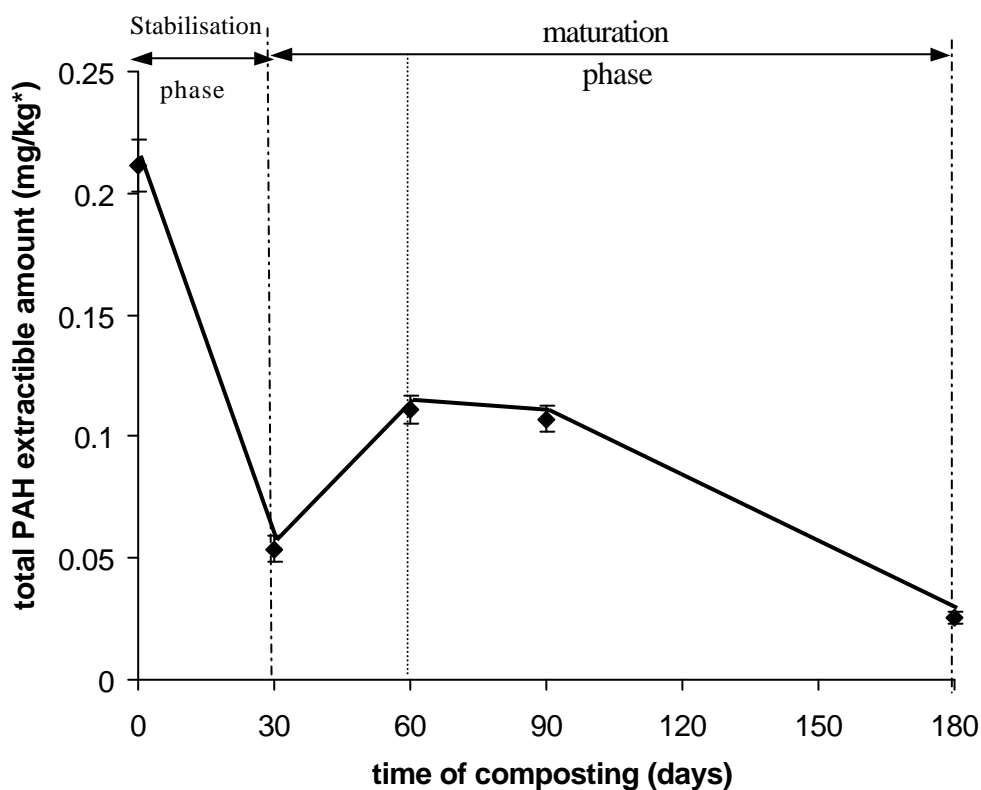


Figure 2. Molecular structure of the 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) considered as priority pollutants by the American Environmental Protection Agency (EPA).

The level of total extractible PAH (TE-PAH) was obtained by summation over all the extractible-solvent amounts of 15 PAH. The benzo(k)fluoranthene content was below the detection limit of GC/MS. Figure 3 illustrates TE-PAH content behaviour during the lagooning sludge composting. The level of TE-PAH in the sludge was 0.24 mg kg^{-1} . This value is very far below the accepted European Union cut-off limits for sludge to be considered safe for agricultural application, which is 6 mg kg^{-1} (CEC, 2000). However, even though they were present in very low concentrations, during composting these pollutants can be concentrated or not, depending on their biodegradability and on losses of carbon oxide, water and volatile compounds in general (Genevini et al., 1987). After mixing the sludge with straw, the TE-PAH decreased to 0.21 mg kg^{-1} .

During composting, after the stabilization phase (30 d of composting), TE-PAH showed a decrease of about 75%. This could be attributed to biodegradation due to the intense microbial activity during the thermophilic phase (Lazzari et al., 1999). The microorganisms capable of

degrading organic matter could be responsible for cometabolic degradation of the PAHs (Kastner and Mahro, 1996; Gramss et al., 1999). The organic matter percentage is decreased from 30.6% to 27.9% and the calculated decomposition percentage (DEC%) during this phase is about 20% (Table 1). However, at the beginning of the maturation phase, TE-PAH showed an increase. This was probably due to part of the PAHs that, at start of composting, were initially adsorbed to sites where they were temporarily less solvent extractible. Sorption of organic contaminants into non-accessible sites of organic material is estimated to be the most significant parameter decreasing the bioavailability of PAHs for microbial degradation (Weissenfels et al., 1992; Pignatello and Xing, 1996).



* mg of PAH per kg of dry compost (mean values corrected by referring to the amount of ash)

Figure 3. Change of total extractible content of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) during composting of lagooning sludge.

Therefore, the strong decrease occurring during the stabilisation phase could be the combined result of both mechanisms: biodegradation by thermophilic populations and sorption by the compost matrix, for instance by lignin-cellulosic residues (Carlstrom and Tuovinen, 2003). The microbial population quickly attacks the sludge material, which is more

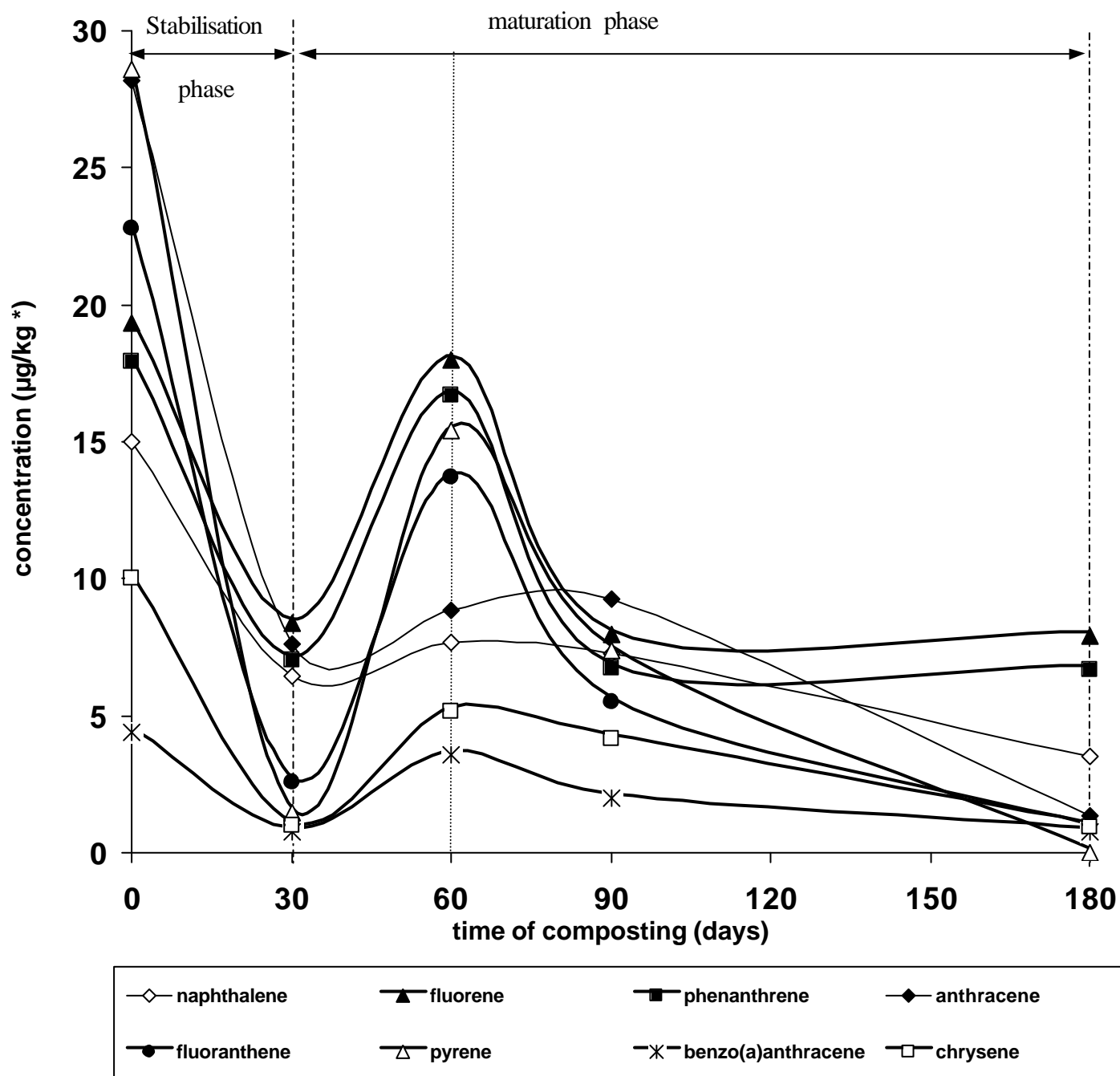
readily bioavailable than straw material. The latter lignin-cellulosic structures temporarily resistant to microbial decomposition could have a high potential for PAH adsorption. After the stabilisation phase or after 90 d of composting, the straw residues were observed completely disappeared in compost mixture. Therefore, their ultimate biodegradation could contribute to PAH release and hence an increase of TE-PAH in the beginning of the maturation phase.

At the end of composting, the TE-PAH content decreased again to reach 88% between the start and the end of composting (D.tot %). The decrease of TE-PAH at the end of maturation phase might originate from further decomposition by mesophilic microorganisms during this phase. The percentage organic matter decreased again from 27.9 to 24.6% and decomposition percentage was recorded at about 40% (Table 1). Martens (1982) found that when mature compost was incubated with ^{14}C -labelled anthracene, benzo[a]anthracene, benzo[a]pyrene and dibenzo[a,h]anthracene, significantly higher amounts of mineralization were observed than when fresh (immature) compost was used. Therefore, mesophilic populations could play an important role in PAH degradation. During this phase of composting, PAH sequestration or binding of their oxidative metabolites within new-formed humic substances might be also suggested to explain PAH decrease at the end of composting (Laor et al., 1996; Kästner et al., 2000; Richnow et al., 2000; Carlstrom and Tuovinen, 2003). The amount of humic substances increased from 17.5 to 20.8 (mg g^{-1}) (Table 1) and the high degree of humification through aromaticity and oxidative polycondensation during the last step of composting has been described in previous studies (Amir et al., 2004).

The profile of change in TE-PAH level found during sludge composting in this study is similar to the total amount change of PAH during composting trials described in other studies. Lazzari et al. (1999) showed, during composting of mixtures of sewage sludge and ligneous waste, that PAHs decreased during the accelerated biooxidation or stabilization phase (20 d) and increased throughout the maturation phase (up to 90 d). These authors have similarly taken into account the possibility of incorrect values caused by a decrease in the weight of compost materials during treatment, also considering the ash content as a stable chemical parameter. Other authors, Ahtiainen et al. (2002), found that after 4 months of composting of a creosote-contaminated soil mixed with spruce bark chips, PAH concentrations temporarily increased, but at the end of composting (after 5 months) decreased by about 80%.

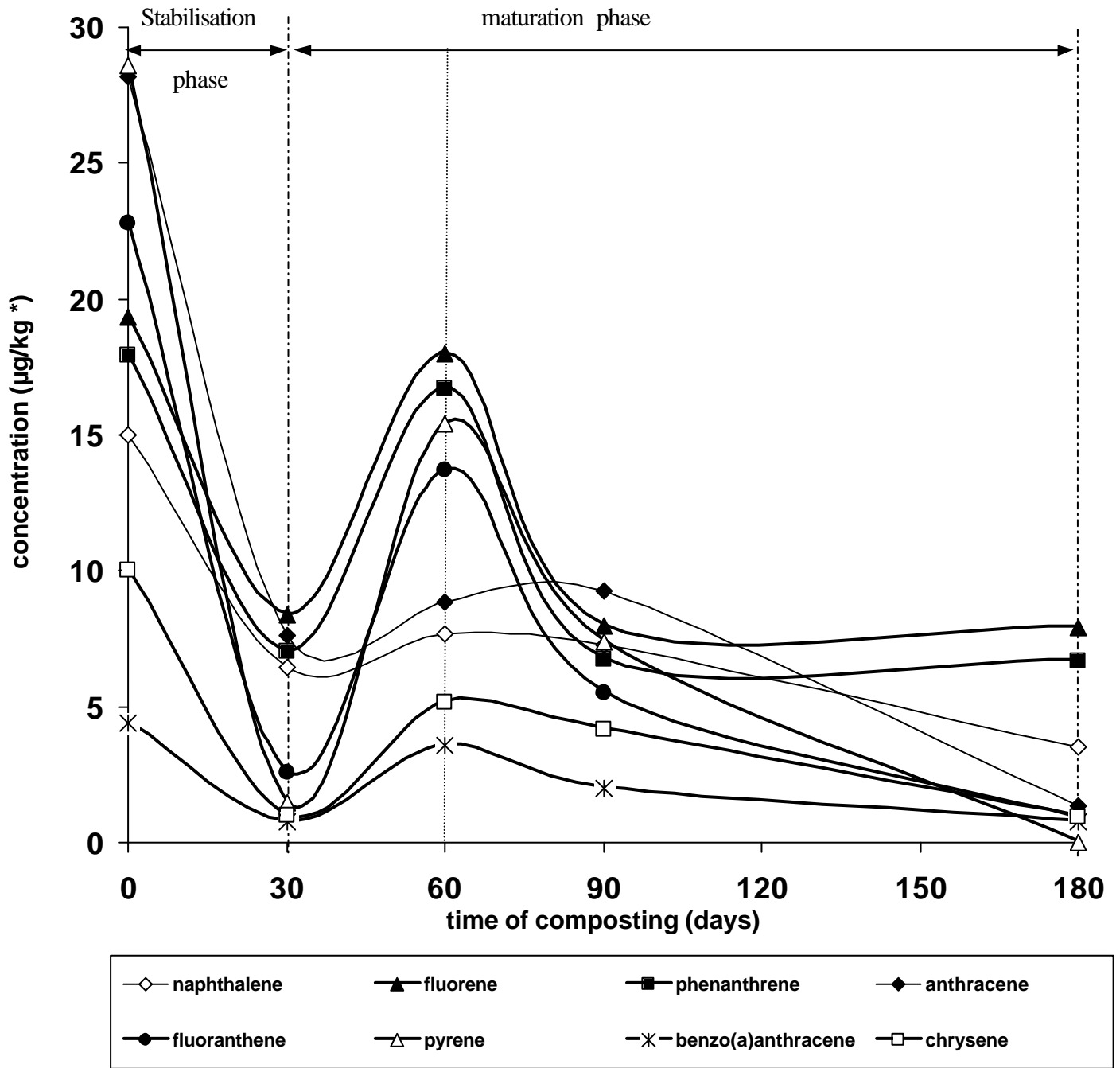
3.3. Behaviour of individual PAH compounds

The follow-up of changes of extractable-solvent amounts of the various 15 PAH during composting process shows that each PAH compound exhibits similar behaviour to the TE-PAH profile change observed previously (Figures 4 and 5).



* µg of PAH per kg of dry compost (mean values corrected by referring to the amount of ash)

Figure 4. Individual amount change of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) with N = 4 during composting of lagooning sludge.



* μg of PAH per kg of dry compost (mean values corrected by referring to the amount of ash)

Figure 5. Individual amount change of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) with $N = 5$ during composting of lagooning sludge.

During the stabilization phase, the levels of all PAHs decreased (D.st). This was less notable for PAH with three or fewer aromatic rings (N = 3) and more notable for PAH with a higher number of aromatic rings (N = 4) (Tables 2 and 3). The sharp decrease of extractible amounts of the latter PAHs could be explained by their strong adsorption to compost matrix such as ligno-cellulosic material, probably due to their greater hydrophobicity compared to the smaller ones (N = 3).

Table 2. Chemical characteristics (N, MW) and quantification of content change of PAHs with N = 4 during lagooning sludge composting.

| PAHs | N | MW | Ci ^a | Cf ^a | D. st % | Rm % (60 days) | % D. tot |
|--------------------|---|-----|-----------------|-----------------|---------|-------------------|----------|
| naphtalene | 2 | 128 | 15.0±0.7 | 3.5±0.2 | 57 | 51 | 76 |
| fluorene | 3 | 166 | 19.0±1.0 | 7.9±0.4 | 57 | 93 | 59 |
| phenanthrene | 3 | 178 | 17.9± 0.9 | 6.7±0.3 | 61 | 93 | 63 |
| anthracene | 3 | 178 | 28.2± 0.4 | 1.3±0.1 | 73 | 31 | 95 |
| fluoranthene | 4 | 202 | 22.8±1.1 | 0.9±0.1 | 89 | 60 | 96 |
| pyrene | 4 | 202 | 28.6±1.4 | nd | 95 | 54 | 100 |
| benzo(a)anthracene | 4 | 228 | 4.4±0.2 | 0.8±0.0 | 82 | 82 | 82 |
| chrysene | 4 | 228 | 10.0±0.5 | 0.9±0.1 | 90 | 51 | 91 |

PAHs : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

N : Number of aromatic ring

MW : Molecular Weight

^a Ci : initial concentration at start of composting

µg of PAH per kg of dry compost (mean values corrected by referring to the amount of ash)

^a Cf : final concentration at end of composting

µg of PAH per kg of dry compost (mean values corrected by referring to the amount of ash)

nd : not detectable

D.st : percentage of PAH content decrease at stabilization phase
 $(Ci - \text{PAH content at 30 days} / Ci) * 100$

Rm : percentage of amount of PAH remaining at 60 days of composting
 $= (\text{PAH content at 60 days} / Ci) * 100$

D.tot : percentage of total PAH content decrease during composting
 $= [(Cf - Ci) / Ci] * 100$

Table 3. Chemical characteristics (N, MW) and quantification of content change during lagooning sludge composting of PAHs with N = 5, plus acenaphthylene and acenaphthene

| PAHs | N | MW | C ⁱ ^a | C ^f ^a | % D.st | % Rm (90 days) | % D.tot |
|-------------------------|---|-----|-----------------------------|-----------------------------|--------|-------------------|---------|
| acenaphthylene | 3 | 154 | 6.5±0.3 | 2.8±0.2 | 57 | 109 | 57 |
| acenaphthene | 3 | 156 | 21.2±1.1 | nd | 66 | 103 | 100 |
| benzo(b)fluoranthene | 5 | 252 | 8.5±0.4 | 0.5±0.0 | 67 | 112 | 95 |
| benzo(a)pyrene | 5 | 252 | 3.7±0.2 | nd | 91 | 109 | 99 |
| Indeno(1.2.3-c.d)pyrene | 6 | 278 | 3.2±0.2 | 0.2±0.0 | 74 | 160 | 93 |
| dibenzo(a.h) anthracene | 6 | 276 | 1.9±0.1 | nd | 100 | 69 | 100 |
| benzeno(g.h.i)perylene | 6 | 276 | 20.1±1.0 | 0.1±0.0 | 100 | 40 | 99 |

PAHs : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

N : Number of aromatic ring

MW : Molecular Weight

^aC_i : initial concentration at start of composting

µg of PAH per kg of dry compost (mean values corrected by referring to the amount of ash)

^aC_f : final concentration at end of composting

µg of PAH per kg of dry compost (mean values corrected by referring to the amount of ash)

nd : not detectable

D.st : percentage of PAH content decrease at stabilization phase
 $(C_i - \text{PAH content at 30 days} / C_i) * 100$

Rm : percentage of PAH remaining at 90 days of composting
 $= (\text{PAH content at 90 days} / C_i) * 100$

D.tot : percentage of total PAH content decrease during composting
 $= [(C_f - C_i) / C_i] * 100$

Smith et al. (1997) show that in soil, adsorption is less reversible with increased numbers of fused aromatic rings or increased hydrophobicity. Other authors, Weissenfels et al. (1992) and Laor et al. (1996) suggest that the hydrophobicity of the PAH compounds results in their strong adsorption to soil organic matter and reduces their availability for the soil micro-organisms.

At the beginning of the maturation phase of composting, levels of all the PAHs were increased. As suggested above, the microbial decomposition of ligno-cellulosic material leads to the release of adsorbed PAHs. However, this PAH desorption varies with the number of aromatic rings. Extractible amounts of PAHs with few aromatic rings (N = 4) except acenaphthene and acenaphthylene showed maximum desorption after 60 d of composting

(Figure 4). Furthermore, the percentages of their levels remaining (Rm%) - except for fluorene and phenanthrene - exhibited low values (Table 2). In contrast, for PAH with higher numbers of aromatic rings (N = 5), plus acenaphthene and acenaphthylene (N = 3; with a condensed ring of five carbons), maximum desorption was observed after 90 d of composting (Figure 5). The percentage of their levels remaining (Rm%) were higher except for dibenzo(a,h) anthracene and benzo(g,h,i) perylene (Table 3). This tendency could be explained by the fact that PAHs with low molecular weight are weakly adsorbed and so could be easily and rapidly desorbed from 60 d of composting. The lower amount of these PAH remaining suggests that they are subjected to a strong microbial decomposition. In fact, their relatively higher solubility (lower hydrophobicity) could lead to greater availability for microbial decomposition (lower adsorption). While, for the larger PAH (number of aromatic rings = 5), desorption is delayed to 90 d of composting and the amounts remaining are higher, which confirms their high adsorption (during the stabilization phase) to sites where they had escaped the microbial attack. It is possible that an increase of their extractability by solvent could explain that the amounts were greater than those measured at the start of composting (Rm > 100%) and might be attributed to the microbial release of some PAH previously tightly bound in the initial sludge matrix. In the literature, Lazzari et al. (1999) also showed, in the course of composting of mixtures of sewage sludge and ligneous wastes, an increase in the percentage presence of the heaviest PAHs during the maturation phase. Wilcock et al. (1996) reported that PAHs with low molecular weights are rapidly lost from sediments, whereas the high molecular weight molecules are more persistent. Carlstrom and Tuovinen (2003) suggested that sequestration occurred concurrently with biomineralization and that slow mineralization gives time for more hydrophobic substrates to be sequestered through adsorption and binding to become unavailable to microbial metabolism.

At the end of the maturation phase, all PAHs showed decreased amounts whatever the number of aromatic rings or molecular weight (Figure 4 and 5). PAH with (N = 4) always showed a strong total decrease (D. tot %), which could be attributed to their high sequestration by humic substances (Table 2 and 3) (Neiman et al., 1998; Karl et al., 1999; Richnow et al., 2000). Guthrie and Pfaender (1999) showed that when ¹⁴C is added to soil as ¹⁴C-pyrene, a major proportion of the recovered ¹⁴C (43-80%) was found in humic/fulvic acid extracts (6.6-26%) or in the residual humin (29-73%).

3.4. Molecular tendency of PAHs

Comparing the behaviour of all PAH compounds during composting showed that the 15 PAH could be classified into groups (Gi) that present the same patterns of change during composting: G1 (naphthalene, anthracene); G2 (fluorene, phenanthrene); G3 (pyrene, fluoranthene, benzo(a)anthracene, chrysene) (Figure 4); G4 (benzo(b) fluoranthene, benzo (a) pyrene, indeno(1,2,3-c,d)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene) (Figure 5). Each group appears to be made up of PAH with a similar or the same number of aromatic rings or molecular structure (Figure 2). G1, naphthalene and anthracene characterized by small number of aromatic rings ($N = 3$) and linear molecular structure, showed a low adsorption during the stabilization phase (Figure 4). Fluorene and phenanthrene (3 aromatic rings) showed high adsorption during stabilization phase which explains their high amounts remaining ($R_m\%$) and the percentages of their total decrease ($D. tot \%$) are lower (Figure 4; Table 2). Pyrene, fluoranthene, benzo(a)anthracene, chrysene (4 aromatic rings) show almost the same percentages of changes (Table 2). For groups G4 (5 or 6 aromatic ring), high adsorption could be -as described above- (Table 3; Figure 5). This suggests that both the mechanisms of biodegradation and adsorption of PAH that occurred during composting are closely related to the number of aromatic rings and the PAH molecular structure.

4. Conclusion

The 16 PAH targeted by the USEPA agency, were investigated during composting of a lagooning sludge. Although, the amounts of total 16 PAH determined in the initial sludge were very far below the recommended limits for sludge to be spread on agricultural land. The fate of the extractible amounts of the PAHs during sewage sludge composting was unknown. The present study targeted the behaviour of PAHs during composting process. The results show the efficient reduction of extractible PAH amounts during composting. The decreases could result from both biodegradation by thermophilic and mesophilic populations and adsorption to compost matrix. During the stabilisation phase, the development of an intense thermophilic activity contributes to extensive decomposition mainly of PAH with small number of aromatic rings or low molecular weight. However, microbial biodegradation was limited for PAHs with a large number of aromatic rings or high molecular weight due to their strong adsorption, which can probably be attributed to their high hydrophobicity. At the beginning of the maturation phase, the decomposition of adsorbing material such as ligno-cellulosic structures, allows the release of the retained PAHs, but with different rates

according to the number of aromatic rings and their molecular structure. PAHs with few aromatic rings or low molecular weight are weakly adsorbed and so could be easily and rapidly desorbed. For the PAHs with a large number of aromatic rings or high molecular weight, which were strongly adsorbed during the stabilisation phase, desorption was delayed. During the maturation phase, the presence of mesophilic populations could play an important role in the final decrease of total extractible amounts of remaining PAH either by biodegradation or by humification. The high content of humic matter during this phase could contribute to the sequestration mainly of PAH with a large number of aromatic rings or high molecular weight, because of their strong hydrophobicity.

During composting, a similar behaviour pattern was recorded between PAH with a similar number of aromatic rings or molecular structure. This suggests that both the mechanisms of biodegradation and adsorption of PAH are strongly related to the number of aromatic rings and PAH molecular structure.

Information on the exact contribution of the mechanisms suggested “biodegradation or sequestration (adsorption)” - proposed in numerous research works - to the removal and decrease of PAH bioavailability is still not conclusive. But, a composting trial using radiolabeled ¹⁴C-PAH has been programmed to determine which mechanisms lead to the PAH decrease: ultimate biodegradation, sorption of parent PAH or binding of their oxidative metabolites to the compost matrix.

Acknowledgements

This work was supported by JER 6013 associated to the AUPELF-UREF and a Scholarship Program of Research Training from the French-Speaking University Agency.

References

- Ahtiainen, J., Valo, R., Järvinen, M., Joutti, A., 2002. Microbial toxicity tests and chemical analysis as monitoring parameters at composting of creosote-contaminated soil. *Ecotox. Environ. Safe.* 53, 323-329.
- Amir, S., Hafidi, M., 2001. Valorisation de boues de stations d'épuration des eaux usées par un bioprocédé aérobie "compostage", *Ann. Chim. Sci. Mat.* 26, S 409 – S 414.
- Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Hamdi, H., Revel, J.C., 2004. Elemental analysis, FTIR, ¹³C-NMR of humic acids extracted from sewage sludge during composting. *Agronomie*, 24, 13-18.

- Carlstrom, C.J., Tuovinen, O.H., 2003. Mineralization of phenanthrene and fluoranthene in yardwaste compost. *Environ. Pollut.* 124, 81-91.
- CEC, Council of the European Community, Working Document on Sludge, 3^d Draft, Brussels, 27 April, 2000, 20 p.
- Crawford, S.L., Johnson, G.E., Goetz, F.E., 1993. The potential for bioremediation of soils containing PAHs by composting. *Compost Sci. Util.* 1, 41- 47.
- Echab, A., Nejmeddine, Hafidi, M., Kaemmerer, M., Guiresse, M., Revel, J.C., 1998. Evolution de la fraction échangeable des éléments métalliques traces (Pb, Cu, Zn et Cd) lors du compostage des boues de lagunage. *Agrochimica.* XLII- 6.
- Genevini, P.L., Mezzanotte, V., Garbarino, A. 1987. Analytical characterization of compost of different origin: agronomic properties and risk factors of the environment. *Waste Manage. Res.* 5, 501-511.
- Guthrie, E.A., Pfaender, F.K., 1998. Reduced pyrene bioavailability in microbially active soils. *Environ. Sci. Tech.* 32, 501-508.
- Gramss, G., Kirsche, B., Voigt K.-D., Günther, Th., Fritsche, W., 1999. Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. *Mycol. Res.* 103, 1009-1018.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1983. Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: polycyclic aromatic hydrocarbons, Lyons, (France) WHO, 32, 477 p.
- Karl, J., Nieman, C., Sims, R.C., Sims, J.L., Sorensen, D.L., McLean, J.E. and Rice, J.A. 1999. [14C] Pyrene bound residue evaluation using MIBK fractionation method for Creosote-contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 33, 776-781.
- Kästner, M., Mahro, B., 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil affected by the organic matrix of compost. *Appl. Microbiol. Biot.* 44, 668-675.
- Kästner, M., Richnow, H.H., 2000. Formation of residues of organic pollutants within the soil matrix-Mechanisms and stability. In: Stegmann, R., Brunner, G., Calmano, W., Matz, G., (Eds.). *Treatment of Contaminated Soils.* Springer, Berlin, Germany, pp. 219-251.
- Laor, Y., Strom, P.F., Farmer, W.J., 1996. The effect of sorption on phenanthrene bioavailability. *J. Biotechnol.* 51, 227-234.
- Lau, K.L., Tsang, Y.Y., Chiu, S.W., 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. *Chemosphere.* 52, 1539-1546.

- Lazzari, L., Spemi, L., Salizzato, M., 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, 1925-1935.
- Lega, R., Ladwig, G., Meresz, O., Clement, R.E., Crawford, G., Salemi, R., Jones, Y., 1997. Quantitative determination of organic priority pollutants in sewage sludge by GC/MS. *Chemosphere*. 34, 1705-1712.
- Martens, R., 1982. Concentrations and microbial mineralization of four to six ring polycyclic aromatic hydrocarbons in composted municipal waste. *Chemosphere*. 11, 761-770.
- Nieman, J.K.C., Kimball, D.O., McLean, J.E., Sims, R.C., Sims, J.L., Sorensen, D.L. and Rice, J.A., 1998. Humification of pyrene in contaminated soil during land farming. Proceedings of the 1998 Conference on hazardous waste research. 252-260.
- Pérez, S., Farré, M., Garcia, M.J., Barceló, D., 2001. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge and their contribution to its toxicity in the ToxAlert[®]100 bioassay. *Chemosphere*. 45, 705-712.
- Pignatello, J.J., Xing B., 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* 30, 139-150.
- Reid, J.B., Fermor, T.R., Semple, K.T., 2002. Induction of PAH-catabolism in mushroom compost and its use in the biodegradation of soil associated phenanthrene. *Environ. Pollut.* 118, 65-73.
- Richnow, H.H., Annweiler, E., Koning, M., Lüth J.-C., Stegmann, R., Garms, C., Francke, W., Michaelis, W., 2000. Tracing the transformation of labelled [1-13C] phenanthrene in soil bioreactor. *Environ. Pollut.* 108, 91-101.
- Semples, K.T., Reid, B. J., Fermor, T.R., 2001. Review of composting strategies to treat organic pollutants in contaminated soil. *Environ. Pollut.* 112, 269-283.
- Smith, M.J., Lethbridge, G., Burns, R.G., 1997. Bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 141-147.
- USEPA/ US Environmental Protection Agency, 1997. Integrated Risk Information System (IRIS), USEPA, Cincinnati, OH.
- Weissenfels, W.D., Klewer, H.J., Langhoff, J., 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biot.* 36, 689-696.
- Wilcock, R.J., Corban, G.A., Northcott, G.L., Wilkins, A.L., Langdom, A.G., 1996. Persistence of polycyclic aromatic compounds of different molecular size and water solubility in surficial sediment of an intertidal sandflat. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 670-676.

Partie II .

Caractérisation des substances humiques lors du compostage de boues (chromatographie sur gel de sephadex, UV Visible, RMN ¹³C, IRTF, Analyse élémentaire, thermochimie)

Cette parité est composée de 6 articles :

Article 5 :

Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their sephadex[®] gel fractions

Auteurs : Amir, S., Hafidi, M., Bailly, J.B., Revel, J-C.

Journal : *Agronomie*. 23, 269-275. 2003. *Available online at [www. edp.science.fr](http://www.edp.science.fr)*

Article 6 :

Elemental analysis, FTIR, ¹³C-NMR of humic acids from sewage sludge composting

Auteurs : Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Hamdi, H., Revel. J.C.,

Journal : *Agronomie*. 24. 13-18. 2004. *Available online at [www. edp.science.fr](http://www.edp.science.fr)*

Article 7 :

Structural changes in lipid-free humic acids during composting of sewage sludge

Auteurs : Amir S., Hafidi, M., Merlina, G., Revel. J.C.,

Journal : *International biodeterioration biodegradation*. In press (2005).

Article 8 :

Structural characterization of fulvic acids during composting of sewage sludge

Auteurs : Amir S., Hafidi, M., Merlina, G., Revel. J.C.,

Journal : *Process Biochemistry* 40, 5, 1693-1700,2005.

Available online at [www. sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).

Article 9 :

Structural characterization of humic acids, extracted from sewage sludge during composting, by Thermochemolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Auteurs : Amir, S., Hafidi, M, Lemee, L., Merlina, G., Guiresse, M., Pinelli, E., Revel, J-C., Bailly, J-R. Amblès, A.

Journal : Process Biochemistry (submitted 2005).

Article 10 :

Structural characterization of fulvic acids, extracted from sewage sludge during composting, by Thermochemolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Auteurs: Amir, S., Hafidi, M. Lemee, L., Merlina, G. Kaemmerer, M., Revel, J-C., Amblès, A.

Journal : Science of the Total Environment (submitted 2005).

Chapitre 1 :

Characterization of Humic Acids extracted from Sewage Sludge during Composting and of their Sephadex[®] gel Fractions

Soumia AMIR^a, Mohamed HAFIDI ^{a*}, Jean-René BAILLY ^b,
Jean-Claude REVEL^b

^a Unité Sol et Environnement, Faculté des Sciences Semlalia, Dépt. de Biologie. BP/2390,
Marrakech, Maroc.

^b Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Auzeville-Tolosane, BP/ 107, Toulouse, France

*Corresponding author: e-mail / hafidi@ucam.ac.ma

Présentation :

Après une détermination dans la première partie de l'innocuité du compost et des différents paramètres contrôlant le bon déroulement du processus de compostage. Dans la filière de recyclage agricole, la qualité agronomique d'un amendement organique ou compost prêt pour épandage est très dépendante de sa teneur en matière organique et surtout en substances humiques. Nombreux auteurs ont attribué la maturité et la qualité d'un compost à leur teneur en substances humiques, ainsi que leur structures chimiques. Les substances humiques reconnues jouent un rôle prédominant dans l'amélioration de la structure et la fertilité des sols. Elles contribuent à une grande capacité d'échange cationique, une libération contrôlée des nutriments minéraux selon les besoins de la plante, caractère tampon de pH, complexation des polluants inorganiques tels les éléments traces métalliques et des polluants organiques tels les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Cependant, une définition précise de la structure moléculaire de matière humique est encore controversée. Les substances humiques sont décrites selon Schnitzer comme des polymères aromatiques de haut poids moléculaire, composés des unités aromatiques substituées et liées par des liaisons covalente C-C, éther et ester. D'autres auteurs décrivent les substances humiques comme des groupes d'unités semblables qui sont associées par des liaisons non-covalentes ou faiblement covalentes pour former des agrégats "homogènes" (Piccolo, 1997).

Le fractionnement sur gel de sephadex est une technique qui consiste à déterminer les sous-fractions existantes dans les structures humiques et l'estimation de leur poids moléculaire. Dans cette étude, nous avons procédé à ce fractionnement pour déterminer l'évolution des sous-fractions des structures moléculaires des acides humiques néoformés au cours du compostage.

Le principe de fractionnement sur gel de sephadex est une séparation des molécules humiques selon leur poids moléculaire, leur forme et leur encombrement moléculaire. La préparation de gel consiste à une décantation du poudre dans un excès d'eau distillée pendant une nuit. Le fractionnement est effectué sur des gels avec différent diamètre de maillon moléculaires en suivant un pouvoir séparateur ascendant G25 (5000 da) ; G75 (50.000 da); G100 (100.000 da). Lors de l'élution, se produit une exclusion rapide des grosses molécules dont le diamètre dépassent celui des pores de gels, puisqu'elles ne passent pas à travers les pores de gel. Cette fraction est nommée « fraction exclue ». Les petites et moyennes molécules dont le diamètre

est inférieur à celui des pores diffusent à l'intérieur du gel, ainsi leur circulation est retardée lors de l'élution et cette fraction est nommée « fraction retenue ».

Le fractionnement est réalisé à chaque fois sur 2 ml de la solution humique. La solution humique est déposée soigneusement sur la surface du gel. L'élution est réalisée avec l'eau distillée et se fait par simple gravité. Des fractions d'environ 2 ml sont collectées dont l'absorbance est mesurée à 290 nm au spectromètre UV. Les contenus des tubes formant le pic de la fraction exclue sont regroupés à chaque fois en une seule fraction « exclue ». Les fractions élues après la fraction exclue sont aussi regroupées en une seule fraction « fraction retenue ». Le fractionnement a été effectué sur chacun des gels G25, G75, G100. Le fractionnement successif G25-G75 est procédé en deux étapes, la séparation a été effectuée en premier sur gel G25 et la fraction exclue récupérée de ce fractionnement est éluee sur le gel G75. Pour le fractionnement G25-75-100, la fraction exclue récupérée de G25-G75 est séparée sur G100. Chaque fractionnement est répété plusieurs fois pour chacun des échantillons afin de rassembler une matière suffisante pour l'analyse des deux fractions « exclue » et « retenue » à différents stades de compostage en utilisant différentes techniques chimiques : analyse élémentaire, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) et Ultraviolet-Visible (UV). Le rapport E4/E6 est le rapport des absorbances des acides humiques entre 465 nm et 665 nm.

L'analyse par spectroscopie infrarouge est effectuée sur des pastilles préparées à partir de 250 mg de KBr séché et 1 mg des acides humiques lyophilisés brutes ou des deux fractions exclues et retenues sur G75, G100.

L'analyse Ultraviolet-visible des acides humiques brutes, leur fractions exclues sur G25, G100 et leurs solutions diluées (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) à différents stades de compostage, a été effectué sur une fréquence passant de 800 à 200 nm jusqu'à l'obtention d'une augmentation d'absorbance centré à 280 nm.

Les profils de l'élution des acides humiques à différents stades de compostage sur les différents gels G25, G75, G100 et ceux obtenues d'un fractionnement successif G25-75, G25-75-100 sont illustrés dans la figure 1.

Les différents chromatogrammes obtenus à différents stades de compostage montrent toujours un seul pic mais symétrique sur G25. Dans le cas de G75, G100, G25-75 et G25-75-100 le pic devient asymétrique et composé des deux fractions : I « fraction exclue » et II « fraction retenue ». La fraction exclue est prédominante et se compose des molécules larges avec un grand poids moléculaire. La fraction retenue est minime et se compose de molécules de taille moyennes et petites. Ainsi, les acides humiques isolés des boues résiduaires à différents

stades du compostage constituent principalement de très larges molécules avec un grand poids moléculaire. L'augmentation de l'intensité d'absorbance du pic avec le stade du compostage particulièrement très nette sur G25, G25-75 ou G25-75-100 peut être corrélée à l'augmentation des concentrations des acides humiques avec le temps du compostage de 1,4 mg/ml en 1 mois à 1,77 mg/ml en 9 mois.

Une comparaison entre le rapport E4/E6 des acides humiques brutes à différents stades de compostage et de leur fraction exclue sur G25, G75, G100 montre une diminution de ce rapport avec l'augmentation du pouvoir séparateur de gel (tableau I). Cette diminution peut être attribuée à une augmentation du poids moléculaire de la fraction exclue ou à une diminution de son acidité totale en utilisant des gels avec un gradient moléculaire ascendant.

Ainsi, l'utilisation des gels avec un grand maillon (pores) moléculaire augmente l'efficacité de fractionnement et se produit davantage une séparation des molécules avec une taille moléculaire faible ou moyenne des molécules très larges. Ces observations montrent une continuité du gradient moléculaire des petites aux grosses macromolécules humiques.

Les spectres infrarouges des acides humiques brutes G0 et de leurs deux fractions (I et II) séparées par G75 et G100 montrent une grande similarité à différents stades de compostage, mais avec une certaine différence d'intensité d'absorbance dans certaines zones à différents stades de traitement et entre les deux types de fractions (figure 2). Ceci indique sur une conservation de structure chimique de base des acides humiques brutes et de leurs fractions au cours du processus de compostage.

Les spectres des deux fractions montrent que les structures exclues I d'acides humiques caractérisés par un grand poids moléculaire sont constitués de composés aromatiques lignine-like polycondensés liés aux chaînes lipidiques et peptidiques périphériques. Alors que les structures retenues II caractérisés par un poids moléculaire moyen et petit sont composés de structures lignin-like moins condensés et sont riches en groupements fonctionnels acides.

Au cours du compostage, l'analyse des spectres infrarouge et l'évolution des différents rapports établis pour déterminer le degré d'aromaticité (1650/2925, 1650/2855) et de polycondensation (1034/2925, 1034/2855, 1034/1540) des acides humiques brutes et de leurs fractions exclues de G75 (figure 2, tableau II) ont montré qu'au cours de l'humification, les composés aliphatiques, lipidiques et peptidiques de très large poids moléculaire se décomposent, ainsi se produisent des structures humiques plus oxydées et polycondensées avec relativement un poids moléculaire très bas.

L'analyse UV-Visible des acides humiques isolés à différents stades de compostage montrent des profils similaires (figure 3), ce qui confirme la ressemblance de structure chimique de

base entre les acides humiques à différents stades de compostage. Cependant, une diminution d'absorbance est remarquée en première phase de compostage et par la suite une reaugmentation est enregistré jusqu'au 9 mois de compostage. Ces variations peuvent être expliquer par un phénomène de minéralisation en première phase suivi par une resynthèse des molécules humiques complexes en phase de maturation de compostage.

Les profiles UV obtenus après des dilutions ascendantes (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) des acides humiques et de leurs fractions exclues indiquent sur un effet de dilution présenté par un maximum d'absorbance entre 260-340 nm (seul le stade 9 mois est présenté) (figure 4). Cet effet de dilution augmente et devient précoce avec l'augmentation du pouvoir séparateur du gel de G25 à G100. Ces résultats confirment une continuité du gradient moléculaire des petites aux grosses macromolécules humiques.

Abstract :

The molecular weight of humic acids extracted from sewage sludge at different stages of composting is estimated by separation on Sephadex gel. The two types of obtained fractions are characterized by Fourier Transform Infrared, Ultraviolet-Visible spectroscopy, and E4/E6 ratio. The fraction of high molecular weight excluded from the gel largely prevails. This fraction consists of polycondensed lignin-like structures bearing peripheral lipidic and peptidic chains. The fraction retained on the gel is characterized by a low and medium molecular weight and is composed of low-condensed lignin constituents with high acidic functional group content. During composting, an increase in aromaticity and polycondensation degree of humic acids, and decrease in aliphatic, peptidic and lipidic compounds are observed. Results obtained show the continuity of the molecular weight gradient from small to very large humic macromolecules, and that humic macromolecules can be regarded as associations of molecular humic sub-units of similar chemical nature.

Key words: humic acid / sewage sludge compost / gel chromatography / spectroscopic characterization

1. Introduction

Organic waste recycling in agriculture as soil amendments has increased greatly over last years, because it is a proper solution for resource-recovery, and avoids environmental and economic problems resulting from the disposal of large amounts of organic wastes [1]. Soil application of organic wastes and residues of any nature requires, however, that these materials be previously subjected to appropriate treatments. These treatments tend, on the one hand, to minimize or eliminate a number of probable adverse effects related to this practice and, on the other hand, to optimise the efficiency of these materials once in the soil. The composting process is a suitable treatment used to produce a stable product, rich in humic-like substances that are environmentally safe and practicable at acceptable operational costs [28]. The agronomic interest of the final product is identified by the determination of the quantity and quality of humic-like acids present in it [29, 2, 30]. Thus, the aims of numerous studies were the determination of the molecular size distribution of such materials and the characterization of the resulting fractions. According to Senesi and Brunetti [27], the composting treatment allows the transformation of organic wastes into humic-like compounds

relatively homogeneous in composition, and chemical and structural properties. This process is accompanied by the loss of peptidic, aliphatic, and polysaccharidic structures, possibly due to intense mineralization achieved by microbial activity during the composting process and formation of more polycondensed, oxidized, unsaturated and aromatic humic acids. Other authors, e.g., Zhigunov and Simakov [32], Inoko and Tamai [21], Tomikawa and Oba [31] suggested the formation of more oxidized humic compounds, with a concomitant lowering of molecular weight, during the composting process.

The present work examines the spectroscopic characteristics (UV-Visible, FTIR) of humic acids extracted from sewage sludge at different times of composting, and of the humic fractions obtained by sephadex gel chromatography.

2. Materials and Methods

2.1. Humic acid extraction

The humic acids were extracted from a mixture of sewage sludge (165 Kg) and straw (20 Kg) at various stages of composting (1, 3, 6 and 9 months). At first, the sample (30 g) was successively treated three times with 40 ml of distilled H₂O to extract the non-humic, water-soluble substances (sugars, proteins), in order to avoid interference between these compounds and humic compounds [9]. The extraction was then carried out on 30 g of the pre-treated sample with 40 ml of NaOH (0.1N). Extraction was repeated several times until uncoloured supernatants were obtained. Centrifugation was then carried out at 4000 g for 15 min, and filtration was made on Whatman paper (125 mm). The filtered solutions were precipitated by acid treatment with 3N H₂SO₄ for 24h at 4°C. The precipitated humic acids were separated from fulvic acid solution by filtration on Whatman paper (125 mm) and then were solubilized by NaOH solution (0.1N). The obtained humic acid solution was dialyzed with a Spectra Por MWCO membrane (7500 Dalton) to eliminate excess salts. The dosage of humic acids was made by KMnO₄ oxidation [12].

2.2. Gel fractionation

Fractionation of humic acids was realized by passing 2 ml of humic acid solution through Sephadex gels with different separation power: G25 (17cm × 4.9 cm, 5000 Da), G75 (17cm × 4.9 cm, 50000 Da), G100 (14 cm × 4.9 cm, 100000 Da). The obtained excluded fraction of G25 was lyophilized, redissolved in 2 ml of H₂O with addition of a small drop of 0.1 N NaOH and passed through G75. The excluded fraction G25-75 obtained of the latter separation was

lyophilized, redissolved (2 ml of H₂O, drop of 0.1 N NaOH) and then passed through G100 to achieve the G25-75-100 fractionation.

The used eluant was distilled water, the fractions (about 2 ml) were collected every 3 min and the absorbance of these fractions was measured with an Unicam SP 1800 spectrophotometer at 350 nm. In order to obtain enough material for the spectroscopic analysis, each fractionation was repeated four times.

2.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Potassium bromide pellets of each sample were prepared by pressing under vacuum a mixture of 250 mg of dried KBr and 1 mg of lyophilized sample (humic acid, separated fractions) [15]. The spectra were obtained using a FTIR Perkin Elmer 1600 spectrophotometer over a 4000 to 400 cm⁻¹ range, at a rate of 16 nm/s.

2.4. Ultraviolet - Visible Spectroscopy

Absorbance measurements of the humic acid solution obtained from sewage sludge at various stages of composting and of their fractions excluded on G25, G75, G100, and their dilute solution of 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 were made in 1 cm quartz cells over a 800 to 200 nm range using an Unicam SP 1800 spectrophotometer.

The E4/E6 ratio was measured as the ratio of absorbances at 465 nm and 665 nm after dissolution of lyophilized sample (2 mg) of the humic acids and of their excluded fractions in 25 ml of 0.05 N NaHCO₃ [13].

3. Results and Discussion

3.1 Gel permeation chromatography and E4/E6 ratio

Fractionation on Sephadex® gel is a very useful technique to estimate the molecular weight of humic acids [5, 23, 30, 31]. The chromatograms obtained on G25 Sephadex for the humic acids extracted from the material at various stages of composting show a similar pattern consisting of one symmetrical peak (Fig. 1), whereas the chromatograms on G75, G100, G25-75 and G25-75-100 also show one predominant, but asymmetrical peak, which could be divided into two main portions: I and II (Fig.1). Portion I corresponds to the excluded fraction, and is the most abundant fraction consisting of large molecules with high molecular weight. Portion II corresponds to the retained fraction that consists of molecules of medium and small sizes which are lower than the diameter of the gel pores. Thus, molecules of large molecular weight prevail in the humic acids of sewage sludge during composting, as previously observed by other authors [3, 24]. The second peak (Fig 1) present in most

chromatograms is very small and corresponds, according to Blondeau [10] and Bailly [6], to Na-humate complexes, whose solubility is influenced by their adsorption on the gel.

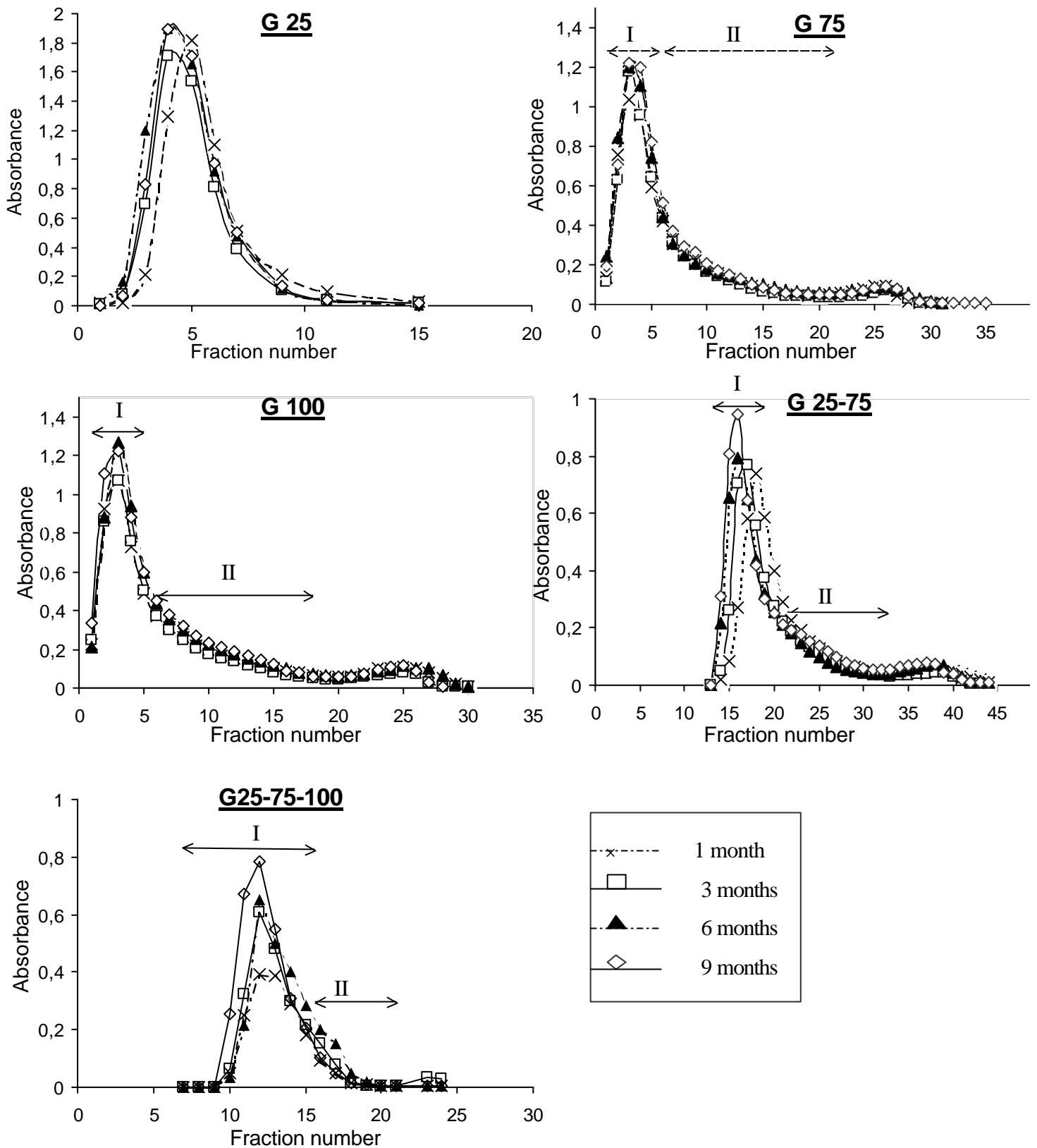


Figure 1. Gel permeation patterns of humic acids extracted from sewage sludge during composting on sephadex gel G25, G75, G100, G25-75, G25-75-100.

The only significant difference between these chromatograms is the absorbance intensity during composting of the first peak, which correlates with the increase from 1.4 mg/ml after 1 month to 1.77 mg/ml after 9 months of humic matter concentration in the sample.

Moreover, with the fractionation and the increase of the gel separation power from G75 to G100, a parallel decrease of the E4/E6 ratio of the excluded fraction is observed at any stage of composting (Table I). According to Chen et al. [13] and Riffaldi et al. [26], the decrease in the E4/E6 ratio may be ascribed to either an increase in the molecular weight of the excluded fraction, or to a decrease of the total acidity of this fraction. Thus, by using gels with increasing separation power, a more efficient separation of the medium and small molecular weight molecules from the large weight fraction is achieved, and consequently a better selection of the molecules with a larger molecular weight in this fraction. These observations confirm the continuity of the molecular weight gradient from small to very large humic macromolecules, considered by many authors [6, 22].

Table I. E4/E6 ratio of unfractionated humic acids at different stages of composting and of their fractions excluded from Sephadex gel G75 and G100.

| E4/E6 | HA | E- HA (G75) | E- HA (G100) |
|----------|------|-------------|--------------|
| 1 month | 3.93 | 3.66 | 3.50 |
| 3 months | 3.93 | 3.63 | 3.50 |
| 6 months | 4.00 | 3.80 | 3.66 |
| 9 months | 4.00 | 3.83 | 3.73 |

HA: unfractionated humic acids, E-HA: excluded humic acid fractions

3.2 FTIR Spectroscopy

The FTIR spectra of unfractionated humic acids G0 at various stages of composting and of the two fractions separated by the gels G75 and G100 (Fig. 2) show a great similarity of some absorption bands with some differences in the intensity. This result indicates the maintenance of the basic chemical structure of the unfractionated humic acids and of their fractions during composting. The assignment and interpretation of the bands were based on references [6, 7, 8,

14, 15, 16, 17, 19] and are the following: (a) a broad band at 3300-3400 cm^{-1} , assigned to H-bonded OH groups (alcohols, phenols, organic acids) and N-H groups; (b) an intense peak at 2920-2930 cm^{-1} , due to asymmetrical aliphatic carbon, especially CH_2 ; (c) a less intense peak at 2855 cm^{-1} , due to symmetrical aliphatic carbon CH_2 ; (d) a broad band at 1630-1650 cm^{-1} ascribed to olefinic and aromatic C=C, C=O (amide I) and quinones groups with a shoulder at 1600 cm^{-1} corresponding to aromatic C=C, C=O, and/or C=O of bonded conjugated ketones, quinone, C=O stretch of amide (I) and a second less marked shoulder at 1540-1550 cm^{-1} , due to amide II and/or aromatic C=C; (e) a small band at 1460-1380 cm^{-1} consisting of a weak peak at 1455 cm^{-1} corresponding to CH_3 and CH_2 , and a second, more pronounced peak near 1420 cm^{-1} corresponding to several groups including phenolic OH, COO^- asymmetric stretch, stretching of ortho-disubstituted aromatic rings; (f) a weak band at 1265-1223 cm^{-1} due to amide III or aromatic ethers; (g) a broad band at 1120-980 cm^{-1} consisting of a large peak centred near 1034 cm^{-1} characteristic of aromatic ethers, and possibly polysaccharides and Si-O of silicates; and (h) two peaks at 520 and 470 cm^{-1} due to para-di-substituted aromatic ring bend.

Comparison between the spectra of the excluded (f I) and retained (f II) fractions on G75 and G100 (Fig. 2) shows the presence of the same basic FTIR bands, in agreement with Ouatmane et al. [22], who suggested similar chemical structure between fractions with various molecular weights. However, some differences of the absorption intensity of some bands were observed between fractions I and fractions II.

Spectra of the excluded fractions I show well pronounced peaks at 1034 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} , 2855 cm^{-1} , peaks with relatively high intensity are also observed near 1650 cm^{-1} , 527 and

470 cm^{-1} , while the absorption intensity near 1600 cm^{-1} and of the peak at 1420 cm^{-1} are weak.

In contrast, the retained fractions II are characterized by the disappearance of the peaks centred at 1034 cm^{-1} , 527 and 470 cm^{-1} and the decrease of absorption near 1650 cm^{-1} . However these fractions maintain the peaks at 1600 and 1420 cm^{-1} , and shows the appearance of new weak peak at 1734 and 1180 cm^{-1} specific to COOH [16, 20], and at 1505-1510 cm^{-1} which corresponds either to amides II [11] or to aromatic ring stretch in lignine like structures [18]. The G100-retained fractions exhibit a greater intensity of the peaks at 2920 and 2850 cm^{-1} and a stronger reduction of the peak centred at 1034 cm^{-1} , in comparison to the G75-retained fraction.

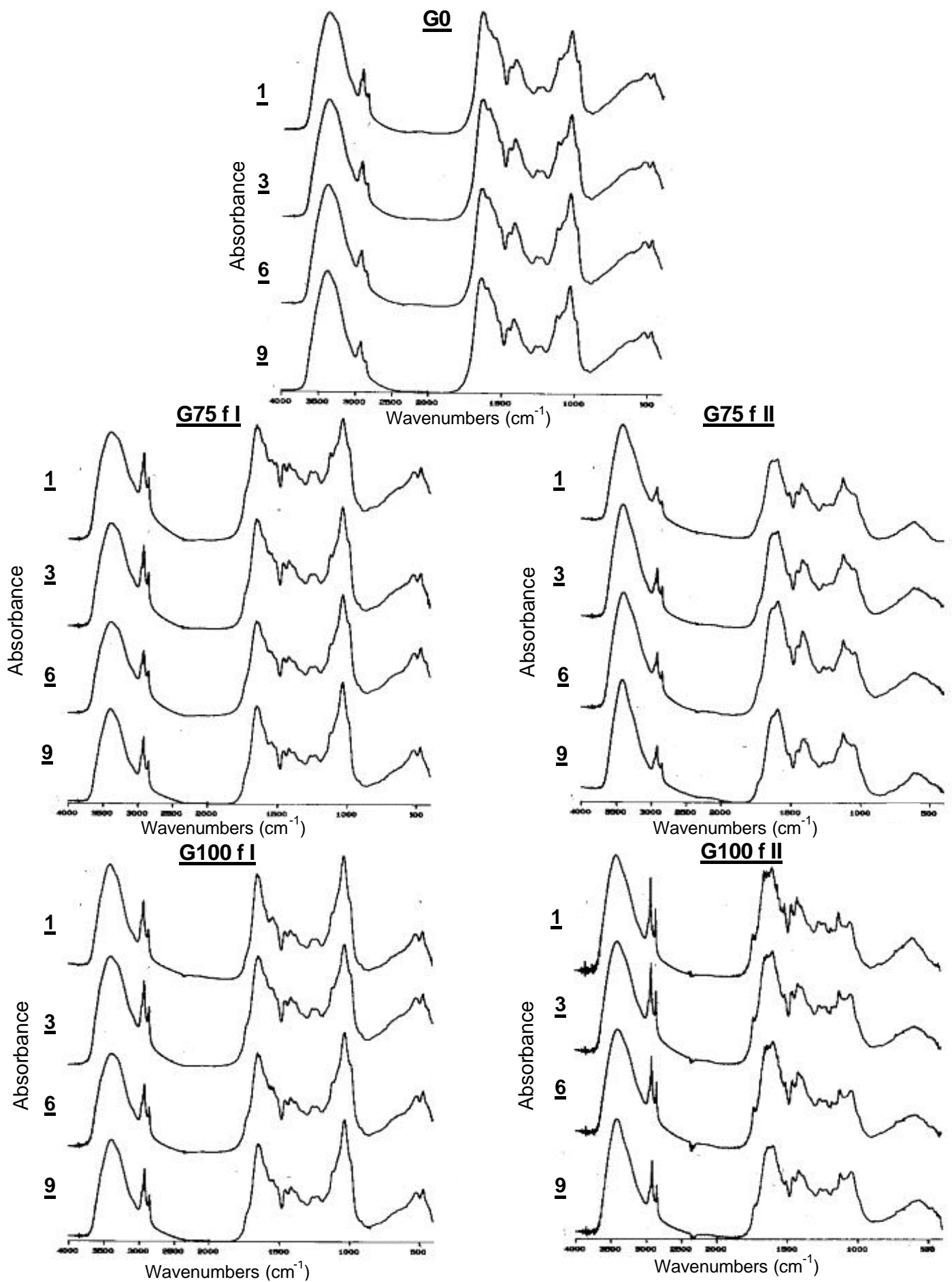


Figure 2. FTIR spectra of the unfractionated humic acids G0 of sewage sludge at different stages of composting (1, 3, 6, 9 months) and of their fractions (I, II) obtained from Sephadex gels G75 and G100.

Thus, in agreement with Tomikawa and Oba [31], the humic acid fractions characterized by a high molecular weight consist of polycondensed aromatic structure lignin-like constituents bearing peripheral lipidic and peptidic chains. In contrast, the fractions of low or medium molecular weight are composed of low condensed lignin-like structures with high content of acidic functional group.

The changes in the aromaticity and polycondensation degree during composting are reflected by the differences of the ratios of the main FTIR peaks of humic acids and of excluded fractions G75 and G100 recorded between the first stage (1 month) and the final stage (9 months) (Table II). During composting an increase of the aromaticity degree (1650/2925, 1650/2855) and of the polycondensation degree (1034/2925, 1034/2855, 1034/1540) of humic acids and their excluded fractions from G75 is shown together with lowering of aliphatic, lipidic and peptidic compounds. In contrast, the fractions excluded from G100 present only a weak increase in these ratios. Thus, during the humification process aliphatic, lipidic and peptidic compounds of large molecular weight are decomposed, and more oxidized and polycondensed humic compounds appear with relatively low molecular weight.

Table II. Increase of the ratios of the main FTIR absorption peaks of unfractionated humic acids and of their fractions excluded on Sephadex gels G75 and G100 between the first stage (1 month) and final stage (9 months) of composting.

| Ratio | HA (1) | E- HA (G75) (1) | E- HA (G100) (1) |
|-----------|--------|-----------------|------------------|
| 1650/2925 | 20 | 8 | 0.20 |
| 1650/2855 | 20 | 22 | 2 |
| 1034/2925 | 30 | 29 | 7.20 |
| 1034/2855 | 30.50 | 45 | 9.54 |
| 1034/1540 | 6 | 31.50 | 0.01 |

(1) the results are expressed in %

HA: unfractionated humic acids, E-HA: excluded humic acid fraction on Sephadex gels

Results similar to those described here were reported by Zhigunov and Simakov [32] who found a higher proportion of the high molecular weight fraction in humic acids separated from decomposing plant residues during the first stages of decomposition, with respect to the later stages. Inoko and Tamai [21] also suggested that many animal and plant residues entering the soil are decomposed and converted into humic compounds with a concomitant lowering of molecular weight. Similarly, Tomikawa and Oba [31] found that with the progress of humification, the relative absorbance of large particle components and the polydispersion of particle weights are decreased, and that the degree of humification was maximum for the fraction with medium or small particle weight.

3.3 UV/Visible Spectroscopy

UV-Visible spectra of humic acids extracted at various stages of composting show similar patterns (Fig. 3), which confirms the resemblance of the basic chemical structures of humic acids at any stage of composting [4]. The decrease of absorbance of humic acid observed during the first month, and its following increase to final stage after 9 months of composting, may be due to the initial mineralization phenomenon and final resynthesis of complex humic molecules during composting, as suggested by Senesi et al. [28].

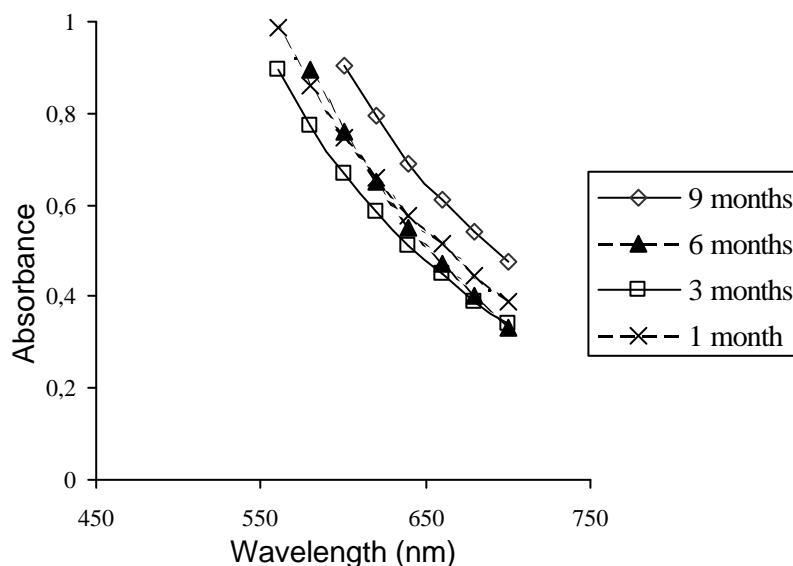


Figure 3. Ultraviolet -Visible absorbance curves of unfractionated humic acids extracted from the sewage sludge compost at different stages of treatment

On the other hand, spectra obtained by dilutions ($1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$) of these humic acids and their excluded fractions, show a dilution effect, indicated by a maximum ultraviolet

absorbance at 260-340 nm, in the figure 4 was shown the case of 9 months of composting. This is attributed to more exposed C=O, COOH, and OH groups following separation by dilution of the molecules or micelles previously bound or unfolding of molecular links, which are masked in the concentrated solutions [4]. This dilution effect increases with the increase of the gel separation power from G25 to G100 (Fig. 4). According to Piccolo [25], during gel permeation, the presence of COO⁻ groups, inside humic acid micelles, induces electrostatic repulsion of negative charges and disruption to smaller aggregates from the original structures. The electrostatic repulsion appears to momentarily overcome the attractive hydrophobic forces that hold together the humic macromolecules. Thus, the small sub-units formed are progressively separated from the large fraction, and diffuse through the small gel pores; thus their elution is delayed. The humic sub-units are finally eluted for volumes typical of low molecular weight compounds.

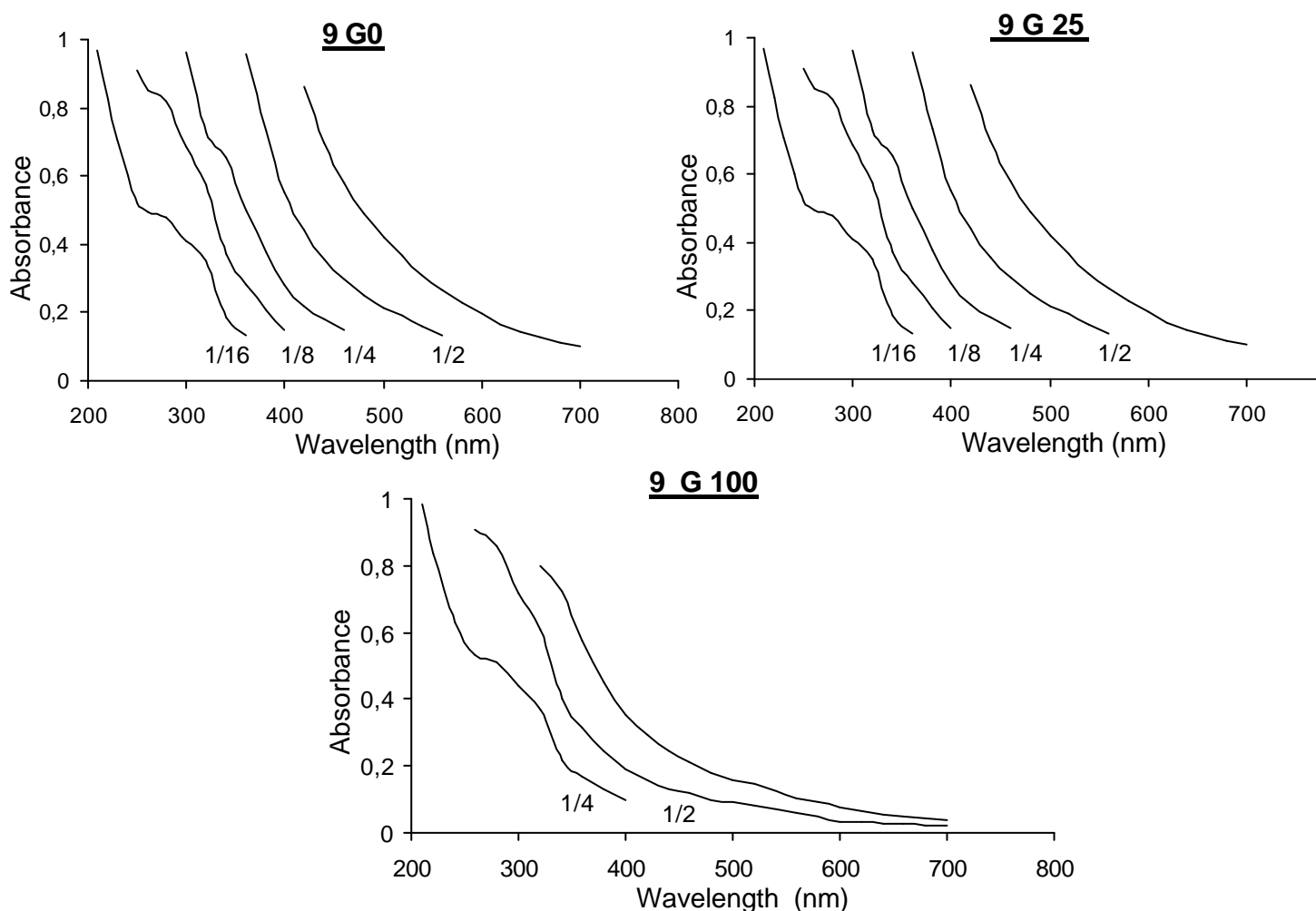


Figure 4. Ultraviolet-Visible absorbance curves at different dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) of unfractionated humic acids extracted from the sewage sludge compost at 9 months of treatment, and of their G25 and G100 excluded fractions on Sephadex gel.

4. Conclusion

Humic acids extracted from sewage sludge at different stages of composting have been analyzed by various chemical methods (Chromatography on Sephadex gel, Ultraviolet/Visible, FTIR Spectroscopy). The obtained results show a predominance of the fraction excluded from the gel of high molecular weight, which consists of polycondensed aromatic of lignin-like structures, bearing peripheral lipidic and peptidic chains. In contrast, the fractions retained on the gel of low or medium molecular weight are composed of low condensed lignin-like structures with a high content of acidic functional group.

During gel permeation, the presence of COO^- groups, inside humic acid micelles, induces electrostatic repulsion of negative charges, which overcome the humic hydrophobic forces and then the disruption to smaller aggregates from the original structures. The small sub-units formed are progressively separated from the large fraction, and diffuse through the small gel pores; thus their elution is delayed for volumes typical of low molecular weight compounds. This dilution effect increases with the increase of the gel separation power.

During composting, the aliphatic, lipidic and peptidic compounds of large molecular weight are decomposed, and more oxidized and polycondensed humic compounds appear with relatively low molecular weight. Thus, with composting appear the humic macromolecules consisting mainly of molecular humic sub-units of similar chemical nature.

Acknowledgements

This work was financed in part by the Moroccan French cooperation PRAD (99/10) and JER 6013 associated to the AUPELF-UREF.

Reference

- [1] ADEME. La collecte et le traitement des déchets, Guide pratique pour les élus de Midi – Pyrénées, (1994).
- [2] Adani F., Genevini P.L., Tambone F., A new index of organic matter stability, *Compost Science & Utilization* 3 (1995) 25-37.
- [3] Almendros G., Polo A., Dorado E., Estudio de la materia organica de diversos tipos de lodos residuales de la provincia de Madrid, *Agrochimica* 27 (1983) 439-454.
- [4] Bailly J.R., Spectroscopie U.V.- Visible des acides humiques non fractionnés et de certaines de leurs fractions obtenues sur gels de dextrane, *Plant and Soil*. 38 (1973), 281-297.

- [5] Bailly J.R., Spectroscopie infra-rouge de quelques fractions d'acides humiques obtenues sur sephadex, *Plant and Soil*. (1976) 95-111.
- [6] Bailly J.R., Sur la structure des substances humiques et le rôle des microorganismes dans leur formation. Thèse doctorat d'Etat Universitaire. Paul Sabatier, Toulouse, France (1985) 380 p.
- [7] Bellamy L.J., *The infrared spectra of complex molecules*. Chapman and Hall, 3^d ed., vol. 1, London, 1975.
- [8] Benny C., Hatchery P.G., Hagar Y., Chen., Chemical and biological characterization of organic matter during composting of municipal solid waste, *J. Environ. Qual.* 25 (1996) 776-785.
- [9] Bernal M.P., Navarro A.F., Roig A., Cegarra J., Garcia D., Carbon and nitrogen transformation during composting of sweet sorghum bagasse, *Biol. Fertil. Soil.* 22 (1996) 141-148.
- [10] Blondeau R., The fractionation of humic acids on sephadex gel: the role of salts and extractants, *Agrochimica XXX* (1986) 128-136.
- [11] Bruckerts S., Gaiffe M., Blonde J.L., Portal J.M., Fractionnement de la matière organique et analyse des composés humiques des sols calcimagnésiens humifères du Jura (France), *Geoderma* 61 (1994) 269-280.
- [12] Chaminade R., Les formes du phosphore dans le sol : nature et rôle des complexes phospho-humiques, *Ann. Agron.* 1 (1944) 1-63.
- [13] Chen Y., Senesi N., Schnitzer M., Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *J. Soil Sci. Soc. Am.* 41 (1977) 352-358.
- [14] Colthup N.B., Daly L.H., Wiberley S.E., *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*, 2nd ed., Academic Press, New York 1975.
- [15] Cross A.D., *Introduction to practical infra-red spectroscopy*, Butterworths ed, london, 1964.
- [16] DeNobili M., Bragato G., Alcaniz J.M., Puigbo A., Comellas L., Characterization of electrophoretic fractions of humic substances with different electrofocusing behavior, 150 (1990) 763-770.
- [17] Gerasimowisz W.V., Byler D.M., Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic studies of humics acids, *Soil Science* 139 (1985) 270-278.
- [18] Haw J.F., Marciel G.E., Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopic study of wood pulping with cross polarization and magic-angle spinning. *Anal. Chem.* 56 (1984) 1323-1329.

- [19] Inbar Y., Chen Y., and Hadar Y., Soil state carbon 13 nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy of composted organic matter, *J. Soil Sci. Soc. Am.* 53 (1989) 1695-1701.
- [20] Inbar Y., Chen Y., Hadar Y., Carbon ⁻¹³ CPMAS NMR and FTIR spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting of solid wastes from Wineries, *J. Soil Sci.* 152 (1991) 272-281.
- [21] Inoko A., Tamai M., Studies on soil humus with special reference to its molecular weight systems. *Bull. Natl. Inst. Agric. Sci. B* (1976)142-182.
- [22] Ouatmane A., Dorazio V, Hafidi M., Revel J.C. , Senesi N., Elemental and spectroscopic characterization of humic acids fractionated by gel permeation chromatography, *Agronomie*, 20 (2000) 491-504.
- [23] Ouatmane A., Etude du compostage de quelques déchets organiques : I– Approche physico-chimique, calorimétriques et spectroscopique de l'étude de l'état de maturation des composts. II-Analyse qualitative et quantitative de la fraction humique, Thèse de Doctorat d'Etat es-science, Faculté de Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc, (2000) 170 p.
- [24] Piccolo A., Nardi S., Concheri G., Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil. Biol. Biochem.* 24 (1992) 373-380.
- [25] Piccolo A., New insights on the conformationnel structure of humic substances as revealed by size exclusion chromatography, in: J. Drozed., et al., (Eds.), *The role of humic substances in the ecosystems and environmental protection*, 8th Meeting IHSS, Poland, 1997, 19-34.
- [26] Riffaldi R., Levi-Minzi R., Saviozzi A., Humic fractions of organic wastes, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 10 (1983) 353-359.
- [27] Senesi N., Brunetti G., Chemical and physicochemical parameters for quality evaluation of humic substances produced during composting, in: M. De bertoldi, P. Sequi, B. Lemmes, T. Papi (Eds.) *The science of composting*. Blackie Academic & Professional, Part 1, Glasgow UK, 1996, 195-212.
- [28] Senesi N., Miano T.M., Brunetti G., Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances, in: A. Piccolo (Eds.), *Humic substances in terrestrial ecosystems*, 1996, 531-593.
- [29] Sequi P., De Nobili M., Leita L., Cercignani G., A new index of humification, *Agrochimica* 30 (1986) 175-180.

- [30] Tomati U., Madejon E., Galli E., Evaluation of humic acid molecular weight as an index of compost stability, *Compost Science & Utilization*, 8 (2000) 108-115.
- [31] Tomikawa A., Oba Y., Characteristics of soil humic substances fractioned in relation to particle weight. II. Particle weight distribution, optical properties, and infrared absorption spectra of fractions of humic acids with different particle weights, *Soil Sci. Plant. Nutr.* 37 (1991) 211-221.
- [32] Zhigunov A.V., Simakov V.N., Composition and properties of humic acids separated from decomposing plant residues. *Sov. Soil Sci.* 9 (1977) 687-693.

Chapitre 2 :

Elemental analysis, FTIR, ¹³C-NMR of humic acids from sewage sludge composting

Soumia AMIR^a, Mohamed HAFIDI^{a*}, George MERLINA^b, Hassan HAMDI^a, Jean-Claude
REVEL^b

^a Unité Sol et Environnement, Faculté des Sciences Semlalia, Dépt. de Biologie. BP/2390,
Marrakech, Maroc.

^b Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Auzeville-Tolosane, BP/ 107, Toulouse, France

*Corresponding author / e-mail: hafidi@ucam.ac.ma

Présentation :

Vu la complexité de structures humiques, nombreuses techniques chimiques complémentaires sont généralement utilisées afin d'accumuler davantage des données suffisantes pour s'approcher de la structure moléculaire de substances humiques et déterminer les transformations produites au sein des structures organiques au cours du processus d'humification. Deux approches sont habituellement utilisées « destructives ou non destructives » dont leur progression dépend de l'évolution des instruments analytiques chimiques modernes :

Approches non destructives : les substances humiques isolés sont analysés directement sans altération chimique, ex : Spectroscopies FTIR et ^{13}C -NMR.

Approches destructives : les macromolécules de substances humiques sont chimiquement ou physiquement dégradées soit jusqu'au niveau élémentaire « ex : analyse élémentaire » ou à différentes sous-unités qui sont par la suite isolées et identifiées « ex : analyse par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse GC /MS après Thermochimolyse ou oxydation par CuO ou KMnO_4 ».

L'objectif de présent travail est une caractérisation de l'évolution de structure d'acides humiques au cours du compostage en se basant sur les différentes techniques : analyse élémentaire, IR-TF et ^{13}C -RMN.

Pour extraire les substances humiques, l'échantillon de compost des boues à différents stades d'évolution a été préalablement traité à H_2O distillée afin d'extraire les substances non-humiques hydrosolubles (sucres, protéines) qui présentent une interférence avec les substances humiques. Par la suite, l'extraction des substances humique est réalisée plusieurs fois par une solution alcaline de NaOH (0,1N) jusqu'à décoloration de surnagent. Après centrifugation et filtration, les solutions regroupées pour chaque échantillon ont été traitées à H_2SO_4 afin de précipiter les acides humiques. Après isolation des surnagents d'acides fulviques, les acides humiques sont resolubilisés par NaOH (0,1N). Les analyses chimiques sont effectuées sur les acides humiques lyophilisés après une étape de dialyse pour éliminer les sels en excès. Le dosage est réalisé par oxydation au KMNO_4 .

L'analyse élémentaire C, H, N est réalisée par un carbographe Fison Carlo Erba EA 1110, et O par un Carbo Erba 1106. Le rapport E4/E6 est déterminé sur une solution de 2 mg d'acides humiques lyophilisés qui est solubilisé dans 25 ml de NaHCO_3 (0,025 M). L'analyse FTIR est effectuée sur des pastilles de KBr avec 2 mg d'acides humiques lyophilisés.

L'analyse ^{13}C -NMR a été réalisée sur une solution de 100 mg d'AH solubilisé dans 3 ml de

NaOD/D₂O (0,5 M). Les spectres ont été obtenus par un spectromètre Bruker AM WB 300 MHz utilisant un découplage H en soumettant les solutions à une fréquence de 75,469 MHz. Les échantillons ont été soumis à une pulsation de 35° avec un temps d'acquisition de 0,98 secs et un délai de relaxation de 1,8 sec. Le temps d'acquisition totale est de 72 h. Les aires d'intégration sont : 0-110 ppm (carbone aliphatique), 110-165 ppm (carbone aromatique), 165-200 ppm (carbone carboxylique).

Les résultats de l'analyse élémentaire ont montré qu'au cours du compostage se produit principalement une diminution de teneur en azote et une augmentation du rapport C/N, teneur en oxygène et O/C (tableau 2). Ces changements sont attribués à une oxydation microbienne des structures aliphatiques et peptidiques périphériques pour assurer leurs besoins énergétiques au cours du compostage. Une légère augmentation du rapport E4/E6 au cours du compostage implique soit une réduction du poids moléculaire des structures humiques probablement par élimination des composés aliphatiques, soit une augmentation de leur contenu en oxygène.

Les spectres FTIR du compost à différents stades d'évolution sont illustrés dans la figure (1). Les résultats ont montré une diminution au cours du traitement de l'absorbance des structures aliphatiques principalement lipidiques en 2920-2930 cm⁻¹, avec une augmentation de l'absorbance vers 1600, 1510, 1460, 1125, 1034 cm⁻¹, présentant des structures aromatiques étherifiées plus oxydées et polycondensées.

L'analyse ¹³C-NMR des acides humiques (figure 2, table 3) montre au cours du compostage une diminution significative de résonance dans la zone 15-45 ppm assignée au carbone de longues chaînes aliphatiques. En parallèle, se produit une augmentation de résonance en 130-165 ppm qui correspond à des structures aromatiques étherifiées démontrées par une persistance de pic de résonance des méthoxyles aromatiques en 56 ppm. Le carbone carboxylique a montré une diminution au cours de la phase de stabilisation originaires de l'intense biodégradation des lipides. La réaugmentation en phase de maturation peut être attribuée à un accroissement des proportions en acides benzéniques avec le processus d'humification. Ces transformations au cours du compostage mettent en évidence l'oxydation microbienne sélective des composés facilement assimilables, comme, par exemple, les chaînes aliphatiques périphériques des structures lipidiques et peptidiques. Ceci a contribué avec un grand part à la production de structures aromatiques riches en groupements fonctionnels. Ces dernières structures aromatiques sont résistantes à la décomposition microbienne et sont donc préservées pour constituer une large partie d'acides humiques néoformés.

Abstract :

The effect of composting on the chemical structure of humic acids extracted from mixture of sewage sludge and straw at different times of treatment was investigated by various methods (elemental analysis, Fourier Transform Infrared and Carbon 13-Nuclear Magnetic Resonance spectroscopies). The starting material was composed of the heterogeneous mixture of etherified aromatic structures bearing peripheral long-chain lipidic, peptidic and carbohydrate structures. The results obtained shows a decrease of aliphatic compounds during composting, in parallel with an increase of aromatic structures - mainly those substituted by functional groups such as phenolic, methoxylic and carboxylic groups. These changes support the preferential oxidation of readily accessible moieties such as aliphatic side chains of lipidic and peptidic structures leading to the production of highly functionalized aromatic macromolecules. The latter compounds are resistant to microbial degradation and are therefore preserved as part of the newly formed humic acid structures.

Key words: sewage sludge/ composting/ humic acids/ chemical structure/ humification.

Résumé :

L'action du processus de compostage sur la structure chimique des acides humiques extraits de mélange de boues résiduaires de stations d'épuration et de paille a été suivie à différents stades du traitement par analyse élémentaire, spectroscopies Infrarouge à Transformée de Fourier et Résonance Magnétique Nucléaire du Carbon 13. Le matériel initial est composé d'un mélange hétérogène de structures aromatiques étherifiées sur lesquelles sont liées de longues chaînes lipidiques et des structures peptidiques et carbohydrates. Les résultats obtenus montrent une diminution, durant le processus de compostage, des composés aliphatiques, avec une augmentation relative des structures aromatiques principalement celles substituées par des groupements fonctionnels tels que phénols, méthoxyles, carboxyles. Ces transformations mettent en évidence l'oxydation préférentielle des composés facilement accessibles, comme, par exemple, les chaînes aliphatiques périphériques des structures lipidiques et peptidiques, ce qui conduit à une production de structures aromatiques riches en groupements fonctionnels. Ces dernières sont résistantes à la décomposition microbienne et sont donc préservées pour constituer une partie de la structure d'acides humiques néoformés.

Mots-Clés : boues résiduaires/ compostage/ acides humiques/ structure chimique/ humification.

1. Introduction

Composting of sewage sludge has recently largely developed in order to obtain a more suitable fertilizer and a safer product for agricultural recycling than the starting material. This aerobic thermophilic biotreatment stabilizes organic matter and suppresses major pathogenic populations [11, 12]. In addition, it is thought to reduce the bioavailability of heavy metals, and enhance the biodegradation of organic pollutants.

However, the compost must reach stability and maturity in order to avoid possible adverse effects during storage and use. According to numerous studies, the amount and chemical structure of the humic substances, principally humic acids, formed during composting constitute the main index for assessing the stability and maturity of compost [9, 12, 19, 21,

28]. These humic substances originate from raw organic matter that has undergone a short period of biotransformation during composting compared to native humification processes in soil [24, 26].

The progress of humification processes is related to numerous factors, such as the nature of the starting materials, time and the oxidative conditions of treatment that influence microbial activities and thus the degradation of the composted material. Gerasimowicz and Byler [13] showed that the relative increase of the degree of aromaticity and unsaturation of the humic acids vary as a function of time and of the treatment used for sewage sludge (drying, anaerobic digestion, composting with or without wood chips). Diaz-Burgos et al. [10], Senesi et al. [26] showed that during composting the unstable organic compounds such as aliphatic and protein materials are transformed through intense microbial activities to more stable humic compounds with more polycondensed, oxidized, olefinic, or aromatic structures. This is similar to the progressive aromatization, mainly the increase of oxidized aromatic structures during native humification processes occurring in soil that has been widely suggested by numerous authors [15, 27].

Other authors such as Almendros et al. [1] found that in majority of cases for composted forest and shrub biomass, the recalcitrant material accumulated during composting was not exclusively aromatic in nature and that the presence of tannins may contribute, through their selective preservation and their condensation reactions, to limit the decomposition of aliphatic biomacromolecules. This view was first proposed by Zech et al. [29] who considered that the hypothesis of increasing aromaticity during humification was questionable, and that this is not the dominant process. Bracewell and Robertson [5] and Baldock et al. [3] showed that during decomposition of natural organic materials, alkyl carbon accumulates, whereas aromatic carbon, presumably derived from lignin structures accumulates as the carbohydrates, cellulose and hemicelluloses are utilised, but disappears with further decomposition to leave a residue with high contents of alkyl carbon.

The objective of this study was to determine the influence of composting on the chemical structure of humic acids in sewage sludge. It has to be emphasized that the starting material has already undergone a long period of aerobic-anaerobic lagooning treatment, and is composed of various solid residues coming from urban discharge water.

Elemental analysis and spectroscopic techniques such as Fourier transform infrared (FTIR), and carbon-13 nuclear magnetic resonance have been widely used for similar studies. We have applied these methods to the humic acids extracted from the sewage sludge at different stages of composting.

2. Material and methods

Sewage sludge was taken from an anaerobic lagoon in an experimental wastewater treatment plant. Composting of mixture of sewage sludge (90 %) and straw (10 %) was performed for 9 months on a composting platform. In order to provide aerobic conditions, the mixture was turned over every 15 days. The progress of composting was followed by monitoring temperature change [2]. Some previously determined physico-chemical characteristics of the compost at different stages of treatment (T0: initial time and T1, T6, T9 corresponding to 1, 6 and 9 months of composting) are reported in table 1 [2].

Table 1. Change in various physico-chemical characteristics of the sewage sludge during composting

| Stages (months) | pH | C/N | O.C. % ^a | DEC % | ash % ^a | H. S. (mg g ⁻¹) ^a | H. A. (mg g ⁻¹) ^a |
|-----------------|------|-------|---------------------|-------|--------------------|--|--|
| T0 | 7.30 | 24.00 | 17.74 | / | 65.90 | 19.10 | 9.94 |
| T1 | 7.40 | 21.40 | 16.18 | 20.00 | 70.70 | 17.45 | 8.80 |
| T6 | 6.73 | 16.40 | 14.26 | 40.00 | 76.30 | 20.80 | 11.60 |
| T9 | 6.77 | 15.24 | 13.45 | 41.50 | 76.78 | 22.80 | 12.70 |

^a% of dry weight

O. C. : Organic carbon

DEC : Decomposition rate

H. S. : Humic substances

H.A. : Humic acids

To extract humic substances, the samples (30 g) were successively first treated three times with 40 ml of distilled H₂O to remove the non-humic, water-soluble substances (sugars, proteins), to avoid interference between these compounds and humic substances. The extraction of humic substances was then carried out with 40 ml of NaOH (0.1M). Extraction was repeated several times until uncoloured solutions were obtained. Centrifugation was carried out at 4000G for 15 min, and the supernatants filtered through Whatman paper. The filtered solutions of each sample were combined and precipitated by acid treatment with 1.5M H₂SO₄ for 24h at 4°C. The precipitated humic acids were separated from fulvic acid solution by filtration through Whatman paper and redissolved in 0.1M NaOH. The humic acid solution obtained was dialyzed with a Spectra-por membrane (7500 Da) to eliminate excess salts. The dosage of humic acid was made by KMnO₄ oxidation [6].

The lyophilized humic acids were analysed by various chemical techniques:

Elemental analysis was performed for C, H, N on a Fison Carlo Erba EA 1110, and for O on a Carbo Erba 1106.

The E4/E6 ratio was determined as described by Chen et al. [7]. The absorbance was measured at 465 and 665 nm after dissolving 2 mg of freeze-dried humic acids in 25 ml of NaHCO₃ (0.025 M).

Infrared (FTIR) spectra were recorded as KBr pellets (250 mg of dried KBr and 2 mg of lyophilized humic acids pressed under vacuum according to Cross [8]) with a FTIR Perkin Elmer 1600 spectrophotometer over the 4000 to 400 cm⁻¹ range, at a rate of 16 nm/s.

¹³C-NMR spectra with ¹H broadband decoupling were recorded at 75.469 MHz on a Bruker AM WB 300 MHz Spectrometer. The solution for NMR examination was prepared by dissolving 100 mg of humic acids in 3 ml of NaOD/D₂O (0.5 M). The spectrum was obtained using inverse-gated-decoupling to suppress the nuclear Overhauser enhancement in order to obtain quantitative results [23]. Acquisition time was 0.98 sec, relaxation delay was 1.8 sec, pulse of 35 degrees, total acquisition time was 72 h. Free induction decays were processed by applying 50 Hz linebroadening and baseline corrections. The integrated areas of the spectrum integrated were: 0-110 ppm (aliphatic carbon), 110-165 ppm (aromatic carbon), 165-200 ppm (carboxylic carbon).

Results and Discussion

3.1. Elemental analysis

Elemental analysis and E4/E6 ratio of humic acids extracted from the sewage sludge at different stages of composting, and the mean values for soil humic acids proposed by Schnitzer [25] are reported in table 2.

The results revealed a significant decrease of N content and an increase of the C/N ratio during composting, in parallel with a substantial increase of O content and a slight increase of O/C. However, no significant variations were observed for H and C contents. The above changes are attributed to the development of microbial activities during composting that use the readily available organic matter such as aliphatic and nitrogenous structures as energy source. Thus, the oxidative microbial degradation of the side chains of nitrogen-containing components linked or adsorbed to a polymers in the starting material lead to the increase of the relative abundance of more oxidized aromatic structures. The absence or no significant

diminution of C and H was probably due to the concentration effect related to the decrease of compost weight during decomposition.

Table 2. Elemental composition and E4/E6 ratio of the humic acids extracted from the sewage sludge compost at different stages of treatment

| Stages (months) | C ^a | H ^a | O ^a | N ^a | atomic ratio | | | E4/E6 |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|------|------|-------|
| | | | | | C/N | C/H | O/C | |
| T0 | 48.90 | 6.87 | 38.60 | 5.61 | 10.00 | 0.59 | 0.59 | 3.70 |
| T1 | 49.20 | 6.42 | 39.90 | 4.46 | 12.86 | 0.64 | 0.60 | 3.93 |
| T6 | 47.84 | 6.50 | 41.00 | 4.58 | 12.18 | 0.61 | 0.64 | 4.00 |
| T9 | 48.76 | 6.59 | 40.00 | 4.68 | 12.16 | 0.62 | 0.63 | 4.00 |
| HAS ^b | 56.20 | 4.80 | 35.50 | 3.20 | 20.50 | 1.00 | 0.50 | 5.00 |

^a % Calculated on organic matter basis

^b HAS: Humic acid of soil model (Schnitzer, 1972)

Similar results were observed by other authors reporting a decrease of N content in humic acids of mature compost compared to uncomposted sludge and straw mixture [10, 12, 13]. These authors suggested a partial loss of N-containing groups and aliphatic side chains following intense mineralization through microbial activity during composting, and formation of more polycondensed, oxidized, olefinic and aromatic humic acids.

The E4/E6 ratio exhibited a slight increase during composting that probably originating from reduction of the molecular weight of the humic acids through loss of their aliphatic compounds and/or increase of their oxygen content as suggested by Chen et al., [7].

Compared to the humic acid model of soil proposed by Schnitzer et al. [25], the humic acids of the sludge compost are characterized by higher levels of H, N, O and higher O/C ratios, but lower C content, C/N and C/H ratios. This can probably be attributed to the richness of the sludge that contain organic wastes, in peptidic compounds and also to the low degree of aromatization of this young humic material [24, 26]. On the other hand, in addition to their high oxygen content, the E4/E6 ratio of the humic acids in sewage sludge compost was below that of soil humic acids at all stages of composting. This is consistent with the suggestion of

Riffaldi et al. [24] and Piccolo et al. [22] about the occurrence of large oxidized macromolecular humic structures in sewage sludge wastes.

3.2. FTIR spectra

The FTIR spectra of the humic acids extracted at various stages of composting exhibit the same absorbances indicating that no noticeable qualitative changes occurred during processing, but these spectra differ in the relative intensity of some bands (Figure 1). The assignments of the main recorded bands reported in numerous studies [4, 13, 17, 19, 25], are: a broad band at 3300-3400 cm^{-1} corresponding to H-bonded OH groups of alcohols, phenols and organic acids, as well as H-bonded N-H groups; a peak at 2920-2930 cm^{-1} from C-H stretching of alkyl structures; a broad band at 1630-1650 cm^{-1} with a first shoulder at 1600 cm^{-1} produced mainly by aromatic C=C, C=O in amide (I), ketone and quinone groups; the second less marked shoulder at 1540-1550 cm^{-1} characterises amide (II); a less intense band between 1460-1380 cm^{-1} corresponds to several chemical groups such as CH_3 , OH of phenols, COO^- and/or ortho-disubstituted aromatic rings; a weak band at 1265-1223 cm^{-1} produced by amides or ethers; a broad band between 1120 and 980 cm^{-1} , with a sharp peak centred near 1034 cm^{-1} mainly characterizes aromatic ethers, but carbohydrates and silicates also absorb in this zone.

All spectra showed a high intensity for three bands: 3400, 1650, 1034 cm^{-1} . The first corresponds to H-bonded OH groups, OH...OH...OH and/or N-H groups, the second one arises mainly from benzoic compounds and the third one is produced mainly by ether linkages C-O-C. These characteristics confirm the presence of highly oxidized polymerised humic acid structures in the sewage sludge.

During composting process, the spectra exhibit a significant decrease of the relative absorbance of aliphatic compounds, mainly lipid chains around 2920-2930 cm^{-1} , with an increase of absorbance at 1460 and a strong increase at 1034 cm^{-1} , as well as the appearance of new small peaks around 1600, 1510 and 1125 cm^{-1} attributed mainly to aromatic ethers from lignin-like structures. This confirms the decrease during composting of aliphatic structures and the increase of more oxidized, polycondensed aromatic structures.

Similar results were obtained by Garcia et al. [12], Gerasimowisz and Byler [13]: a decrease during sludge composting of the intensity of bands corresponding to aliphatic components, amides, carboxyl, ketone groups and carbohydrates and an increase of bands assigned to aromatic structures.

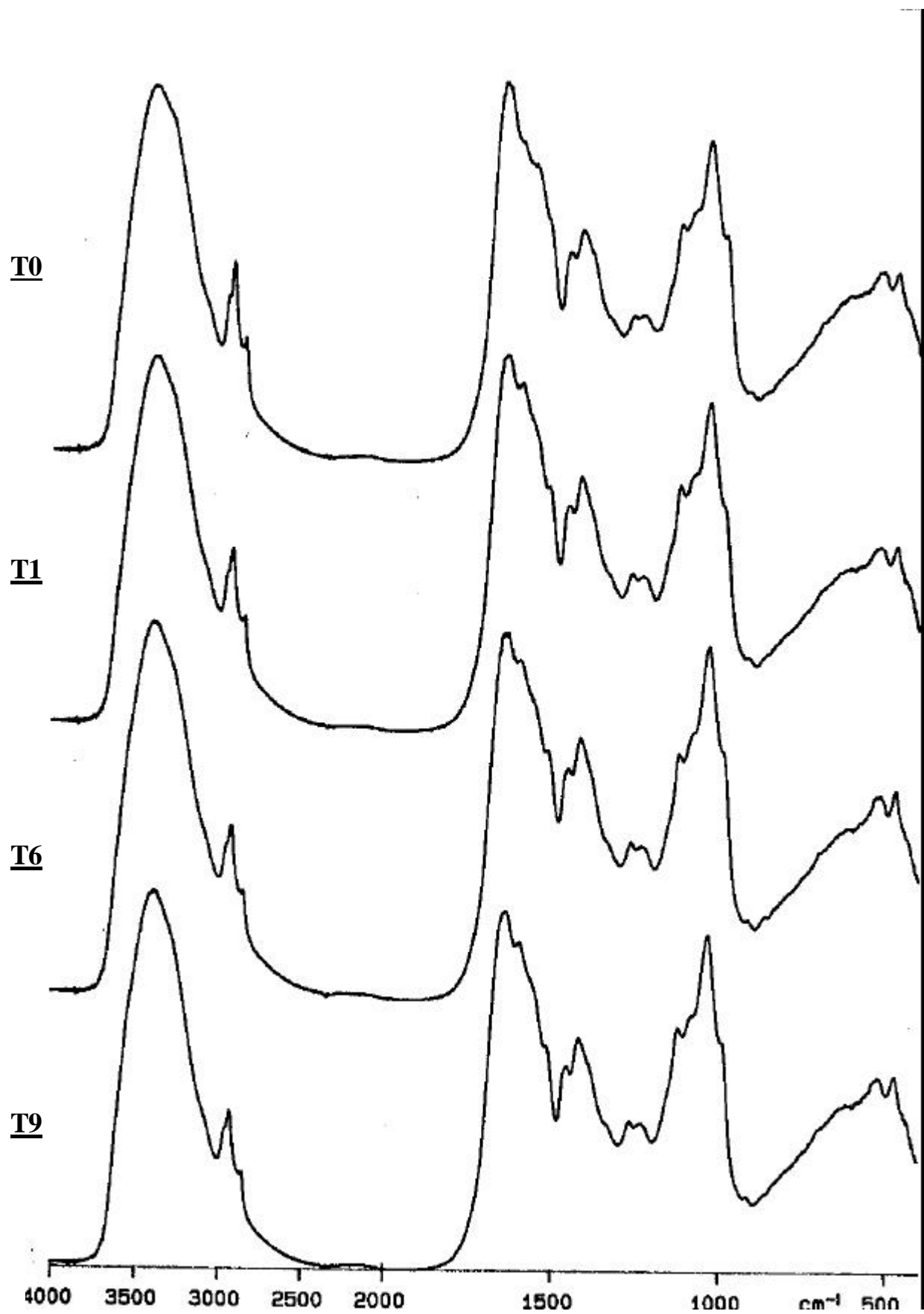


Figure 1. FTIR spectra of the humic acids extracted from the composted sewage sludge at different stages of treatment.

3.3. ¹³C-NMR Spectra

Humic acids generally exhibit similar resonance in liquid-state ¹³C-NMR spectra at different times of composting, however the intensities of the resonances change significantly during composting (figure 2). The interpretations of the spectra were based on numerous studies [1, 3, 12, 13, 14, 22]. The signals at 14.6, 16.7, 19.2, 22.9, 25.2, 29.4, 33.5, 37.3, 41.4 and 46.2 ppm are attributable to paraffinic C in alkyl chains. The main signal at 29.4 ppm is characteristic of (CH₂)_n fatty acid chains [16, 20]. The aliphatic carbons substituted by oxygen and nitrogen are usually observed in the 50 to 105 ppm region. The prominent signal around 56.5 ppm is mainly produced by methoxyl groups of aromatic ethers [22]. Amino acids generally exhibit a signal around 61.5 ppm. Carbohydrates appear at 73 ppm, frequently around 70-90 ppm and at 102, 106, 111.5 ppm which corresponds to anomeric carbons. Unsubstituted aromatic C shows signals at 118.9 and at 128 ppm. Olefinic C may also be included in this region. Carbon-substituted aromatic carbons appear around 134.6, 137.5 and 139.7 ppm. The signal at 152.7 ppm is mainly produced by phenolic carbon, aromatic ethers and/or N-substituted aromatic carbons. The high resonances at 169 and 174 ppm may arise from phenolate, carboxylic and amide groups. ¹³C-NMR spectroscopy indicates the presence of heterogeneous structures in the humic acids extracted from the sewage sludge. During composting, the aliphatic area shows a significant decrease of resonance in the 15-45 ppm interval corresponding to long aliphatic chains. Substituted aliphatic carbons usually exhibit high resonance, and are mainly attributed to methoxyl groups of aromatic ethers at around 56 ppm. Thus, the latter structures are highly resistant to microbial degradation compared to other alkyl groups. In fact, Huang et al. [18] observed the persistence of a peak at 57 ppm in *Calluna vulgaris* litter after natural degradation for 23-years. In the aromatic area, the resonance of substituted aromatic structures around 130-165 ppm shows an increase compared to unsubstituted aromatic signals around 110-130 ppm.

Comparison of integrated areas: aliphatic (0-110 ppm), aromatic (110-165 ppm) and carboxylic (165-200 ppm) regions (Table 3) shows a high proportion of aliphatic carbon compared to aromatic and carboxylic ones. The aliphatic character remains still important after composting of the sludge.

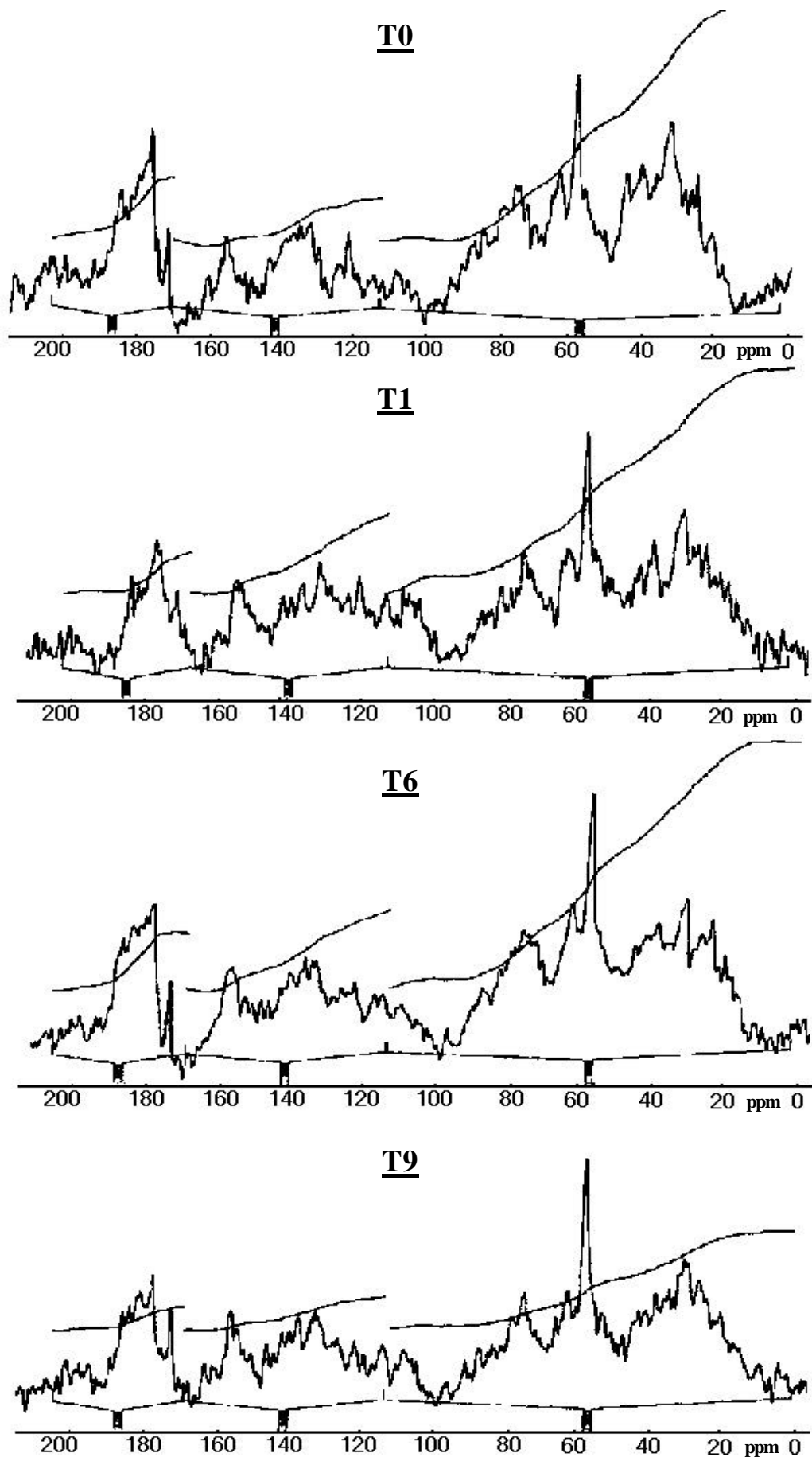


Figure 2. ^{13}C -NMR spectra of the humic acid extracted from the composted sewage sludge at different stages of treatment.

Table 3. Changes of carbon distribution in humic acids of the sewage sludge during composting

| Stages (months) | Aliphatic ^a | Aromatic ^a | Carboxylic ^a |
|-----------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| T0 | 69.61 | 12.35 | 18.03 |
| T1 | 64.43 | 24.28 | 11.29 |
| T6 | 64.64 | 20.65 | 14.70 |
| T9 | 63.31 | 21.56 | 15.13 |

^a Values are expressed as percentages of the whole spectrum area

The significant contribution, in the aliphatic area, of methoxyl groups of aromatic ethers and their persistence to microbial degradation can explain why a low decrease of aliphatic carbons took place. This may also explain the slight decrease of H and C contents –observed above by elemental analysis-, despite the significant decomposition of the aliphatic structures of lipidic or nitrogen-containing compounds. Aromatic carbon shows a high increase doubling the original amount. Carboxyl carbon shows a decrease during the stabilization phase (1 month), and then increases during the maturation phase. The decrease of resonance in the carboxyl area during the stabilization phase may originate from the intense degradation of lipids. The subsequent increase during the maturation phase is probably related to the increase of the proportion of benzoic sub-units. These findings are in agreement with those of Garcia et al. [12] and Gerasimowisz and Byler [13].

Treating together all these results show the heterogeneous composition of humic acids extracted from the sewage sludge. There is a strong contribution of long-chain lipids and recalcitrant etherified aromatic structures, beside peptidic and carbohydrate structures. In fact, the sewage sludge originate from various liquid wastes, which have undergone microbial degradation during treatment in the wastewater plant. So, they are composed mainly of residues of dead algae, fungi and bacteria resulting in peptides and lipidic chain presence, besides material recalcitrant to microbial degradation like the resistant etherified structures.

During treatment by composting, proliferating microbial populations use the readily degradable aliphatic compounds, primarily lipidic and peptidic molecules, as a source of

energy. In parallel, aromatic structures, mainly those substituted by phenolic, methoxylic and carboxylic functional groups showed an increase with treatment time. The results obtained indicate that with the duration of composting, the starting material and mainly readily degradable compounds such as aliphatic side chains linked to polymers can be oxidized, leading to the production of more highly functionalized aromatic structures that contain a greater proportion of hydroxyl, methoxyl, carboxyl and carbonyl groups. These resistant structures are so preserved to become part of the new-formed humic acids. Contents of humic acids shows during composting an increase from 9.94 to 12.70 mg per g of dry compost (Table 1). Thus, these findings are consistent with the increase in the degree of polymerisation and aromaticity during composting resulting from the humification process. The duration of treatment, the structure of the starting material and aerobic conditions have a clear influence on the humification processes occurring during composting.

4. Conclusion

Structural changes of the humic acids extracted from a mixture of sewage sludge and straw during composting were followed using various analytical techniques (elemental analysis, Fourier transform infrared spectroscopy, ^{13}C -NMR). The results obtained indicate that the starting material is an heterogeneous mixture of etherified aromatic structures bearing peripheral long-chain lipidic, peptidic and carbohydrate structures. During composting, through the development of intense microbial activity, oxidative degradation mainly of readily accessible compounds occurs such as that of aliphatic side chains of lipidic and peptidic structures. This leads to the production of highly oxidized and polycondensed aromatic macromolecules. The latter compounds, as biopolymers resistant to microbial decomposition, are preserved to become part of the new-formed humic acids. These findings show that humification occurs during composting, hence the stability and maturation of the end product.

Acknowledgements

This work was supported JER 6013 associated to the AUPELF-UREF and a Scholarship Program of Research Training from the French-Speaking University Agency.

References

- [1] Almendros G., Dorado J., González-Vila F. J., Blanco M. J., Lankes U., ¹³C NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest and shrub biomass, *Soil Biol. Biochem.*, 32 (2000) 793-804.
- [2] Amir S., Hafidi M., Valorisation de boues de stations d'épuration des eaux usées par un bioprocédé aérobie "compostage", *Ann. Chim. Sci. Mat.*, 26 (2001) S 409 – S 414.
- [3] Baldock. J. A., Oades J. M., Nelson P. N., Skene T. M., Golchin A. Clarke P., Assessing the extent of decomposition of natural organic materials using solid-state ¹³C-NMR spectroscopy, *Aust. J. Soil Res.*, 35 (1997) 1061-83.
- [4] Bellamy L.J., *The infrared spectra of complex molecules*, Chapman and Hall, 3rd ed., vol. 1, London, 1975.
- [5] Bracewell, J. M. Robertson, G.W., Characteristics of soil organic matter in temperate soil by curie-point pyrolysis-mass spectrometry, III. Transformations occurring in surface organic horizons, *Geoderma* 40 (1987) 333-344.
- [6] Chaminade R., Les formes du phosphore dans le sol: nature et rôle des complexes phospho-humiques, *Ann. Agron.*, 1 (1944) 1-63.
- [7] Chen Y., Senesi N., Schnitzer M., Information provided on humic substances by E4/E6 ratios, *J. Soil Sci. Soc. Am.*, 41 (1977) 352-358.
- [8] Cross A.D., *Introduction to practical infra-red spectroscopy*, Butterworths ed, London 1964.
- [9] Deiana S., Gessa C., Mununza B., Ruasa R., Seeber R., Analytical and spectroscopic characterization of humic acids extracted from sewage sludge, manure and worm compost, *Soil Sci.*, 150 (1990) 419-424.
- [10] Diaz-Burgos M.A., Polo A., Calcinai M., Masciandaro G. and Ceccanti B., Use of pyrolysis-gas chromatography to evaluate sludge humification., In Senesi N., Miano T.M., (Eds.), *Humic substances in the Global Environment and Implications on Human Health*, Amsterdam, Elsevier, 1994, pp. 1285-128.
- [11] Dumontet S., Diné H., Baloda S.B., Pathogen reduction in sewage sludge by composting and other biological treatments: A Review, *Biological Agriculture and Horticulture*, 16 (1999) 409-430.
- [12] Garcia C., Hernandez T. and Costa F., Characterization of humic acids from uncomposted and composted sewage sludge by degradative and non-degradative techniques, *Bioresource Technol.*, 41 (1992) 53-57.

- [13] Gerasimowicz W.V., Byler D.M., Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic studies of humic acids, *Soil Sci.*, 139 (1985) 270-278.
- [14] Gonzalez-Vila F.J., Ludemann H.D., Martin F., ¹³C-NMR structural features of soil humic acids and their methylated, hydrolyzed and extracted derivatives, *Geoderma*, 31 (1983) 3-15.
- [15] Haider K., Martin J.P., Synthesis and transformations of phenolic compounds by *Epicoccum nigrum* in relation to HA formation, *Soil Sci. Am. Prod.*, 31 (1967) 766-772.
- [16] Hatcher, P.G., Schnitzer, M., Dennis, L.W., Maciel, G.E., Aromaticity of humic substances in soils. *Soil, Sci. Soc. Am. J.*, 45 (1981) 1089-1094.
- [17] Hernandez M. T., Moreno J. I., Costa F., Gonzalez-vila F. J., Frund R. Structural features of humic acid-like substances from sewage sludge. *Soil. Sci.* 149 (1990) 63-68.
- [18] Huang Y., Stankiewicz B. A., Eglinton G., Snape C.E. Evans B., Latter P.M., Ineson P., Monitoring biomacromolecular degradation of *Calluna vulgaris* in a 23 year field experiment using solid state ¹³C-NMR and pyrolysis GC/MS., *Soil Biol. Biochem.*, 30 (1998) 1517-1528.
- [19] Inbar Y., Chen Y., Hadar Y., Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting of solid wastes from wineries, *J. Soil Sci.*, 152 (1991) 272-281.
- [20] Lindeman L.P., Adams J. Q., Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry: Chemical shifts for the paraffins through C₉, *Anal. Chem.*, 43 (1971) 1245-1251.
- [21] Ouattmane A., Dorazio V., Hafidi M., Revel J.C., Senesi N., Elemental and spectroscopic characterization of humic acids fractionated by gel permeation chromatography, *Agronomie* 20 (2000) 491-504.
- [22] Piccolo A., Campanella L., Petronio L., Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of soil humic substances extracted by different mechanisms, *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, 54 (1990) 750-756.
- [23] Preston C.M., Rauthan, B.S., Rodger C., Ripmeester J. A., A hydrogen-1, carbon-13 and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance study of p-benzoquinone polymers incorporating amino nitrogen compounds ("synthetic humic acids"). *Soil Sci.*, 134 (1982) 277 –292.
- [24] Riffaldi R., Levi-Minzi R., Saviozzi A., Humic fractions of organic wastes, *Agric. Ecosyst. Environ.*, 10 (1983) 353-359.
- [25] Schnitzer M., Chemical, spectroscopic and thermal methods for the classification and characterization of humic substances. In: *Humic Substances: their structure and function in biosphere*. Nieuwersliuis. Pudoc., (1972) 293-310.

- [26] Senesi N., Miano T.M., Brunetti G., Humic substances in organic amendments and effects on native soil humic substances, in: A. Piccolo (Eds.), Humic substances in terrestrial ecosystems, (1996) 531-593.
- [27] Stevenson F.J., Humus chemistry : Genesis, composition, reactions, NewYork, John Wiley-Interscience, 1982.
- [28] Tomati U., Madejon E., Galli E., Evaluation of humic acid molecular weight as an index of compost stability, Compost Science & Utilization, 8 (2000) 108-115.
- [29] Zech W., Johansson M.B., Haumaier L., Malcolm R.L., CPMAS ¹³C-NMR and IR spectra of spruce and pine litter and of the klason lignin fraction at different stages of decomposition, Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde.150 (1987) 262-265.

Chapitre 3 :

Structural changes in lipid-free humic acids during composting of sewage sludge

Soumia AMIR^a, Mohamed HAFIDI^{a*}, Georges MERLINA^b,

Jean-Claude REVEL^b

^a Unité Sol et Environnement (Lab. Ecol. Végét.), Faculté des Sciences Semlalia, Dépt. de
Biologie. BP/2390, Marrakech, Morocco.

^b Equipe Agronomie Environnement Ecotoxicologie, Ecole Nationale Supérieure
Agronomique de Toulouse, Auzeville-Tolosane, 31326, Castanet, Tolosan, France

*Corresponding author / e-mail: hafidi@ucam.ac.ma

Présentation :

Nombreuses études ont attribué la maturité du compost à sa teneur en substances humiques et leur structures. Cependant, les chercheurs sont encore en controverse pour attribuer la stabilité et maturité d'un compost à une prédominance dans les structures humiques d'unités aromatiques ou composés aliphatiques stables. L'origine de ces contradictions trouvées peut être liée à plusieurs facteurs comme la source et le degré d'évolution de la matière humique, la technique d'extraction, les méthodes de purification, les analyses chimiques utilisés et d'autres (Gonzalez-vila et al. 1983).

La délipidation est considérée une étape importante dans les protocoles d'extraction de substances humiques. Dans les boues résiduaire, les acides gras et dicarboxyliques ont été démontrés très prédominants (Hernandez et al. 1990). Piccolo et al. (1990) and Preston and Schnitzer (1984) suggèrent que les acides gras forment dans les substances humiques des esters phénoliques ou sont partiellement adsorbés par des forces non-covalente type H ou van der Waals. Ainsi, la purification permet d'isoler des structures plus homogènes et mène à obtenir par la suite des informations représentatives sur les changements de la dite « vraie » structure macromoléculaire humique en employant différentes techniques chimiques et spectroscopiques.

Dans ce chapitre on va aborder une comparaison entre les structures d'acides humiques non-délipidés et délipidés à différents stades de compostage à l'aide de différentes méthodes chimiques : Analyse Élémentaire, Infra-rouge FTIR, Spectroscopie ^{13}C -RMN.

La composition élémentaire et le rapport E4/E6 des acides humiques non-purifié AH et ceux extraits après élimination des lipides à différents stades de compostage sont illustrés dans le tableau (1). Les acides humiques extraits du mélange des boues initiales après élimination des lipides (LFHAs 0) en comparaison aux acides humiques extraits sans purification préalable (HA0) montrent des teneurs en C, N et un rapport C/H élevés, mais des teneurs en O, et un rapport C/N plus bas. Ces différences pourraient être attribuées à une richesse des (LFHAs 0) en structures aromatiques et en composés contenant l'azote, en raison d'une augmentation de leur intensité après élimination des lipides, principalement de longues chaînes d'acides gras.

Au cours du compostage, les acides humiques soit délipidés et non délipidés montrent des changements très significatifs de l'azote qui diminue et de l'oxygène qui augmente. Le rapport C/N montre une augmentation très significative. Ces changements au cours du compostage sont expliqués par une utilisation microbienne sélective de structures peptidiques, ainsi qu'une oxydation de structures aliphatiques périphériques. Les diminutions non

significatives de teneur en C et H peuvent être liées à un effet de concentration due à une diminution du poids du compost par décomposition du substrat organique.

Les teneurs en acides humiques délipidés montre une grande augmentation au cours du compostage comparé aux acides humiques non délipidés. Ce qui peut être attribué soit à une richesse des AH purifiés en structures aromatiques polycondensées ou soit les valeurs sont sous-estimées dans le cas des AH non purifiés puisqu'en tient compte de la diminution des acides gras au cours du compostage.

Les spectres FTIR des acides humiques délipidés et non-délipidés extraits à différents stades de compostage montrent les mêmes zones d'absorbances indiquant sur une conservation de structures chimiques de base même après délipidation et au cours de traitement par compostage (figure 1, tableau 2). Cependant, des variations d'intensité d'absorbance peuvent être remarquer dans certains zones. Les principales changements notés suite à une délipidation antérieure sont une élimination des structures qui absorbent environ 3400, 2920, 1600, 1450-1400 and 1100 cm^{-1} correspondant aux structures aliphatiques tel de longues chaînes d'acides gras et carbohydrates avec une extrémité carboxylique. D'autres structures montrent une grande absorbance environ 1652, 1540 et 1230 cm^{-1} , attribué aux structures contenant l'azote et aux structures aromatiques étherifiées dont l'intensité augmente suite à une élimination d'acides gras des structures humiques.

Au cours du compostage se produit dans les deux cas d'acides humiques (HA0) et (LFHAs 0), une diminution des structures qui absorbent vers 2920-2930 et 1540 cm^{-1} confirmant une utilisation microbienne des structures aliphatiques et peptidiques. Alors qu' une augmentation de structures aromatiques étherifiées est démontrée par une augmentation de l'intensité d'absorbance environ 3400, 1600, 1510, 1460, 1230, 1034, et 1125 cm^{-1} .

Les spectres ^{13}C -NMR des acides humiques délipidés ou non-délipidés sont illustrés (figure 2, tableau 3). Les spectres des acides humiques délipidés montrent une bonne résonance avec une grande intensité de structures aromatiques. L'intégration des spectres a montré que la délipidation mène à une diminution du carbone aliphatique et une augmentation de l'intensité du carbone aromatique (tableau 4). A peu près 45 % des structures aliphatiques sont éliminées, qui pourrait correspondre à des acides gras libres. Ainsi, une bonne résonance des spectres après délipidation pourrait être liée au fait que suite à une élimination des lipides les substances humiques ont réduit leur tendance à former des agrégats dans la solution, et par la suite réduction de leur complexité stéréochimique.

Les spectres à différents stades de compostage présentent des signaux de résonances à des zones similaires, mais dont les intensités diffèrent au cours du processus.

Le carbone aliphatique a montré une diminution surtout dans la zone 15-45 ppm correspondants au carbone paraffinique $-CH_2$ dans les chaînes aliphatiques longues. Le carbone paraffinique est démontré le plus facilement assimilable par les populations microbiennes comme source d'énergie. Dans la zone 45-110 ppm, le carbone du groupement methoxyle des éthers aromatiques montre toujours un grand signal de résonance au cours du compostage lié à une grande résistance de ce type de carbone à la dégradation microbienne. En parallèle, le carbone aromatique montre une augmentation d'intensité liée en même temps au processus d'humification, ainsi qu'à un effet de concentration suite à une décomposition du carbone aliphatique. Alors que le carbone carboxylique montre une diminution dans la phase de stabilisation et augmente dans la phase de maturation. La première diminution peut être expliquée par une décomposition des acides aliphatiques ou amides. L'augmentation en phase de maturation est liée à une grande formation des unités d'acides benzoïques lors de l'humification. L'ensemble des variations enregistrées au cours du compostage sont importantes dans le cas des acides humiques délipidés. Ainsi, la présence des lipides ou acides gras pourrait introduire des sous-estimations.

Abstract :

Structural changes in humic acids (HAs) extracted after lipid removal from sewage sludge during composting were investigated using various chemical methods (elemental analysis, Fourier transform infrared spectroscopy and ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy). Compared to non-purified HAs, lipid-free HAs (LFHAs) exhibit higher C and N contents and high absorbance around 1652, 1540 and 1230 cm^{-1} , which indicates the intensity of the etherified aromatic structures and nitrogen-containing components. Less absorbance around 2920, 1600, 1414 and 1100 cm^{-1} could be assigned to their low level of aliphatic compounds, mainly those with a carboxyl group. According to ^{13}C -NMR spectroscopy, almost 45 % of aliphatic structures are removed by lipid extraction and these correspond mainly to long-chain fatty acids. During composting, significant decomposition of non-substituted alkyl structures.

Key words: lipid-free humic acids, sewage sludge, composting, etherified aromatic structures.

Résumé :

Les changements structuraux des acides humiques extraits des boues résiduaires après élimination des lipides ont été suivis lors du compostage en employant différentes méthodes d'analyse chimique (analyse élémentaire, spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier et Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13). Comparé aux acides humiques non-purifiés HAs, les acides humiques extraits de compost délipidé montrent un taux de carbone C et d'azote N élevé et une grande absorbance pour les longueurs d'onde de 1652, 1540 et 1230 cm^{-1} , indiquant une forte présence de structures aromatiques étherifiées et de composants contenant de l'azote, tandis qu'une absorbance moins marquée autour de 2920, 1600, 1414 et 1100 cm^{-1} pourrait être liée à une présence plus faible en composés aliphatiques, principalement ceux ayant des extrémité carboxyles. Selon l'analyse spectroscopique ^{13}C -NMR, près de 45 % des structures aliphatiques sont éliminées lors de la délipidation en relation avec l'élimination des acides gras libres. Au cours du processus de compostage, les principales transformations enregistrées sont une décomposition des structures alkyles non-substituées, une décomposition des composés azotés et en parallèle une augmentation des structures aromatiques étherifiées.

Mots clefs : acides humiques, boues résiduaires, compostage, structures aromatiques étherifiées.

1. Introduction

Composting is a useful method of producing a stabilized product from sludge waste that can be used as a source of nutrients and soil conditioner in the field. Compost has the advantage of improving soil structure and fertility by increasing the proportion of stable humic substances in the soil (Hsu and Lo, 1999). However, sometimes harmful effects can arise after application of unmatured composts with incomplete stabilisation or biotransformation of the organic fraction into stable humic substances (Mathur et al., 1993; Déportes et al., 1995). The content and structure of the humic substances in compost have been investigated in numerous studies as the main indices for assessing compost maturity (Garcia et al., 1992; Ouatmane et al., 2000; Tomati et al., 2000). However, the structure of humic material is still controversial. Some studies suggest the predominance of aromatic units in humic substances, whereas others

have shown that many humic extracts contain largely aliphatic structures. Many factors such as the origin of humic material, the extraction technique and the purification methods are responsible for discrepancies found (Gonzalez-Vila et al., 1983). Some studies are based on the hypothesis reported by Schnitzer and Khan (1972) and Schnitzer et al. (2000) that humic acids could be assumed to be highly cross-linked aromatic polymers of high molecular weight with covalent carbon-carbon, ether and ester-linkages connecting the substituted aromatic moieties. Others support humic substances as groups of similar particles which are associated by weak covalent and non-covalent bonds to "homogeneous" aggregates, which in unfractionated humic substances form large mixed aggregates (Wershaw et al., 1977; Piccolo, 1997). In sludge humic structures, dicarboxylic and fatty acids were reported to be the most abundant compounds (Hernandez et al., 1990). Fatty acids or free lipids are not considered to be true constituents of humic structures by some authors, e.g. Réveillé et al. (2003). Lipids have been shown to be present as an admixture, or held by non covalent bonds to humic macromolecules. Piccolo et al. (1990) and Preston and Schnitzer (1984) suggested that fatty acids occur in humic substances partly as phenolic esters and partly adsorbed by weaker forces such as H-bonding and van der Waals forces. They also disturb chemical and spectroscopic analysis of humic substances. The ^{13}C -NMR spectra of humic substances are usually reported to exhibit a good signal/noise ratio, but to be poorly resolved because of their heterogeneous nature and their tendency to aggregate or to form micelle-like structures. Other causes for poor resolution, such as the presence of paramagnetic, organic-free radicals or metal ions, were not found to have excessive influence on line broadening in humic substances spectra (Preston and Schnitzer, 1987). Therefore, purification is needed to eliminate the weakly bound long alkyl chains from the raw humic material. It removes the extractable monomers or fragments that interfere with the analysis of the main macromolecular structure of humic substances. Purification permits the isolation of the more homogenous structures and leads better representative information about the true changes of humic macromolecular structure when using various chemical and spectroscopic techniques (elemental analysis, Fourier transform infrared analysis [FTIR] and ^{13}C -NMR spectroscopy). Gonzalez-Vila et al., (1999) suggest that a systematic study of organic material of compost should include the characterisation of both the colloidal organic fraction (which conforms to the operationally defined compost humic substances) and the "extractives" (lipids and water-soluble products). Therefore, this study was carried out in order to compare the humic acids (HAs) extracted from uncomposted sludge after lipid removal, lipid-free humic acids (LFHAs 0), or without lipid removal (HAs 0). The structural changes in LFHAs were also investigated

during the course of composting. Elemental analysis, FTIR and ^{13}C -NMR) were used for analysis, because information gained from each analytical technique is important and because individual techniques complement each other. When used together, they provide an unbiased analysis as against the selectivity that each individual technique may impart (Chefetz et al., 2002; Hafidi et al., 2004).

2. Materials and Methods

2.1. Composting

Sewage sludge from an anaerobic lagoon in an experimental wastewater treatment plant in Marrakech city (Morocco) was mixed (90:10) with straw and composted in a heap for 6 months on a purpose-built platform. To provide aerobic conditions the mixture was turned every 15 days. The progress of composting was followed by monitoring the temperature. This peaked at 52°C after 7 days of the stabilization phase and then decreased to 32°C during the maturation phase (Amir and Hafidi, 2001). Sampling was carried out at different stages during composting. These were at the initial mixing stage, after 1 month and after six months.

2.2. Purification pre-treatments

Free lipids were removed before extraction of humic substances using a 2:1 chloroform-methanol mixture (Lichtfouse et al., 1998). Lipid extraction was carried out three times at 4°C using 15 g fresh samples with 120 ml solvent mixture.

These pre-treated samples were then subjected to evaporation to remove remaining solvent, and they were then washed three times with water to remove other non-humic water-soluble molecules, such as sugars and proteins, which might interfere with the analysis of the humic substances.

2.3. Humic acid extraction

Extraction of humic substances from the purified samples in 0.1M NaOH was repeated several times until colourless solutions were obtained. After centrifugation and filtration, the solutions were pooled and precipitated by acid treatment with 3M H_2SO_4 at 4°C for 24 h. The precipitated HAs were separated from the fulvic acid solution by filtration and then re-dissolved in 0.1M NaOH. The humic acid solutions obtained were freeze-dried after dialysis using a Spectra-por membrane (1000 Da) to eliminate excess salts. The humic acid content was calculated after freeze-drying a known volume.

2.4. Humic acid analysis

The chemical structure of the humic acids was investigated by various techniques:

Elemental analysis was performed for C, H, O and N on a Carlo Erba EA 1112 analyser. E4/E6, the ratio of the absorbance of 2 mg freeze-dried HAs in 25 ml 0.025 M NaHCO₃, was measured at 465 and 665 nm using a U.V. Unicam SP 1800 spectrophotometer. FTIR spectra were recorded from KBr pellets (250 mg dried KBr and 2 mg freeze-dried HAs pressed under vacuum) with a FTIR Perkin Elmer 1600 spectrophotometer over the 4000 to 400 cm⁻¹ range, at a rate of 16 nm sec⁻¹. ¹³C-NMR spectra with ¹H broadband decoupling were recorded at 75.469 MHz on a Bruker AM WB 300 MHz spectrometer. The solution was prepared by dissolving 100 mg HAs in 3 ml 0.5 M NaOD (NaOH/D₂O). The spectra were obtained using inverse-gated-decoupling to suppress nuclear Overhauser enhancement and provide quantitative results (Preston and Schnitzer, 1984). Acquisition time was 0.98 sec, relaxation delay 1.8 sec, pulse of 35°, total acquisition time 72 h. Free induction decays were processed by applying 50 Hz line broadening and baseline corrections (Wilson et al., 1983). Chemical carbon distribution was estimated from the ratio of integrated areas of the spectrum to the whole spectrum area: 0-55 ppm (alkyl carbon), 55-110 ppm (alkyl carbon substituted by oxygen or nitrogen), 110-165 ppm (aromatic carbon), and 165-200 ppm (carboxylic and amide carbon).

3. Results and discussion

3.1. Elemental analysis

The elemental composition of unpurified HAs and LFHAs extracted at different stages of composting are illustrated in table 1. HAs extracted from initial sludge after lipid removal, LFHAs 0, when compared with HAs extracted without lipid pre-purification (HAs 0), show relatively higher C and N contents and C:H ratios, but lower contents of O and H, and C:N and O:C ratios. This could be attributed to their high content of aromatic structures and nitrogen-containing components, owing to an increase of their intensity following the removal of lipids, mainly long-chain fatty acids. Piccolo et al. (1990) found that the percentage of N increased in the humic structures isolated after purification. The low content of O is attributed to loss of carboxyl groups of fatty acids. During composting, a decrease in C, H and especially N occurred with an increase of O, and of C:H, C:N and O:C ratios. This could be explained by the oxidative microbial degradation of N-containing components in the starting material, which results in an increase of more oxidized aromatic structures (Amir et al., 2004). Studies have also suggested a partial loss of N-containing structures and aliphatic side chains during composting, and formation of more oxidized aromatic humic acids (Garcia et al., 1992;

Diaz-Burgos et al., 1994). In the raw material, the level of LFHAs 0 is less than the level of HAs 0 expressed as dry weight of raw sludge (Table 1). The calculated difference between contents of HAs 0 and LFHAs 0 implies that about 13.8% could represent the long-chain fatty acid removed by purification and which have been accounted for in the level of HAs 0. During composting, the level of LFHAs increased markedly compared with the level of unpurified HAs (Table 1). This difference could be attributed partly to an underestimation of unpurified HAs resulting from a decrease in the amount of free fatty acid isolated with them. . Indeed, in the course of composting, microbial populations could use fatty acids readily as a source of energy. The high intensity of the condensed aromatic carbon in LFHAs could also explain this difference. The E4/E6 ratio of LFHAs is below those of HAs without lipid removal, which may be explained by the fact that the compounds remaining in LFHAs , after lipid removal, are mainly condensed aromatic structures. The slight increase in the E4/E6 ratio during composting could originate from reduction in the molecular weight of the HAs through loss of their aliphatic compounds and/or from the increase of their oxygen content (Amir et al., 2003).

Table 1. Elemental composition and E4/E6 ratio of the unpurified humic acids HAs and of lipid-free humic acids LFHAs extracted from composted sewage sludge at different stages of treatment.

| Samples | C ^a | H ^a | N ^a | O ^a | Atomic ratio | | | E4/E6 | HA amount (mg g ⁻¹) ^b |
|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|-------|------|-------|--|
| | | | | | C/H | C/N | O/C | | |
| LFHAs 0 | 51.14 | 6.45 | 6.10 | 36.31 | 0.66 | 8.39 | 0.53 | 1.62 | 8.57 |
| LFHAs 1 | 49.86 | 5.87 | 4.46 | 39.81 | 0.71 | 11.17 | 0.60 | 1.79 | 15.00 |
| LFHAs 6 | 50.08 | 5.90 | 4.77 | 39.26 | 0.71 | 10.50 | 0.59 | 1.94 | 17.57 |
| HAs 0 * | 48.90 | 6.87 | 5.61 | 38.60 | 0.59 | 10.00 | 0.59 | 3.70 | 9.94 |
| HAs 1 * | 49.20 | 6.42 | 4.46 | 39.90 | 0.64 | 12.86 | 0.60 | 3.93 | 8.80 |
| HAs 6 * | 47.84 | 6.50 | 4.58 | 41.00 | 0.61 | 12.18 | 0.64 | 4.00 | 11.60 |

^a % calculated on organic matter basis; ^b dry weight basis

* Amir et al. (2004)

3.2. FTIR spectra

The FTIR spectra of HAs 0 and LFHAs from sludge at different stages of composting (Fig. 1) exhibited similar peak locations, but the relative intensity of the absorbances changed with lipid removal and between LFHAs isolated at different stages of composting. The assignments of the main bands, based on numerous studies (Gerasimowicz et al., 1985; Hernandez et al., 1990; Ricca and Severini, 1993; Gonzalez-Vila et al., 1999; Amir et al., 2004; Hafidi et al., 2004) are given in Table 2.

Compared to unpurified HAs 0, LFHAs 0 showed a high incidence of structures absorbing around 1652, 1540 and 1230 cm^{-1} , assigned to etherified aromatic structures and N-containing compounds. However, these LFHAs are less rich in compounds absorbing around 3400, 2920, 1600, 1450-1400 and 1100 cm^{-1} corresponding to aliphatic structures such as long-chain fatty acids and carbohydrates with a carboxylic extremity.

During composting, there was a decrease in absorbance around 2930 cm^{-1} , and 1540 cm^{-1} related to microbial oxidation of aliphatic and peptidic compounds, whilst the increase of absorbance around 3400, 1600, 1400 and 1230 cm^{-1} is attributed to the increased relative intensity of phenolic and etherified aromatic structures.

Table 2. The main absorbance bands in FTIR spectra and their assignments

| Bands and peaks (cm^{-1}) | Assignments |
|--|---|
| 3300-3400 cm^{-1} | H-bonded OH groups of alcohols, phenols and organic acids, as well as H-bonded N-H groups |
| 2920-2930 cm^{-1} | C-H stretching of alkyl structures |
| 1630-1650 cm^{-1} | aromatic and olefinic C=C, C=O in amide (I), ketone and quinone groups |
| 1600 cm^{-1} | aromatic C=C, COO^- , C=O |
| 1540-1550 cm^{-1} | amide (II) |
| 1400 cm^{-1} | OH of phenols, COO^- , $-\text{CH}_3$ |
| 1260-1200 cm^{-1} | amide III or aromatic ethers C-O-C |
| 1170-1030 cm^{-1} | -C-O-C of carbohydrates, aromatic ethers, Si-O-C groups |

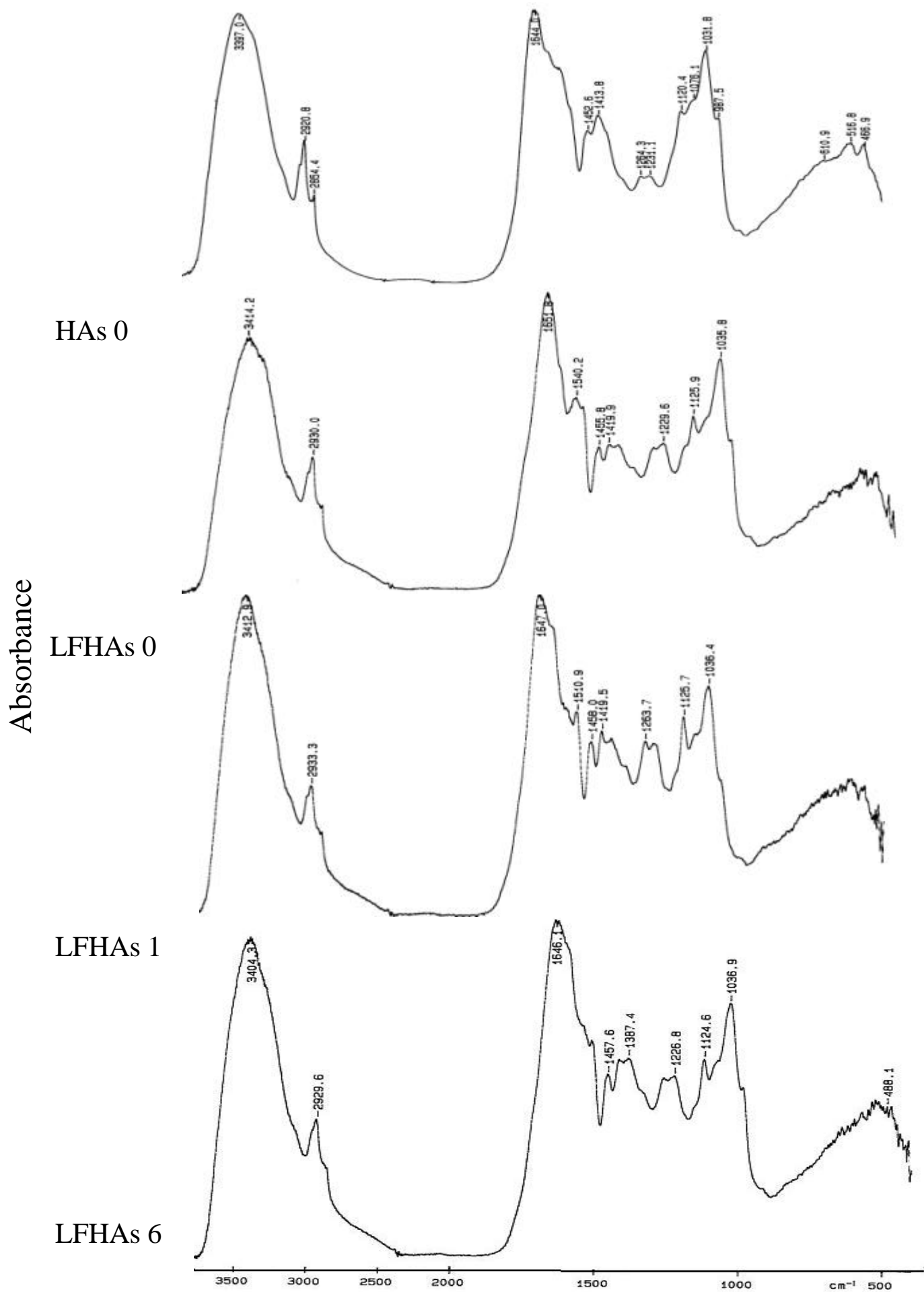


Figure 1. FTIR spectra of the unpurified humic acids extracted from the raw sludge (HAs 0) and of lipid-free humic acids extracted from composted sludge at different stages of treatment LFHAs (0; 1; 6 months).

3.3. ¹³C-NMR Spectra

The ¹³C-NMR spectra of HAs 0 and of LFHAs at different steps of composting were interpreted (Fig. 2; Table 3) on the basis of spectra, in the studies of Preston and Schnitzer (1984), Inbar et al. (1991), Ricca and Severini (1993), Gonzalez-Vila et al. (1999), Amir et al. (2004) and Hafidi et al. (2004). Carbon distribution among various chemical groups was obtained by integration of the spectrum into four areas (Table 4).

Table 3. Resonance signals in ¹³C-NMR spectra and attributed chemical groups.

| Signal (ppm) | Attributed chemical groups |
|--------------|---|
| 0-50 | paraffinic C in alkyl chains |
| 50-110 | aliphatic carbons substituted by oxygen and nitrogen, mainly around 56 ppm methoxyl groups of aromatic ethers |
| 110-130 | unsubstituted aromatic C |
| 130-145 | Carbon-substituted aromatic carbons |
| 145-160 | Oxygen or nitrogen substituted aromatic carbons |
| 160-200 | Carboxylic carbons, ester or amide |

Table 4. Changes of carbon distribution in the unpurified humic acids and of lipid-free humic acids extracted from composted sludge at different stages of treatment.

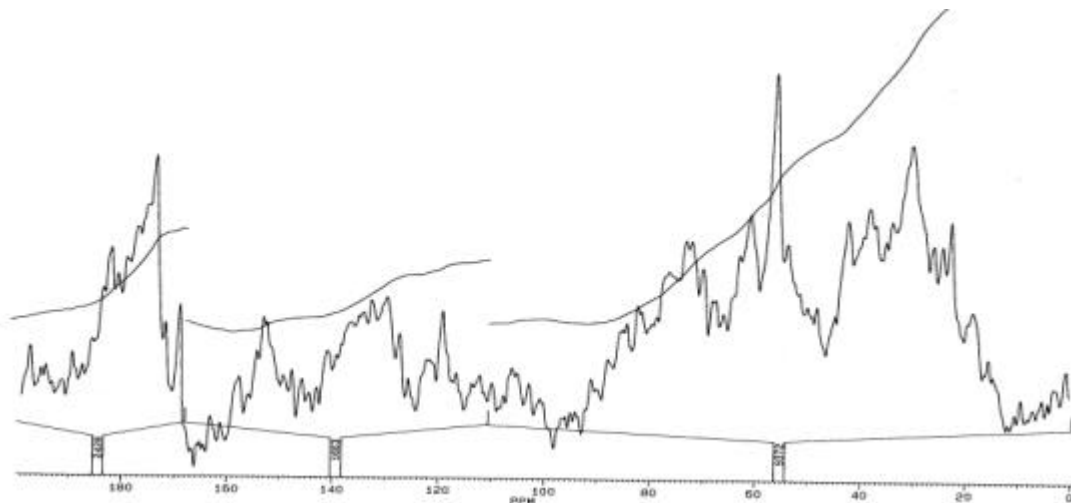
| Samples | C-alkyl ^a | O, N-alkyl ^a | C-aliphatic ^{a c} | C-aromatic ^a | C-carboxylic, C-amide ^a |
|---------|----------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| LFHAs 0 | 17.61 | 20.50 | 38.11 | 40.46 | 21.42 |
| LFHAs 1 | 4.74 | 19.88 | 24.62 | 56.00 | 19.38 |
| LFHAs 6 | 4.86 | 22.11 | 26.97 | 52.31 | 20.72 |
| HAs 0 * | / | / | 69.61 | 12.35 | 18.03 |
| HAs 1 * | / | / | 64.43 | 24.28 | 11.29 |
| HAs 6 * | / | / | 64.64 | 20.65 | 14.70 |

^a Values are expressed as percentages of the whole spectrum area

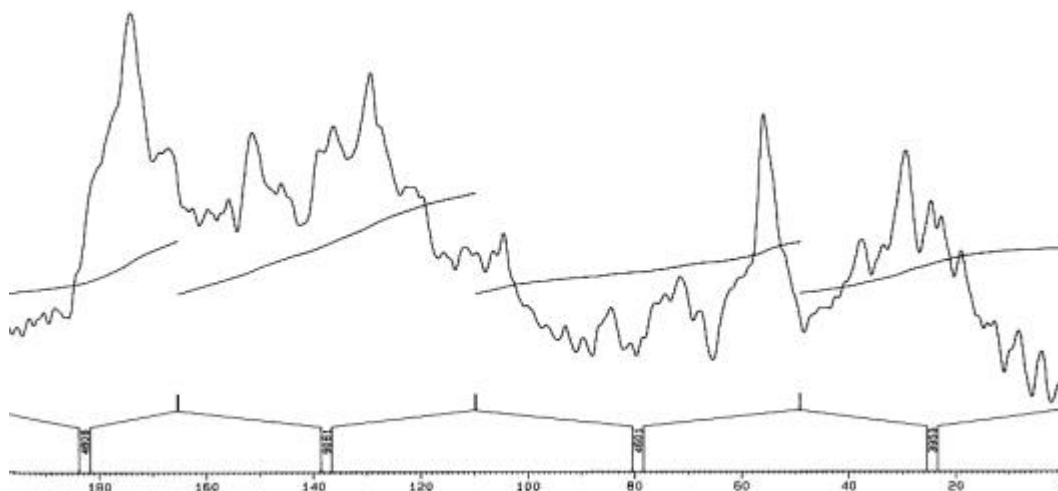
^b C-aliphatic = C-alkyl+ O- or N-alkyl

*Amir et al. (2004)

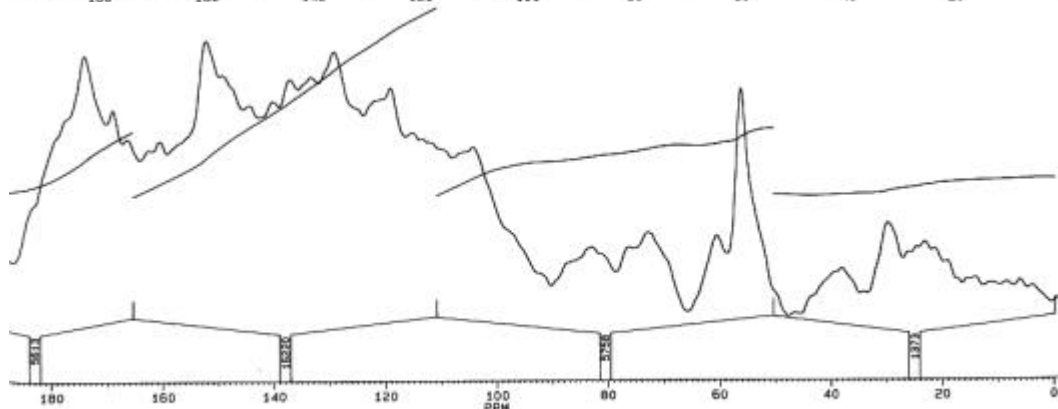
HAs 0



LFHAs 0



LFHAs 1



LFHAs 6

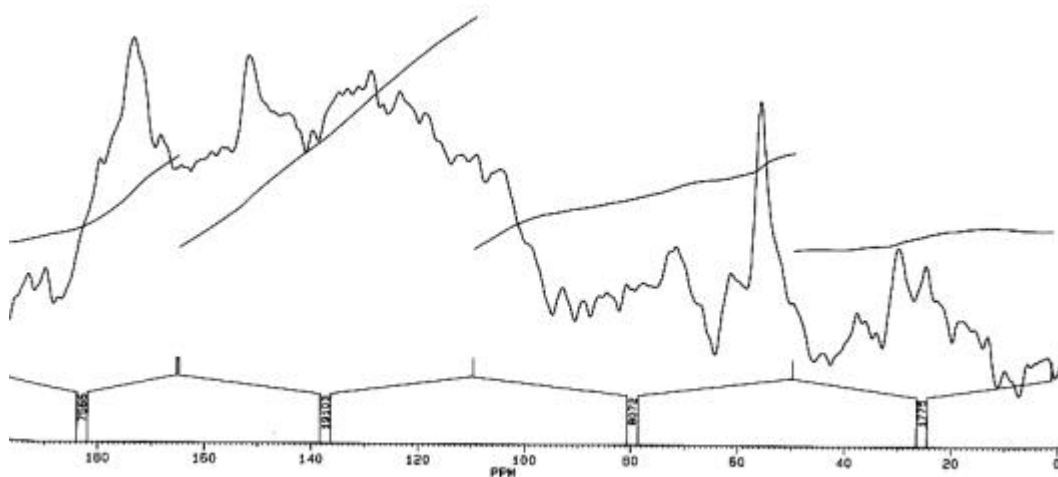


Figure 2. ^{13}C -NMR spectra of the unpurified humic acids extracted from the raw sewage sludge (HAs 0) and of lipid-free humic acids extracted from composted sludge at different stages of treatment LFHAs (0; 1; 6 months).

The spectra of LFHAs (Fig. 2) were better resolved and revealed a high intensity of aromatic structures. The lipid removal may reduce the tendency of humic molecules to form aggregates in solution, and diminish the complex stereochemistry of the high-molecular-weight humic material without purification. Aliphatic C decreased, while the aromaticity of extracts was generally enhanced by purification. Values for the carboxylic and amide C increased with lipid removal (Table 4). The purified LFHAs 0 had fewer aliphatic carbons, an average of 38.1% than unpurified HAs 0, which had 69.6%. In contrast, aromatic carbons in LFHAs 0 showed higher values, an average of 40.5% compared to 12.4% in HAs 0. Réveillé et al. (2003) reported that the aliphatic character of the HAs of sludge is attributable to the presence of lipids presumably trapped in the humic structure.

Therefore, almost 45% of the aliphatic structures in humic acids without previous lipid removal were composed of free lipids, mainly long-chain fatty acids. This level increased to 62% during the stabilisation phase and decreased slightly to 58% in the last stage of composting. This increase in lipid release could be the result of the depolymerisation of organic macromolecules through microbial decomposition and changes in the physico-chemical properties of the sludge heap during composting.

The LFHAs showed during composting a significant decrease in C-alkyl or non-substituted aliphatic carbon with a marked increase of aromatic carbons (Table 4). The increase of aromaticity could have resulted from microbial synthesis, or as a result of a concentration effect brought about by the reduction of other classes of compounds. In the substituted alkyl area, although a decrease of signal of around 60 ppm occurred and is attributed to decomposition of amidic compounds, the methoxyl of etherified aromatic compounds around 56 ppm always showed a high intensity and appeared to be resistant to microbial decomposition (Amir et al., 2003; Amir et al., 2004). Carboxyl carbon shows a slight decrease during the stabilization phase (1 month), and then increases during the maturation phase. The decrease of resonance in the carboxyl area during the stabilization phase may originate from decomposition of aliphatic acids or amides. The subsequent increase during the maturation phase is probably related to the increase in the proportion of benzoic sub-units (Gerasimowisz and Byler, 1985; Garcia et al., 1992).

In the case of unpurified HAs, the signal in the carboxyl region of the spectrum shows important variations, which attributed to the loss of free lipid content during composting from 2.14 to 0.83 % (expressed in dry weight). The variation in other aromatic and aliphatic areas is markedly less intense compared to the purified humic acid structures (LFHAs) in the course of composting. Therefore, it may be concluded that with purification more representative

information about the change of structural humic macromolecules during composting has been obtained.

4. Conclusion

Using the chemical methods of elemental analysis, Fourier transform infrared spectroscopy and ^{13}C -NMR to compare humic acids isolated from sludge after or without lipid removal, show that almost half the amount of aliphatic structures in HAs (LFHAs) without lipid removal was mainly of free fatty acids. The purified HAs were richer in aromatic structures, and low in aliphatic structures. During composting, the structural changes observed in the LFHAs were a marked increase in etherified aromatic structures and a decrease in aliphatic structures. These variations are underestimated in the case of unpurified HAs owing to the occurrence of free fatty acids the levels of which fell during composting. As a result of lipid removal before humic acid isolation, best information about structural change in the humic during composting has been obtained.

Acknowledgements

This work was supported by JER 6013 in association with AUPELF-UREF and a Scholarship Program of Research Training from the French-Speaking University Agency AUF.

References

- Amir, S., Hafidi, M., 2001. Valorisation de boues de stations d'épuration des eaux usées par un bioprocédé aérobie "compostage". *Annales de Chimie, Sciences des Matériaux*, Elsevier 26, S 409 – S 414.
- Amir, S., Hafidi, M., Bailly, J.R., Revel, J.C., 2003. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex gel fractions. *Agronomie* 23, 269-275.
- Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Hamdi, H., Revel, J.C., 2004. Elemental analysis, FTIR, ^{13}C -NMR of humic acids from sewage sludge composting. *Agronomie* 24, 13-18.
- Chefetz, B., Tarchitzky, J., Deshmukh A.P., Hatcher P.G., Chen Y., 2002. Structural characterization of soil organic matter and Humic acids in particle-size fractions of an agricultural soil. *Soil Science Society of America Journal* 66, 129-141.
- Déportes, I., Benoit, J.L., Zmirou, D., 1995. Hazard to man and the environment posed by the use of urban waste compost: a review. *The Science of the Total Environment* 172, 197-222.

- Diaz-Burgos, M.A., Polo, A., Calcinai, M., Masciandaro, G., Ceccanti B., 1994. Use of pyrolysis-gas chromatography to evaluate sludge humification In : Senesi, N., Miano, T.M., (Eds.), *Humic substances in the Global Environment and Implications on Human Health*, Elsevier, Amsterdam, pp. 1285-128.
- Garcia, C., Hernandez, T., Costa, F., 1992. Characterization of humic acids from uncomposted and composted sewage sludge by degradative and non-degradative techniques. *Bioresource Technology* 41, 53-57.
- Gerasimowicz, W.V., Byler, D.M., 1985. Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic studies of humic acids. *Soil Science* 139, 270-278.
- Gonzalez-Vila, F.J., Almendros, G., Madrid, F., 1999. Molecular alterations of organic fractions from urban waste in the course of composting and their further transformation in amended soil. *The Science of the Total Environment* 236, 215-229.
- Gonzalez-Vila, F.J., Ludemann, H.D., Martin, F., 1983. ¹³C-NMR structural features of soil humic acids and their methylated, hydrolyzed and extracted derivatives. *Geoderma* 31, 3-15.
- Hafidi, M., Amir, S., Revel, J.C., 2004. Structural characterization of olive mill wastewater after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and ¹³C-NMR. *Process Biochemistry* (in press).
- Hernandez, M.T., Moreno, J.I., Costa, F., Gonzalez-Vila, F.J., Frund, R. 1990. Structural features of humic acid-like substances from sewage sludge. *Soil Science* 149, 63-68.
- Hsu, J-H., Lo, S-L., 1999. Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting of pig manure. *Environmental Pollution* 104, 189-196.
- Inbar, Y., Chen, Y., Hadar, Y., 1991. Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting of solid wastes from wineries. *Journal of Soil Science* 152, 272-281.
- Lichtfouse, E., Chenu, C., Baudin, F., Leblond, C., Da Silva, M., Behar, F., Derenne, S., Largeau, C., Wehrung, P., Albrecht P., 1998. A novel pathway of soil organic matter formation by selective preservation of resistant straight-chain biopolymers: chemical and isotope evidence. *Organic Geochemistry* 28, 411- 415.
- Mathur, S.P., Downen, G., Dinel, H., Shnitzer, M., 1993. Determination of compost biomaturity. I. Literature review. *Biological Agriculture & Horticulture* 10, 65-85.
- Ouatmane, A., Dorazio, V., Hafidi, M., Revel, J.C., Senesi, N., 2000. Elemental and spectroscopic characterization of humic acids fractionated by gel permeation chromatography. *Agronomie* 20, 491-504.

- Piccolo, A., 1997. New insights on the conformationnel structure of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. In: Drozed, J., (Eds.), The role of humic substances in the ecosystems and environmental protection, 8th Meeting IHSS, Poland, pp. 19-34.
- Piccolo, A., Campanella, L., Petronio, B.M., 1990. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of soil humic substances extracted by different mechanisms. *Soil Science Society of America Journal* 54, 750-756.
- Preston, C., 1996. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Science* 16, 144-166.
- Preston, C.M., Schnitzer, M., 1984. Effects of chemical modifications and extractants on the carbon-13 NMR spectra of humic materials. *Soil Science Society of America Journal* 48, 305-311.
- Preston, C.M., Schnitzer, M., 1987. ¹³C-NMR of humic substances: pH and solvent effect. *Journal Soil Science* 38, 667-678.
- Réveillé, V., Mancuy, L., Jardé, E., Garnier-sillan, E., 2003. Characterisation of sewage sludge derived organic matter : lipids and humic acids. *Organic Geochemistry* 34, 4, 615-627.
- Ricca, G., Severini, F., 1993. Structural investigations of humic substances by IR-FT, ¹³C-NMR spectroscopy and comparison with a maleic oligomer of known structure. *Geoderma* 58, 233-244.
- Schnitzer, M., Dinel, H., Schulten, H.R., Paré, T., Lafond. S., 2000. Humification of duck farm wastes. In: Ghabour E.A. and G. Davies (Eds.), *Humic Substances: Versatile Components of plants "Soil and Water"*. The Royal Society of Chemistry, pp. 20-34.
- Schnitzer, M., Khan, S.U., 1972. *Humic Substances in the Environment*. New York, Marcel Dekker.
- Tomati, U., Madejon, E. Galli, E., 2000. Evaluation of humic acid molecular weight as an index of compost stability. *Compost Science & Utilization* 8, 108-115.
- Wershaw, R.L., Pinckney, D.J., Booker, S.E., 1977. Chemical structure of humic acids, I. A generalized structural model. *Journal of Research of the US Geological Survey* 5, 565-569.
- Wilson, M.A., Heng, S., Goh, K.M., Pugmire, R.J., Grant, D.M., 1983. Studies on litter and acid insoluble soil organic matter fractions using ¹³C-cross polarization nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Soil Science* 34, 83-97.

Chapitre 4 :

Structural characterization of fulvic acids during composting of sewage sludge

Soumia AMIR^a, Mohamed HAFIDI^{a*}, Georges MERLINA^b,

Jean-Claude REVEL^b

^a Unité Sol et Environnement (Lab. Ecol. Vég.), Faculté des Sciences Semlalia, Dépt. de
Biologie. BP/2390, Marrakech, Morocco.

^b Equipe Agronomie Environnement Ecotoxicologie, Ecole Nationale Supérieure
Agronomique de Toulouse, Auzeville-Tolosane, BP/ 107, 31326, Castanet, Tolosan, France

*Corresponding author / e-mail: hafidi@ucam.ac.ma

Présentation :

Les acides fulviques constituent une fraction des substances humiques avec un grand intérêt dans la complexation des minéraux et la croissance de la plante. Vu leur taille plus petite et leur contenu en groupements carboxyles, ils sont chimiquement plus réactifs que les acides humiques. Ils peuvent être facilement absorbés par les racines des plantes et stimulent la nutrition minérale des plantes. Ainsi, une détermination de leur teneur et leur structure chimique est d'une grande importance pour déterminer l'effet fertilisant et structural du compost des boues sur le sol.

L'objectif de ce présent chapitre est une caractérisation structurale des acides fulviques à différents stades de compostage (temps initial, après 1, 3, 6 et 9 mois) en se basant sur les mêmes techniques chimiques complémentaires utilisées pour l'analyse des acides humiques : analyse élémentaire, spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) et Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13 (^{13}C -NMR).

Les résultats de l'analyse élémentaire (tableau 1) montrent que les structures isolées du mélange initial contiennent de grandes teneurs en O, N et S et de faibles teneurs en C, H et rapport C/N comparé aux acides fulviques d'un sol modèle de Schnitzer. Les valeurs sont dans l'ordre des valeurs obtenues en littérature pour les AF des autres boues résiduaire. Au cours du compostage se produit une grande diminution de contenu en O, S et du rapport O/C simultanément avec une augmentation de teneur en C, H, N et du rapport C/N. Tenant compte d'une augmentation des teneurs en acides fulviques au cours du compostage (de 6,4 à 14 mg/g), les variations enregistrées peuvent être expliquées par une décomposition microbienne des structures facilement assimilables riches en oxygène, avec une augmentation de l'intensité des structures récalcitrantes et des composés contenant N (sous forme amide stable).

Un faible rapport E4/E6 suggère la composition des acides fulviques en structures condensées. Ce rapport a montré une très faible diminution au cours du compostage, qui peut être liée à une diminution de leur contenu en oxygène ou augmentation de leur degré de polycondensation.

L'analyse par spectroscopie infrarouge a montré un grand contenu des acides fulviques en structures aromatiques avec des chaînes alkyles latérales polyalcools ou polyacides (figure 2, légende 1).

Au début du traitement se produit une augmentation de l'absorbance vers 3400, 1640, 1540 et 1410 cm^{-1} et une diminution de l'absorbance des structures qui absorbent vers 1100 cm^{-1} . Ces

changements impliquent une utilisation microbienne au cours du compostage de structures alcools et acides, ce qui a contribué à une augmentation de l'intensité de composés aromatiques et peptidiques.

L'augmentation en fin du compostage de l'absorbance vers 1140 cm^{-1} pourrait être attribuée à la néoformation de liaisons type éther/ ester suite à des réactions de repolycondensation.

L'analyse par spectroscopie RMN- C^{13} (figure 3, légende 2) a montré que les structures isolées de mélange initial sont composées en biomolécules non-humifiées (carbohydrates et polypeptides) et en structures aromatiques riches en groupements fonctionnels. A début du processus du compostage, on voit une diminution de carbone type alkyl et carboxylique attribuée à leur utilisation microbienne (tableau 2). En parallèle, l'augmentation de signal de résonance en 50-110 ppm principalement à 102,5 ppm pourrait correspondre à une néoformation ou préservation de structures anomérique ou type cétale. Ainsi que, en phase intermédiaire, se produit une augmentation de résonance de carbone de structures aromatiques. L'augmentation en fin du compostage de résonance environ 32 et 174 ppm confirment la néoformation de structures alkoyles suite à l'établissement des liaisons ester/éther. Ces structures pourraient être considérées comme des nouvelles entités incorporées pendant l'humification plutôt que des composés piégés dans les structures acides fulviques. Ces réactions de repolymérisation ou couplage oxydative en fin du processus compostage implique l'arrivée à des étapes avancées en humification. Les acides fulviques du produit final est composé de structures avec un caractère plus aromatique, oxydés et polycondensés, qui sont chimiquement et biologiquement plus stables et moins réactive que les structures initiales.

Abstract :

Changes occurring in the chemical structure of fulvic acids extracted from composted sewage sludge at different times of treatment were investigated by various chemical methods (Elemental analysis, Fourier Transform Infrared and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance). The starting material was composed of aromatic structures, carbohydrates, polyalcohol or polyacid alkyl side-chains. During the stabilisation phase of composting, the microbial metabolism seems to begin by the decomposition of aliphatic alcohols or acids shown by a decrease of absorbance around 1136 cm^{-1} , a resonance in C-alkyl and carboxyl areas. In parallel, structures with anomeric, acetal or ketal carbons and aromatic compounds around 102; 130-160 ppm respectively, were preserved or yielded from microbial decomposition. At the end of composting, the increase of resonance around 32 and 174 ppm in the NMR spectra and the increase of absorbance around 1142 cm^{-1} in the FTIR spectra suggest the presence of ester/ether linkages and neoformation of alkyl ethers/esters. The latter structures could be considered as new constituent moieties incorporated during humification, rather than compounds somehow trapped in the fulvic acid structures. The end product exhibits more aromatic and polycondensed structures, which are chemically and biologically more stable and less reactive than the starting material.

Key words : fulvic acids/ sewage sludge/ composting/ chemical structure/ humification.

1. Introduction

In recent years, great interest has been shown in agricultural recycling of organic wastes of anthropogenic origin to replace expensive chemical fertilizers and encourage environmentally sound disposal of the residues [1]. Appropriate pre-treatment of these wastes is prerequisite to reduce or eliminate any harmful effects on soil and to optimize the fertilizing power of the final product once in the soil. Composting of sewage sludge is a useful method for producing a stable material, which can be used as a source of nutrients and as a soil conditioner in the field [2]. During composting, part of the organic matter is mineralised to carbon dioxide, ammonia and water and another part is transformed into refractory humic substances. Compost quality is defined by its stability and maturity. Stability refers to the level of biological activity of the compost and is dependent on the degree of degradation achieved during the composting process. Maturity refers to a lack of phytotoxicity when compost is

used as a soil conditioner on vegetation [3]. Unstable composts are characterised by high amounts of easily degradable organic matter. Compost stability cannot be related directly to chemical parameters as C/N ratio, pH, EC and amount of extractable C because these parameters depend on composition of starting material [4]. But, It could be directly related to microbial activity and can be measured by respiration rate, carbon dioxide production or heat evolution [5]. The maturity of compost is related to their level in humic substances, which are highly produced in the last stage of the composting process [6]. The content and structure of the humic substances in compost have been investigated in numerous studies as the main indices for assessing compost maturity [7-9]. These humic substances play a vital role in soil fertility and plant nutrition. The value of humic substances in soil fertility and plant nutrition relates to the many functions these complex organic compounds perform as a part of the life cycle on earth. The life-death cycle involves a recycling of the carbon containing structural components of died plant and animals through humification process and back into the living plant. Humic substances influenced indirectly or directly in plant growth as in uptake of plant nutrients, seed germination, energy metabolism etc. However, despite that the interest of humic substances and their structural characterization have been published in many different journal at numerous countries, their molecular structure is still a matter of debate [10]. This is originating from that humic substances have been shown to contain a wide variety of molecular components. Some typical components are: polysaccharides; polypeptides; lignins; esters; phenols; ethers; carbonyls; quinones; lipids; peroxydes; various combinations of benzene, acetal, ketal, and lactol, and furan ringed compounds and aliphatic (carbon chains) compounds. Furthermore, the extreme variability in the molecular features of humic substances relates back to precursor compounds and the environmental conditions under which humic substances formed such as origin of starting material and processing (native humification in soil or organic waste composting...). Therefore, to complete our work of characterizing humic acids from compost of sewage sludge taken in wastewater plant in Morocco [11]. Structural characterization of fulvic acids from same compost is investigated. Fulvic acids are shown with high interest in mineral chelating and plant growth. Due to their smaller size and high content in carboxyl groups, they are much more chemically reactive than humic acids [12]. They can readily enter plant roots, stems, and leaves and because of their high exchange capacity as they enter plant parts they carry trace minerals into plant tissues.

The chemical structure of fulvic acids depends on the way in which humification occurs during composting. Two main pathways have been proposed to explain humification:

biodegradation and accumulation of recalcitrant material [13; 14] or oxidation and polyphenolic condensation [5; 15; 16]. A new pathway suggested by Lichtfouse et al. [17] involves selective preservation of resistant aliphatic biopolymers produced upon microbial biosynthesis. In this work, various chemical methods were used to obtain comparative and complementary informations about changes of chemical structure of fulvic acids during composting. A destructive methods as elemental analysis could provide elemental composition of fulvic acid. Non-destructive spectropical method Fourier Transform Infrared (FTIR) is served as a qualitative tool for monitoring chemical groups and bands of fulvic acids. While Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance is important to known chemical nature or distribution of carbon among chemical groups. Accordingly, these techniques were applied to analysis fulvic acids extracted at different stages of composting of sewage sludge.

2. Material and Methods

2.1. Composting

Sewage sludge were taken from an anaerobic lagoon in an experimental wastewater treatment plant. A mixture of sewage sludge (165 Kg) and straw (20 Kg) characterized by C/N of 24 and moisture of 54 % was composted in a heap for 180 days on a composting platform. Aerobic conditions are maintained by turning over manually composting heap every 15 days. Composting progress was followed by mesuring daily temperature at different locations of compost heap (inside, at bottom, superficially, in the periphery). To obtain the representative samples and results for analysis, ten samples from compost heap (each 500 g) were collected in the same sites temperature readings at various step of composting -they are pooled and mixed thoroughly-: raw mixture = RM; Compost after 30; 90; 180 days of processing.

2.1. Purification pre-treatments

To remove free lipids before extraction of humic substances, a chloroform-methanol mixture (2:1) was used [17]. Lipid extraction was carried out three times at 4°C on 15 g of fresh sample with 120 ml of the solvent mixture.

After solvent evaporation, the samples were treated three times with 40 ml of distilled water. to remove the methoxyl moieties generated during the methanol extraction. In addition, this removes the other non-humic, water-soluble substances (sugars, proteins), which may interfere with the analysis of humic substances.

2.3. Fulvic acid extraction

The extraction of humic substances was carried out on fat-free samples with 40 ml of NaOH (0.1M). Extraction was repeated several times until colourless solutions were obtained. Centrifugation was carried out at 4000G for 15 min. The filtered solutions of each sample were combined and precipitated by acid treatment with 3M H₂SO₄ at 4°C for 24h. The fulvic acid solution was separated from the precipitated humic acids through centrifugation and filtration and then dialyzed with a Spectra-por membrane (1000 Da) to eliminate excess salts. The fulvic acid content was calculated after freeze-drying.

2.4. Fulvic acid analysis

Various chemical methods were applied for the analysis of the freeze-dried fulvic acids :

Elemental analysis was performed for C, H, N and O on a Carlo Erba EA 1112.

The E4/E6 ratio was determined as described by Chen et al. [18]. The absorbance was measured at 465 and 665 nm with a U.V. Unicam SP 1800 spectrophotometer, after dissolving 2 mg of freeze-dried fulvic acids in 25 ml of NaHCO₃ (0.025 M).

Infrared (FTIR) spectra were recorded from KBr pellets (250 mg of dried KBr and 2 mg of freeze-dried fulvic acids pressed under vacuum according to Cross, [19]) with a FTIR Perkin Elmer 1600 spectrophotometer over the 4000 to 400 cm⁻¹ range, at a rate of 16 nm/s.

¹³C-NMR spectra with 1H broadband decoupling were recorded at 75.469 MHz on a Bruker AM WB 300 MHz Spectrometer. The solution was prepared by dissolving 100 mg of fulvic acids in 3 ml of NaOD/D₂O (0.5 M). The spectrum was obtained using inverse-gated-decoupling to suppress nuclear Overhauser enhancement and provide quantitative results [20]. Acquisition time was 0.98 sec, relaxation delay was 1.8 sec, pulse of 35 degree, total acquisition time was 72 h. Free induction decays were processed by applying 50 Hz linebroadening and baseline corrections [21]. Semi-quantitative results of percentages of carbon distribution were obtained from the ratio of integrated areas of the spectrum to the whole spectrum area: 0-55 ppm (alkyl carbon), 55-110 ppm (alkyl carbon substituted by oxygen or nitrogen), 110-165 ppm (aromatic carbon), 165-200 ppm (carboxylic carbon).

3. Results and Discussion

3.1. Composting parameters

Temperature variation during composting (Fig. 1) followed a typical pattern exhibited in composting systems. Two phases were observed during the process: a phase of stabilization

(about 30 days of composting), where temperature has peaked to 52° C after 7 days of processing, this phase is characterized by a development of thermophilic communities. The temperature is then decreased to 30° C. The maturation phase is marked after 60 days by a temperature tray at 35 °C and characterized by development of mesophilic populations. The obtained compost after 180 days is characterized by a C/N ratio of about 16.4, a decomposition rate of 40 % [22].

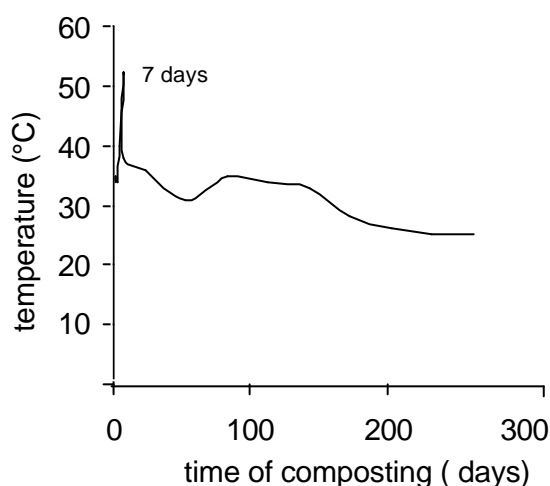


Figure 1. Temperature variation during composting of lagooning sludge.

3.2. Elemental analysis

The elemental composition and the E4/E6 ratio for fulvic acids (FAs) extracted from the sewage sludge at different stages of composting, those for sludge FAs reported in other studies [23; 24] and for model soil FAs suggested by Schnitzer [25], are illustrated in Table 1. FAs of the initial sludge mixture RM show much higher O and N contents and O/C ratio values, but lower contents of C and H and C/N ratio compared to FAs of soil. A similar range of values has been found in other studies on sludge [23; 24]. The high value of S (= 8.1 %) is very close to that reported by Sposito et al. [23] (Table 1). Schaumberg et al. [26] showed that the major portion (69 %) of the very high S content in the sludge FAs could be due to organic sulfate esters from detergents. The low C/N ratio and high O/C ratio, nitrogen and sulphur contents could reflect the high amount of non-humified biomolecules (carbohydrates and polypeptides) in sludge FAs as suggested previously by Petronio et al. [27] and Piccolo et

al. [28]. A high contribution of aromatic structures rich in functional groups could be in agreement with the high C/H and O/C ratios [12].

Table 1. Elemental composition and E4/E6 ratio of the fulvic acids extracted from the sewage sludge compost at different stages of treatment.

| Samples (days) | C ^a | H ^a | O ^a | N ^a | S ^a | atomic ratio | | | E4/E6 | FA content (mg/g) |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|-----|-----|-------|-------------------------|
| | | | | | | C/N | C/H | O/C | | |
| RM | 32.1 ± 0.42 | 4.2 ± 0.22 | 52.1 ± 0.25 | 3.5 ± 0.05 | 8.1 | 10.8 | 0.6 | 1.2 | 1.57 | 6.41 ± 0.49 |
| 30 | 39.7 ± 0.42 | 5.5 ± 0.08 | 48.3 ± 0.47 | 3.6 ± 0.12 | 2.8 | 12.8 | 0.6 | 0.9 | 1.26 | 9.53 ± 0.09 |
| 90 | 40.9 ± 0.19 | 5.7 ± 0.00 | 48.5 ± 0.26 | 4.2 ± 0.06 | 0.7 | 11.4 | 0.6 | 0.9 | 1.21 | 12.17 ± 0.29 |
| 180 | 39.5 ± 0.32 | 5.1 ± 0.38 | 48.2 ± 0.71 | 3.9 ± 0.01 | 3.3 | 11.8 | 0.7 | 0.9 | 1.23 | 14.01 ± 0.17 |
| FAs ^b | 40.8 | 6.6 | 41.6 | 2.8 | 8.2 | 17.0 | 0.5 | 0.8 | - | - |
| FAs ^c | 30.0 | 6.2 | 58.2 | 5.6 | / | 6.3 | 0.4 | 1.5 | - | - |
| FAs ^d | 45.7 | 5.4 | 44.8 | 2.1 | 1.9 | 25.5 | 0.7 | 0.7 | 9.6 | - |

^a % Calculated on organic matter basis, values are means of three replicates

^b means of three anaerobic sludges (Sposito et al. 1976)

^c sludge (Riffaldi et al. 1988)

^d Fulvic acid of soil model (Schnitzer, 1978)

During composting, a strong decrease in O and in the O/C ratio occurred concomitant to an increase of the C, H and N contents and the C/N ratio and with a non-significant change of C/H ratio. While, during 180 days of composting was recorded an increase of the FA content from 6.4 to 14 mg/g of dry compost. These changes could result from microbial utilisation of O-containing structures and preservation of recalcitrant material such as aromatic structures and N-containing moieties (stable amide forms), which could be present in the neoformed FA

network [29]. Otherwise, the decrease of O and of the O/C ratio with an increase of C and H content without change of the C/H ratio could also be due to decarboxylation or dehydroxylation of functional groups of aromatic structures leading to a relative increase in the amount of ring C and H. The C/H ratio cannot be considered as an index of stability or maturation as it was found by Riffaldi et al. [30] that the C/H ratio taken as a degree of carbonization is very constant between fulvic acids extracted from many kinds of organic source at different degrees of maturity. The decrease in S content at the beginning of composting could also be attributed to microbial decomposition of S-containing structures. However, some increase at the final step of composting could result from cross-linking or polycondensation generating stable organic S-containing degradation products [31].

The E4/E6 ratio for sludge FAs was considerably lower than that of soil FAs. Values of the same order, in the range (2-3), have been found for FAs of other sludges [30]. The low E4/E6 ratio suggests the presence of abundant condensed aromatic structures in sludge FAs [12]. During composting, the slight decrease of the E4/E6 ratio may be explained by the decrease of oxygen content in the fulvic acids and/or by the further increase of their degree of polycondensation as suggested by Chen et al., [18].

3.3. FTIR analysis

The FTIR spectra of the fulvic acids extracted at various stages of treatment exhibited similar peak locations but the relative intensity of the absorbance changed during composting (Fig. 2). The interpretations of spectra (Legend 1) were based on numerous studies [19; 32; 33].

During composting, absorbance around 3400, 1640, 1540 and 1410 cm^{-1} showed an increase, with a relative decrease of absorbance intensity around 1100 cm^{-1} . These changes could be explained by microbial decomposition of alcoholic and acidic structures and the relative increase of aromatic and peptidic compounds. Chefetz et al. [14] showed that part of the humification process in agricultural soils involves lignin side-chain oxidation, and incorporation of microbially derived units into the humic macromolecules. In the end compost (180 days) the increase in absorbance around 1140 cm^{-1} could be attributed to ester/ether linkages, as well as to formation of S containing ester through intense polycondensation. The repolymerization mechanism through oxidative coupling or etherification/esterification reactions has been shown to occur in advanced stages of humification [11; 34; 35].

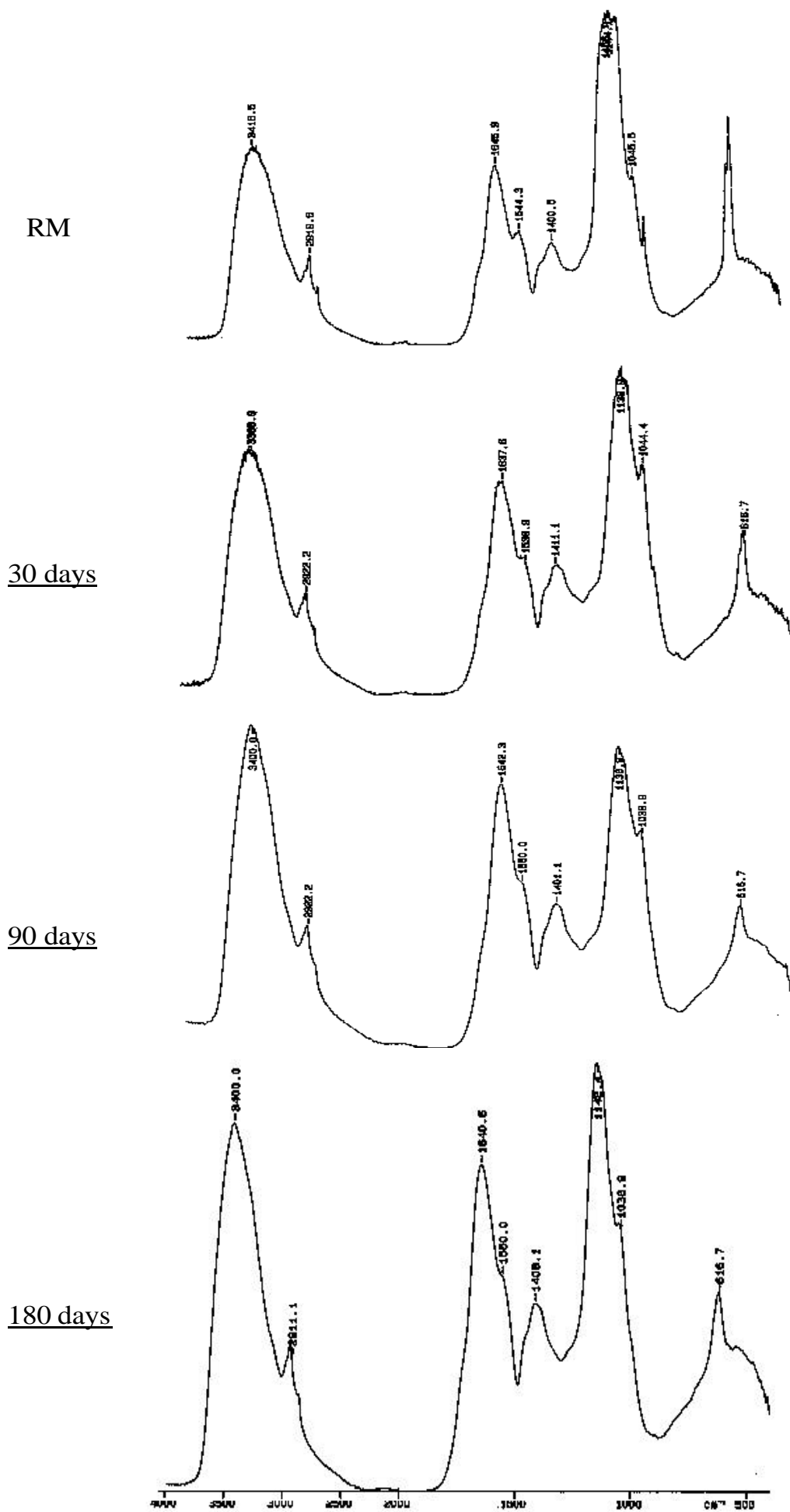


Figure 2. FTIR spectra of the fulvic acids extracted from the composted sewage sludge at different stages of treatment.

Legend 1. Observed infrared bands of fulvic acids from composted sludges and their assignments

| Bands and Peaks (cm ⁻¹) | Proposed assignments |
|-------------------------------------|--|
| 3300-3400 cm ⁻¹ | H-bonded OH groups of alcohols, phenols and organic acids, as well as Hbonded N-H groups |
| 2920-2930 cm ⁻¹ | C-H stretching of alkyl structures |
| 1630-1650 cm ⁻¹ | aromatic and olefinic C=C, C=O in amide (I), ketone and quinone groups |
| 1540-1550 cm ⁻¹ | amide (II) |
| 1400 cm ⁻¹ | OH of phenols, -COO ⁻ , -CH ₃ |
| 1200-1100 cm ⁻¹ | amide III, aliphatic alcohols or acids, C-O and O-H deformation of carboxylic groups of carbohydrates, C-O stretch of aryl ethers, esters; as well as organo-sulphur compounds |

3.4. ¹³C-NMR analysis

Fulvic acids at different times of composting exhibit generally similar resonance areas in ¹³C-NMR spectra, however the intensities of the resonances change significantly during composting (Fig. 3). The interpretations of the spectra (Legend 2) were based on numerous studies [6; 11; 20; 21; 36-40]. Total area of each spectrum was integrated and divided into the following regions: aliphatic carbon (0-50 ppm), alkyl carbon substituted by oxygen and nitrogen (50-110 ppm), aromatic carbon (110-165 ppm) and carboxylic carbon (165-200 ppm). Carbon distribution changes significantly during composting (Table 2). Fulvic acids of raw mixture RM exhibit a high resonance of aromatic carbon and alkyl carbon substituted by oxygen or nitrogen. Sposito et al. [23] suggest that much of the C in the sludge FAs is present in condensed aromatic ‘nuclei’ instead of aliphatic side chains.

During the stabilisation phase of composting (30 days), a significant increase of intensity of the resonance occurred in the 50-110 ppm area mainly around 102.5 ppm. In parallel, intensities of alkyl, aromatic and carboxyl carbons showed a relative decrease during this phase. This may be attributed to selective preservation of structures of anomeric carbon or production through biodegradation of cetalic and ketalic moieties.

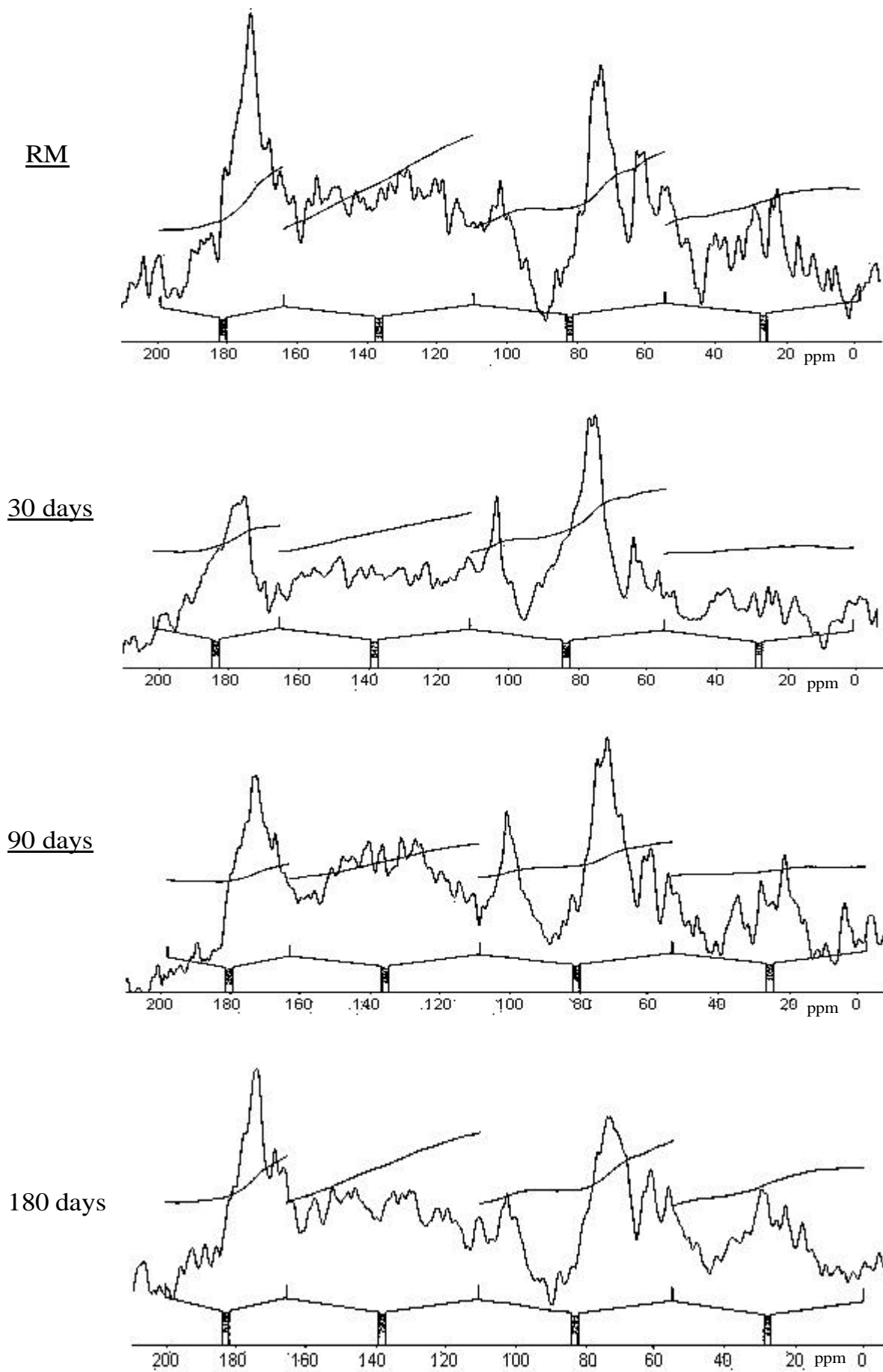


Figure 3. ^{13}C -NMR spectra of the fulvic acid extracted from the composted sewage sludge at different stages of treatment.

Legend 2. ^{13}C -NMR signals of fulvic acids from composted sludges and attributed chemical groups

| Signal (ppm) | Attributed chemical groups |
|----------------------|---|
| 22.9; 29.8; 32; 36.4 | paraffinic C in alkyl chains |
| 56.2 | methoxyl groups $-\text{OCH}_3$ |
| 61-63 | amino acids |
| 74 | C2-C5 in Carbohydrates |
| 102.5 ppm | anomeric carbons of polysaccharide or tannin structures, acetal and ketal carbons |
| 110-130 | unsubstituted aromatic C |
| 130-145 | Carbon-substituted aromatic carbons |
| 145-160 | Oxygen or nitrogen substituted aromatic carbons |
| 160-200 | Carboxylate, ester or amide |

Table 2. Changes of carbon distribution of fulvic acids extracted from the sewage sludge compost at different stages of treatment.

| Samples (days) | C-alkyl ^a | O-alkyl/N-alkyl ^a | Aromatic ^a | Carboxylic ^a |
|----------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| RM | 13.37 | 28.09 | 34.78 | 23.76 |
| 30 | 5.20 | 46.87 | 29.08 | 18.85 |
| 90 | 8.55 | 37.65 | 37.10 | 16.70 |
| 180 | 17.95 | 29.12 | 31.97 | 20.97 |

^a Semi-quantitative percentages obtained from ratio of integrated areas of the spectrum to the whole spectrum area

In the next step of composting or maturation phase (90 days), an increase in the intensity of aromatic structures occurred. However, in the end compost (180), the intensity of those structures decreases, but aliphatic ethers/esters enrichment seems to take place, as shown by the increase of intensity in C-alkyl area and a significant increase in carboxyl area (165-190 ppm). Inbar et al. [6] found similarly an increase in aliphatic C and carboxyl groups, and a decrease in phenolic OH and total aromaticity in humic material during composting of grape marc of wine processing. The occurrence of aliphatic ethers/esters in the last step is confirmed in FTIR spectra by an increase of the intense absorbance peak around 1140 cm^{-1} , and slightly the peak around 2925 cm^{-1} . The same results have been reported by other authors, which suggests the accumulation of relatively recalcitrant aliphatic polyesters at advanced stages of humification which can be considered as stable structures contributing to the formation of humic substances [20; 41; 42].

The correlation of results obtained from elemental analysis, FTIR and ^{13}C -NMR spectroscopy shows that FAs from raw sludge mixture present high levels of aromatic structures bound to polyacohols or polyacid alkyl side-chains, as demonstrated by high absorbance in FTIR spectra around 1100 cm^{-1} and an intense NMR signals around 74 and 174 ppm. In fact, previous works suggest that polycarboxylic acids can be regarded as model compounds for soil fulvic acids [43]. During the stabilisation phase of composting (30 days), a decrease in O content and O/C ratio, and reduced absorbance around ($1100\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) and resonance at around 56, 63 and 174 ppm suggest that microbial metabolism began by the decomposition of aliphatic alcohol and acids. In parallel, some structures incorporating anomeric, ketal or cetal carbon are preserved or yielded through microbial decomposition as shown by the intense resonance around 102 ppm. During the next step of the maturation phase, a significant increase of aromatic or peptidic compounds (90 days) is seen through the high absorbance around 3400 and 1640 cm^{-1} , as well as an intense resonance around 120-160 ppm. The increase of aromaticity has been previously demonstrated to occur during humification [11; 12; 21; 35]. In the end compost (180), the increase of resonance around 32 and 174 ppm in the NMR spectra and the increase of absorbance around 1142 cm^{-1} in FTIR spectra and the slight increase of C/H ratios without a change of the O/C ratio could indicate an ester/ether linkage and neoformation of alkyl ethers/esters. Some authors suggest that the resonance at 31 ppm includes bridging methylenes between aromatic rings [44]. The present results support the suggestions of Schnitzer, [25] that the increase of stability of humic substances could be attributed to occurrence of additional chemical bonding via C-O and C-C bonds to main hydrogen bonds “van der Waal’s forces”). Skjemstad et al. [45] showed an accumulation of

alkyl structures even in highly decomposed material and considered this not due to selective preservation, but rather to an increase in cross-linking of the long-chain alkyl material occurring during humification. In addition, Schnitzer et al. [46] reported an increase of molecular cross-linking and more inter- and intra- molecular associations of the organic matter during composting leading to the formation of larger molecules that are chemically and biologically less reactive than the starting materials.

Therefore, considering their resistance to prior exhaustive chloroform-methanol extraction, these alkyl ether/esters can be considered as constituent moieties incorporated during humification, rather than compounds trapped somehow in the fulvic acid structures.

4. Conclusion

Fulvic acids extracted from lagooning sewage sludge are mainly composed of aromatic structures, carbohydrates, polyacohols or polyacid alkyl side-chains. During composting, biodegradation and humification processes involve a decrease of some aliphatic alcohols or acids, preservation of aromatic material and production of structures incorporating anomeric, ketal or cetal carbon. At the end of composting, an intense ester/ether linkage suggested the neof ormation of alkyl ether/esters attributed to cross-linking of the alkyl material occurring during humification rather than its selective preservation. The end product exhibited more aromatic and stable aliphatic structures that are chemically and biologically less reactive than the starting material. Accordingly, the characterization of the chemical structure of fulvic acids could be considered as important tool to investigate humification process during composting and to determine the end product suitable for agricultural applications.

Acknowledgements

This work was supported JER 6013 associated to the AUPELF-UREF and a Scholarship Program of Research Training from the French-Speaking University Agency.

References

- [1] ADEME. La collecte et le traitement des déchets, Guide pratique pour les élus de Midi – Pyrénées 1994.
- [2] Mustin, M. Le compost, gestion de la matière organique. Edition Français Dubus, Paris. 945 p, 1987.

- [3] Hue, N.V. and J. Liu. Predicting compost stability. *Compost Science and Utilization*. 1995, **3** 8-15.
- [4] Paletsky W.T., Young, J.C. Stability measurement of biosolids compost by aerobic respirometry. *Compost Science and Utilization*. 1995, **3** 16-24.
- [5] Veeken, A., K. Nierop, V. de Wilde, and B. Hamelers. Characterisation of NaOH-extracted humic acids during composting of a biowaste. *Bioresource Technol.* 2000, **72** 33-41.
- [6] Inbar, Y., Y. Hadar, Y. Chen. Characterization of humic substances formed during the composting of solid wastes from wineries. *The Science of the Total Environment*. 1992, **113** 35-48.
- [7] Garcia, C., T. Hernandez, and F. Costa. Characterization of humic acids from uncomposted and composted sewage sludge by degradative and non-degradative techniques. *Bioresource Technol.*, 1992, **41** 53-57.
- [8] Ouatmane, A., V. Dorazio, M. Hafidi, J.C. Revel, and N. Senesi. Elemental and spectroscopic characterization of humic acids fractionated by gel permeation chromatography. *Agronomie*. 2000, **20** 491-504.
- [9] Tomati, U., E. Madejon, E. Galli. Evaluation of humic acid molecular weight as an index of compost stability. *Compost Science & Utilization*. 2000, **8** 108-115.
- [10] IHSS. Humic substances : Nature'S most versatile materials. 20th Anniversary Biennial Conference of International Humic Substances Society, 2002, July 21-26, Boston, USA.
- [11] Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Hamdi, H. and Revel. J.C. Elemental analysis, FTIR, ¹³C-NMR of humic acids from sewage sludge composting. *Agronomie*. 2004, **24** 13-18.
- [12] Senesi, N., T.M. Miano, and G. Brunetti. Humic substances in organic amendments and effects on native soil humic substances. In A. Piccolo (eds) *Humic substances in terrestrial ecosystems*, 1996, pp. 531-593.
- [13] De Leeuw, J.W., and C. Largeau. A review of macromolecular organic compounds that comprise living organisms and their role in kerogen, coal and petroleum formation. In M.H. Engel and S.A. Macko, (ed) *Organic Geochemistry, Principles and Applications*. Plenum. New York, 1993, pp. 23-72.
- [14] Chefetz, B., Y. Chen, E. Clapp, and P.G. Hatcher. Characterization of organic matter in soils by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, 2000, **64** 583-589.
- [15] Flaig, W. Effects of microorganisms in the transformations of lignin to humic substances. *Geochim. Cosmochem. Acta*. 1964, **28** 1523-1535.

- [16] Martin, J.P., and K. Haider. Microbial activity in relation to soil humus formation. *Soil Sci.*, 1971, **111** 54-63.
- [17] Lichtfouse, E., C. Chenu, F. Baudin, C. Leblond, M. Da Silva, F. Behar, S. Derenne, C. Largeau, P. Wehrung, and P. Albrecht. A novel pathway of soil organic matter formation by selective preservation of resistant straight-chain biopolymers: chemical and isotope evidence. *Org. Geochem.* 1998, **28** 411- 415.
- [18] Chen, Y., N. Senesi, and M. Schnitzer. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *J. Soil Sci. Soc. Am.*, 1977, **41** 352-358.
- [19] Cross, A.D. Introduction to practical infra-red spectroscopy, Butterworths ed, London, 1964.
- [20] Preston, C. Applications of NMR to soil organic matter analysis : history and prospects. *Soil Science.* 1996, **16** 144-166.
- [21] Wilson, M.A., S. Heng, K.M. Goh, R.J. Pugmire, D.M. Grant. Studies on litter and acid insoluble soil organic matter fractions using ^{13}C -cross polarization nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Soil Science.* 1983, **34** 83-97.
- [22] Amir, S., M. Hafidi. Valorisation de boues de stations d'épuration des eaux usées par un bioprocédé aérobie "compostage". *Ann. Chim. Sci. Mat.* 2001, **26** S 409 – S 414.
- [23] Sposito, G., K.M. Holtzclaw, and J. Baham. Analytical properties of the soluble, metal-complexing fractions in sludge-soil mixtures: II. Comparative structural chemistry of fulvic acid. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1976, **40** 691-697.
- [24] Riffaldi, R., A. Saviozzi, and R. Levi-Minzi. Water extract of fresh and mature farmyard manure. *Biological wastes*, 1988, **23** 65-72.
- [25] Schnitzer, M. Humic substances: chemistry and reactions. In M. Schnitzer and S.U. Khan (ed) *Soil Organic Matter*. Elsevier. Amsterdam, 1978, pp.1-64.
- [26] Schaumberg, G.D., K.M. Holtzclaw, C.S. Le Vesque, and G. Sposito. Characterization of sulfur in fulvic acids extracted from anaerobically digested sewage sludge. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1982, **46** 310-314.
- [27] Petronio, B.M., T. Ferri, C. Papalini, and A. Piccolo. Characterization of the organic component of a sludge. *Talanta.* 1989, **36** 1177-1182.
- [28] Piccolo, A., P. Zaccheo, and P.G. Genevini. Chemical characterization of humic substances extracted from organic-waste-amended soils. *Bioresource Technology.* 1992, **40** 275-282.

- [29] Knicker, H., P.G. Hatcher, and F.J. González-Vila. Formation of heteroaromatic nitrogen after prolonged humification of vascular plant remains as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Environ. Qual.* 2002, **31** 444-449.
- [30] Riffaldi, R., F. Sartori, and R. Levi-Minzi. Humic substances in sewage sludge. *Environ. Pollut. Ser. B.* 1982, **3** 139-146.
- [31] Holtzclaw, K.M., and G. Sposito. Analytical properties of the soluble, metal-complexing fractions in sludge-soil mixtures : III. Unaltered anionic surfactants in fulvic acid. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1978, **42** 607-611.
- [32] Gerasimowicz, W.V., and D.M. Byler. Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic studies of humic acids. *Soil Sci.* 1985, **139** 270-278.
- [33] Hernandez, M. T., J. I. Moreno, F. Costa, and F.J. Gonzalez-Vila. Frund Structural features of humic acid-like substances from sewage sludge. *Soil. Sci.* 1990, **149** 63-68.
- [34] Sjoblad, R.D. and J.M. Bollag. Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms. In V.E.A. Paul and J.N. Ladd (ed) *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker. New-York, 1981.
- [35] Amir, S., M. Hafidi, J.R. Bailly, and J.C. Revel. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex gel fractions. *Agronomie.* 2003, **23** 269-275.
- [36] Chen, Y., Y. Inbar, Y. Hadar and R.L. Malcolm. Chemical properties and solid-state CPMAS 13 C-NMR of composted organic matter. *The Science of the Total Environment.* 1989, **81-82** 201-208.
- [37] Gonzalez-Vila, F.J., H.D. Ludemann, and F. Martin. ¹³C-NMR structural features of soil humic acids and their methylated, hydrolyzed and extracted derivatives. *Geoderma.* 1983, **31** 3-15.
- [38] Ricca, G., and F. Severini. Structural investigations of humic substances by IR-FT, ¹³C-NMR spectroscopy and comparison with a maleic oligomer of known structure. *Geoderma.* 1993, **58** 233-244.
- [39] Skene, T.M., P. Clarke, J.O. Skjemstad, and J.M. Oades. Browning reactions between Eucalyptus litter and different nitrogen sources. *Australian Journal of Soil Research.* 1997, **35** 1085-1091.
- [40] Almendros, G., J. Dorado, F.J. González-Vila, M.J. Blanco, and U. Lankes. ¹³C-NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest and shrub biomass. *Soil Biol. Biochem.* 2000, **32** 793-804.

- [41] Kögel-Knabner, L., and P.G. Hatcher. Characterization of alkyl carbon in forest soils by CPMAS ¹³C NMR spectroscopy and dipolar dephasing. *The science of the total environment*. 1989, **81/82** 169-177.
- [42] Pacchiano, R.A., W. Sohn, V.L. Chlanda, J.A. Garbow, R.E. Stark. Isolation and spectral characterization of plant-cuticle polyesters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993, **41** 78-83.
- [43] Bracewell, J.M., G.M. Robertson, D.I. Welch. Polycarboxylic acids as the origin of some pyrolysis products characteristic of soil organic matter. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 1980, **2** 239-248.
- [44] Shin, H.S., and H. Moon. An “average” structure proposed for soil fulvic acid aided by DEPT/QUAT ¹³C NMR pulse techniques. *Soil Science*. 1996, **161** 250-256.
- [45] Skjemstad, J.O., P. Clarke, A. Golchin, and J.M. Oades. Characterization of soil organic matter by solid-state ¹³C-NMR spectroscopy. In G. Cadisch and K.E. Giller (ed), *Driven by Nature. Plant Litter Quality and Decomposition*. CAB International. Wallingford, 1997, pp. 253-271.
- [46] Schnitzer, M., H. Dinel, H.R. Schulten, T. Paré, and S. Lafond. Humification of duck farm wastes. In E.A. Ghabour and G. Davies (eds) *Humic Substances: Versatile Components of plants “Soil and Water”*. The Royal Society of Chemistry. 2000, pp. 20-34.

Chapitre 5 :

Structural characterization of humic acids, extracted from sewage sludge during composting, by Thermochemolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry

S. AMIR^a, M. HAFIDI^{a*}, L. LEMEE^b, G. MERLINA^c, GUIRESSE M^c, PINELLI E^c, J-C. REVEL^c, J-R. BAILLY^c, A. AMBLES^b

^a Unité Sol et Environnement (lab. Eco-Végétale), Faculté des Sciences Semlalia,
Département de Biologie. BP/2390, Marrakech, Maroc.

^b Laboratoire de Chimie XII, Université de Poitiers, 40 avenue du Recteur Pineau, Poitiers
86022, France.

^c Equipe Agronomie, Environnement et Ecotoxicologie (A2E), Ecole Nationale Supérieure
Agronomique, Auzeville-Tolosane, BP/ 107, Toulouse, France

*Corresponding author / e-mail : hafidi@ucam.ac.ma

Présentation :

Les substances humiques ont été décrites selon nombreuses études comme un squelette hétérogène, se composent d'une large variété d'unités moléculaires : polysaccharides; polypeptides; lignines; esters; phénols; éthers; carbonyles; quinones; lipids; peroxydes; benzène, acétal, ketal, lactol, furan, etc. Cette extrême variabilité de structure moléculaire de substances humiques est due au fait d'une variation de leur composition selon l'origine du substrat et les conditions environnementales sous lesquels ils sont formés. La voie chimique de transformation de matière organique brute aux substances humiques est très complexe et entraîne un nombre de réactions de dégradations et condensations encore non déterminées. L'objectif de ce chapitre est d'utiliser une technique qui permettra de comprendre les biotransformations produites au cours du compostage sur les unités moléculaires constitutives de substrat organique d'origine.

La Thermochemiolyse est connue comme une bonne méthode pour obtenir des informations détaillées sur les structures qui édifient les macromolécules organiques. Elle est basée sur une dégradation thermique des macromolécules humiques en différentes sous-unités qui sont par la suite isolées et identifiées. Nombreux auteurs ont employé cette technique pour développer d'avantage une meilleure compréhension de processus d'humification dans le sol en surveillant la biotransformation d'entités aromatiques dérivées de la lignine (Bracewell et al., 1980; Del le Rio et al., 1994; Schulten et al., 1996; Chefetez et al., 2000); aussi bien une caractérisation des acides humiques isolés de compost à différents degrés de maturité (Serés-Aspax et al., 1985; Miikki et al., 1999). Une technique destructive comme le couplage thermochemiolyse/ chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de Masse pourrait fournir ainsi une indication sur la composition moléculaire des substances humiques isolés du mélange boues résiduaires et paille à différents stades de compostage.

L'analyse est réalisée sur 2 mg d'acides humiques lyophilisés (HA) qui sont solubilisés par le chloroforme et mélangé avec 10 μ l de solution de méthanol contenant de tetramethyl ammonium hydroxyde (TMAH) (50 % (v/v)). Après évaporation de méthanol à 40° pendant 5 min, le résidu est transféré dans des tubes de quartz pour chauffage de 350 à 650°C (5°C msec⁻¹) et maintenu par la suite à 650°C pendant 10 s. Pour analyse, les produits de thermochemiolyse sont transférés par hélium au GC et GC-MS. Les composés sont identifiés sur la base de leur temps de rétention en GC et une comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des standards et les données obtenues de la littérature.

Les thermogrammes obtenues des acides humiques à différents stades de compostage sont présentés dans la figure 1. Le tableau 2 présente les composés identifiés par spectrométrie de masse correspondants aux principaux pics de thermogrammes.

Les principaux composés identifiés dans la première partie des thermogrammes sont des esters méthyliques de mono-, di- et tri-methoxy (alkyle)-benzène et acides benzoïques similaires aux produits d'oxydation de la lignine d'unités type para-hydroxyphényl, guaiacyle et syringyle. Il faut noter que les groupements méthoxyles pourraient correspondre soit aux entités qui existent dans la molécule d'origine ou celles introduites suite à la méthylation in situ. La deuxième partie de thermogrammes est composé d'une série d'acides gras C15, C16, C18:1, C18.

L'absence des autres structures tels les acides aminés, les polysaccharides peuvent être attribuer soit au fait de leur élimination suite à l'extraction préalable par l'eau donc ils constituent des unités non-structurales, et sont juste adsorbés sur le matériel humique. Ainsi que, cette technique peut être non sensible pour ce type de composés.

Une grande contribution de structures lignin-like peut être expliquer par leur résistance à la décomposition microbienne parmi tous les composés organiques lors du traitement des eaux usées dans la station d'épuration. Les acides gras C15, C16, C18:1, C18 sont souvent considérés des résidus de l'activité microbienne. Ainsi, les boues résiduaires sont formées essentiellement des tissus des organismes microbiens, algues, champignons morts et des composés organiques récalcitrants à la dégradation microbienne.

Au cours du compostage, le changement de la composition moléculaire des acides humiques a été déterminé en suivant les abondances relatives des sous-unités constitutives de leur pyrogramme à différents stades de traitement.

L'abondance relative «Pi» de chaque produit de pyrolyse d'AH est calculé par le rapport de la surface du pic correspondant à la somme des surfaces de tous les pics considérés significatifs dans le pyrogramme.

$$P_i = \frac{a_i}{\sum_1^n a_i}$$

a_i est la surface moyenne de chaque pic

Les données obtenues sont présentées dans la figure 2. Les résultats ont une diminution significative de proportion des dérivés méthylés type para-hydroxyphényl (28) syringyle (36), avec une augmentation progressive des dérivés méthylés de l'acide protocatéchique (30), aldéhyde gallique (35), acide gallique (38) et acide caféique (39). L'ensemble des

transformations produites suit la voie de biodégradation de la lignine qui implique une oxydation de chaînes latérales et après des réactions de déméthoxylation et hydroxylation, l'acide caféique constitue un produit intermédiaire et les acides protocatéchique, gallique constituent les derniers composés de la séquence de biotransformation de la lignine. Ces derniers composés contribuent à la formation de substances humiques suite à des réactions d'auto-polycondensation et/ou recombinaison avec les autres composés azotés. Ainsi, un suivi des sous unités de la lignine pourrait déterminer le stade d'évolution de structures organiques pour la formation des substances humiques. Au cours du compostage, se produit une diminution des dérivés type parahydroxyphényl et une augmentation de dérivés type guaiacyl et syringyle (telque acide protocatéchique, acide gallique) (figure 3). Ce qui indique sur une augmentation du degré d'oxydation avec le processus de compostage. Dans notre cas le rapport S/G n'a pas montré de changement significatif au cours du compostage et ne peut être utilisé comme indice déterminant le degré de condensation des structures au cours de ce processus.

Les acides gras montrent une augmentation après la phase de stabilisation soupçonnée originaire du développement des populations microbiennes au cours cette phase. La diminution après à la fin du processus est liée à la mort des populations microbiennes en fin du compostage en absence des conditions favorables tel l'aération et les nutriments facilement assimilables.

Ces observations sont en accord avec la formation des substances humiques au cours du compostage à travers une polycondensation des monomères déjà biotransformés par le métabolisme microbien que d'une simple altération des polymères initiales.

Ainsi, afin de déterminer le degré de décomposition de chaînes latérales de structures lignine et l'évolution de différents sous-unités de structures chimiques similaires, les différents composés méthylés de pyrolyse ont été groupés en 6 familles et sont suivis au cours du compostage : C6-C3 ou structures lignine-like (benzène avec chaîne latérale à 3 carbones); C6-C2 (benzène avec chaîne latérale à 2 carbones); C6-C1 (acides benzoïques), hydroquinones, composés azotés et acides gras (figure 4).

Le substrat organique initial est composé de 25-28 % de sous-unités C6-C1, une même proportion en acides gras; 13-17 % de C6-C3 ou C6-C2; 7-8 % d'hydroquinones ou composés azotés. Au cours du compostage, les structures humiques ont montré une diminution de proportions de composés C6-C3 ou lignin-like de 16,7 à 10,7 %, en parallèle avec une augmentation et prédominance principalement des composés C6-C1 en fin de processus qui atteint 34 %. En fait, l'augmentation de proportion de ces derniers composés C6-C1 comme

l'acide gallique et protocatéchique est lié à une dégradation de chaînes latérales des structures lignine-like C6-C3. Cependant, un phénomène de néosynthèse microbienne pourrait aussi avoir contribué pour donner lieu à ces grandes teneurs de composés C6-C1.

Pour évaluer l'importance des changements structuraux produits au cours du processus de compostage, deux indices ont été utilisés pour suivre la distribution de différents sous-unités de thermochemiolyse.

L'indice de Shannon-Weaver (Ish) permet de déterminer le degré de diversité à l'intérieur des polymères humiques. Cet indice est calculé selon la formule suivante:

$$Ish = - \sum_{i=1}^n P_i \log_2 P_i \quad 0.5 < Ish < 4.5$$

P_i est l'abondance relative de chaque produit de pyrolyse considéré.

Les structures du mélange initial présentent un grand indice d'environ 3,00 attribué à une grande hétérogénéité de structures organiques des boues utilisées. Au cours du compostage, l'indice reste relativement constant malgré une grande néoformation des AH (figure 5). Ceci indique sur une ressemblance et une continuité de leur mécanisme de formation lors du compostage. Aussi que une néoformation des AH à partir des sous-unités de structure chimique similaire.

L'indice de similitude S_{ij} compare deux pyrogrammes et fournit le degré de ressemblance entre la composition chimique des échantillons étudiés. Il est calculé selon la formule :

$$S_{ij} = \frac{\sum_{i=1}^n \min(P_i^k, P_j^k)}{n} \quad P_i^k < P_j^k$$

P^k est l'abondance relative de chaque produit de pyrolyse identifié dans les pyrogrammes i et j , n est le nombre des pics considérés.

Le degré de similitude S_{ij} est calculé entre un pyrogramme des acides humiques (AH) à chaque stade de compostage et celui du mélange initial (figure 6a). S'_{ij} est le degré de similitude entre deux pyrogrammes d'acides humiques (AH) à deux stades de compostage successifs (figure 6b).

Le degré de similitude $S_{0/1}$ entre le pyrogramme d'AH à 30 jours de compostage et le mélange initial présente une valeur de l'ordre de 0,76. Cette valeur est diminuée et se stabilise après à environ 0,68 en comparaison avec les autres pyrogrammes à 90; 180 et 270 jours. S'_{ij}

diminue à environ 0,63 entre les pyrogrammes à 30 et 90 jours de compostage. Cependant, il reste relativement constant en comparant les autres pyrogrammes : entre 90 et 180 jours, et entre 180 et 270 jours. Ces variations montrent un certain changement du taux de néoformation des acides humiques après la phase de stabilisation qui varie de la même façon après 3 mois de compostage (figure 5), indiquant la mise en place d'un processus d'humification et sa prédominance après ce stade de compostage.

Abstract :

Thermochemolysis coupled with gas chromatography and mass spectrometry were applied to determine the structure of humic acids (HA) extracted from a sewage sludge and straw mixture at different steps of composting. The starting material released various compounds such as mono-, di-, tri-methoxy (alkyl) benzene and (alkyl) benzoic acids presenting lignin like derivatives of p-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl units. In addition, other aromatic non-lignin derived structures were found along with series of branched C15, linear C16, C18 fatty acid methyl esters. The follow-up of various lignin-derived units during composting shows a decrease in p-hydroxyphenyl type-compounds (P) after the stabilisation phase. In parallel the more oxidized units, derived from guaiacyl (G) and syringyl (S) units, corresponding mainly to methylated derivatives of caffeic acids, protocatechuic acids, gallic acids and aldehydes, significantly increased in comparison with the other aromatic structures. Various ratios commonly used as parameters to determine the degree of lignin decomposition during humification were followed to monitor the chemical structure changes of the starting material during composting. In the present case, the S/G ratio did not present significant changes during composting. The acid/aldehyde ratio was supervised using the ratio of gallic acids to gallic aldehyde methylated derivatives and showed an increase from 0.73 to 2.13 after the stabilisation phase but a decrease to 0.93 at the end of composting. This evolution may be explained by the increase of acid-containing derivatives following the intense oxidation of lignin side-chains during the stabilisation phase. But, the decrease of the acid/aldehyde ratio during the maturation phase could be attributed to a decrease in acid units by polymerisation of benzoic acid type-compounds through ester/ether linkages. The follow up of six families of compounds of similar chemical structures during composting showed a decrease of lignin-type compounds C6-C3 and that C6-C1 units predominated in the humic acid isolated from end compost sludge. The fatty acid methyl esters showed an increase in the intermediate

phase of composting probably originating from the activities and tissues of microorganismes, which are very numerous during the process. The final decrease in fatty acids may be explained by the death of most of the microbial population at the end of composting typified by a low respiratory rate. The index of Shannon-Weaver (Ish) remained constant at about 3 in course of composting indicating the neoformation of HA from subunits of similar chemical nature. A similitude index (Sij, S'ij) showed a split between 30 and 90 days of composting indicating a change in the rate of neoformation of HA after a stabilisation phase. Afterwards, the rate of HA neoformation varied linearly with the duration of composting.

Key words : Thermochemolysis/GC/MS coupling, sludge composting, humic acids, benzenecarboxylic acid units, condensation, lignin degradation, fatty acids.

1. Introduction

Composting of organic waste has become widely developed to yield a product that provides more fertilization and is safer than the starting material for agricultural recycling. This aerobic thermophilic biotreatment leads to the biotransformation of raw organic matter into a more stable product, rich in humic substances. The amounts and chemical structure of the humic material constitute, according to numerous studies, the main indices for assessing the stability and maturity of the compost (Garcia et al., 1992; Ouattmane et al., 2000; Tomati et al., 2000). The humic substances play a fundamental role in conditioning soil properties, since they are directly involved in the slow release of nutrients, high cation exchange capacity, pH, buffer capacity and heavy metals and xenobiotic organic molecule retention (Senesi et al., 1996). However, the actual structural of humic material is still controversial (Deleew and Largeau, 1993; Lichtfouse et al., 1998). Some studies suggest the predominance of aromatic units in humic substances, whereas other groups have shown that many humic extracts contain largely aliphatic structures. Many factors could cause these contradictions such as the origin of the humic material, the extraction technique, the purification method and the analysis techniques (Gonzalez-Vila et al., 1983). Previous works using FTIR and ¹³C-NMR spectroscopy to study changes in the chemical structure of humic acids (Amir et al., 2004 a) and fulvic acids (Amir et al., 2004 b) isolated from composted sludge at different degree of maturity, showed the presence of abundant etherified/ esterified aromatic structures by intense bands around 1600 and 1140 or 1034 cm⁻¹ in FTIR spectra and a strong and

persistent ¹³ C-NMR signal, at different stages of composting, around 56, 74 and 174 ppm corresponding to ether and ester bonds. The thermochemolysis technique has proved to be a good method to obtain detailed structural information on the building blocks of organic macromolecules. It is based on the thermal break down of humic macromolecular into various subunits; which are subsequently isolated and identified (Bracewell et al., 1980, Schulten et al., 1996). In contrast to simple pyrolysis, this chemolytic procedure hydrolyses and methylates ester and ether linkages, and assists in the depolymerisation and methylation of lignin or other organic structures (Martin et al., 1995; Filley et al., 1999). Moreover, the procedure avoids decarboxylation and produces the methyl esters of carboxylic acids and methyl ethers of hydroxyl groups, rendering many of the polar products volatile enough for GC analysis (Chefetz et al., 2002). Numerous authors have used this chemical approach to develop a better understanding of how humification occurs in soil by following the biotransformation of aromatic entities from lignin derivatives (Del Rio et al., 1994; Chefetz et al., 2000); as the approach has also been used to characterize humic material isolated from compost at different degrees of maturity (Miikki et al., 1999). Hatcher and Clifford (1994) and del Rio et al. (1994) have shown that the TMAH thermochemolysis of HA in soil yields monomethoxy, dimethoxy, and trimethoxy benzenecarboxylic acid methylesters and fatty acid methyl esters. Chefetz et al. (2000) showed that the ratio of syringyl to guaiacyl compounds (S/G) decreased suggesting a preferential degradation of the syringyl units by micro-organisms, and explained this by humification with increasing depth. Del Rio and Hatcher (1994) suggest the formation of benzenecarboxylic acid moieties during the coalification process. Miikki et al. (1999) observed, with increasing maturation time in the course of composting, an increase in the relative amounts of alkylbenzenes and a decrease in the relative amounts of alkylphenols. Veeken et al. (2000) showed that during composting, there was an increase of aromatic compounds mainly methoxy-phenols with respect to other compounds suggesting an increased solubility of lignin. These authors report the significant contribution of fatty acids C16, C18:1, C18 to the humic acids of biowaste compost. Miikki et al. (1999) and Réveillé et al. (2003) reported also that fatty acids constitute an important fraction in the pyrograms of the humic acids in sewage sludge even on exhaustively pre-extracted samples. These entities could have a positive effect on soil by influencing the water retention capacity, the structural stability and the biodegradation-humification balance in amended soils. However, they could be unfavourable in large quantities and induce phytotoxicity problems (Gonzales-Vila et al., 1999). Numerous authors show that part of these fatty acids seem to be bound chemically to the macromolecular structure network of HA

because they are not recovered in the lipid extract (Grasset and Amblès, 1998; Gobé et al., 2000; Grasset et al., 2002; Réveillé et al., 2003). They explained this, either by the fact that solvent extraction was not complete, only partial removal of lipids from HA being allowed, or that these lipids were more difficult to extract. Réveillé et al. (2003) suggested that even with additional lipid extraction carried out directly on the purified humic acids, some lipids would remain associated with humic acids by covalent bondings or by simply being trapped in their structure. Grasset et al. (2002) used TMAH and tetraethylammonium acetate (TEAAC) to discriminate between free and esterified fatty acids for a better understanding of the humification process and the capacities of soils to retain or release auto-chthonous or allochthonous (xenobiotic) compounds. Accordingly, considering their importance as entities tightly trapped within humic structures or cross-linked through ester bonds in the matrix, the removal of lipid could destroy or disturb cross-linking bounds between molecular units and thus some entities may become more easily released through pyrolysis from molecular structures leading to an overestimation of their presence compared to others. In this work, we used TMAH-GC-MS analysis to follow during composting the structural changes of the units making up the humic acid structure as a whole, without previous or later lipid removal.

2. Material and methods

2.1. Composting

Sewage sludge was taken from an anaerobic lagoon in an experimental wastewater treatment plant. Composting of a fresh sewage sludge (90 %) and straw (10 %) mixture at 54 % of moisture was followed over 270 days on a composting platform. To provide aerobic conditions, the mixture was turned every 2 weeks. Some preliminary physical-chemical characteristics of compost at different stages of treatment are illustrated in Table 1 : (RM = initial raw mixture; after 30 days “stabilization phase”; 90; 180; 270 days of composting “maturation phase”).

Table 1. Change of some physicochemical characteristics of sewage sludge and straw mixture during composting

| Stages of composting (days) | pH | O.C. % ^a | NTK% | C/N | DEC % | ash % ^a |
|-----------------------------|-----|---------------------|------|------|-------|--------------------|
| RM | 7.3 | 17.7 | 0.74 | 24.0 | / | 65.9 |
| 30 | 7.4 | 16.2 | 0.76 | 21.4 | 20.0 | 70.7 |
| 90 | 6.8 | 15.0 | 0.81 | 18.5 | 36.5 | 75.3 |
| 180 | 6.7 | 14.3 | 0.87 | 16.4 | 40.0 | 76.3 |
| 270 | 6.8 | 13.5 | 0.88 | 15.2 | 41.5 | 76.8 |

Results expressed by dry weight
O. C. : Organic carbon NTK : Total Kjeldahl Nitrogen DEC : Decomposition rate

2.2. Humic extraction

To extract humic substances (HS), fresh sample (30 g) was firstly washed three successive times with 40 ml of H₂O to remove non-humic, water-soluble substances (sugars, proteins), and so avoid interferences between these molecules and humic compounds (Bernal et al., 1996). The extraction was then carried out on a pre-treated sample with 40 ml of 0.1 N NaOH. Extraction was repeated several times until colourless supernatants were obtained. Centrifugation is then done at 4000g for 15 min. The filtered solutions were then acidified with 3 N H₂SO₄ until pH 2 and kept for 24h at 4°C. The precipitates, or humic acids (HA) were separated from the fulvic acids (FA) remaining in solution and then dissolved in 0.1 N NaOH. The HA fraction was dialyzed with a 1000 Da Spectra Por membrane to eliminate excess salts, and then was freeze-dried. The HA dosage were assayed by KMnO₄ oxidation (Chaminade, 1944).

2.3. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry

About 2 mg of freeze-dried humic acids (HA) were dissolved in chloroform and mixed with 10 µl of a methanol solution containing 50 % (w/w) of tetramethyl ammonium hydroxide (TMAH) (Aldrich). The samples were then heated for 5 min. to 40°C to evaporate the methanol. The remaining solid was transferred to 25 x 1.9 mm (i.d.) quartz tube filled with quartz wool.

The tube was then heated from 350 to 650°C at 5°C msec⁻¹ and maintained at 650°C for 10 s. Thermochemolysis products were carried into the GC or the GC-MS by a flow of He gas.

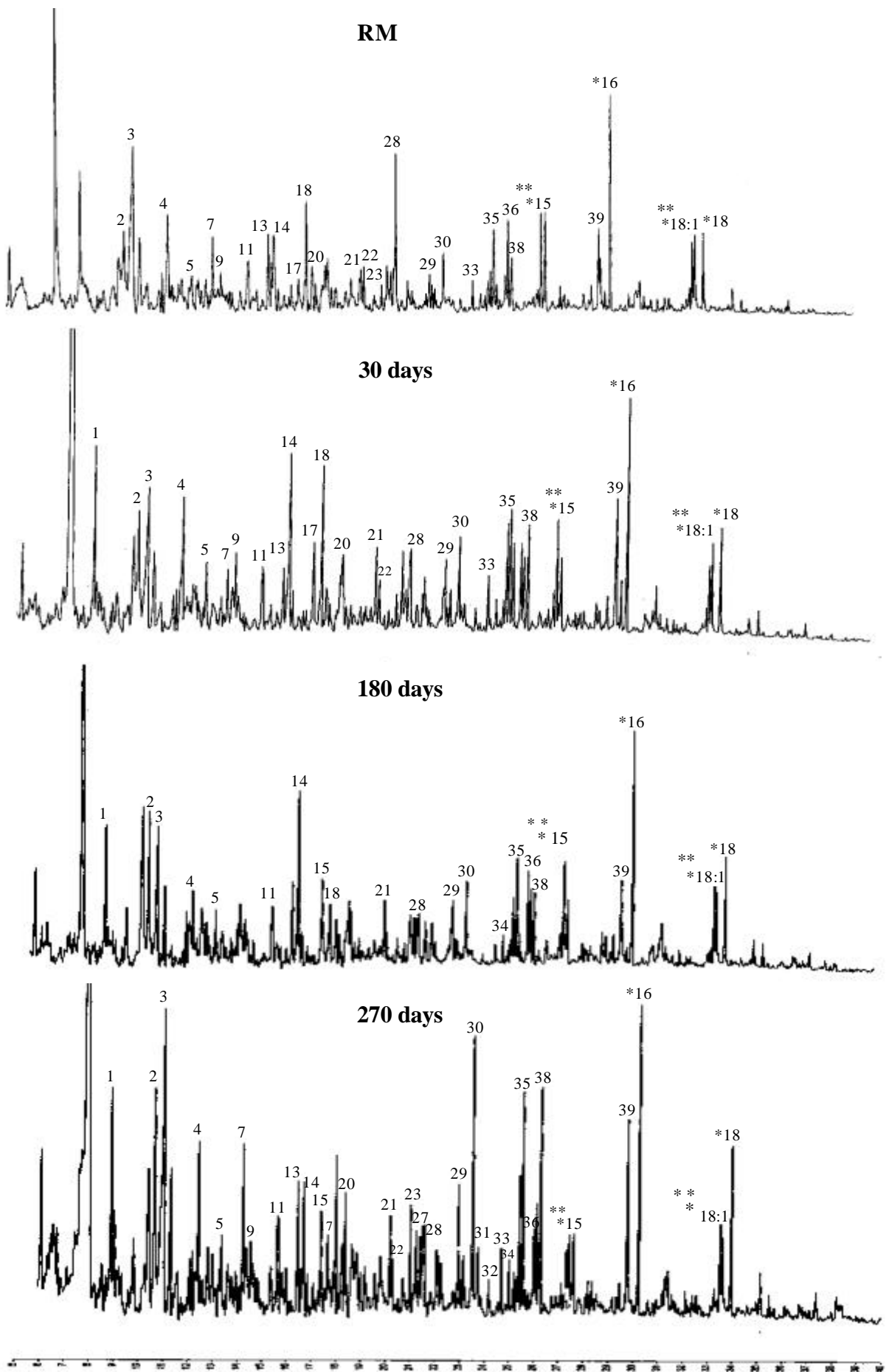
GC separations were done on a Varian 3900 gas chromatograph using a BPX (SGE) capillary column (30 m long, 0.25 mm i.d.). Column temperature was programmed from 60 to 300°C at 5°C.min⁻¹ and held at 300°C for 30 min. GC-MS analysis was performed in similar conditions on a Varian 3400 chromatograph coupled with a Finigan Incos 500 mass spectrometer. The compounds were identified on the basis of their GC retention times and by comparisons of their mass spectra with standards and data from the literature.

3. Results and Discussion

The chromatograms of TMAH-GC/MS of the humic acids (HA) isolated at different stages of composting are illustrated in Fig. 1. Table 2 lists the main compounds identified in the chromatograms, which can be classified into the following major groups: lignin derived and non-lignin derived aromatic compounds, heterocyclic N-containing compounds, fatty acid methyl esters (FAMEs). The TMAH thermochemolysis of HA at different stages of composting yielded various compounds: mainly mono-, di- and tri-methoxy (alkyl)-benzenecarboxylic acid methyl esters. These entities seem to present oxidized degradation products derived from lignin as methylated p-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl units. It should be noted that the methoxyl groups detected could correspond to the methoxyl groups originally present in the molecule or to free hydroxyl groups that become methylated after pyrolysis methylation.

Besides these lignin-derived structures, there are other non-lignin aromatic structures and series of FAMEs composed of branched iso and anteiso C15, C18:1 and linear C16, C18 (fatty acid peaks are labelled by star (*)). These fatty acids have often been shown to predominate amongst homologous series of fatty acids in HA (Hatcher and Clifford., 1994; Martin et al., 1995; Réveillé et al., 2003).

The nitrogen-containing structures are mainly present as heterocyclic compounds such as indol. But, the presence of other unknown aliphatic nitrogenic structures (7) should be mentioned. The heterocyclic structure could originate from biological precursors such as plant and microbial residues. However, the absence of amino acids or other peptide compounds could be explained this, by their intermolecular condensation to form heterocyclic structures as indol under pyrolysis conditions (Chiavari and Galletti, 1992; Knicker and Hatcher, 1997; Hendricker and Voorhees, 1998).



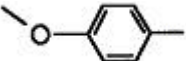
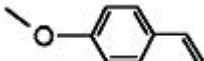
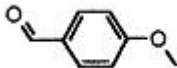
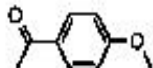
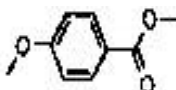
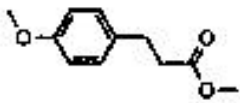
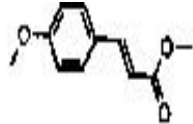
* fatty acids

Figure 1. Thermochemolysis-Gas Chromatogram of humic acids of sewage sludge during composting.

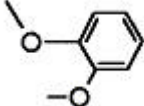
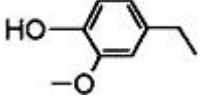
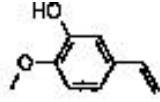
Table 2. List of the main aromatic compounds related to peaks presenting significant surface area in the chromatograms obtained from thermochemolysis of humic acids of sewage sludge during composting.

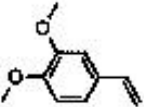
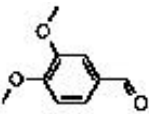
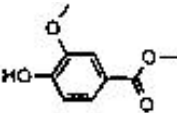
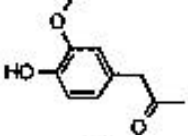
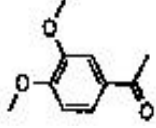
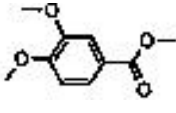
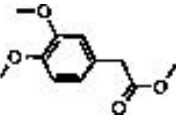
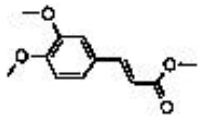
Lignin-derived compounds

Compounds derived from p-hydroxyphenyl structures

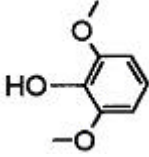
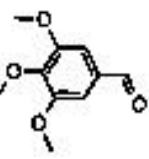
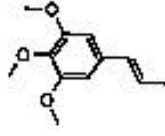
| | | |
|----|---|--|
| 1 |  | 4-methoxytoluene |
| 4 |  | 1-methoxy-4-vinyl benzene |
| 10 |  | 4-methoxybenzaldehyde |
| 19 |  | 4-methoxy acetophenone |
| 20 |  | 4-methoxybenzoic acid, methyl ester |
| 28 |  | 3-(4-methoxyphenyl)-2-propanoic acid, methyl ester |
| 37 |  | 3-(4-methoxyphenyl)-2-propenoic acid, methyl ester |

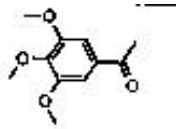
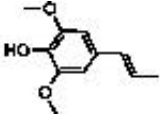
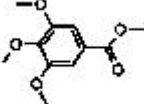
Compounds derived from guaiacyl structures

| | | |
|----|---|-------------------------|
| 6 |  | 1, 2-dimethoxybenzene |
| 12 |  | 4-ethyl-2-methoxyphenol |
| 17 |  | 2-methoxy-5-vinylphenol |

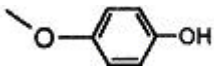
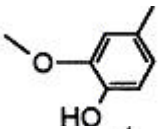
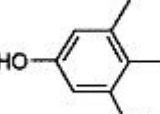
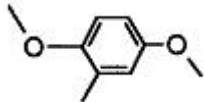
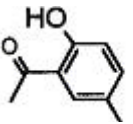
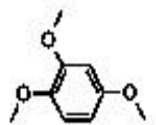
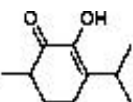
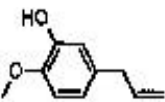
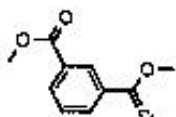
- 18  3, 4-dimethoxy-styrene
- 23  3,4-dimethoxybenzaldehyde
- 26  4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid methyl esters
- 27  1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propan-2-one
- 29  1-(3, 4-dimethoxyphenyl)-ethanone
- 30  3,4-dimethoxybenzoic acid methyl ester
- 32  2-(3,4-dimethoxyphenyl)-ethanoic acid methyl ester
- 39  3-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propenoic acid methyl ester

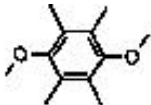
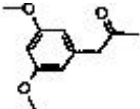
Compounds derived from syringyl structures

- 15  2,6-dimethoxyphenol
- 31  3,4,5-trimethoxy benzaldehyde
- 33  1, 2, 3-trimethoxy-5-propenylbenzene

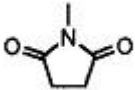
- 35  3, 4, 5-trimethoxyacetophenone
- 36  2,6-dimethoxy-4-propenylphenol
- 38  3,4, 5-trimethoxybenzoic acid methyl ester

Other non-lignin derived compounds

- 2  4-methoxyphenol
- 5  2-methoxy-4-methylphenol
- 8  4,5-dimethoxybenzene-1,3-diol
- 9  1,4-dimethoxy-2-methylbenzene
- 14  2-hydroxy-5-methylacetophenone
- 16  1,2,4-trimethoxybenzene
- 21  2-hydroxy-3-isopropyl-6-methylcyclohex-2-enone
- 22  5-allyl-2-methoxyphenol
- 24  isophthalic acid, dimethylester

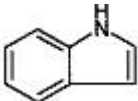
- 25  1,4-dimethoxy-2,3,5,6-tetramethylbenzene
- 34  1-(3,5-dimethoxyphenyl)-propan-2-one

Nitrogen-containing compounds

- 3  1-methyl-2,5-pyrrolidinedione

- 7 unidentified aliphatic N compounds
7

- 11  1-methyl-1H-indol

- 13  1H-indol

Fatty acids methyl esters

- *15 : iso Pentadecanoic acid, methyl ester
- **15 : anteiso Pentadecanoic acid, methyl ester
- * 16 : hexadecanoic acid, methyl ester
- * 18:1 : iso octadecenoic acid, methyl ester
- **18:1 : anteiso octadecenoic acid, methyl ester
- * 18 : octadecanoic acid, methyl ester

The non-detection of carbohydrates and polysaccharides may be attributed to that they are not structurally humic compounds and they are only physically adsorbed, which leading to their easy removal by the first water extraction step (Schnitzer, 1972). Some authors suggest that the lack of carbohydrate-derived peaks in the TMAH chromatogram is due to poor sensitivity of this technique to carbohydrates (Clifford et al., 1995). Recently, Fabbri and Helleur (1999) reported that TMAH thermochemolysis of cellulose and starch yields 1, 2, 4-trimethoxybenzene (compounds labelled 16).

Accordingly, humic acids isolated from sludge compost are composed of heterogeneous structures. In fact, the sludge material originates from various residues carried by domestic, industrial, and agronomic liquid-waste effluents and other sources. Similar observations have been reported by Garcia et al. (1992) who show that gas chromatogram features of products methylated after persulfate and alkaline permanganate oxidation of HA isolated from uncomposted and composted mixtures of sludge and grape debris are mainly composed of linear n-fatty acids and phenolic acids such as methoxy-, dimethoxy- and trimethoxy-benzoic acids.

The presence of fatty acids C15, C16, C18:1, C18 is often attributed to residues from microbial activity (Neirop et al., 1999; Chefetz et al., 2002). The high contribution of lignin-like compounds may be explained by the fact that, of all the organic compounds present in organic waste, they are the most resistant to microbial degradation during wastewater lagooning. Since, lagooning sludge consists mainly of components of dead algae, fungi and micro-organisms and material recalcitrant to microbial degradation.

During composting, the proportion of structural units varies between the chromatograms at different steps of composting and more oxidized lignin-derived units prevail at the end of process. Thus, it is important to follow the chemical transformation of lignin by-products since they are subject to humification and they can become incorporated into the macromolecular structure of HS. Accordingly, structural changes of HA during composting were followed through comparison between the relative abundances of the subunits making up their chromatograms at different stages of composting. The relative abundance «Pi» of each pyrolysis product from HA is calculated as the ratio between the area of the corresponding peak to the sum of areas of all the peaks considered in the pyrograms (Ayuso et al., 1996).

$$P_i = \frac{a_i}{\sum_1^n a_i}$$

a_i is the area of each peak in the pyrogram

The relative abundance of various pyrolysis products released from HA are presented in Fig. 2. The follow-up during composting of fatty acid methyl esters shows an increase, after the stabilization phase, mainly of branched C15, linear C16 and C18 fatty acids, which then

decreased at the end of composting. Concerning the aromatic compounds, there was a significant decrease in the proportion of methylated p-hydroxyphenyl derivatives (28) and also of syringyl derivatives (36), with the progressive increase in the proportion of methylated protocatechuic acid (30), gallic aldehyde (35), gallic acid (38) and of caffeic acid (39).

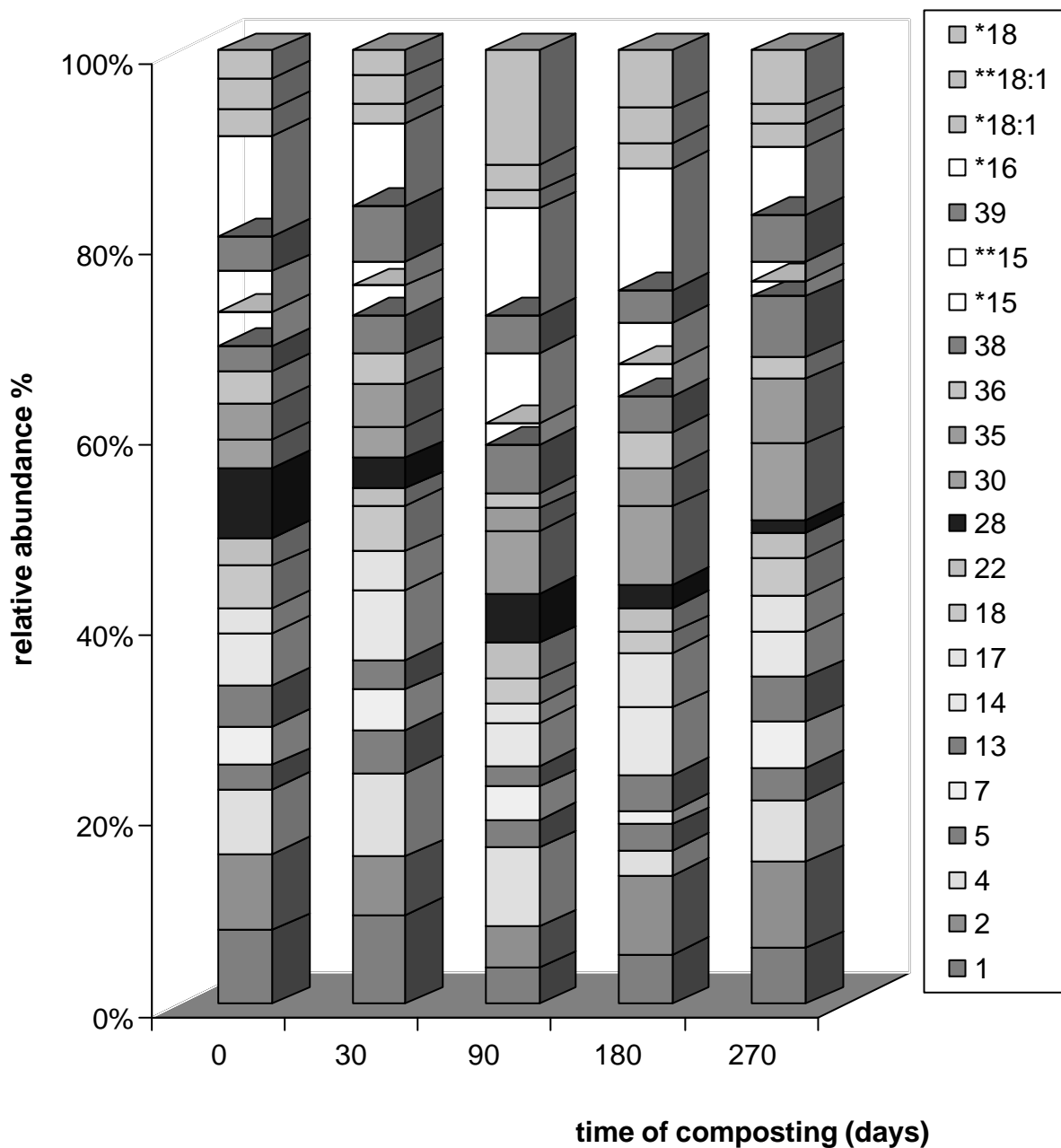


Figure 2. Changes of the relative abundance of main products thermally released from humic acids (HA) of sewage sludge at different stages of composting.

These transformations of lignin-like structures during composting are consistent with those of the pathway proposed by Martin and Haider (1971) for the production of polyphenolic acids

such as protocatechuic acid and gallic acid from biotransformations of coniferyl alcohol or *p*-hydroxycinnamyl alcohol by three fungi of Imperfecti group (*E. nigrum*, *S. atra*, and/or *A. sydowi*) during lignin biodegradation. Lignin side chains are oxidized and methoxy groups removed or hydroxylation occurs, resulting in an increase of more oxidized polyphenolic acids. The protocatechuic acid and gallic acid derivatives always constitute the last lignin-degradation product leading to the formation of humic substances following self-polycondensation and/or combination with other nitrogen-containing compounds, while caffeic acid (39) constitutes the intermediate products during lignin biodegradation (Flaig, 1964; Martin and Haider, 1971).

Therefore, to understand the humification process, recently, numerous authors have monitored lignin decomposition and its structural changes by following various indexes. Chefetez et al. (2000) use the S/G ratio (syringyl to guaiacyl) as a parameter to gauge evolution based on the assumption that condensed lignin G-type units are more resistant to biological degradation than lignin with a larger proportion of methoxyl groups. These authors report that the S/G ratio decreases suggesting preferential degradation of syringyl units by micro-organisms. In our case, the S/G ratio did not present significant changes, it decreased from 0.59 to 0.49 in the intermediate step of composting and increased to 0.66 at the end of the process. The follow up of various lignin-derived units shows a decrease of *p*-hydroxyphenyl type-compounds after 30 days of composting, while in parallel the guaiacyl and syringyl units significantly increase at the end of process (Fig. 3).

Guaiacyl and syringyl units both show only a slight decrease at the beginning of the maturation phase. Indeed, the increase of guaiacyl and syringyl units at the end of composting is in agreement with strong production of protocatechuic acid and gallic acid derivatives during composting.

In fact, other authors such as Guggenberger et al. (1994) and Chefetez et al. (2002) base their reasoning on the theory of side-chain oxidation of lignin structures as one of the major humification processes. They have reported that a decrease in the content of lignin compounds and an increase in the acid/aldehyde ratio occurs with humification in the soil. Hatcher et al. (1995) also suggested that benzenecarboxylic acids in TMAH products are predominantly derived from lignin units during wood decomposition, where the α -C of the side chain has been oxidized to a carboxyl group.

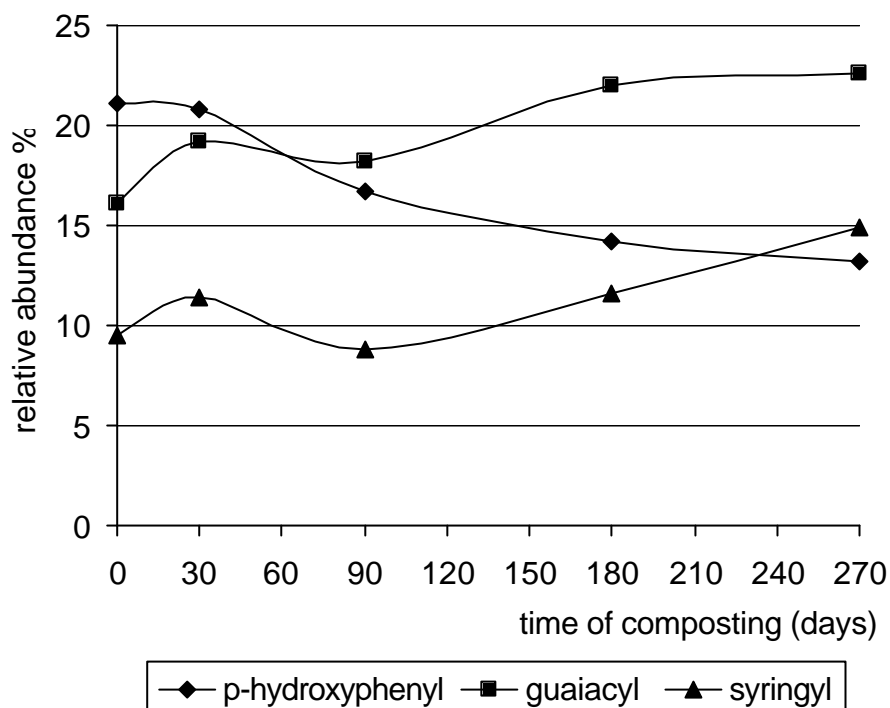


Figure 3. Evolution of various lignin-like derived units in humic acids of sewage sludge during composting

The ratio of acid-containing derivatives to aldehydes containing derivatives (acid/aldehyde ratio) is commonly used to assess the stage of lignin degradation. High acid/aldehyde ratios represent an advanced stage of lignin side-chain oxidation by microorganisms. In the present study, using the ratio of gallic acids (38) to gallic aldehydes (35) methylated derivatives showed an increase from 0.73 to 2.13 after the stabilisation phase and decreased to 0.93 at the end of composting. This evolution is in agreement with the increase of acid-containing derivatives following the intense oxidation of lignin side-chains during the stabilisation phase. But, the decrease of the gallic acid to aldehyde ratio during the maturation phase could be attributed to a decrease of acid units by polymerisation of benzoic acids compounds through ester/ether linkages. The later mechanism was previously proposed in numerous studies involving the formation of humic substances (Gonzalez-Vila et al., 2001; Amir et al., 2004a; Hafidi et al., 2004). However, according to some authors, caution must be taken when using the acid/aldehyde ratio in TMAH pyrolysis as a measure of lignin degradation (Tanczos et al., 1999). They show that aldehydes can undergo a Cannizzaro reaction (disproportion/methylation) producing their corresponding carboxylic acids.

Therefore, to determine the degree of decomposition of the side-chains of lignin structures and the evolution of compounds with similar chemical structures, in this study six families are grouped from various pyrolysis products released from humic acids at each steps of composting (Fig. 4): C6-C3 (3 carbons in side-chain of aryl unit); C6-C2 (2 carbons in side-chain of aryl unit); C6-C1 (benzoic acids compounds), hydroquinones, nitrogenous structures and fatty acids.

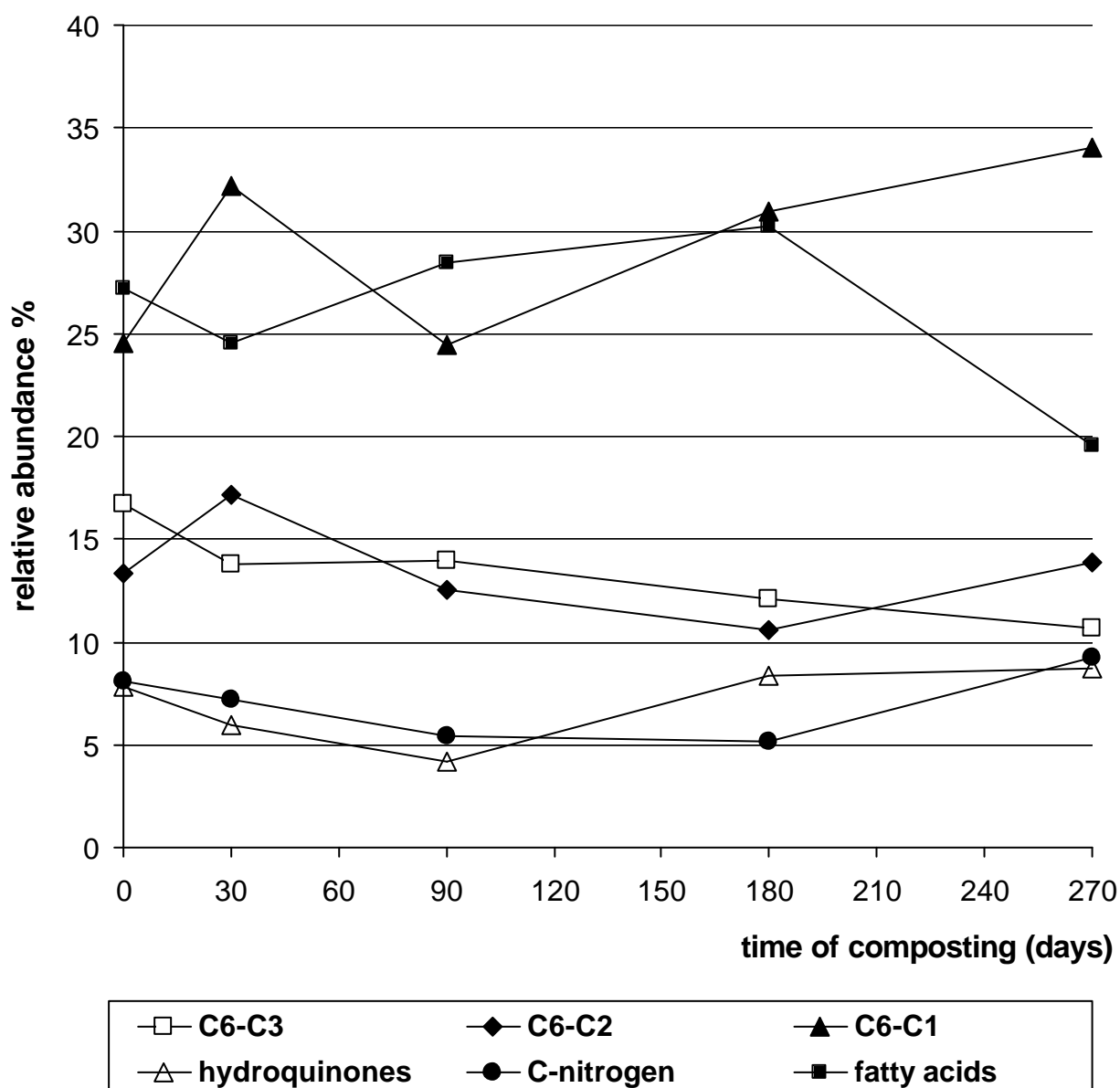


Figure 4. Changes of six structural groups composing thermochemolysis products released from humic acids of sewage sludge during composting

The initial organic material was composed of 25-28 % of C6-C1 units, the same proportion of fatty acid methyl esters; 13-17 % of each C6-C3 or C6-C2; 7-8 % of hydroquinones and similarly the nitrogenous compounds. During composting, the humic structures show a decrease in the proportions of C6-C3 or lignin-like compounds from 16.7 to 10.7 %, in parallel C6-C2 and mainly C6-C1 compounds tend to increase during composting. The increase in the proportions of the latter groups was partly related to the microbial decomposition of the side-chains (C3) of lignin-like compounds C6-C3. However, the decrease recorded mainly in both groups C6-C2 and C6-C1, and hydroquinone and nitrogen compounds that occurred at the beginning of the maturation phase may be attributed to their adsorption to cells of the mesophilic micro-organisms, which proliferate in this step of composting. According to Varadachari and Ghosh (1984), lignin is first degraded by extracellular enzymes to smaller units, which are then adsorbed into microbial cells where they are partly converted and discharged into the surrounding medium where they polymerise.

In the final stage of composting, the predominant compounds were the C6-C1 unit-like, which rose from 24.5 % to 34 %. The hydroquinones and nitrogenous structures did not show significant increases in comparison with the initial amounts. As reported above, the C6-C1 compounds such as methylated protocatechuic acid and gallic acid derivatives constitute the last subunits yielded from the biotransformation of lignin compounds and leading through autopolycondensation or recombination with nitrogenous structures to the neof ormation of humic acids during composting. The great increase in the proportion of these units during composting could be also partly attributed to microbial neosynthesis rather than only to the biotransformation of lignin structures.

The fatty acids present within the humic acid structures, can be divided into the unbound or “free” lipids, lipid components that are physically or otherwise strongly trapped within the macromolecular network, and finally those that are cross-linked to the matrix through ester bonds. During composting, the relative abundance of total fatty acids decreased from 27.2 % to 19.54 %. This variation could be explained by their decrease following the decomposition during the stabilisation phase of plant and animal residues present in the original waste. However, the increase in the amount of fatty acid in the intermediate step could originate from algal and microbial activity, which intensely developed during composting. The final decrease may be attributed to the death of most microbial populations at the end of the composting process (Hatcher et al., 1981).

In summary, all the above observations support the formations of humic substances during the course of composting through polycondensation of monomers already biotransformed during

microbial metabolism rather than just strict biodegradation of starting polymers. The microbial populations that developed during composting used the starting organic material as a source of energy. The microbial metabolism probably involved β -keto-adipate where protocatechiuc acid and catechol are the two main probable entrance points for opening the aromatic ring (Stanier and Ornston, 1973; Bailly and Raboanary, 1985). The polyphenols arising from oxidation or microbial biotransformation of starting materials, could be subjected to ultimate microbial decomposition producing CO_2 and H_2O . Alternatively, a great part of these polyphenols may undergo recombination, either alone or with other metabolites (amino acids and peptides). Therefore, the data obtained here support the notion that the humification process occurring during composting follows a polyphenolic model. The relative importance of sources of polyphenolic acids C6-C1 units from degradation of starting organic wastes or from microbial neosynthesis is unknown.

However, the continued presence of lignin materials in the humic acids and the high levels of production of benzenecarboxylic acids show that oxidative degradation acts partly on side chains and monomers linked to or adsorbed to a macromolecular starting polymer. In contrast, if microbial oxidation acts on free monomers, a great part of the monomers would be ultimately subjected to decomposition and few benzenecarboxylic acid derivatives would be produced. Saiz-Jimenez et al. (1989) attributed the greater part of poly-methoxy-phenol, -and hence lignin residues- in the pyrolysis product of HA to the incomplete degradation or selective preservation of grass lignin during earthworm composting.

Veeken et al. (2000) suggest that the main route of HA formation during composting of biowaste is most likely the degradation pathway (lignin theory). But, the significant contribution of condensation route (or polyphenol theory) is, according to these authors, also possible following the increase of solubility of lignin- and polyphenol-derived compounds, as well as the appearance of N-type compounds in the HA fraction after 35 days of composting.

Thus, oxidized lignin-derivatives always constitute the “core” of humus, mainly for material in which microbial decomposition is still incomplete or not sufficiently advanced.

To assess the importance of structural changes that occur during composting, two indices were applied to follow the distribution of various pyrolysis subunits.

The index of Shannon-Weaver (Ish) indicates the degree of diversity inside the humic polymer. This ecological index is usually used to express the degree of organisation of an ecosystem. Low values correspond to low diversity, while a high index corresponds to a complex system. This index has been used by Alcaniz et al. (1983) and Ayuso et al. (1996) to examine the organisation of organic compounds in soil and humic acids. Alcaniz et al. (1983)

suggest that a high diversity index I_{sh} in soil implies that the abundance of fragments is quantitatively equal, while a low index indicates the existence of a selective process. Ayuso et al. (1996) show that the low I_{sh} seen in the leonardite soil pyrogram must be due to a selective process such as oxidation followed by humification. This index is calculated as follows:

$$I_{sh} = - \sum_1^n P_i \log_2 P_i \quad 0.5 < I_{sh} < 4.5$$

where P_i is the relative abundance of each pyrolysis product considered. The results show a high index of about 3.00. This may be related to the great heterogeneity of the organic material making up sludge compost. During composting, the index value remains relatively constant in spite of a high neoformation of humic acids during composting (Fig. 5). This shows the resemblance and continuity of the same mechanism of their neoformation during composting, plus their neoformation from subunits of similar chemical nature (Amir et al., 2003).

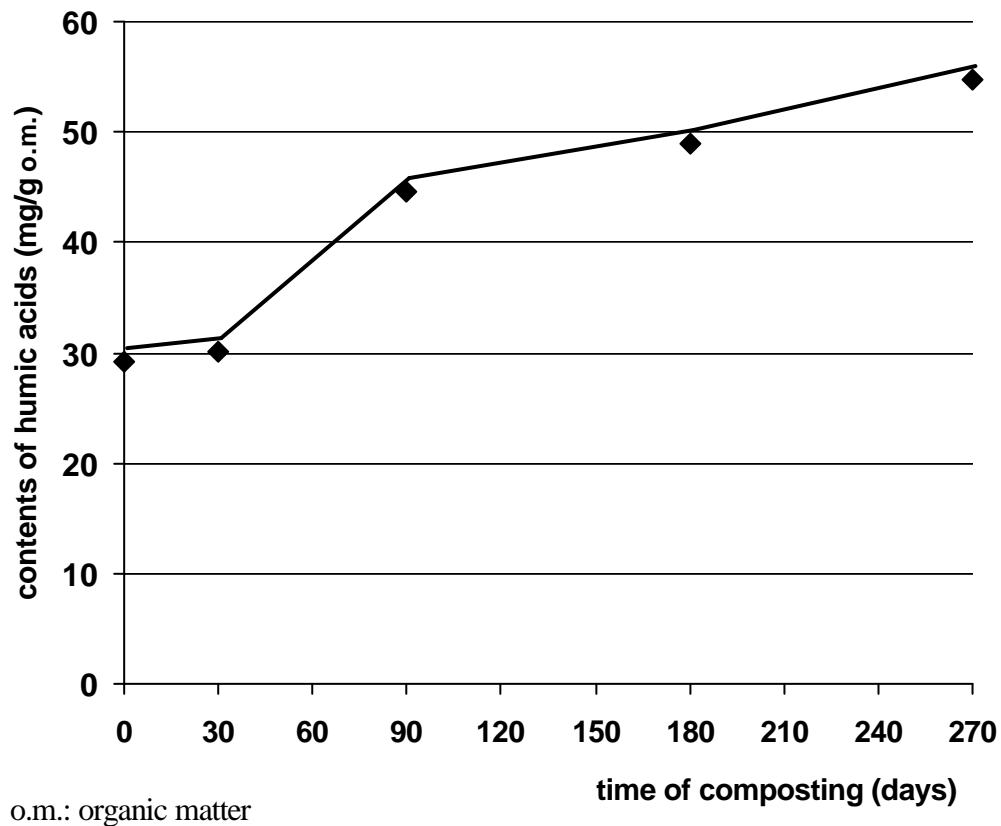


Figure 5. Contents of humic acids isolated from sewage sludge during composting

A similitude index S_{ij} compares two pyrograms and gives the degree of resemblance between their chemical-structural compositions. This index has been used by Ceccanti et al. (1986) and Ayuso et al. (1996) to determine the degree of similarity between two pyrograms of different organic materials (soil, compost, sewage sludge...). It is calculated as follows:

$$S_{ij} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{P_i^k}{P_j^k}}{n} \quad P_i^k < P_j^k$$

P^k is the relative abundance of the subunits making up the i and j pyrograms considered, n is the number of peaks.

S_{ij} is the degree of similitude between the pyrogram of humic acids (HA) at each stage of composting and their pyrograms at the start of composting (Fig. 6a). S'_{ij} is the degree of similitude between two pyrograms of humic acids (HA) at successive stages of composting (Fig. 6 b).

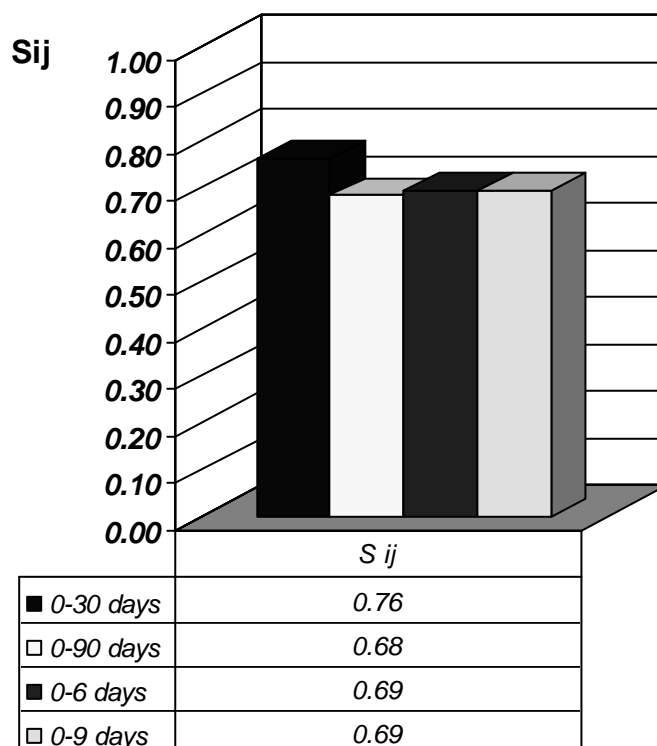


Figure 6a. Similitude index between thermochemolysis chromatogram of humic acids at each stage of composting and the chromatogram at start of composting.

$S_{0/1}$ between pyrograms of HA at 30 days of composting and of the initial mixture before composting (RM) shows a great value of about 0.76. The index value then decreased and remained constant near 0.68 in comparison with each pyrogram of the other stages of treatment 90; 180 and 270 days with the pyrogram of the initial mixture before composting (RM).

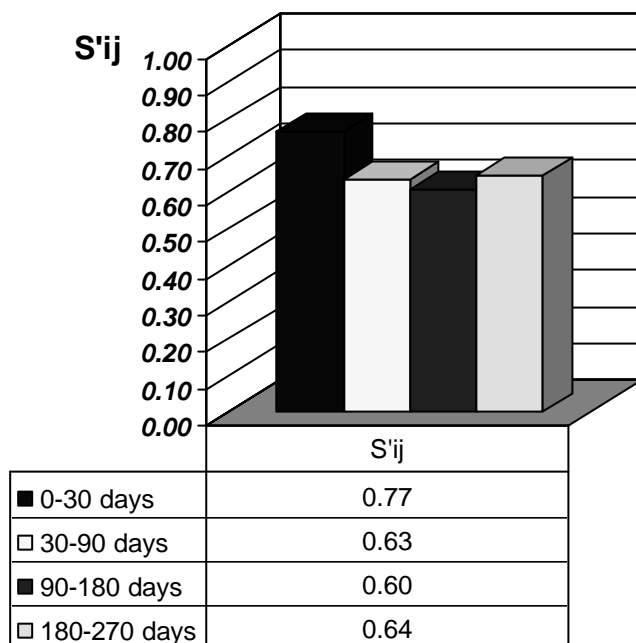


Figure 6b. Similitude index between two thermochemolysis chromatograms of humic acids at successive stages of composting.

S'_{ij} decreases to about 0.63 between pyrograms at 30 and 90 days of composting. But, remains relatively constant in comparison between pyrograms of other successive stages, between 90 and 180 days and between 180 and 270 days of treatment. All these changes show a split between 30 and 90 days of composting indicating some change in the rate of neoformation of HA after the stabilisation phase (Fig. 5). Afterwards, this rate of neoformation varied linearly with the time of composting.

4. Conclusion

The results obtained from thermochemolysis coupled with gas chromatography and mass spectrometry show that the organic material isolated from the initial sewage sludge (90 %) and straw (10 %) mixture is composed mainly of various lignin-derived compounds

constituting organic waste recalcitrant to microbial decomposition in the wastewater plant. Moreover, fatty acid methyl esters attributed to residues of dead algal, fungal and microbial organisms remaining in the lagooning sludge. The evolution of lignin-derived compounds during composting shows that p-hydroxyphenyl units decreased after the stabilisation phase. In parallel the more oxidized units of guaiacyl (G) and syringyl like-structures (S) significantly increased corresponding mainly to methylated derivatives of caffeic acids, protocatechuic acids, gallic acids and aldehydes. In the chemical structure of humic acids isolated from mature sludge compost, C6-C1 type units or polyphenolic acids are highly predominant. These units originate partly from the oxidation of the side-chain of C6-C3 lignin-like compounds, which is considered as the main process occurring during the biotransformation of lignin to form humic substances. Microbial neosynthesis could also be suggested to explain the great amounts of these units present at the end of composting. Indeed, the index of Shannon-Weaver supports the neoformation of HA during composting, from subunits of similar chemical nature. The similitude index indicates a change in the neoformation rate of humic acids during maturation phase, which is commonly known as composting phase where much humification occur. The all variations are consistent with the “condensation” pathway and that neoformation of humic acids during composting seems to occur through polycondensation of monomers already biotransformed during microbial metabolism rather than just strict biodegradation of starting polymers. However, the continued presence of lignin materials in humic acids and the high levels of benzenecarboxylic acid production show that oxidative degradation acts partly on side chains and monomers linked or adsorbed to the macromolecular starting polymer. The oxidized lignin-derivatives always constitute the “core” of humic structures, especially for material in which microbial decomposition is still incomplete. The fatty acids within the humic acid structures show an increase during the composting process attributed to the development of intense microbial activity and then the amounts decrease after the death of most of the microbial communities in the final stage of low respiration rate.

Acknowledgements

This work was supported by the JER 6013 associated to the AUPELF-UREF and Scholarship Program of Formation in Search of French-speaker university agency AUF.

The authors thank P. Winterton (UPS Toulouse-Fr), a Native English Speaker, for his helpful criticisms of the English version of the manuscript.

References

- Alcaniz, J.M., Seres, A., Gassiot-Matas, M., 1983. Soil depth variations of humic composition studied by pyrolysis-gas chromatography (Py-GC). VIII International Symposium on Humus and Plant: Studies about humus. Praga. I,1-4.
- Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Hamdi, H., Revel, J.C. (2004 a). Elemental analysis, FTIR and ¹³C-NMR of humic acids from sewage sludge composting. *Agronomie* 24, 13-18.
- Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Revel, J.C. (2004 b). Structural characterization of fulvic acids during composting of sewage sludge. *Process Biochem* (In press).
- Amir, S., Bailly, J.R., Revel, J.C., Hafidi, M., 2003. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex gel fractions. *Agronomie* 23, 269-275.
- Ayuso, M., Hernandez, T., Garcia, C., Pascual, J.A., 1996. Biochemical and chemical – structural characterization of different organic materials used as manures. *Bioresource Technol.* 57, 201-207.
- Bailly, J.R., Raboanary, M., 1986. Sur la formation de substances parahumiques a partir d'acides phénoliques simples par des microorganismes du sol. *Agrochimica*, 30, 58-74.
- Bernal, M.P., Navarro, A.F., Roig, A., Cegarra, J., Garcia, D., 1996. Carbon and nitrogen transformation during composting of sweet sorghum bagasse. *Biol. Fertil. Soil.* 22, 141-148.
- Bracewell, J.M., Robertson, G.W., Williams, B.L., 1980. Pyrolysis–Mass Spectrometry studies of humification in a peat and a peaty Podzol. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 2, 53-62.
- Ceccanti, B., Alcaniz-Baldellou, J.M., Gispert-Negrell, M., Gassiot-Matas, M., 1986. Characterization of organic matter from two different soils by pyrolysis-gas chromatography and isoelectric focusing. *Soil. Sci.* 142, 83-90.
- Chaminade, R., 1944. Les formes du phosphore dans le sol: nature et rôle des complexes phospho-humiques. *Ann. Agron.* 1-63.
- Chefetz, B., Chen, Y., Clapp, E., Hatcher, P.G., 2000. Characterization of organic matter in soils by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 64, 583-589.
- Chefetz, B., Tarchitzky, J., Deshmukh A.P., Hatcher P.G., Chen Y., 2002. Structural characterization of soil organic matter and Humic acids in particle-size fractions of an agricultural soil. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 66, 129-141.
- Chiavari, G., Galletti, G.C., 1992. Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of amino acids. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 24, 123-137.

- Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D.E., Bortiatynski, J.M., Hatcher, P.G. 1995. A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: Thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Org. Geochem.* 23, 169-175.
- de Leeuw J.W., Largeau C., 1993. A review of macromolecular organic compounds that comprise living organisms and their role in kerogen, coal and petroleum formation. In *Organic Geochemistry, Principales and Applications*, eds M. H. Engel and S.A. Macko, pp. 23-72. Plenum, New York.
- Del Rio, J.C., Gonzalez-Vila, F.J., Martin, F., Verdejo, T., 1994. Characterization of Humic acids from low-rank coals by ^{13}C -NMR and pyrolysis-methylation. Formation of benzenecarboxylic acid moieties during the coalification process. *Org. Geochem.* 22, 885-891.
- Fabbri, D., Helleur, R., 1999. Characterization of the tetramethyl-ammonium hydroxide thermochemolysis products of carbohydrates. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 49, 277-293.
- Filley, T.R., Minard, R.D., Hatcher, P.G. 1999. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis : Proposed mechanisms based upon the application of ^{13}C -labeled TMAH to synthetic model lignin dimer. *Org. Geochem.* 30, 607-621.
- Flaig, W., 1964. Effects of microorganisms in the transformations of lignin to humic substances. *Geochim. Cosmochem. Acta*, 28, 1523-1535.
- Garcia, C., Hernandez, T., Costa, F., 1992. Characterization of Humic acids from uncomposted and composted sewage sludge by degradative and non degradative techniques. *Bioresource Technol.* 41, 53-57.
- Gobé, V., Lemée, L., Amblès, A. 2000. Structure elucidation of soil macromolecular lipids by preparative pyrolysis and thermochemolysis. *Org. Geochem.* 31, 409-419.
- Gonzalez-Vila, F.J., Amblès, A., del Rio, J.C., Grasset, L. 2001. Characterisation and differentiation of kerogens by pyrolytic and chemical degradation techniques. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 58-59, 315-328.
- Gonzalez-Vila, F.J., Almendros, G., Madrid, F., 1999. Molecular alterations of organic fractions from urban waste in the course of composting and their further transformation in amended soil. *Sci Total Environ.* 236, 215-229.
- Gonzalez-Vila, F.J., Ludemann, H.D., Martin, F., 1983. ^{13}C -NMR structural features of soil humic acids and their methylated, hydrolyzed and extracted derivatives, *Geoderma*, 31, 3-15.
- Grasset, L., Amblès, A., 1998. Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 47, 1-12.
- Grasset, L., Guignard C, Amblès, A. 2002. Free and esterified aliphatic carboxylic acids in humin and humic acids from a peat sample as revealed by pyrolysis with

- tetramethylammonium hydroxide or tetramethylammonium acetate. *Org. Geochem.* 33, 181-188.
- Guggenberger, G., Christensen, B.T., Zech, W. 1994. Land use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of silos. I. Lignin and carbohydrates signature. *Eur. J. Soil. Sci.* 45, 449-458.
- Hafidi M., Amir S., Revel J-C. (2004). Structural characterization of olive mill wastewater after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and ^{13}C -NMR. *Process Biochem.* (In press).
- Hatcher, P.G., Clifford, D.J. (1994). Flash pyrolysis and in situ methylation of humic acids from soil. *Org. Geochem.* 21, 1081-1092.
- Hatcher, P.G., Nammy, M.A., Minnard, S.C., Dible, D.M. Carson, 1995. Comparison of two thermochemolysis methods for the analysis of lignin in decomposing wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with TMAH. *Org. Geochem.* 23, 881-888.
- Hatcher, P.G., Schnitzer, M., Dennis, L.W., Maciel, G.E., 1981. Aromaticity of humic substances in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 1089-1094.
- Hendricker, A.D., Voorhees, K.J. 1998. Amino acid and oligopeptides analysis using curie-point pyrolysis mass spectrometry with in-situ thermal hydrolysis and methylation: mechanistic considerations. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 48, 17-33.
- Knicker, H., Hatcher, P.G., González-Vila F.J., 2002. Formation of heteroaromatic nitrogen after prolonged humification of vascular plant remains as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Environ. Qual.* 31, 444-449.
- Lichtfouse, E., Chenu, C., Baudin, F., Leblond, C., Da silva, M., Behar, F., Derenne, S., Largeau, C., Wehrung, P., Albrecht P., 1998. A novel pathway of soil organic matter formation by selective preservation of resistant straight-chain biopolymers: chemical and isotope evidence. *Org. Geochem.* 28, 411- 415.
- Martin F., del Rio J.C., Gonzalez-Vila, Verdejo T. 1995. Pyrolysis derivation of humic substances 2. pyrolysis of soil humic acids in the presence of Tetramethylammonium hydroxide. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 31, 75-83.
- Martin, J.P., Haider, K., 1971. Microbial activity in relation to soil humus formation. *Soil Sci.* 111, 54-63.
- Miikki, V., Hänninen, K., Knuutinen, J. Hyötyläinen, J. 1999. Pyrolysis of humic acids from digested and composted sewage sludge. *Chemosphere.* 38, 247-253.

- Neirop, K.G.J., Buurman, de Leeuw J.W. 1999. Effect of vegetation on chemical composition of H horizons in incipient podzol as characterized by ¹³C-NMR and pyrolysis-GC/MS. *Geoderma*. 90, 111-129.
- Ouatmane, A., Dorazio, V., Hafidi, M., Revel, J.C., Senesi, N., 2000. Elemental and spectroscopic characterization of humic acids fractionated by gel permeation chromatography. *Agronomie*, 20, 491-504.
- Réveillé, V., Mancuy, L., Jard , E., Garnier-sillan, E. 2003. Characterisation of sewage sludge derived organic matter : lipids and humic acids. 34, 615-627.
- Saiz-Jimenez, C., Senesi, N., de Leeuw, J.W., 1989. Evidence of lignin residues in Humic acids isolated from vermicomposts. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 15, 121-128.
- Schnitzer, M., Khan, S.U., 1972. *Humic Substances in the Environment*. New York : Marcel Dekker.
- Schulten, H.R., Leinweber, P., 1996. Characterization of humic and soil particles by analytical pyrolysis and computer modeling. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 38, 1-53.
- Senesi N., Miano T.M., Brunetti G., 1996. Humic substances in organic amendments and effects on native soil humic substances, in: A. Piccolo (Eds.), *Humic substances in terrestrial ecosystems*, 531-593.
- Stanier, R. Y., Ornston L. N., 1973. The β -keto-adipate pathway, *Adv, Microbial. Physiol.* 9, 89-151.
- Tanczos, I., Rendl, K., Schmidt, H. 1999. The behavior of aldehydes – produced as primary pyrolysis products –in the thermochemolysis with tetramethyl ammonium hydroxide-. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 49, 319-327.
- Tomati, U., Madejon, E., Galli, E., 2000. Evaluation of HA molecular weight as an index of compost stability. *Compost Science & Utilization*, 8, 108-115.
- Varadachari, C., Ghosh, K. 1984. On humus formation. *Plant Soil.* 77, 305-313.
- Veeken, A., Nierop, K., de Wilde, V., Hamelers, B., 2000. Characterisation of NaOH-extracted Humic acids during composting of a biowaste. *Bioresource Technol.*, 72, 33-41.

Chapitre 6 :

Structural characterization of fulvic acids, extracted from sewage sludge during composting, by Thermochemolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry

S. AMIR^a, M. HAFIDI^{a*}, L. LEMEE^b, J-R. BAILLY^c,
G. MERLINA^c, M. KAEMMERER^c, J-C. REVEL^c, A. AMBLES^b

^a Unité Sol et Environnement (lab. Ecol-Végétale), Faculté des Sciences Semlalia,
Département de Biologie. BP/2390, Marrakech, Maroc.

^b Laboratoire de Chimie XII, Université de Poitiers, 40 avenue du Recteur Pineau, Poitiers
86022, France.

^c Equipe Agronomie, Environnement et Ecotoxicologie (A2E), Ecole Nationale Supérieure
Agronomique, Auzeville-Tolosane, BP/ 107, Toulouse, France

*Corresponding author / e-mail : hafidi@ucam.ac.ma

Présentation :

Dans les chapitres précédents sur la caractérisation par spectroscopie FTIR et ^{13}C -NMR des structures acides fulviques isolés du compost des boues à différents degrés de maturité, les résultats ont révélé une grande contribution des structures aromatiques étherifiées et estérifiées. Ces structures ont été démontrées en spectroscopie FTIR par une grande absorbance environ 1600 et 1140 cm^{-1} et en spectroscopie ^{13}C -NMR par un grand signal de résonance à 74 et 174 ppm. Selon nombreuses études, les structures acides fulviques pourrait présenter une certaine similarité aux acides humiques, mais ils sont généralement caractérisés par une grande hydrophilicité lié à leur grande teneur en composés riches en groupements fonctionnels oxygénés carboxyles et alcools. Ainsi, la thermochimioolyse avec le tétraméthyle ammonium hydroxyde (TMAH) pourrait constituer une technique destructive adéquate pour leur caractérisation structurale puisqu'elle a comme principe une attaque sélective des liaisons type éther et ester dans les macromoléculaires organiques (Hatcher et al., 1995). Cette dernière procédure chimiolytique consiste lors de la dépolymérisation des structures organiques à l'hydrolyse et méthylation des liaisons type ester et éther (Martin et al., 1995; del Rio et al., 1996; Filley et al., 1999). Il est de grande importance pour identifier les composés polaires tel les acides benzoïques et acides gras (Chefetez et al., 2002).

Ce présent travail est une étude par couplage thermochimioolyse/ chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de Masse de l'évolution des sous-unités moléculaires constitutives des acides fulviques lors du compostage du mélange de boues résiduaires.

Le même protocole expérimental utilisé pour les acides humiques (chapitre 9) a été réalisé sur 4 mg des acides fulviques lyophilisés isolés à différents stades de compostage.

Les chromatogrammes TMAH-GC/MS des acides fulviques (FA) à différents stades de compostage sont illustrés dans la figure 1. Le tableau 2 regroupe les principaux composés identifiés. Différents composés sont thermiquement libérés des structures acides fulviques et sont principalement des esters méthyliques de mono-, di- et tri-méthoxy (alkyle)-acides benzoïques similaires aux produits d'oxydation de la lignine. Ils sont classés en trois groupes présentant des composés dérivés des trois monomères de la lignine: des squelettes méthylés de p-hydroxyphényle, de guaiacyle ou de syringyle, en plus des autres structures aromatiques, et une série d'acides gras C15, C16, C18 et C18:1 indiqué par un (*) (figure 1). En plus des autres structures encore non-identifiés tel que (7), probablement des structures aliphatiques

contenant l'azote. L'absence des polysaccharides est expliquée soit par leur élimination par l'eau, soit due au très faible sensibilité de cette technique aux carbohydrates.

La grande contribution des composés oxydés dérivés de la lignine est liée à leur grande résistance à la dégradation microbienne parmi d'autres composés organiques. Les acides gras C15, C16, C18:1, C18 sont attribués aux résidus de microorganismes ou plantes. Ainsi, le substrat organique initial des boues de lagunage est composé des corps microbiens des algues, champignons et bactéries et du matériel récalcitrant à la dégradation microbienne.

Au cours du compostage, l'évolution de différentes sous-unités structurales des acides fulviques a été suivie à travers une comparaison de leur abondances "Pi" dans les thermogrammes à différents stades de compostage (voir formule chapitre 9). Les données obtenues sont présentées dans la figure 2. Au cours du compostage se produit une disparition de 4-méthoxybenzaldehyde (10) avec l'augmentation de l'intensité de 4-méthoxytoluene (1), 4-méthoxyphénole (2), substance azotée inconnue (7) et dérivé méthylé de l'acide protocatéchique (30, 35, 38). D'autres composés comme le (37) et (39) montrent une augmentation en phase intermédiaire et après une diminution au stade final du compostage. Ainsi, l'augmentation et la grande contribution d'aldéhydes et acides benzoïques tel le (30, 35, 38) indiquent sur un stade d'oxydation de chaînes latérales de lignine bien avancé. Alors que la disparition de 4-hydroxybenzaldehyde (10) est attribuée à leur biotransformation aux dérivées hydroquinones (2) dans les conditions de compostage.

En cherchant à déterminer une relation entre acides et aldéhydes correspondants, on note une grande augmentation de teneur de l'acide gallique (38) à 180 jours, qui diminue en fin du compostage avec l'augmentation de teneur de l'aldéhyde gallique. La première augmentation est liée à une intense oxydation de dérivés de lignine, alors que l'augmentation de proportions de dérivés aldéhydes peut être attribuée à un mécanisme de polymérisation oxydative à travers des liaisons type ester/éther en fin du compostage.

L'évolution de différentes sous unités dérivées de la lignine a montré une diminution de proportion de dérivés p-hydroxyphényle avec l'augmentation de dérivés type guaiacyle (figure 3). Ce qui implique une augmentation du degré d'oxydation avec le processus de compostage. En fait, les hydroquinones, l'acide protocatéchique, l'acide et l'aldéhydes gallique ont été démontrées les derniers dérivés de séquence de biotransformation de la lignine. Ces composés contribuent largement à une néoformation de substances humiques suite à un phénomène d'auto-polycondensation et aux recombinaisons aux autres structures organiques et azotées.

La teneur d'acides gras a montré une augmentation en phase intermédiaire de compostage particulièrement le C18:1, cette teneur a montré une diminution en fin du compostage (Fig. 2). L'augmentation est attribuée aux résidus des corps des populations microbiennes développés au cours du compostage et la diminution est liée à la mort de la majorité des populations microbiennes en fin du compostage.

Afin de déterminer les changements dans la structure chimique des acides fulviques au cours du traitement, l'évolution de 5 familles de composés groupées de structure chimique similaire a été étudiée au cours du compostage (figure 4): C6-C3 (benzène avec chaîne latérale à 3 carbones); C6-C1 (acides benzoïques), hydroquinones, structures azotées et acides gras. Les sous-unités de type-lignine C6-C3 ont montré une diminution au cours du compostage liée à l'oxydation microbienne, après avoir connu une augmentation en phase intermédiaire attribuable à une amélioration de la solubilité de la lignine. Les sous-unités C6-C1 ont été réduites au début de compostage, ce qui est expliqué par une oxydation du 4-methoxybenzaldéhyde en hydroquinones dans ces conditions de compostage. L'augmentation des sous-unités (C6-C1) à la fin du processus de compostage pourrait soit être liée à l'oxydation des chaînes périphériques des sous-unités type lignine C6-C3 ou soit être attribuée en partie à la néosynthèse microbienne. L'augmentation de l'intensité de structures azotées non identifiées peut être soupçonner d'origine l'activité microbienne. Alors que, l'augmentation en parallèle de proportion de structures azotées avec les hydroquinones au début de compostage peut être attribuée à un phénomène de nitrosation d'acides phénoliques, et une grande affinité des hydroquinones aux ammonium (NH₃).

Ces résultats permettent de suggérer une néoformation ou resynthèse des acides fulviques, au cours du compostage, suite à une autopolycondensation ou recombinaison des monomères déjà biotransformés tel que les sous unités C6-C1 et hydroquinones avec d'autres structures azotées.

Pour évaluer l'importance des changements structuraux produits au sein des acides fulviques au cours du compostage, deux indices sont appliqués pour poursuivre la distribution de divers sous-unités libérés thermiquement des acides fulviques à différents stades de traitement. L'indice de Shannon-Weaver (Ish) montre le degré de diversité au sein des structures fulviques. Il est calculé selon une formule citée en chapitre 9 et les données obtenues sont illustrées dans la figure 5. L'indice a montré une augmentation au début du compostage, ce qui implique une augmentation de la diversité structurale qui est liée probablement à une néoformation des dérivés hydroquinones et des composés azotés avec l'entrée aux conditions de compostage.

L'indice de similitude est un indice qui permet de comparer entre deux thermogrammes et fournit le degré de ressemblance entre les structures chimiques des acides fulviques à différents stades de compostage. S_{ij} est le degré de similitude entre le thermogramme à chaque stade de compostage et le thermogramme du mélange initial (figure 6 a). S'_{ij} est le degré de similitude entre les thermogrammes à deux stades successifs de compostage (figure 6 b). L'indice de similitude entre le thermogramme du mélange initial et celui à un mois de compostage $S_{0/1}$ montre de très faible valeur de l'ordre de 0,35. Cette valeur reste la même pour les autres stades de compostage à 90; 180 et 270 jours, ce qui implique une fois dans les conditions de compostage, il y'a apparition ou intégration de nouvelles structures tel que les hydroquinones et les composés azotés. Alors que l'autre indice S'_{ij} montre une augmentation à 0,78 entre 30 et 90 jours, mais diminue et se stabilise à une valeur de 0,6 entre 90 et 180 jours et entre 180 et 270 jours de traitement. En corrélation avec l'augmentation des teneurs des acides fulviques au cours du traitement (figure 7), on peut suggérer une néoformation des FA lors du compostage de sous-unités chimiques similaires principalement des hydroquinones, sous unités C6-C1, C6-C3 et composés azotés.

Abstract :

Thermochemolysis coupled with gas chromatography and mass spectrometry was applied to determine the chemical structure of fulvic acids (FA) extracted from a sewage sludge and straw mixture at different steps of composting. The FA starting materials were composed mainly of mono-, di- and tri-methoxy (alkyl) benzoic acids representing lignin derivatives in an advanced stage of oxidation, as well as of methylated polyphenols and a series of fatty acids saturated C15, C16, C18, unsaturated and branched C18:1. Besides, there are many unidentified structures suspected to be N-containing compounds. During the composting process, the fate of the three structural typical monomer units of lignin was followed. The *p*-hydroxyphenyl units showed a strong decrease especially at the beginning of composting. The guaiacyl units showed a steady increase in the course of composting. A decrease of syringyl units was noted at the beginning of composting, but they then increased towards the end of composting. These changes support the formation during composting of more oxidized units. All subunits composing the fulvic acid structure have been subdivided into main five groups

of similar chemical structure. The lignin-like C6-C3 subunits showed a decrease during composting attributed to microbial oxidation, but there was an increase during the intermediate step of composting related probably to an enhancing of lignin solubility. The C6-C1 subunits were reduced at the beginning of composting, which has been mainly attributed to the oxidation of 4-methoxybenzaldehyde to hydroquinones derivatives under the composting conditions. Although, the increase of these subunits (C6-C1) at the end of composting originates from oxidation of C6-C3 lignin side-chains or could be partly attributed to microbial neosynthesis. The unidentified N-containing compounds increased strongly during course of composting. The rise in the level of fatty acids at the beginning of composting is attributed to an increase of branched-chain fatty acids such as C18:1 commonly used as bacterial biomarkers. Their amounts were greatly reduced at the end of composting. Both the Shannon-Weaver and similitude indices show an increase in structural diversity at the start of composting conditions following the appearance of hydroquinone derivatives and unidentified nitrogen compounds in the FA network. But, the FA structure reaches a certain level of homogeneity at the end of composting through neof ormation or resynthesis of FA through self-polycondensation or recombination of C6-C1 subunits and hydroquinone derivatives with N-containing compounds.

Key words : Thermochemolysis/Gas Chromatography/ Mass spectrometry, composting, sludge sewage, fulvic acids, structural changes.

1. Introduction

Recycling sewage sludge in agriculture as fertiliser and as an organic amendment in intensively –cropped and organic matter- depleted soils is classed as an important environmental strategy (Garcia et al., 1992). However, pre-treatment is needed to avoid numerous harmful effects caused by the application to soil of non-matured composts (Mathur et al., 1993). Composting of organic wastes has received a great deal of attention to obtain greater fertilizing power and a safer product than the starting material for agricultural recycling. This aerobic thermophilic biotreatment leads to the biotransformation of raw organic matter into a more stable product rich in humic substances. The amounts and chemical structures of the humic material constitute, according to numerous studies, the main indices to assess the stability and maturity of compost (Garcia et al., 1992; Ouattmane et al.,

2000; Tomati et al., 2000). Humic substances are known to be an important organic fraction. Among them, fulvic acids have proved to be of great interest in chelating mineral elements and in enhancing plant growth. Due to their smaller size and high carboxyl group content, they are much more chemically reactive than humic acids (Senesi et al., 1996). As a consequence, the determination of their chemical composition and structure at a molecular level is of importance for soil scientists. The structural nature of humic material is still controversial with many factors possibly involved in the contradictions such as the origin of the humic material investigated, the extraction techniques used, the purification methods and the analysis techniques (Gonzalez-Vila et al., 1983). In previous works using FTIR and ^{13}C -NMR spectroscopy to study changes in chemical structure of fulvic acids isolated from composted sludge at different degrees of maturity (Amir et al., 2004), the presence of large amounts of etherified/esterified aromatic structures was revealed by intense bands around 1600 and 1140 cm^{-1} in FTIR spectra and high ^{13}C -NMR signals at 74 and 174 ppm corresponding to alkyl ether and ester bonds. However, polysaccharides may also be responsible for these signals. .

Thermochemolysis has proved to be a good method to obtain detailed structural information on the building blocks of organic macromolecules. It is based on the thermal breakdown of humic macromolecules into various subunits which are subsequently isolated and identified.

Numerous authors have used simple pyrolysis or TMAH-GC-MS analysis to develop a better understanding of how humification occurs in soil by supervising biotransformation of aromatic entities from lignin derivatives (Bracewell et al., 1980; Del Rio et al., 1994; Schulten et al., 1996; Chefetez et al., 2000); as well as by characterizing humic acid material isolated from compost at different degrees of maturity (Serés-Aspax et al., 1985; Miikki et al., 1999). In contrast to simple pyrolysis-GC/MS that could involve decarboxylation and formation of very polar products, thermochemolysis with tetramethyl ammonium hydroxide (TMAH) selectively cleaves ester and certain ether linkages (such as B-O-4 aliphatic-aryl bonds) in macromolecular organic matter (Hatcher et al., 1995). The latter chemolytic procedure hydrolyses and methylates ester and ether linkages, and assists in the depolymerisation and methylation of organic structures (Martin et al., 1995; del Rio et al., 1996; Filley et al., 1999). It is especially useful for detecting polar compounds such as long-chain fatty acids and benzenecarboxylic acids (Chefetez et al., 2002).

The fatty acids are the entities suggested to be bonded to humic substances by two separate mechanisms (i): physical adsorption on external surfaces and in internal voids of humic polymers or (ii) esterification to hydroxyl groups of phenolic building blocks (Schnitzer et al.,

1975; Grasset and Amblès, 1998; Gobé et al., 2000; Grasset et al., 2002). Numerous authors such as Miikki et al. (1999) and Réveillé et al. (2003) show that the fatty acids constitute an important fraction in the pyrograms of the humic acids in sewage sludge even in the exhaustively lipid pre-extracted and post-extracted samples. Some lipids are therefore thought to remain associated with humic material by covalent bonds or simply trapped within their structure. These entities could have a positive effect on soils by influencing their water retention capacity, their structural stability and on the biodegradation-humification balance in amended soils. They could, however be unfavourable in large doses and induce phytotoxicity problems (Gonzales-Vila et al., 1999).

Accordingly, considering the importance of lipid as entities that are tightly trapped within humic structures or cross-linked through ester bonds in the matrix (Grasset and Amblès., 1998; Gobé et al., 2000; Grasset et al., 2002; Réveillé et al., 2003), their removal could destroy or disturb cross-linking bonds between molecular units. Thus, some molecules could become easily released through thermochemolysis from molecular structures leading to overestimation of their presence compared to others ones. In this work, we used TMAH-GC-MS to follow the structural changes during composting of the units making up the fulvic acids structure as a whole, without previous or post-lipid removal.

2. Material and methods

2.1. Composting

Sewage sludge was taken from an anaerobic lagoon in an experimental wastewater treatment plant. A mixture of fresh sewage sludge (90%) and straw (10%) was composted on a purpose-built platform at 54% moisture for nine months. To provide aerobic conditions for the composting, the mixture was turned every two weeks. Some preliminary physico-chemical characteristics of the mixture at different stages of composting (RM = raw mixture; 30 days = stabilization phase; 90; 180; 270 days of composting = maturation phase) are illustrated in Table 1 (Amir and Hafidi, 2001).

Table 1. Change of some physicochemical characteristics of sewage sludge and straw mixture during composting

| Stages of composting (days) | pH | C. % ^a | N. % | C/N | DEC % | ash % ^a |
|-----------------------------|------|-------------------|-------|-------|-------|--------------------|
| RM | 7.30 | 17.74 | 0.742 | 24.00 | / | 65.90 |
| 30 | 7.40 | 16.18 | 0.756 | 21.40 | 20.00 | 70.70 |
| 90 | 6.80 | 15.01 | 0.812 | 18.48 | 36.50 | 75.30 |
| 180 | 6.73 | 14.26 | 0.868 | 16.40 | 40.00 | 76.30 |
| 270 | 6.77 | 13.45 | 0.882 | 15.24 | 41.50 | 76.78 |

^a Result expressed by dry weight

C. : Organic carbon N. : Total Kjeldahl Nitrogen DEC : Decomposition rate

2.2. Fulvic acid isolation

To extract humic substances (HS), the fresh sample (30 g) is firstly treated three successive times with 40 ml of H₂O to remove non-humic, water-soluble substances (sugars, proteins), and so avoid interference between these compounds and humic compounds (Bernal et al., 1996). The extraction was then made on a pre-treated sample with 40 ml of 0.1 N NaOH. Extraction was repeated several times until uncoloured supernatants were obtained. Centrifugation was then carried out at 4000g for 15 min. The filtered solutions underwent acid treatment with 3 N H₂SO₄ until pH 2 and preserved for 24h at 4°C. The fulvic acids (FA) supernatants were separated from the precipitated “humic acids (HA)” through filtration. The FA were dialyzed through a 100 Da Spectra Por membrane to eliminate excess salts and then lyophilized. The FA were assayed by KMnO₄ oxidation.

2.3. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry

About 4 mg of lyophilized FA were dissolved in chloroform and mixed with 10 µl of a methanol solution containing 50% (w/w) of tetramethyl ammonium hydroxide (TMAH) (Aldrich). The samples were heated for 5 min. to 40 °C to evaporate the methanol. The remaining solid was transferred to a 25 x 1.9 mm (id) quartz tube filled with quartz wool.

The tube was then heated from 350 to 650 °C at 5 °C msec⁻¹ and maintained at 650 °C for 10 s. Thermochemolysis products were carried into the GC or the GC-MS by He gas.

GC separations were done on a Varian 3900 gas chromatograph using a BPX (SGE) capillary column (30 m long, 0.25 mm i.d.). Column temperature was programmed from 60 to 300 °C at a rate of 5 °C min⁻¹ and held for 30 min at 300 °C. GC-MS analysis was performed in similar conditions on a Varian 3400 chromatograph coupled with a Finigan Incos 500 mass spectrometer. The compounds were identified on the basis of their GC retention times and by comparisons of their mass spectra with standards and with data from the literature.

3. Results and Discussion

The chromatograms of TMAH-GC/MS of the FA isolated at different stages of composting are illustrated in Fig. 1. Generally, the product distribution is similar to that obtained by Hatcher and Clifford (1994); the first portion of the chromatogram mainly contains the peaks of aromatic compounds. The second portion consists of peaks that represent aliphatic compounds, consisting mostly of fatty acid methyl esters. Table 2 lists the main aromatic compounds presenting significant surface areas in the chromatograms.

Various aromatic compounds are thermally released from FA, which is mainly composed of methyl esters of mono-, di- and tri-methoxy (alkyl)-benzenecarboxylic acids. These entities seem to represent oxidized degradation products derived from lignin (del Rio et al., 1996; Lehtonen et al., 2000). There are classified into three main groups presenting typical monomer units of lignin: p-hydroxyphenyl, guaiacyl or syringyl methylated skeletons. Besides, other aromatic structures occur such as 4-methoxyphenol. It should be noted that the methoxy groups could correspond to those originally present in the molecule or to free hydroxyl groups that become methylated during the pyrolysis reactions.

The fatty acids methyl esters (FAMES) yielded from FA thermochemolysis are mainly composed of saturated linear C15, C16, C18 and branched unsaturated C18:1. The peaks of fatty acids are labelled with a star (*) (Fig. 1). Besides, there are numerous unidentified structures such as (7) which are suspected to be nitrogen-containing aliphatic structures. The absence of polysaccharides may be because they are not structural entities of fulvic acids and could be easily removed during the first step of water extraction (Schnitzer and Khan, 1972).

However, according to Clifford et al. (1995), the lack of carbohydrate-derived peaks in the TMAH chromatogram could be due to the poor sensitivity of this technique to carbohydrates.

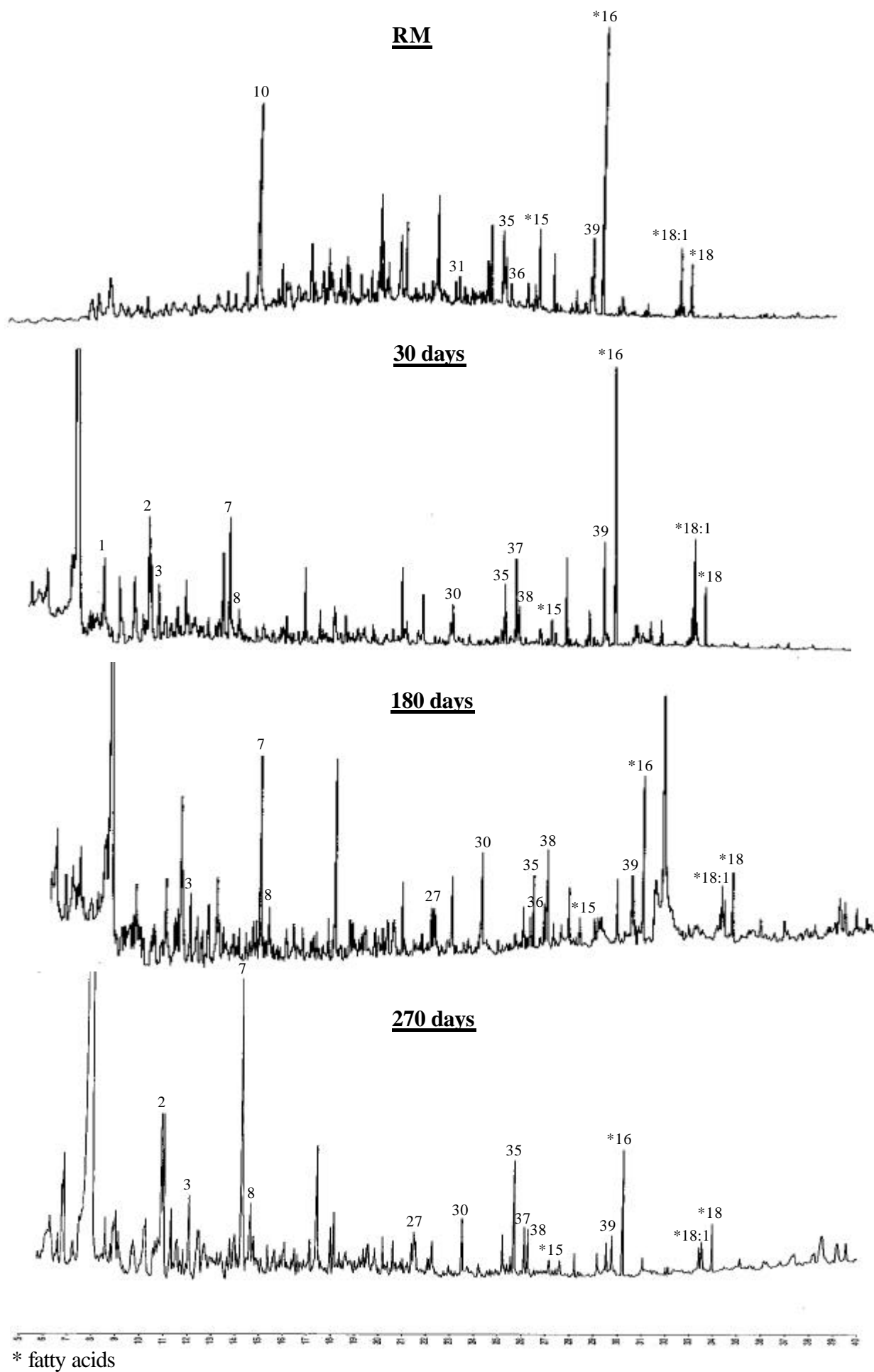
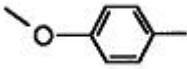

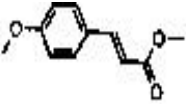
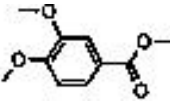
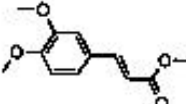
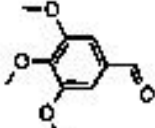
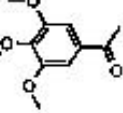
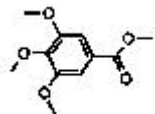
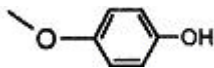
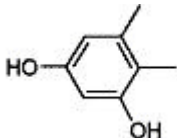


Figure 1. Thermochemolysis-Gas Chromatogram of fulvic acids (FA) extracted from sewage sludge at different stages of composting.

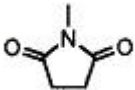
Table 2. Peak identification of main aromatic compounds significantly present in thermochemolysis chromatograms of fulvic acids (FA) isolated from sewage sludge during composting.

| Compounds derived from p-hydroxyphenyl structures | | |
|---|---|---|
| 1 |  | 4-methoxytoluene |
| 10 |  | 4-methoxybenzaldehyde |
| 37 |  | 3-(4-methoxyphenyl)-prop-2-enoic acid methyl ester |
| Compounds derived from guaiacyl structures | | |
| 30 |  | 3,4-dimethoxybenzoic acid methyl ester |
| 39 |  | 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propenoic acid methyl ester |
| Compounds derived from syringyl structures | | |
| 31 |  | 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde |
| 35 |  | 3,4,5-trimethoxyacetophenone |
| 38 |  | 3,4,5-trimethoxybenzoic acid methyl ester |

Other aromatic compounds

- 2  4-methoxyphenol
-  4,5-dimethoxybenzene-1,3-diol
-

Nitrogen-containing compounds

- 3  1-methyl-2,5-pyrrolidinedione
- 7 unidentified aliphatic N compounds
-

Fatty acids methyl esters

- *15 : iso Pentadecanoic acid, methyl ester
 - * 16 : hexadecanoic acid, methyl ester
 - * 18:1 : iso octadecenoic acid, methyl ester
 - **18:1 : anteiso octadecenoic acid, methyl ester
 - * 18 : octadecanoic acid, methyl ester
-

The large contribution of more oxidized lignin-derived compounds may be explained by the fact that they are the compounds most resistant to microbial degradation among various organic wastes during wastewater lagooning. Schnitzer and Khan (1972) and Ertel and Hedges (1984) found also that following oxidative degradation by CuO, lignin phenols in FA are more highly oxidized or altered.

Fatty acids C15, C16, C18:1, C18 are often considered as residues from micro-organisms or plants (Kögel-Knabner, 2002), trapped within the humic structure or cross-linked through ester bonds in the matrix (Neirop et al., 1999; Gobé et al., 2000; Grasset et al., 2002; Chefetz

et al., 2002). So, starting material of lagoon sludge is mainly made up of compounds of dead algae, fungi and other micro-organisms and of material recalcitrant to microbial degradation.

During composting, the evolution of these various structural subunits of FA was followed through the comparison between their abundances in the thermograms at different steps of composting. The relative abundance “Pi” of each thermochemolysis product from FA is calculated as the ratio between the area of the corresponding peak a_i to the sum of the areas of all the peaks considered in the pyrogram (Ayuso et al., 1996).

$$P_i = \frac{a_i}{\sum_1^n a_i}$$

The values obtained are presented in Fig. 2. The results show that during the stabilization phase of composting, 4-methoxybenzaldehyde (10) disappeared with the appearance of 4-methoxytoluene (1), 4-methoxyphenol (2), unknown nitrogen substances (7) and methylated derivatives of protocatechuic acid (30). The relative abundance of the latter compounds increase progressively during composting. The mono-, di-methoxy alkyl-benzenecarboxylic acid methyl esters (37) and (39) show an increase in the intermediate phase and then a decrease in the final step of composting. The results are in agreement with the theory of side-chain oxidation of lignin structures as one of the major humification processes (Guggenberger et al., 1994; Chefetez et al., 2002). Indeed, the increase of (37) and (39) is explained by the fact that they are the intermediate products in the oxidation sequence of the structural monomers of lignin such as p-hydroxycinnamyl alcohol and coniferyl alcohol (Flaig, 1964; Haider and Martin, 1967; Wang and Huang, 1987). However, the decrease mainly of di-methoxy alkyl-benzene carboxylic acid methyl esters (39) could be attributed to their tower in oxidation of their side-chain producing so protocatechuic acid methylated derivatives (30), which highly increased in the end of composting.

According to Guggenberger et al. (1994) and Chefetez et al. (2002), the high benzenecarboxylic acids content of the TMAH products indicates a developed stage of lignin side-chain oxidation by microorganisms. Commonly the side-chain oxidation of mono-methoxy alkyl-benzenecarboxylic acid methyl esters (37) must yield its corresponding product 4-methoxybenzaldehyde or acid (10). However, even the initial amount of this compound (10) disappeared after the stabilization phase, which could be attributed to its ready oxidation or biotransformation to hydroquinone derivatives (2) in the composting conditions. Numerous previous studies suggest that phenols can be spontaneously oxidized to quinones and that the conversion is more likely carried out by polyphenoloxidase enzymes (Stevenson, 1994).

Indeed, 4-methoxyphenol (2) or hydroquinone derivatives show an important increase at the end of composting.

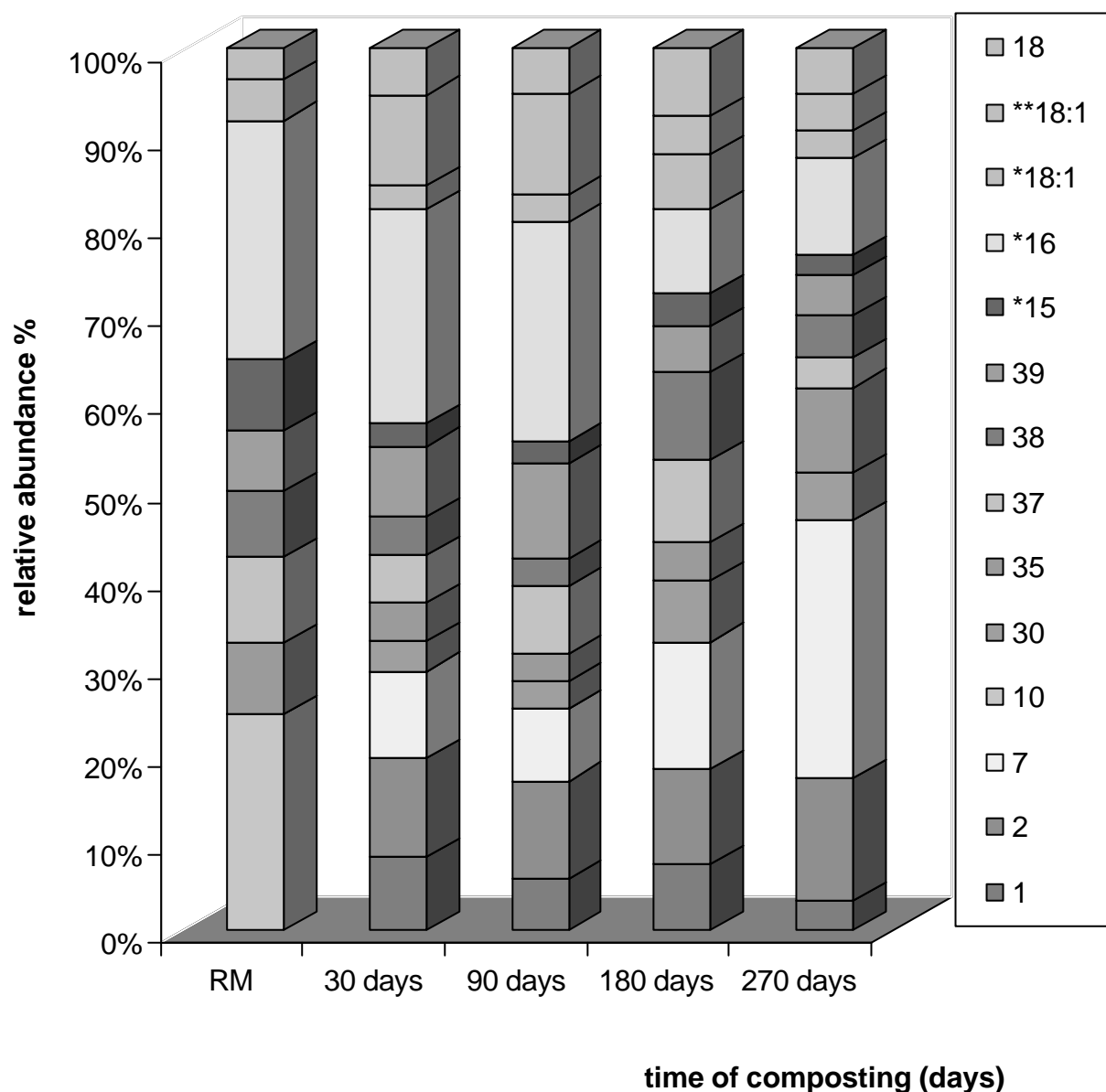


Figure 2. Changes in the relative abundance of the main products thermally released from fulvic acids (FA) of sewage sludge at different stages of composting.

Concerning, the syringyl-derived structures, methylated derivatives of gallic acid and aldehyde (35, 38) show a decrease in the intermediate steps of composting and then an increase at the end of composting. The ratio of acid-containing derivatives to aldehydes containing derivatives (acid/aldehyde ratio) is commonly used to assess the degradation stage

of lignin. High acid/aldehyde ratios represent a developed stage of lignin side-chain oxidation by microorganisms (Guggenberger et al., 1994; Chefetez et al., 2002). In this study, gallic acid (38) show a high amount at 180 days of composting, but decreased in the end of composting when gallic aldehyde (35) increased. This evolution is in agreement with the increase of acid-containing derivatives following the intense oxidation of lignin side-chains during the course of composting. But, the decrease of the gallic acid to aldehyde ratio at the end of composting could be attributed to process of oxidative polymerization of polyphenol acid units through ester/ether linkages (Amir et al., 2004; Hafidi et al., 2004). The oxidative polymerization of polyphenols was previously proposed in numerous studies as important mechanism involving the formation of humic substances in soil and sediments (Pal et al., 1994; Stevenson, 1994; Sparks, 1995; Huang, 2000).

However, Tanczos et al. (1999) recommend caution in the use of acid/aldehyde ratios in TMAH pyrolysis as a parameter to measure degradation of lignin compounds. They show that aldehydes can undergo a Cannizzaro reaction (disproportion/methylation) producing their corresponding carboxylic acids.

Among other parameters to follow process of humification, Chefetez et al. (2000) suggested the S/G ratio (syringyl to guaiacyl) as an index of evolution based on the assumption that condensed G-type lignin units are more resistant to biological degradation than lignin with a larger proportion of methoxyl groups S-type. These authors report that when the S/G ratio is decreased it suggests preferential degradation of syringyl units by microorganisms. In our case, the S/G ratio showed a decrease at the beginning of composting, but increased at the end of the process. Syringyl units show at the beginning of composting a decrease (Fig. 3) that could be attributed to their decomposition by the intense activity of the thermophilic populations that develop in the stabilisation phase. However, these structures then increased at the end of composting. The proportion of guaiacyl units showed a steady increase during the course of composting. The p-hydroxyphenyl units showed a strong decrease especially at the beginning of composting. Therefore, these results suggest the increase of guaiacyl units and syringyl derivatives at the end of composting, which indicate the increase of more oxidized units during composting. The G/P ratio (guaiacyl to p-hydroxyphenyl) showed a progressive increase during composting. Indeed, lignin side chains are oxidized, methoxy groups removed and hydroxylation occurred, resulting in an increase of more oxidized polyphenolic acids (Davies et al., 2001). The increase of methylated derivative of hydroquinone, protocatechuic acid, gallic acid or aldehyde at the end of composting is in agreement with that they constitute the last products to be formed in the lignin degradation sequence (Martin and

Haider, 1981). These products lead to the formation of humic substances following self-polycondensation and/or combination with other nitrogen compounds (Hatcher et al., 1994; Martin et al., 1995).

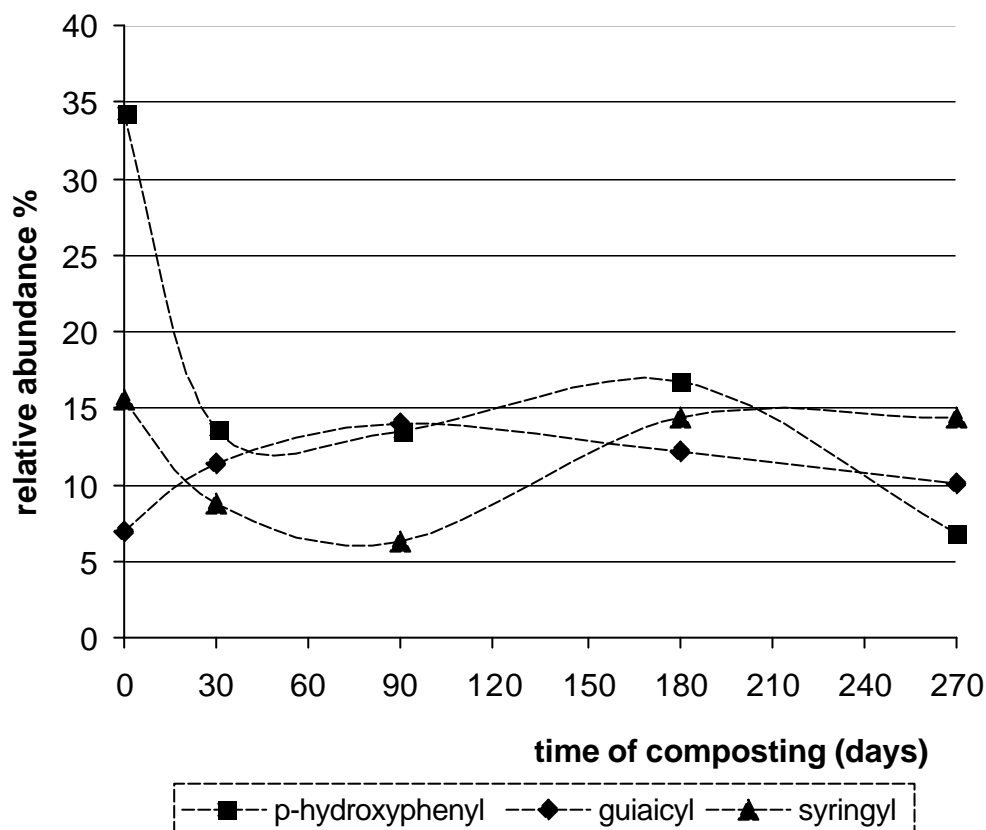


Figure 3. Evolution of various lignin-derived units in fulvic acids of sewage sludge during composting

Fatty acids C15 and C16 show a decrease in course of composting, while branched C18:1 increased during the stabilization phase and then decreased in the final stages of composting (Fig. 2). The decrease of fatty acids could be attributed to their use by microbes as a source of energy, but the increase of branched C18:1 in the intermediate step of composting could originated from residues of microbial activity. Branched-chain fatty acids are commonly used as bacterial biomarkers (Parkes, 1987).

To determine the main changes occurring in the chemical structure of the fulvic acids during treatment, the evolution of five subunit families grouping compounds of similar chemical structure in the fulvic acid network was monitored in the course of composting (Fig. 4): C6-

C3 (-3 carbons in the side-chain bound to the benzene unit); C6-C1 (benzoic acids), hydroquinone derivatives, nitrogenic structures and fatty acids.

During the stabilisation phase there occurs a slight decrease of C6-C3, but a strong decrease of C6-C1 subunits. In parallel, there was an increase in the hydroquinone derivatives and unidentified structures of aliphatic nitrogen-containing compounds. The great decrease of C6-C1 can mainly be attributed to the oxidation of 4-methoxybenzaldehyde into hydroquinones derivatives following the start of composting conditions. The increased intensity of numerous unidentified nitrogenous structures may derive from residual plant compounds or fungal and microbial remains that have been physically or chemically protected in humic structures against further microbial degradation (Knicker et al., 2002). Koch (1990) showed that bacterial cell walls are formed of peptidoglycan (murein) which contain carbohydrate as well as amino acid elements composing N-acetyl-glucosamine and N-acetylmuramic acid. Knicker et al. (1995) and Gomes et al. (1996) investigated also the melanins in various actinomycetes and fungi. These authors indicated by IR study the high aliphaticity of these melanins than humic structure from the same soils (Kögel-Knabner, 2002). In fact, Gonzalez et al. (2003) show the preferential incorporation of carbohydrate, possibly low molecular weight polysaccharides (hemicelluloses) and additional amount of N-containing compounds into fulvic acids.

On the other hand, the parallel in the increase of the proportion of nitrogenous structures with that of hydroquinones at the beginning of composting supports the Bremner (1968) scheme of nitrosation of phenolic moieties, and the high affinity of hydroquinone for ammonia (NH₃) (Stevenson, 1994). Some authors show that the contribution of nitrosation of organic matter as mechanism to immobilisation of N can occur in soil environments upon normal nitrification at neutral to slightly acidic pH values (Azhar et al. 1986; Thorn and Mikita, 2000). However, this parallel increase could be also explained by that these structures are from microbial origin, Butler and Day (1998) suggest that melanin in fungi contain protein, carbohydrates, lipids and a polymeric core that consists of various types of phenolics, indolic, quinone, hydroquinone, semi-quinone monomers. They reported that ligninase enzymes from white-rot fungi are able to completely degrade fungal and bacterial melanins. In the beginning of the maturation phase, the increased proportion of C6-C3 may be attributed to an increase in the solubility of lignin-like compounds in the presence of the mesophilic populations that develop during this phase. This community is recognized by its strength to attack more resistant structures. In the late steps of composting, it is mainly C6-C1 subunits and the unidentified nitrogen structures that are increased, while the C6-C3 subunits are decreased. The large

increase in C6-C1 could due to the oxidation of the side-chain of C6-C3 compounds, but could partly be attributed to microbial neosynthesis.

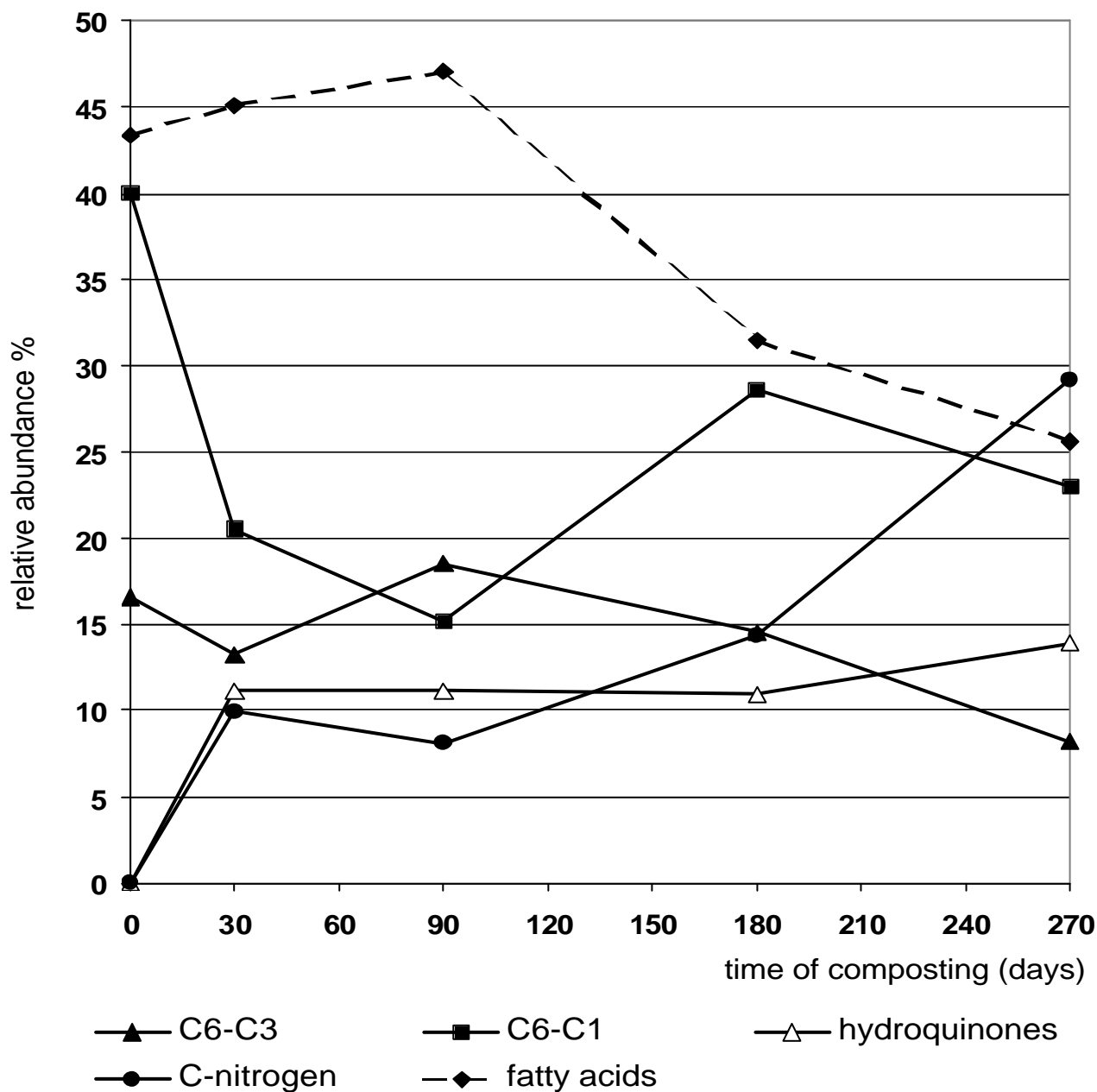


Figure 4. Changes of five structural groups composing thermochemolysis products released from fulvic acids of sewage sludge during composting

Fatty acids increased during the stabilisation phase of composting when microbial activities were intense, and then decreased after the death of the majority of the microbial populations in the final stage of composting.

Therefore, these findings suggest the neoformation or resynthesis of fulvic acids, during composting, from self-polycondensation or recombination mainly of C6-C1 subunits and hydroquinones derivatives with unknown aliphatic structures N-containing compounds. Numerous authors show the presence in soil or compost of a considerable proportion of “unidentified nitrogen” that constituted the hydrolysis-resistant structures (Anderson et al., 1989; Tinoco et al., 2004).

This is in the agreement with the common models of formation of refractory organic nitrogen through depolymerization and recondensation pathways (Anderson et al., 1989; Kelly and Stevenson, 1994; Knicker et al., 2002). The latter involves microbial degradation of organic macromolecules such as lignin and proteins to oligomers and monomers. Part of the oligomers and monomers recombine by random condensation or 1, -4 additions of ammonium and amino groups on phenols or quinone to form complex macromolecular N-containing structures. Jokic et al. (2004) showed that the Maillard reaction and polyphenol model, into one combined humification pathways incorporating carbohydrates, amino acid and polyphenol moieties into the humic structure as would likely occur in nature.

Therefore, all above observations support the formations of fulvic acids in the course of composting through polycondensation of monomers already biotransformed during microbial metabolism rather than strict biodegradation of starting polymers. To assess the importance of the structural changes produced, two indices were applied to follow the distribution of various thermochemolysis subunits in the FA network during composting.

The index of Shannon-Weaver (Ish) exhibit the degree of diversity inside fulvic polymer. This ecological index is usually used to express the degree of organisation of an ecosystem. Low values correspond to low diversity, while a high index corresponds to a complex system. This index has been used by Alcaniz et al. (1983) and Ayuso et al. (1996) to examine the organisation of soil and humic acids. Alcaniz et al. (1983) suggest that a high diversity index Ish in soil implies the presence of fragments that occur in quantitatively equal amounts, while a low index indicates the occurrence of a selective process. Ayuso et al. (1996) show that the low Ish of the leonardite soil pyrogram must be due to a selective process such as oxidation occurring in the course of humification. This index is calculated as follows:

$$Ish = - \sum_{i=1}^n P_i \log_2 P_i \quad 0.5 < Ish < 4.5$$

where P_i is the relative abundance of each product considered in the thermochemogram (Shannon and Weaver, 1963). Our results are illustrated in Fig. 5 and show an increase of

Ish at the start of composting and a slight decrease at the end. The initial augmentation arises from the increase in structural diversity of fulvic acids through formation of hydroquinone derivatives and other unidentified aliphatic N-containing structures following the change of medium conditions as the composting process starts (aeration, self-heating, intense microbial activity...).

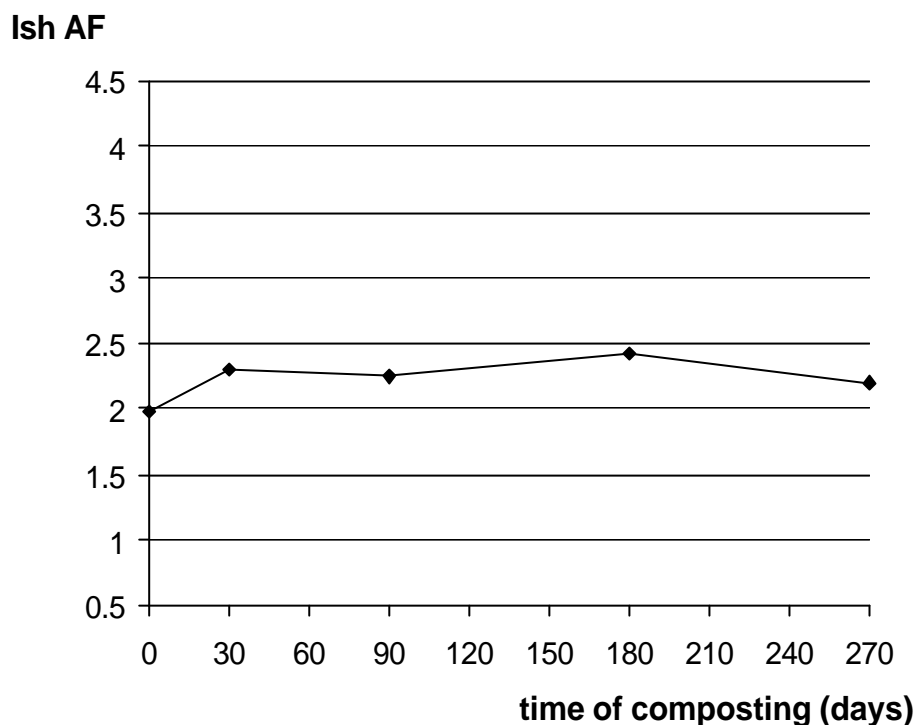


Figure 5. Index of Shannon-Weaver for fulvic acids (FA) of sewage sludge during composting

A similitude index S_{ij} compares two thermograms and gives the degree of resemblance between the chemical structural composition of fulvic acids at different steps of composting. This index has been used by Ceccanti et al. (1986) and Ayuso et al. (1996) to determine the degree of similarity between two pyrograms of different organic materials (soil, compost, sewage sludge...). It is calculated as follows:

$$S_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^n \min(P_i^k, P_j^k)}{n} \quad P_i^k < P_j^k$$

P^k is the relative abundance of product in thermogram i and j , n is the number of peaks (products) considered.

S_{ij} is the degree of similitude between the thermogram at each stage of composting and thermogram at start of composting (Fig. 6 a). S'_{ij} is the degree of similitude between two thermograms at successive steps of composting (Fig. 6 b).

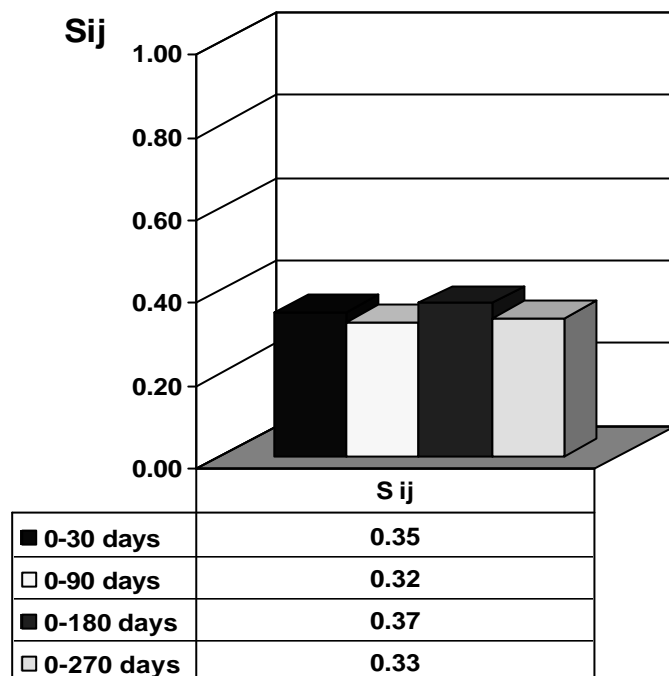


Figure 6 a. Similitude index between thermochemolysis chromatogram of fulvic acids at each stage of composting and the chromatogram at the start of composting.

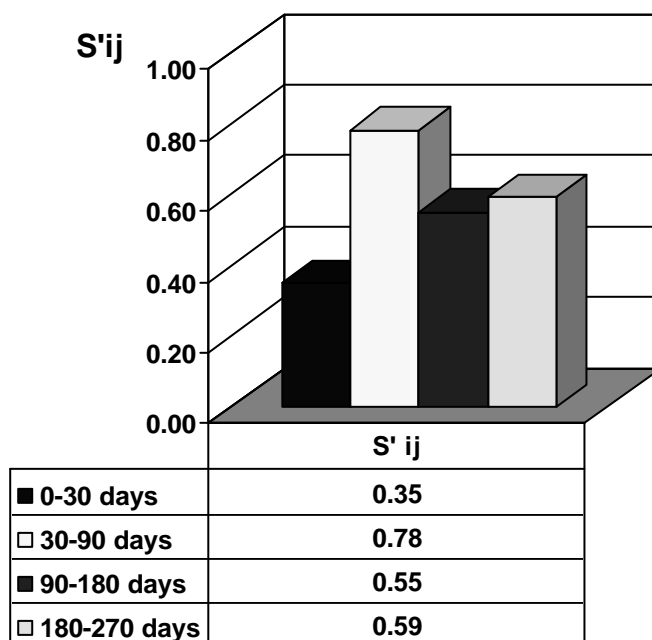


Figure 6b. Similitude index between two thermochemolysis chromatograms of fulvic acids at successive stages of composting.

The index of similitude $S_{0/1}$ shows a low value of about 0.35 between the thermogram at 30 days and that obtained before composting. This value remains relatively constant in comparison between each thermogram of other stages 90; 180 and 270 days, with the thermogram before composting.

The low similarity indice between the composted and uncomposted substrate implies great changes in the mechanism of formation of FA with the changes in conditions at the beginning of the composting process. Indeed, with the onset of the composting conditions, new structures appeared in the FA network such as hydroquinones and nitrogen-containing compounds. S'_{ij} increased to 0.78 between 30 and 90 days, but decreased and remained constant near a value of 0.6, between 90 and 180 days and between 180 and 270 days of treatment. The increase in the index of similarity in the later steps of composting suggests neoformation of FA from similar chemical subunits. The slight decrease at the end of composting could be attributed to the importance of selective processes or oxidation of the side-chains of lignin-like compounds C6-C3 and the neoformation of C6-C1 sub-units. The observations are also in agreement with the change in the rate of neoformation of fulvic acids during composting (Fig. 7).

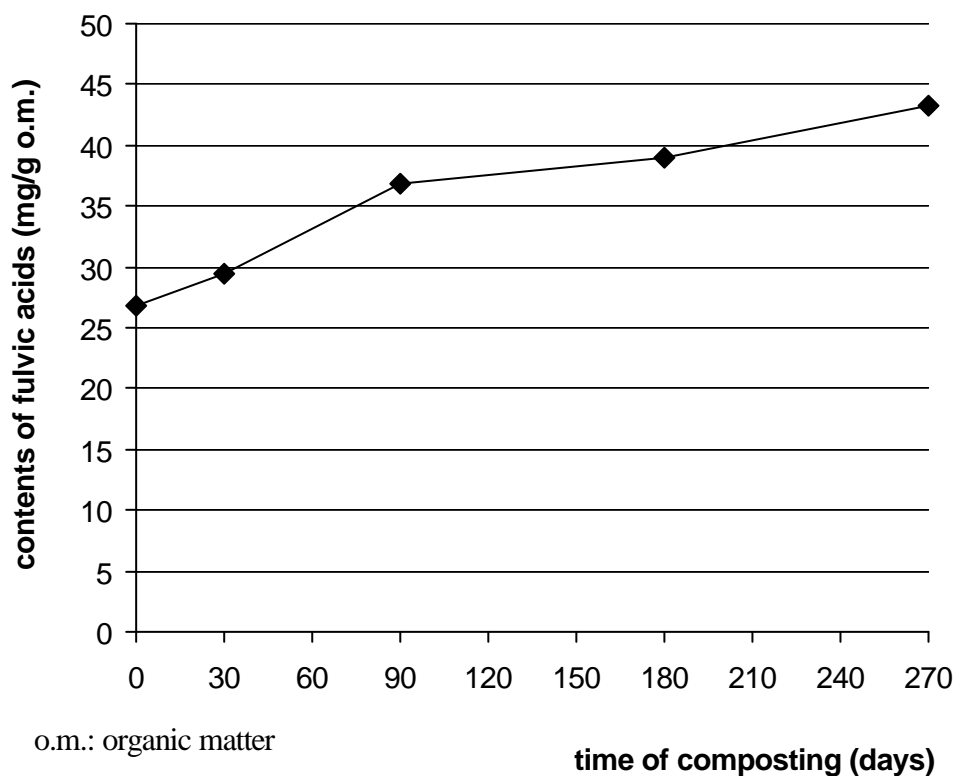


Figure 7. Contents of fulvic acids isolated from sewage sludge during composting

4. Conclusion

The evolution of the chemical structure of fulvic acids isolated from a sludge and straw mixture in the course of composting was monitored using Thermochemolysis coupled with Gas Chromatography and Mass Spectrometry. The starting material was composed mainly of mono-, di- and tri-methoxy (alkyl) benzoic acids, which constitute lignin derivatives in an advanced step of microbial oxidation that occurred during treatment of wastewater in plant. Besides, methylated polyphenols and a series of fatty acids. The fatty acids could originate from microbial or plant residues. During composting, an increase of intensity is shown for the more oxidized units C6-C1 such as protocatechuic, gallic acids or aldehydes following the side-chain oxidation of the lignin-like structure C6-C3. Besides, the neoformation of hydroquinone derivatives and unidentified aliphatic structures mainly N-containing compounds occurred with the entrance in the composting conditions. The level of fatty acids shows an increase during composting which is related to the presence of intense microbial activities and it then decreases after the microbial populations die in the final step of low respiration rate. These findings suggest the neoformation or resynthesis of fulvic acids during composting from self-polycondensation or recombination mainly of C6-C1 subunits and hydroquinones derivatives with unidentified N-containing compounds. Therefore, there is polycondensation of monomers already biotransformed by microbial metabolism during composting rather than strict biodegradation of starting polymers.

Acknowledgements

This work was supported by the JER 6013 associated to the AUPELF-UREF and Scholarship Program of Formation in Search of French-speaker university agency.

The authors thank P. Winterton (UPS Toulouse-Fr), a Native English Speaker, for his helpful criticisms of the English version of the manuscript.

References

- Alcaniz, J.M., Seres, A., Gassiot-Matas, M., 1983. Soil depth variations of humic composition studied by pyrolysis-gas chromatography (Py-GC). VIII International Symposium on Humus and Plant: Studies about humus. Praga. I, 1-4.
- Amir, S., Hafidi, M., 2001. Valorisation de boues de stations d'épuration des eaux usées par un bioprocédé aérobie "compostage". Ann. Chim. Sci. Mat., 26, S 409 – S 414.

- Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Revel, J.C., 2004. Structural characterization of fulvic acids during composting of sewage sludge. *Process Biochem* (in press).
- Anderson, H.A., Bick, W., Hepburn, A., Stewart, M., 1989. Nitrogen in humic substances. p. 223-253. In M.B.H. Hayes, P. MacCarthy, R.L. Malcolm, R.L. Swift (ed.) *Humic substances II*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Ayuso, M., Hernandez, T., Garcia, C., Pascual, J.A., 1996. Biochemical and chemical – structural characterization of different organic materials used as manures. *Bioresource Technol.* 57, 201-207.
- Azhar, El Sayed, R. Verhe, M. Proot, P. Sandra, W. Verstraete. 1986. Binding of nitrite-N on polyphenols during nitrification. *Plant Soil.* 94, 369–382.
- Bernal, M.P., Navarro, A.F., Roig, A., Cegarra, J., Garcia, D., 1996. Carbon and nitrogen transformation during composting of sweet sorghum bagasse. *Biol. Fertil. Soil.* 22, 141-148.
- Bracewell, J.M., Robertson, G.W., Williams, B.L., 1980. Pyrolysis–Mass Spectrometry studies of humification in a peat and a peaty Podzol. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 2, 53-62.
- Bremner, J.M. 1968. The nitrogenous constituents of soil organic matter and their role in soil fertility. *Pontif. Acad. Sci. Scr. Varia* 32, 143–193.
- Butler, M.J., Day, A.W., 1998. Fungal melanins : a review. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 1115-1136.
- Ceccanti, B., Alcaniz-Baldellou, J.M., Gispert-Negrell, M., Gassiot-Matas, M., 1986. Characterization of organic matter from two different soils by pyrolysis-gas chromatography and isoelectric focusing. *Soil. Sci.* 142, 83-90.
- Chefetz, B., Chen, Y., Clapp, E., Hatcher, P.G., 2000. Characterization of organic matter in soils by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 64, 583-589.
- Chefetz, B., Tarchitzky, J., Deshmukh, A.P., Hatcher, P.G., Chen, Y., 2002. Structural characterization of soil organic matter and humic acids in particle-size fractions of an agricultural soil. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 66, 129-141.
- Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D.E., Bortiatynski, J.M., Hatcher, P.G., 1995. A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: Thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Org. Geochem.* 23, 169-175.
- Davies, G., Ghabbour, E.A., Steelink, C., 2001. Humic acids: Marvelous products of soil chemistry. *Journal of Chemical Education.* 78, 1609-1614.

- del Rio, J.C., Gonzalez-Vila, F.J., Martin, F., and Verdejo, T., 1994. Characterization of Humic acids from low-rank coals by ^{13}C -NMR and pyrolysis-methylation. Formation of benzenecarboxylic acid moieties during the coalification process. *Org. Geochem.* 22, 885-891.
- del Rio, J.C., Hatcher, P.G., 1996. Structural characterization of humic substances using thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. In : Gaffney, J.S., Marley, N.A., Clark, S. B. (Eds), *Humic and Fulvic Acids, Isolation, Structure and Environmental Role*, ACS Symposium series 651. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 78-95.
- Ertel, J.R., Hedges, J.I., 1984. The lignin component of humic substances: distributions among soil and sedimentary humic, fulvic, and base-insoluble fractions. *Geochim. Cosmochim., Acta*, 48, 2065-2074.
- Filley, T.R., Minard, R.D., Hatcher, P.G., 1999. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis : Proposed mechanisms based upon the application of ^{13}C -labeled TMAH to synthetic model lignin dimer. *Org. Geochem.* 30, 607-621.
- Flaig, W., 1964. Effects of microorganisms in the transformations of lignin to humic substances. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 28, 1523-1535.
- Garcia, C., Hernandez, T., Costa, F., 1992. Characterization of Humic acids from uncomposted and composted sewage sludge by degradative and non degradative techniques. *Bioresource Technol.* 41, 53-57.
- Gobé, V., Lemée, L., Amblès, A., 2000. Structure elucidation of soil macromolecular lipids by preparative pyrolysis and thermochemolysis. *Org. Geochem.* 31, 409-419.
- Gomes, R.C., Mangrich, A.S., Coelho, R. R.R., Linhares, L.F., 1996. Elemental, functional group and infrared spectroscopic analysis of actinomycetes melanins from Brazilian soils. *Biol. Fertil. Soil* 21, 84-88.
- Gonzalez-Vila, F.J., Almendros, G., Madrid, F., 1999. Molecular alterations of organic fractions from urban waste in the course of composting and their further transformation in amended soil. *Sci. Total Environ.* 236, 215-229.
- Gonzalez-Vila, F.J., Amblès, A., del Rio, J.C., Grasset, L., 2001. Characterisation and differentiation of kerogens by pyrolytic and chemical degradation techniques. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 58-59, 315-328.
- Gonzalez-Vila, J.A, Gonzalez-Vila, F.J., Almendros G., Zancada C.M., Polvillo O., Martin F., 2003. Preferential accumulation of selectively preserved biomacromolecules in the humus fractions from a peat deposit as seen by analytical pyrolysis and spectroscopic techniques. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 68-69, 287-298.

- Grasset, L., Amblès, A., 1998. Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 47, 1-12.
- Grasset, L., Guignard, C, Amblès, A., 2002. Free and esterified aliphatic carboxylic acids in humin and humic acids from a peat sample as revealed by pyrolysis with tetramethylammonium hydroxide or tetramethylammonium acetate. *Org. Geochem.* 33, 181-188.
- Guggenberger, G., Christensen, B.T., Zech, W., 1994. Land use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of silos. I. Lignin and carbohydrates signature. *Eur. J. Soil. Sci.* 45, 449-458.
- Hafidi, M., Amir, S., Revel, J-C., 2004. Structural characterization of olive mill wastewater after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and ^{13}C -NMR. *Process Biochem.* (In press).
- Haider, K., Martin, J.P., 1967. Synthesis and transformations of phenolic compounds by *Epicoccum nigrum* in relation to HA formation. *Soil Sci. Am. Prod.* 31 (6), 766-772.
- Hatcher, P.G., Clifford, D.J., 1994. Flash pyrolysis and in situ methylation of humic acids from soil. *Org. Geochem.* 21, 1081-1092.
- Hatcher, P.G., Nammy, M.A., Minnard, S.C., Dible, Carson, D.M., 1995. Comparison of two thermochemolysis methods for the analysis of lignin in decomposing wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with TMAH. *Org. Geochem.* 23, 881-888.
- Huang, P.M., 2000. Abiotic catalysis. In: Sumner, M.E. (Ed.), *Handbook of Soil Science*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. B303–B332.
- Jokic, A., Wang, M.C., Liu, C., Frenkel, A.I, Huang, P.M. 2004. Integration of the polyphenol and Maillard reactions into a unified abiotic pathway for humification in nature: the role of δ - MnO_2 . *Org. Geochem.* 35, 747–762.
- Kelly, K.R., Stevenson, F.J., 1996. Organic forms of N in soil. p. 407-427, In A. Piccolo (ed.) *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Knicker, H., Almendros, G., Gonzalez-Vila, F.J., Lüdemann, H.-D., Martin, F., 1995. C-13 and N-15 NMR analysis of some fungal melanins in comparison with soil organic matter. *Org. Geochem.* 23, 1023-1028.
- Knicker, H., Hatcher, P.G., González-Vila F.J., 2002. Formation of heteroaromatic nitrogen after prolonged humification of vascular plant remains as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Environ. Qual.* 31, 444-449
- Koch, A.L., 1990. Growth and form of bacterial cell wall. *American Scientist* 78, 327-341.

- Kögel-Knabner, I. 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 34, 139-162.
- Lehtonen, K., Hänninen, K., Ketola, M., 2001. Structurally bound lipid in peat humic acids. *Org. Geochem.* 32, 33-43.
- Martin, F., del Rio, J.C., Gonzalez-Vila, Verdejo, T., 1995. Pyrolysis derivation of humic substances 2. Pyrolysis of soil humic acids in the presence of Tetramethylammonium hydroxide. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 31, 75-83.
- Martin, J.P., Haider K., 1981. Microbial degradation and stabilization of ¹⁴C labeled lignins phenols and phenolic polymers in relation to soil humus formation. In : lignin biodegradation : microbiology, chemistry and potential applications. Kirk, K., Higuchi, T. Chang H. eds, CRC press. : 603.
- Mathur, SP., Downen, G., Dinel, H., Schnitzer, M., 1993. Determination of compost biomaturity. I. Literature review. *Biol Agri Horticult.* 10, 65-85.
- Miikki, V., Hänninen, K., Knuutinen, J., Hyötyläinen, J., 1999. Pyrolysis of humic acids from digested and composted sewage sludge. *Chemosphere.* 38, 247-253.
- Neirop, K.G.J., Buurman, de Leeuw, J.W., 1999. Effect of vegetation on chemical composition of H horizons in incipient podzol as characterized by ¹³C-NMR and pyrolysis-GC/MS. *Geoderma.* 90, 111-129.
- Ouatmane, A., Dorazio, V., Hafidi, M., Revel, J.C., Senesi, N., 2000. Elemental and spectroscopic characterization of humic acids fractionated by gel permeation chromatography. *Agronomie.* 20, 491-504.
- Pal, S., Bollag, J.-M., Huang, P.M., 1994. Role of abiotic and biotic catalysts in the transformation of phenolic compounds through oxidative coupling reactions. *Soil Biol. Biochem.* 26, 813-820.
- Parkes, R.J., 1987. Analysis of microbial communities with sediments using biomarkers. p. 147-177. In *Ecology of Microbial Communities*, ed. by M. Fletcher, T. R. G. Gray and J. G. Jones, Cambridge University Press, Cambridge.
- Réveillé, V., Mancuy, L., Jardé, E., Garnier-sillan, E., 2003. Characterisation of sewage sludge derived organic matter: lipids and humic acids. *Org. Geochem.* 34 (4), 615-627.
- Schnitzer, M., Khan, S.U., 1972. *Humic substances in the environment*. New York : Marcel Dekker.
- Schnitzer, M., Neyroud, J.A., 1975. Alkanes and fatty acids in humic substances. *Fuel.* 54, 17-19.

- Schulten, H.R., Leinweber, P., Theng, B.K.G., 1996. Characterization of organic matter in interlayer clay-organic complex from soil by pyrolysis methylation-mass spectrometry. *Geoderma* 69, 105-118.
- Senesi, N., Miano, T.M., Brunetti, G. Humic substances in organic amendments and effects on native soil humic substances. In A. Piccolo (eds) *Humic substances in terrestrial ecosystems*, 1996, pp. 531-593.
- Serés-Aspax, A., Alcaniz-Baldellou, J.M., Gassiot-Matas, M., 1985. Application of pyrolysis-gas chromatography to the study of the composting process of barley straw and pear-tree wood. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 8, 415-426.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press. Urbana.
- Sparks, D.L., 1995. *Environmental Soil Chemistry*. Academic Press, San Diego, CA.
- Stevenson, F.J., 1994. Dynamics of soil nitrogen transformations; In *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions*. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Tanczos, I., Rendl, K., Schmidt, H. 1999. The behavior of aldehydes – produced as primary pyrolysis products – in the thermochemolysis with tetramethyl ammonium hydroxide-. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 49, 319-327.
- Thorn K. A., Mikita, M. A. 2000. Nitrite Fixation by Humic Substances: Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance Evidence for Potential Intermediates in Chemodenitrification. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 568–582
- Tinoco, P., Almendros, G., Francisco, J. Gonzalez-Vila, Lankes, U., Lüdemann, H-D., 2004. Analysis of carbon and nitrogen forms in soil fractions after the addition of 15 N-compost by ¹³C and ¹⁵N Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5412-5417.
- Tomati, U., Madejon, E., Galli, E., 2000. Evaluation of HA molecular weight as an index of compost stability. *Compost Science & Utilization*. 8, 108-115.
- Wang, M.C., Huang, P.M., 1987. Polycondensation of pyrogallol and glycine and the associated reactions as catalyzed by birnessite. *Sci. Total Environ.* 62, 435-442.

Synthèse, conclusion générale et perspectives

Synthèse et Conclusion Générale

L'objectif de ce travail est de faire sortir les boues de station d'épuration de leur réputation de déchets pour en faire un produit utilisable en agriculture par sa valorisation en un compost, sain, sans danger pour la santé et l'environnement et contenant une matière organique régénérée.

Le compostage est une filière de recyclage prometteuse qui, à partir de ces boues, peut fournir un produit de qualité et d'aspect acceptable par le marché tant du point de vue économique que psychologique du fait de l'hygiénisation et de la stabilisation (CCME, 1996; Brinton, 2000).

La valeur fertilisante du produit est un des premiers critères pour l'agriculteur. Ainsi, la qualité agronomique du compost des boues étudiées en tant qu'engrais a été recherchée. Les résultats des analyses physico-chimiques préliminaires ont démontré que leurs teneurs en Azote, Phosphore, Potassium, Calcium, Magnésium sont de l'ordre des valeurs observées dans différentes études pour d'autres composts des boues utilisés comme engrais, dont l'étude statistique réalisée en Suisse sur 137 installations de compostage des boues (Chassot et al. 2000) (Annexe 2; Tableau 1).

Un autre avantage des produits issus des boues est leur comportement d'engrais organique phosphaté et azoté à action retardée ou progressive et dont la minéralisation dans le sol serait en équilibre avec le besoin des plantes, ce qui permet de réduire le risque de pollution par ces éléments (Bouselhaj, 1996). Dans le cas de l'azote, ce critère est renforcé au cours du compostage grâce à une forte immobilisation de l'azote N-inorganique surtout nitrique potentiellement lessivable (Powlson, 1993) par une forme organique associée aux constituants microbiens ou aux structures humiques formées principalement dans la phase de maturation. Pour le phosphore, la quantité potentiellement disponible représente toujours environ 25 % du phosphore total.

Un autre critère permettant de retenir le compostage des boues est l'obtention d'un produit fini stable facile à stocker et à utiliser. Il devrait perdre les caractéristiques initiales des boues qui, elles, génèrent des problèmes de stockage du fait de leur caractère fermentescible lié à leur évolution biologique. Lors du compostage, les transformations de la matière organique et la formation de structures humiques complexes permettent d'évaluer le degré de stabilisation ou de maturation du produit final (Sanchez-Monedero et al. 1999; Ouatmane et al. 2000; Wu et Ma, 2002). L'analyse par spectroscopie infrarouge permet de déterminer directement les transformations des matières organiques produites lors du compostage par rapport aux boues

initiales. Les spectres obtenus à différents stades de compostage ont montré une même allure générale. Les principales variations observées sont une diminution de l'absorbance des composés aliphatiques liés aux lipides, polysaccharides et amides et une augmentation de l'absorbance des structures aromatiques étherifiées dans le compost mature. La diminution du caractère aliphatique et l'augmentation de l'aromaticité ont été démontrés aussi par de nombreux auteurs sur d'autres systèmes de compostage (Inbar et al. 1991; Chefetez et al. 1998a; Zbytniewski et Buszewski, 2005). La qualité d'amendement d'un compost est liée en principe à cette aromaticité des structures organiques qui influe sur la structure et texture du sol (Riveroa et al. 2004; Spaccini et al. 2002).

Parmi les critères environnementaux, la teneur en éléments traces métalliques d'un produit destiné à l'agriculture est soumise à législation du fait du risque toxique qu'ils peuvent représenter (Amlinger, 2004). Ainsi, pour obtenir un compost de qualité, il est donc indispensable de contrôler en amont la concentration en éléments traces dans les boues à composter. Pour les boues étudiées, les teneurs en éléments traces Zn, Pb, Cu, Ni du compost sont inférieures quelque soit le stade de compostage aux teneurs données pour des composts qualifiés de "propres" (voir tableau 6, page 28). Cependant, si les teneurs totales ne donnent aucune indication sur la mobilité ou la biodisponibilité de ces éléments traces, l'utilisation d'une méthode d'extraction séquentielle fournit des informations sur cette mobilité potentielle en fonction des formes chimiques des éléments traces (Horn et al. 2003). Les résultats d'une extraction séquentielle appliquée sur le compost des boues à différents stades de traitement et l'application des modèles de régression linéaire sur ceux-ci montrent en fait que les concentrations totales des éléments traces observées ne peuvent pas préjuger des quantités biodisponibles à partir de ce compost. En général, moins de 2 % des teneurs des métaux lourds étudiés (% /teneur totale en élément) peuvent être potentiellement bio-disponibles (fraction « échangeable + soluble »), une large proportion est dans la fraction résiduelle inerte (Zn : 79,6 %, Cu : 70,4 %, Pb : 82,4 %, Ni : 82,8 %), le reste étant sous des formes moins bio-disponibles fraction organique, carbonate ou sulfure (Zn : 20,2 %, Cu : 29,4 %, Pb : 17,7 %, Ni : 15,2 %). Lors du compostage, hormis le Ni, les formes mobiles des métaux lourds montrent une certaine tendance à la diminution, suggérant leur immobilisation. Le transfert des métaux lourds aux fractions organique et carbonate n'entraîne pas forcément une mobilisation des métaux car celles-ci peuvent constituer des phases intermédiaires pour la formation des complexes humiques plus stables (Kaerner et al. 1999 ; Halim et al., 2003). Les variations observées permettent l'utilisation d'une régression pas à pas caractérisée par une augmentation significative du coefficient de corrélation R^2 avec les variations de certains

paramètres physico-chimiques tels que le pH, le taux des cendres, la décomposition de la matière organique et l'augmentation des teneurs en substances humiques.

Le changement de la distribution métallique entre les différentes fractions peut être considéré comme très faible par rapport à ce qui serait attendu dans un système biologiquement et chimiquement très actif comme le compostage. Ceci est principalement dû au fait qu'une grande proportion des teneurs totales est en majorité liée à des formes chimiques inertes ou très stables et qu'en plus ces teneurs totales sont très faibles. Les teneurs potentiellement mobiles étant très négligeables, on peut écarter toute possibilité de contamination métallique suite à l'application du compost au sol, même à long terme. Ainsi, dans le cas du compost des boues étudiées, les teneurs en éléments traces et leurs formes chimiques ne restreignent pas son usage agricole.

Les études réalisées sur les polluants organiques, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques et les Esters de l'Acide Phthalique, montrent elles aussi des teneurs dans le produit final très négligeables qui autorisent une utilisation agricole de ce compost de boues sans craintes de contamination. Elles permettent de mettre en évidence un certain nombre de mécanismes contribuant à leur élimination par biodégradation ou à leur incorporation suite à des modifications de leur état chimique initial.

Vu leur structure chimique simple, les phthalates, subissent généralement une biodégradation complète qui peut suivre alternativement deux voies métaboliques (Cartwright et al., 2000). Dans une première voie, l'attaque microbienne commence par une oxydation des chaînes aliphatiques latérales facilement assimilables avant l'ouverture du cycle aromatique. Ceci explique l'apparition d'esters phthaliques à chaînes alcoyles très courtes qui sont probablement issus de l'oxydation d'esters à chaînes aliphatiques plus longues. La deuxième voie consiste en une dé-estérification / transestérification successive des deux parties esters. Dans le cas du DEHP, la dé-estérification suit une cinétique de décomposition du premier ordre. Son produit de dé-estérification le MEHP présente une cinétique de déalkylation similaire. L'apparition de benzyle butyle phthalate en fin du compostage représente un cas de transestérification suite au remplacement d'un butyle du DBP par un noyau aromatique justifié par la grande abondance de composés organiques aromatiques à ce stade du compost. La biodégradation des phthalates s'est révélée plus rapide et efficace dans un milieu microbiologiquement plus actif comme le compostage de boues activées (Zeng et al. 2004). Ainsi, un traitement par compostage peut maîtriser toute contamination de boues résiduaire en phthalates à condition de bien contrôler les conditions de compostage par un bon

développement des populations microbiennes variées et par une durée du compostage suffisante (Marttinen et al. 2004).

Pour les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques les teneurs initialement dosées ont été aussi quasi-totalement abattues lors du compostage mais avec une combinaison de nombreux mécanismes. Une forte biodégradation est impliquée au cours de la phase de stabilisation surtout pour les HAP légers avec un faible poids moléculaire alors que pour les HAP à poids moléculaire élevé, c'est le mécanisme d'adsorption lié à leur grande lipophilie qui est principalement prédominant lors de cette phase (Lazzari et al. 1999). Cette adsorption n'est que superficielle puisque au début de la phase de maturation, les HAP adsorbés sont relibérés par la décomposition microbienne du support lignino-cellulosiques (paille). La vitesse de relargage diffère selon le poids moléculaire des individus, les HAP avec un nombre de cycle aromatique et un poids moléculaire faibles sont faiblement adsorbés et peuvent être ainsi facilement et rapidement désorbés. Pour les HAP avec un nombre de noyaux aromatiques et un poids moléculaire élevés, fortement adsorbés durant la phase de stabilisation, ils voient leur désorption retardée. Durant la phase de maturation, la réduction finale du reste des teneurs en HAP est liée soit à une biodégradation intense liée à la présence de populations microbiennes mésophiles, ou soit à une polycondensation de leurs métabolites d'oxydation aux substances humiques néoformées lors de cette phase. Ces réactions de polycondensation semblent très importantes pour les HAP à grand nombre de noyaux aromatiques et de poids moléculaire élevé. Les mécanismes de biodégradations, d'adsorption et d'humification des HAP sont très dépendants du nombre de cycles aromatiques et de la structure moléculaire de ceux-ci. En résumé, lors du compostage, une partie des HAP sont dégradés, alors que le reste est probablement séquestré à l'intérieur des vides micellaires humiques en développant des réactions de polycondensations oxydatives avec les substances humiques (Richnow et al. 1997). Ces réactions entraînent un changement de leur état chimique initial en formant un résidu inextractible inerte désigné sous le terme de résidu biogénique et considéré comme non toxique (Kästner et al. 1995).

Par conséquent, le traitement par compostage peut être assimilé à un processus de dépollution ou de détoxification des polluants organiques à condition de bien contrôler les différentes conditions pour le développement d'une grande variété de populations microbiennes permettant des séquences métaboliques et enzymatiques variées efficaces et capables de récupérer une plus large proportion d'énergie disponible dans un substrat organique naturel ou xénobiotique (Juhász et Naidu, 2000). La succession des populations microbiennes thermophiles et mésophiles permet d'assurer la synergie nécessaire pour réaliser des étapes de

dégradation différentes et complémentaires et pour achever une dégradation complète d'un substrat organique complexe.

En conclusion, pour fournir un produit utile pour le sol et minimiser ou supprimer tout risque de contamination probable, il faut gérer d'une part la phase de dégradations ou de stabilisation des composantes organiques, et s'assurer d'une bonne maturation du produit d'autre part (Vinceslas-Akpa et al. 1997; Sanchez-Monedero, 2004; Ouatmane et al. 2000).

Un test agronomique en utilisant le ray grass a été réalisé en vases de végétation dans le but de confirmer l'absence d'une éventuelle toxicité du compost et la maturité du produit final (Pascual et al. 1997). Les résultats obtenus n'ont montré aucun effet dépressif. A l'opposé en augmentant la dose du compost appliquée au sol, de 100 à 400 kg équivalent azote par ha de sol, on constate une augmentation significative de la production végétale soit dans la partie aérienne ou soit dans la partie racinaire et ce pour les deux récoltes successives (Annexe 3, tableau 1).

Généralement, la qualité agronomique d'un compost est très liée au degré de sa maturation (Keeling et al. 2003). Selon plusieurs chercheurs, la maturation du compost est déterminée par sa teneur en substances humiques et surtout par l'aromaticité de leurs structures (Spaccini et al. 2002, Zorpas et al. 2003). Ainsi, l'objectif de la dernière partie est la caractérisation structurale des substances humiques à différents stades du compostage en utilisant un ensemble de techniques diverses et complémentaires telles que l'analyse élémentaire, les techniques chromatographiques ou spectroscopiques (Senesi et al. 1996). L'intérêt de l'utilisation de techniques variées est l'acquisition d'un maximum de données utiles pour caractériser les biotransformations des différentes composantes organiques et les mécanismes de formation de structures humiques au cours du compostage.

Un fractionnement des acides humiques sur gel de Séphadex a permis d'identifier la présence de deux types de sous-structures moléculaires. La plus prédominante est de nature hétérogène avec des structures aromatiques très polycondensées, sur lesquelles sont greffées des structures aliphatiques périphériques telles que des polysaccharides, des polypeptides et des chaînes lipidiques longues. La deuxième sous fraction est plus petite, de nature plus homogène et se compose de structures aromatiques moins polycondensées et riches en groupements fonctionnels surtout carboxyliques. Ces groupements carboxyles ont été identifiés comme les entités assurant les liens non covalents de type pont hydrogène ou van der Waals de cette sous fraction avec la fraction prédominante (Piccolo et al. 1997).

Cependant, avec l'augmentation du pouvoir séparateur du gel, l'élution de structures lipidiques avec la deuxième sous fraction permet de suggérer qu'une partie des structures lipidiques n'est pas strictement liée à la première sous fraction prédominante, et ne serait qu'un coextrait isolé avec les structures humiques. Une élimination préalable de ces entités lipidiques permet l'isolement de structures humiques moins hétérogènes et dont les analyses sont plus facilement exploitables (Gonzalez-Vila et al., 1983).

Les analyses élémentaires, par spectroscopie infrarouge et résonance magnétique nucléaire C^{13} effectuées sur les acides humiques non délipidés et délipidés ont démontré que la purification a enlevé près de 45 % des composés aliphatiques coextraits avec les structures humiques isolées sans délipidation préalable et qui sont des acides gras libres en grande partie. Ces dernières techniques couramment employées pour la caractérisation des fonctions carbonées de la matière organique peuvent être également employées pour évaluer le degré d'humification de la matière organique au cours du compostage en fonction de son caractère aromatique (Inbar et al. 1991; Senesi et al. 1996 ; Chien et al. 2003).

Une corrélation entre les données fournies par ces différentes techniques suggère que l'humification au cours du processus du compostage consiste à une diminution du caractère aliphatique et une augmentation des structures aromatiques éthérifiées plus polycondensées. La diminution du caractère aliphatique est attribuée à l'oxydation des structures aliphatiques facilement assimilables telles que les peptides et les polysaccharides par les populations microbiennes développées au cours du compostage à fin d'assurer leurs besoins énergétiques (Inbar et al. 1991). Cette réduction du pool aliphatique est considérée comme contribuant à l'augmentation du caractère aromatique (Zbytniewski et Buszewski, 2005). Dans le cas des acides humiques, l'aromatisation est le principal indice de leur maturation au cours du compostage. Cependant, dans le cas des acides fulviques, la prédominance du caractère aliphatique des polyalcools ou des polyacides influe sur les transformations structurelles produites lors du compostage, une partie des structures aliphatiques de type cétole étant préservée sous des formes stables (Almendros et al. 2000).

L'utilisation de la thermo-chemolyse couplée avec un chromatographe en phase gazeuse avec un détecteur de masse (TMAH-GC-MS) permet d'acquérir plus de détails sur les sous unités moléculaires composants les structures humiques et leur évolution lors du traitement par compostage (Veeken et al. 2000; Schnitzer et al. 2000). Dans le cas des acides humiques, une grande variété de structures aromatiques en partie de type lignine-like est identifiée en plus d'une grande proportion d'acides gras. Selon cette étude, l'humification au cours du compostage peut être attribuée à une oxydation de la chaîne latérale des structures lignine like

C6-C3 en produisant de grandes quantités de sous unités plus oxydées, dont les acides polyphénoliques C6-C1 de type guaicyl et syringyl. Toutefois la néosynthèse microbienne peut aussi être à l'origine de ces sous-unités C6-C1. L'humification observée par la suite est attribuée à une autopolycondensation de ces unités selon la « voie de polycondensation des poly phénols » (Chefetez et al. 1998b). Dans le cas des acides fulviques, les structures sont plus homogènes et se composent aussi en grande partie d'acides gras et de sous unités lignine-like. Cependant, le mécanisme de leur néoformation diffère, puisque, du fait des conditions oxydantes du début de compostage, une grande partie des structures C6-C1 s'est transformée en hydroquinones avec une formation parallèle de structures aliphatiques de nature azotée encore mal-identifiées et probablement d'origine microbienne comme suggéré par Knicker et al. (2002). Lors du compostage, la recombinaison de ces hydroquinones avec les structures aliphatiques azotées peut être considérée comme la principale voie de néoformation des structures fulviques. Ainsi nos observations montrent que les mécanismes de néoformation des acides fulviques et celle des acides humiques sont différents. Cependant, dans les deux structures humiques et fulviques, l'augmentation des acides gras est liée aux productions des populations microbiennes développées lors du compostage et leur diminution à la fin du processus est liée à la mort de la majorité de ces populations microbiennes (Klamer et al. 1998).

A la lumière de l'ensemble des résultats, la maturation d'un compost converge vers l'élaboration d'une matière humique avec un caractère aromatique de plus en plus prédominant, particulièrement dans le cas des acides humiques. Dans le cas des acides fulviques, les structures aliphatiques plus stables semblent encore préservés ou néoformés. Avec l'humification, les structures humiques deviennent plus homogènes en composant des sous unités humiques similaires qui perdent progressivement leur filiation aux structures organiques initiales. Ces données sont en parfait accord avec les données récentes de la littérature et permettent de les classer parmi les structures humiques les plus évoluées à grand degré d'aromaticité (González et al. 2001 ; Zbytniewski et Buszewski, 2005). Ainsi, l'augmentation du caractère aromatique lors du compostage peut être considérée comme un indice de sa maturation (Zorpas et al. 2003). Parmi les techniques employées, le choix d'une méthode plus pratique pour la détermination du degré d'aromaticité d'un compost amène à considérer à la fois la simplicité de la technique, sa reproductibilité, et l'acquisition des données relativement quantitatives sur la distribution du carbone entre les différentes structures chimiques.

L'infrarouge est certes une méthode simple et accessible, mais reste très limitée pour déterminer le degré d'aromaticité des structures chimiques puisque des structures aromatiques et aliphatiques peuvent absorber dans une même zone du spectre IR. La thermo-chemolyse donne plus de détails sur les sous unités moléculaires composant les structures étudiées, mais elle présente encore l'inconvénient de n'analyser qu'une faible proportion de l'échantillon et donc de ne pas évaluer exactement les proportions des différentes structures impliquées lors de l'humification. Le recours à une étude quantitative par thermo-chemolyse est exigeant en quantité de matières lyophilisées à analyser et en temps (Schulten et Leinweber, 1996; Leinweber et Schulten, 1999). L'analyse par RMN-C13 peut être retenue puisque c'est la technique qui permet de suivre l'importance relative des différentes formes de carbones obtenues lors du compostage et qui fournit le plus de données quantitatives sur le degré d'aromatisation du produit analysé. Cette technique est préférentiellement utilisée à l'état solide pour éviter tout problème de solubilité imparfaite de l'échantillon dans le solvant deutéré.

En résumé, pour l'obtention d'un compost mature, à haute valeur agronomique, il faut chercher à influencer l'aromatisation du produit au cours du compostage en contrôlant les conditions de déroulement du processus de compostage, et le choix des mélanges de matières premières destinées à composter (Madejón et al. 2001 ; Spaccini et al. 2002 ; Rivero et al. 2004)

En cherchant à améliorer l'aromatisation du produit final, on peut maximiser l'oxydation des structures aliphatiques périphériques facilement assimilables et, par la suite, favoriser la production de structures aromatiques à caractère récalcitrant et riches en groupements fonctionnels surtout oxygénés. Ces groupements fonctionnels leur permettent d'assurer des réactions d'autopolycondensation ou recombinaison avec d'autres structures organiques déjà biotransformées pour former des structures humiques. Ces réactions de polycondensations oxydatives très stables peuvent intégrer aussi des métabolites provenant de composés xénobiotiques tels que les HAP qui peuvent être séquestrés ou piégés à l'intérieur des vides miscellaires humiques. Par ailleurs, les groupements fonctionnels des structures humiques ainsi obtenus assurent des réactions de complexation ou d'immobilisation des éléments traces métalliques présents dans le mélange à composter. Par conséquent, l'obtention d'un produit final dans un état structurellement stable peut assurer au sol un meilleur amendement humifère sans risque.

Parallèlement l'intérêt du compostage comme processus de détoxification des polluants organiques amène actuellement de nombreux organismes de normalisation français, européens et internationaux à développer des programmes de recherche visant à proposer des méthodes standardisées d'évaluation de la biodégradabilité tournées vers des molécules (comme les détergents) ou des matériaux spécifiques (comme les plastiques) (Gourdon, 2002). De nombreuses recherches ont démontré que le compostage des sols réduit très significativement la contamination des sols pollués en pétroles (Morris et al. 1995). Les résultats obtenus dans ce travail et les remarques projetées dans le cadre d'une dépollution des xénobiotiques organiques (HAP, phthalates) par le biais de biodégradation ou de compostage, nous permettront de proposer la nécessité d'utiliser le compostage comme traitement de détoxification de boues d'origine industrielle, afin d'éviter ou réduire au maximum le transfert de toute pollution organique probable vers les écosystèmes quelque soit la destination finale de ces boues.

Finalement, les données acquises dans ce travail ne doivent pas rester limitées à un cadre de recherche universitaire. La résolution des problèmes liés aux boues et les projets de valorisation de celles-ci ne pourraient réussir sans un transfert d'information à l'extérieur pour sensibiliser le public qui devra distinguer clairement entre les boues brutes issues des stations qui sont des déchets et les produits issus des mêmes boues hygiénisées et/ou compostées qui respectent des normes de qualité et qui sont une véritable matière première fertilisante et amendante.

Perspectives

Au cours de ce travail, nous avons distingué l'utilité d'une étude sur les lipides à deux niveaux :

En premier, l'augmentation des teneurs d'acides gras particulièrement les phospholipides en présence d'activités microbiennes intenses et leur diminution à la fin avec la mort de la majorité de ces populations pourraient servir comme d'indices d'évolution biologique lors du compostage. Sachant que certains phospholipides sont considérés des biomarqueurs ou des substances de signature caractéristique pour une espèce simple ou même un groupe spécifique de micro-organismes, on aurait la possibilité d'obtenir des indications sur l'évolution et les changements des différents principaux groupes microbiens au cours du compostage, comme les moisissures, les actinomycètes et les bactéries gram positives ou

négligentes. Ainsi connaissant les phospholipides caractéristiques des différentes espèces thermophiles ou mésophiles, des rapports entre les phospholipides de différentes espèces peuvent être établis comme indicateurs de maturation du compost.

En deuxième lieu, les réactions de polycondensations oxydatives entre les métabolites des HAP et les structures humiques nous ont conduit à envisager lors de l'humification l'établissement d'un noyau aromatique plurinucléaire dont le nombre de noyaux ou « maillons » augmente avec le processus. Par ailleurs, l'augmentation d'entités lipidiques de type stéroïdes ou terpènes observée serait une autre voie pour appuyer cette hypothèse. Parmi les autres études en perspective, le suivi de l'évolution d'un HAP radiomarqué lors du compostage permettrait de déterminer la proportion qui subit une biodégradation totale et celle intégrée dans le corps humique.

ANNEXES

Annexe 1

1. Origine des Boues étudiées

Les boues d'épuration étudiées ont été prélevées de la station expérimentale de traitement des eaux usées par lagunage anaérobie. La station a été installée dans les champs d'épandage des eaux usées de la ville de Marrakech (Zone d'El Azzouzia), et elle n'a reçu que les eaux provenant du quartier résidentiel Guéliz et une partie du rejet du quartier industriel de la ville de Marrakech. Les boues ont été prélevées à différents niveaux du bassin pour avoir un échantillon homogène. Par la suite les boues ont été étalées pour réduire leur teneur en eau par évaporation, afin de faciliter leur transport pour l'essai de compostage qui a été conduit avec les boues humides sur une plateforme à la Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech.

2. Description du système pilote de lagunage anaérobie

Le système est constitué d'un seul bassin creusé dans un substrat calcaire sous forme d'une cuve à bord incliné avec un volume total de 665 m³ et une hauteur totale de 3,2 m dont 3 m sont en eau, ayant comme dimensions pour la partie supérieure : 32,8 m de long par 11 m de large, et pour le fond : 26 m de long et 1,2 m de large (figure 1). Au début de son fonctionnement en 1985 le système était destiné à traiter l'effluent de 50.000 équivalent habitants. Les performances épuratoires et caractéristiques physico-chimiques de l'eau brute (EB) et de l'eau traitée (ET) par ce bassin de lagunage sont indiquées dans le tableau 1.

La boue utilisée dans cette étude a été prélevée au fond du bassin après son arrêt de fonctionnement en 1993. Elles n'ont subi aucun traitement de digestion ou de stabilisation à part une légère évaporation par simple séchage à l'air libre.

Tableau 1. Caractérisation des eaux usées brutes et traitées et performances épuratoires du lagunage anaérobie (Echab, 1998)

| | E.B. | E.T. | % abattement | Référence |
|---------------------------------------|--------|--------|--------------|---------------------|
| MES (mg/l) | 171,78 | 111,85 | 34,88 | Bousselhaj, 1996 |
| DCO (mgO ₂ /l) | 400,93 | 418,19 | / | |
| DBO (mgO ₂ /l) | 267,79 | 181,10 | 32,37 | |
| NTK (mg/l) | 66,88 | 54,49 | 18,53 | |
| N-NH ₄ ⁺ (mg/l) | 46,20 | 37,7 | 18,40 | |
| PT (mg/l) | 9,49 | 8,37 | 11,80 | |
| P-PO ₄ (mg/l) | 4,85 | 4,54 | 6,39 | |
| Pb (µg/l) | 69,62 | 45,59 | 11,60 | Fars, 1994 |
| Cu | 34,43 | 22,36 | 21,51 | |
| Cd | 17,18 | 17,50 | / | |
| Zn | 549,35 | 393,40 | 28,19 | |

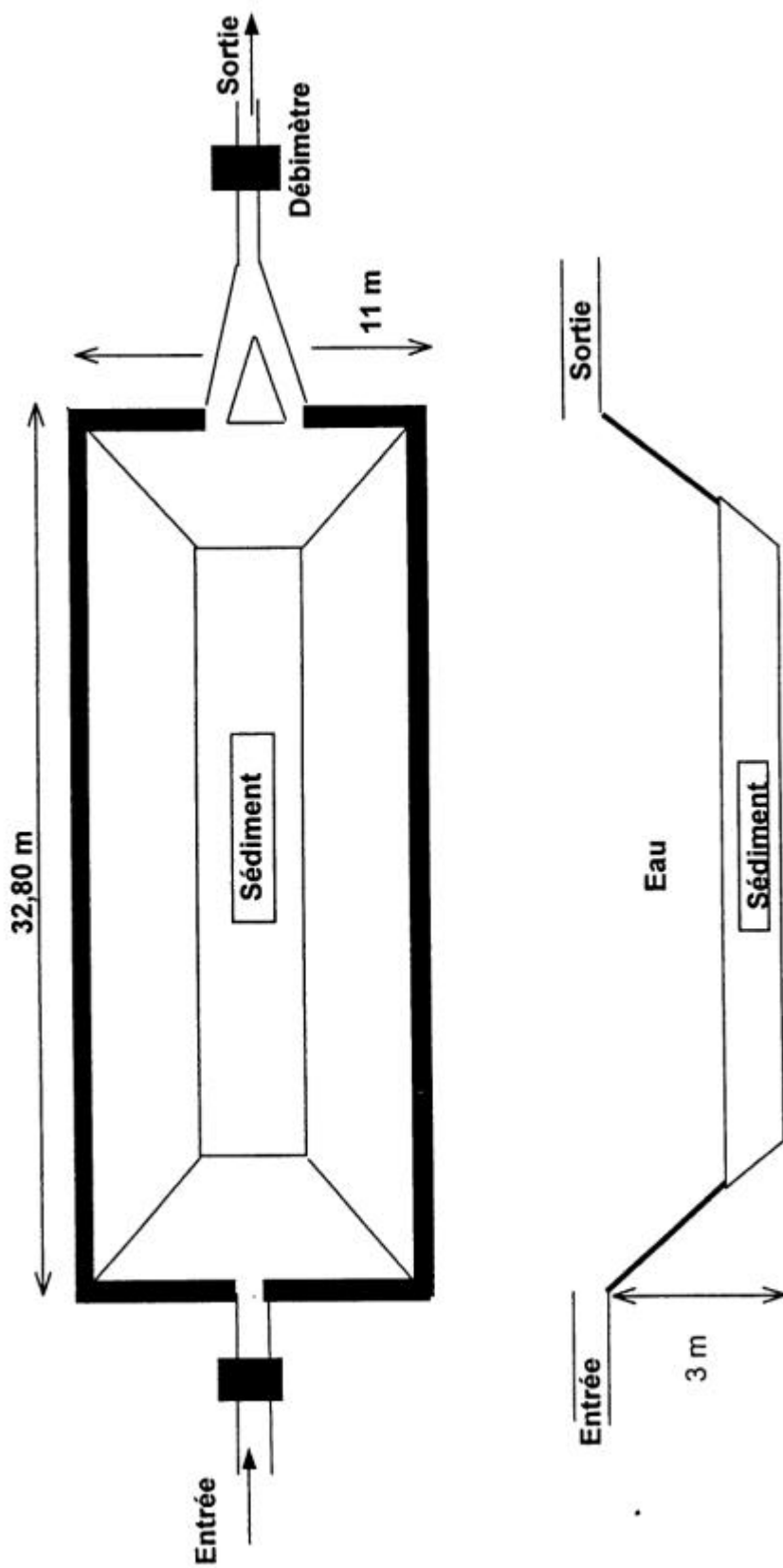


Figure 1. Schéma du bassin de lagunage anaérobie de Marrakeck (Echab, 1998)

3. Essai de Compostage

Pour un bon déroulement du processus de compostage la paille a été utilisée comme additif pour améliorer à la fois la structure massive des boues et pour ramener le rapport C/N à une valeur favorable au commencement et à la conduite du processus du compostage. Les caractéristiques physico-chimiques des boues et de la paille sont illustrées dans le tableau 2 (Amir, 2000). Le mélange choisi est 90 % de boues et 10 % de paille. Ainsi, 165 kg de boues de lagunage et 20 kg de paille ont été bien homogénéisés et placés en forme de tas sur une plate forme de compostage dans le jardin expérimental de la Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech. La température, signe d'activité microbienne, a été mesurée quotidiennement pour contrôler le développement du processus. Un brassage a été effectué tout les 15 jours afin d'assurer une bonne aération du mélange à composter, et l'homogénéité du processus sur tout le mélange à composter. Des prélèvements de 2,5 Kg sont réalisés à différents stades caractéristiques du compostage : temps initial ; après 1 mois ; après 3 mois ; après 6 mois et 9 mois de compostage. A chaque prélèvement, le sous-échantillonnage a été réalisé en surface, fond, bas, côté du tas sur dix points différents pour bien mélanger le tout en un seul échantillon représentatif. Les échantillons sont ensuite conservés au congélateur (-18°C) jusqu'à analyse.

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques de matières à composter

| Caractéristiques physico-chimiques | Boues | Paille | Mélange |
|------------------------------------|-------|--------|---------|
| Humidité % | 50 | 10 | 54 |
| pH | 7,4 | 6,75 | 7,3 |
| C.org % | 18,14 | 46,4 | 17,75 |
| M.O % | 31,3 | 97,8 | 30,6 |
| NKT % | 1,29 | 0,74 | 0,74 |
| C/N | 14 | 62,7 | 24 |
| Cendres % | 68,8 | 20 | 65,9 |

C.org : Carbone organique ; NKT : Azote total kjeldahl; M.O : Matière organique

Annexe 2

Tableau 1. Données actuelles de la littérature sur des composts suisses à valeur d'engrais
(Chassot et al. 2000).

| | Unité par kg MS | n | Minimum | Maximum | Moyenne pondérée | Médiane |
|---------------------------------|--------------------|-----|---------|---------|---------------------|---------|
| Azote total (Ntot) ¹ | g | 137 | 6,4 | 22,9 | 13,5 | 13,3 |
| Phosphore (P) ¹ | g | 137 | 0,97 | 3,9 | 3,4 | 3,1 |
| Potassium (K) ¹ | g | 137 | 2,5 | 23,2 | 9,2 | 9,6 |
| Calcium (Ca) ¹ | g | 137 | 2,7 | 153 | 47,5 | 52,8 |
| Magnésium (Mg) ¹ | g | 137 | 0,17 | 17,5 | 7,4 | 5,8 |
| Cadmium (Cd) ¹ | mg | 137 | 0,01 | 1,22 | 0,36 | 0,36 |
| Chrome (Cr) ¹ | mg | 137 | 4,5 | 78 | 22,3 | 22,8 |
| Cuivre (Cu) ¹ | mg | 137 | 12,5 | 218 | 57,7 | 47 |
| Mercure (Hg) ¹ | mg | 137 | 0,02 | 0,55 | – | 0,12 |
| Nickel (Ni) ¹ | mg | 137 | 2,2 | 51 | 16,3 | 15,1 |
| Plomb (Pb) ¹ | mg | 137 | 12,5 | 154,9 | 49,3 | 44,5 |
| Zinc (Zn) ¹ | mg | 137 | 65 | 510 | 183,5 | 162 |
| HAP ² | µg | 3 | 827 | 2698 | 2006 ³ | 2492 |

n = nombre d'installations de compostage.

¹ Substances contrôlées dans le cadre de l'ordonnance sur les substances.

² Somme de 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques

³ Moyenne arithmétique.

Annexe 3

Essai agronomique en vases de végétation : Ray Grass

Dans des pots de culture contenant un kilogramme de sol, tamisé à 2 mm, une dose connue du compost de boues à 9 mois (compost final) est rajoutée à chaque fois. Des quantités croissantes de compost de boues ont été appliquées soit 3,59 ; 7,17 ; 14,34 g correspondants à l'équivalent de 100; 200; 400 kg d'azote total par ha de sol (soit 11,34; 22,68; 45,35 tonnes de matière sèche de compost par ha de sol). La conversion des quantités par pot en matière sèche par hectare a été faite en tenant en compte de la densité apparente du sol d'environ 1,6. L'expérience a fait l'objet de quatre répétitions en double (x 8) incluant les pots de contrôle avec le sol seul. Le doublement a été effectué dans l'objectif de récupérer les racines après la première coupe.

Les graines de ray-grass d'Italie «*Lolium multiflorum*» ont étéensemencées (à raison de 1 gramme/pot) de façon homogène à quelques centimètres de la surface du sol (Chaminade, 1960). Les essais ont été conduits dans les conditions climatiques naturelles (Juin-Aout) dans une ombrière à la Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech. L'irrigation des pots a été effectuée en fonction des besoins (au 2/3 de la saturation) avec l'eau courante. Deux coupes successives de la partie aérienne ont été effectuées à 1 mois et 2 mois. Les parties aériennes et les racines prélevées pour chaque essai ont été bien rincées, égouttées, séchées à 60 °C pendant 72 h. Les pesées des matières végétales séchées permettent l'estimation de la production végétale du ray grass (g poids secs/pot)

Tableau 2 : Biomasse végétale de ray grass (g poids secs/pot) après 1 mois (1^{ère} coupe) et après 2 mois (2^{ème} coupe) de l'essai type Chaminade réalisé avec le compost de boues.

| Essai | PA : 1 coupe | PR : 1 coupe | PA : 2 coupe | PR : 2 coupe |
|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Contrôl | 6,93 ± 0,50 | 0,76±0,07 | 2,95±1,42 | 0,75±0,22 |
| 1 dose | 8,06± 0,57 | 0,82±0,01 | 2,69±0,13 | 0,96±0,16 |
| 2 dose | 10,12±0,73 | 2,67±0,49 | 3,37±0,48 | 1,05±0,17 |
| 3 dose | 11,23±0,48 | 2,03±0,32 | 4,35±0,86 | 0,89±0,18 |

PA: partie aérienne ; PR : partie racinaire

1 dose = 100 ; 2 dose = 200 kg ; 3 dose = 400 kg équivalent azote/ha

Références bibliographiques

- Almendros, G., Dorado, J., González-Vila, F.J., Blanco, M.J., Lankes, U., 2000. ^{13}C -NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest and shrub biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 793-804.
- Amir, 2000. Traitement des boues de stations d'épuration par le procédé de compostage Mémoire de DESA, Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 40 p.
- Amlinger D., 2004. Heavy metals and organic compounds from wastes used as organic fertilisers, ENV.A.2./ETU/2001/0024, Compost-Consulting & Development, Perchtoldsdorf.
- Bousselhaj, K., 1996. Etude du potentiel fertilisant (N et P) de deux boues de stations d'épuration par lagunage anaérobie et par boues activées. Thèses de 3^{ème} cycle, Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 171 p.
- Brinton, W.F., 2000. Compost Quality in America, compost quality standards and guidelines. Woods End Research Laboratory, Inc.
- Cartwright, C.D., Owen, S.A., Thompson, I.P., Burns., R.G., 2000. Biodegradation of diethyl phthalate in soil by a novel pathway. *FEMS Microbiology Letters*, 186, 1, 1, 27-34.
- CCME (Canadian Council of the Ministers of the Environment), 1996. Guidelines for compost quality. CCME 106E, CCME Documents, Winnipeg, 11 pp.
- Chaminade, R., 1960. Expérimentation en petits vases de végétation. Types d'essais pour tester l'efficacité des engrais humiques. *Annal. Agron.*, 86-87, 121-126.
- Chassot, G.M., Candinas, T., Kupper, T., Besson J.M., 2000. Qualité des engrais à base de déchets et contamination du sol due à leur utilisation. *Revue suisse Agric.*, 32, 2, 85-91.
- Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y., 1998b. Purification and Characterization of Laccase from *Chaetomium thermophilum* and Its Role in Humification. *Appl. Environ. Microb.*, 64, 9, 3175-3179.
- Chefetz, B., Hatcher, P.G., Hadar, Y., Chen, Y., 1998a. Characterization of Dissolved Organic Matter Extracted from Composted Municipal Solid Waste. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 62, 326-332.
- Chen, J-S., Chiu, C-Y., 2003. Characterization of soil organic matter in different particle-size fractions in humid subalpine soils by CP/MAS ^{13}C NMR. *Geoderma*, 117, 129-141.
- Chien, S-W.C., Huang, C.C., Wang, M.C., 2003. Analytical and spectroscopic characteristic of refuse compost-derived humic substances. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 1, 1, 62-71.
- Echab, A., 1998. Reutilisation des boues de stations d'épuration des eaux usées en Agriculture : Impact des métaux lourds. thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 133 p.
- Fars, S., 1994. Etude de l'élimination des métaux lourds (Cu, Zn, Pb et Cd) contenus dans les eaux usées de Marrakech par quatre systèmes expérimentaux : Lagunage anaérobie, Lagunage

aéro-anaérobie, Sur-irrigation drainage et infiltration-percolation. Thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 157 p.

Gonzalez-Vila, F.J., Lankes, U., Ludemann, H.D., 2001. Comparison of the information gained by pyrolytic techniques and NMR spectroscopy on the structural features of aquatic humic substances. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 58–59, 349–359.

Gonzalez-Vila, F.J., Ludemann, H.D., Martin, F., 1983. ¹³C-NMR structural features of soil humic acids and their methylated, hydrolyzed and extracted derivatives. *Geoderma*, 31, 3-15.

Gourdon, R., 2002. Aide à la définition des déchets dits biodégradables, fermentescibles, méthanisables, compostables. RECORD 00-0118/1A. www.record-net.org.

Halim, M., Conte, P., Piccolo, A., 2003. Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. *Chemosphere*, 52, 1, 265-275.

Horn, A.L., Düring, R-A., Gäth, S., 2003. Comparison of decision support systems for an optimised application of compost and sewage sludge on agricultural land based on heavy metal accumulation in soil. *The Science of The Total Environment*. 311, 1-3, 35-48.

Inbar, Y., Chen, Y., Hadar, Y., 1991. Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting of solid wastes. *Soil. Sci.* 152. 272-282.

Juhasz, A.L., Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45, 1-2, 57-88.

Kaemmerer, M., Guiesse, M., Revel, J.C., Koetz, P., Facal, P., Rey, F. 1999. Conductimetric behaviour of humic acids with Cu(II) ions. *Analisis*, 27, N° 5.

Kästner, M., Lotter, S., Heerenklage, J., Breuer-Jammali, M., Stegmann, R., Mahro, B., 1995. Fate of ¹⁴C-labeled anthracene and hexadecane in compost manured soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1128–1135.

Keeling, A.A., McCallum, K.R., Beckwith, C.P., 2003. Mature green waste compost enhances growth and nitrogen uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.) through the action of water-extractable factors. *Bioresource Technol.*, 90, 127–132.

Klamer, M, Baath, E., 1998. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis *FEMS Microbiology Ecology*, 27, 9-20.

Knicker, H., Hatcher, P.G., González-Vila, F.J., 2002. Formation of heteroaromatic nitrogen after prolonged humification of vascular plant remains as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Environ. Qual.*, 31, 444-449.

- Lazzari, L., Sperti, L., Salizzato, M., 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, 1925-1935.
- Leinweber, P., Schulten, H.R., 1999. Advances in analytical pyrolysis of soil organic matter. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 49, 359-583.
- Madejón, E., López, R., Murillo, J.M., Cabrera, F., 2001. Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 84, 55-65.
- Marttinen, S.K., Hänninen, K., Rintala, J.A. Removal of DEHP in composting and aeration of sewage sludge. *Chemosphere*, 54, 3, 2004, 265-272.
- Marttinen, S.K., Kettunen, R.H., Rintala, J.A., 2003. Occurrence and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates. *The Science of the Total Environment*, 301, 1-12.
- Morris, P.J., Shelton, M.E., Chapman, P.E., In *Bioremediation of Recalcitrant Organics*, Hinchee, R.E., Hoeppe, R.E., Anderson, D.B., Eds., Battelle Press: Columbus, OH, 1995, pp 123-130.
- Ouatmane, A., Provenzano, M.R., Hafidi, M., Senesi, N., 2000. Compost maturity assessment using calorimetry, spectroscopy and chemical analysis. *Compost Science and Utilisation*, 8, 2, 124-134.
- Pascual, J.A., Ayuso, M., Garcia, C., Hernández, T., 1997. Characterization of urban wastes according to fertility and phytotoxicity parameters. *Waste Management & Research* 15, 103-112.
- Piccolo, A., 1997. New insights on the conformational structure of humic substances as revealed by size exclusion chromatography, in: J. Drozd., et al., (Eds.), *The role of humic substances in the ecosystems and environmental protection*, 8 th Meeting IHSS, Poland, 19-34.
- Powlson, D.S., 1993. Understanding the soil nitrogen cycle. *Soil Use and management*. 9. 3. 86-94.
- Richnow, H.H., Seifert, R., Hefter, J., Link, M., Francke, W., Schaefer, G., Michaelis, W., 1997. Organic pollutants associated with macromolecular soil organic matter - a mode of binding. *Org. Geochem.* 26, 745-758.
- Rivero, C., Chirenje, T., Ma, L.Q., Martinez, G., 2004. Influence of compost on soil organic matter quality under tropical conditions. *Geoderma*, 123, 355-361.
- Sanchez-Monedero, M.A., Mondini, C., de Nobili, M., Leita, L., Roig, A., 2004. Land application of biosolids. Soil response to different stabilization degree of the treated organic matter. *Waste Management*. 24, 325-332.

- Sanchez-Monedero, M.A., Roig, A., Cegarra, J., Bernal, M.P., 1999. Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting. *Bioresource Technol.*, 70, 193–201.
- Schnitzer, M., Dinel, H., Schulten, H.R., Paré, T., Lafond, S., 2000. Humification of duck farm wastes. In: Ghabour E.A. and G. Davies (Eds.), *Humic Substances: Versatile Components of plants "Soil and Water"*. The Royal Society of Chemistry, pp. 20-34.
- Schulten, H.R., Leinwebe, P., 1996. Characterization of humic and soil particles by pyrolysis and computer modeling analytical. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 38, 1-53.
- Senesi, N., Miano, T.M., Brunetti, G., 1996. Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances, in: A. Piccolo (Eds.), *Humic substances in terrestrial ecosystems*, 531-593.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Conte, P., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H., 2002. Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Soil Biol. Biochem.*, 34, 1839–1851.
- Veeken, A., Nierop K., de Wilde, V., Hamelers, B., 2000. Characterisation of NaOH-extracted Humic acids during composting of a biowaste. *Bioresource Technol.*, 72, 33-41.
- Vinceslas-Akpa, M., Loquet, M., 1997. Organic matter transformations in lignocellulosic waste products composted or vermicomposted (*eisenia fetida andrez*): chemical analysis and ¹³C CPMAS NMR spectroscopy. *Soil Biol. Biochem.*, 29, 314, 751-758.
- Wu, L., Ma, L.Q., 2002. Relationship between Compost Stability and Extractable Organic Carbon. Published in *J. Environ. Qual.*, 31, 1323–1328.
- Zbytnewski, R., Buszewski, B., 2005. Characterization of natural organic matter (NOM) derived from sewage sludge compost. Part 1: chemical and spectroscopic properties, *Bioresource Technol.*, 96, 471- 478.
- Zeng, F., Cui, K., Li, X., Fu, J., Sheng, G., 2004. Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescences* FS1. *Process Biochemistry*, 39, 9, 1125-1129.
- Zorpas, A.A., Arapoglou, D., Panagiotis, K., 2003. Waste paper and clinoptilolite as a bulking material with dewatered anaerobically stabilized primary sewage sludge (DASPSS) for compost production. *Waste Management*, 23, 27–35.

Contribution à la valorisation de boues de stations d'épuration par compostage : devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost.

Le suivi des transformations du mélange boues de lagunage-paille pendant le compostage par différents paramètres physico-chimiques et d'humification et par spectroscopie FTIR permet de caractériser la maturité du compost final. Bien que les teneurs en éléments traces métalliques (Cu, Zn, Pb, Ni ...) soient faibles et que moins de 2 % soient potentiellement biodisponibles, la spéciation métallique varie peu lors du compostage, la fraction disponible de tous les métaux (sauf Ni) tendant à diminuer passant sous des formes résistantes (sulfures, carbonates et organiques). Le suivi des polluants organiques prioritaires a montré que parmi les 6 phthalates étudiés, le DEHP est le plus abondant et sa biodégradation suit une cinétique de premier ordre conformément aux voies de métabolisation. Pour les 16 HAP prioritaires, la biodégradation est favorisée dans la phase de stabilisation principalement pour les HAP légers. Dans la phase de maturation, la disparition des HAP les plus lourds semble être liée à une polycondensation oxydative de leurs métabolites avec les structures humiques.

La caractérisation structurale des substances humiques lors du compostage par analyses élémentaires, spectroscopiques et chromatographiques révèle la présence de deux sous fractions, une prédominante à grand poids moléculaire comportant des structures aromatiques très polycondensées liées à des chaînes aliphatiques périphériques, l'autre de faible poids moléculaire constituée de structures aromatiques moins polycondensées et riches en groupements fonctionnels. La maturation est reliée à une augmentation du degré d'aromaticité et de polycondensation due à la formation de liaisons éther pour les acides humiques tandis que les structures aliphatiques oxygénées et polyamines stables sont préservées pour les acides fulviques. L'étude par TMAH/GC/MS démontre que la néoformation des acides humiques est principalement liée à une autopolycondensation d'acides polyphénoliques C6-C1 originaires de l'oxydation de la lignine ou néo-synthétisés par les micro-organismes. Les acides fulviques seraient néo-formés plutôt par recombinaison des hydroquinones avec des structures polyamines.

Mots clés : compostage, boues de lagunage, ETM, HAP, EAP, acides humiques et fulviques

Contribution to the valuation of sewage sludge by composting : fate of the metal and organic micropollutants and humic balance of a compost

The follow-up of the alterations of the lagooning sewage sludge-straw mixture in course of composting by using different parameters as physico-chemical ones and those of humification and by spectroscopy FTIR allows to characterize the maturity of the final compost. Although the contents of the heavy metals (Cu, Zn, Pb, etc ...) are weak and although less than 2 % is potentially bioavailable, the chemical partitioning of metals varies little during the composting, the available fraction of all the metals (except Ni) tended to decrease and may be become under resistant forms (sulfide, carbonates and organic). The analysis of the organic compounds targeted as priority pollutants showed that among the 6 phthalates studied, the DEHP is the most predominant one and its biodegradation follows a first-order kinetic model of metabolisation pathways. For the 16 priority PAHs, the predominant biodegradation takes place in the phase of stabilization mainly for the PAHs of low molecular weight. In the maturation phase, the disappearance of the PAHs in particular those of high molecular weight could be attributed to a phenomenon of oxydative polycondensation of their metabolites with the humic structures.

The structural characterization of humic substances isolated during the composting by elementary analyses, spectroscopy and chromatography reveals the presence of two sub-fractions. The most predominant one of great molecular weight consists of aromatic highly polycondensed structures on which the long aliphatic chains are bound peripherally. The second sub-fraction of small molecular weight is composed of less polycondensed aromatic structures and contains more functional entities. Maturation is attributed to an increase of the degree of aromaticity and of polycondensation following the formation of ether links in the case of humic acids, whereas, the oxidised aliphatic structures and stable polyamines are preserved in the case of fulvic acids. The TMAH/GC/MS study demonstrates that the neoformation of humic acids is mainly due to an autopolycondensation of polyphenolic acids C6-C1 originating from oxidation of lignine or neo-synthesis by micro-organisms. Fulvic acids would be neo-formed rather by recombination of hydroquinones with polyamines structures.

Key words : composting, lagooning sludge, ETM, HAPs, EAPs, humic and fulvic acids.