



**HAL**  
open science

# Activités enzymatiques extracellulaires des agrégats bactériens de stations d'épuration d'eaux usées urbaines

Aurore Cadoret

► **To cite this version:**

Aurore Cadoret. Activités enzymatiques extracellulaires des agrégats bactériens de stations d'épuration d'eaux usées urbaines. Microbiologie et Parasitologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2003. Français. NNT : 2003NAN12513 . tel-01747630

**HAL Id: tel-01747630**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747630v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

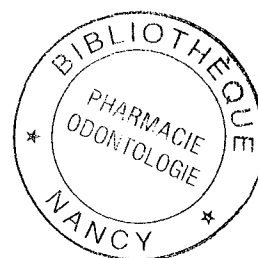
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

HENRI POINCARÉ, NANCY I  
Faculté de Pharmacie  
Ecole Doctorale Biologie Santé Environnement



## THESE

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau

présentée et soutenue publiquement

par

Aurore CADORET

le 7 novembre 2003

Titre :

**ACTIVITES ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES DES  
AGREGATS BACTERIENS DE STATIONS D'EPURATION  
D'EAUX USEES URBAINES.**

**Directeur de thèse :** Jean-Claude BLOCK (Professeur, U.H.P. Nancy I)

*Db 19378*

### **Membres du jury :**

Président :	Maria WELLMAN-ROUSSEAU	Maître de conférences, U.H.P. Nancy I (F).
Rapporteurs :	Dominique FONTVIEILLE	Professeur, Université de Savoie, Chambéry (F).
	Pierre SERVAIS	Professeur, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles (B).
Juges :	Frédéric JORAND	Maître de conférences, U.H.P. Nancy I (F).
	Jean-Jacques PERNELLE	Chargé de recherches, CEMAGREF, Antony (F).
Invité :	Philippe GINESTET	Docteur, CIRSEE-Ondéo services, Le Pecq (F).



« Faites que le rêve dévore votre vie afin que la vie ne dévore pas votre rêve. »

Antoine de Saint-Exupéry



## Remerciements.

Je remercie les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail :

- Maria Wellman-Rousseau (MCU, UHP) pour ses conseils judicieux concernant l'interprétation de certains résultats. Merci aussi d'avoir accepté de présider le jury.
- Messieurs Dominique Fontvieille (Pr., Université de Savoie), et Pierre Servais (Pr., Université Libre de Bruxelles) de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail et de la pertinence de leurs commentaires.
- Philippe Ginestet (Dr., CIRSEE-Ondéo services) pour ses encouragements et pour avoir su intéresser ma réflexion à une orientation plus appliquée.
- Frédéric Jorand (MCU, UHP) qui m'a généreusement fait bénéficier tout au long de la thèse de son expertise théorique et pratique et de questions toujours motivantes. Merci aussi de ta gentillesse et de ta disponibilité.
- Monsieur Jean-Jacques Pernelle (CR, CEMAGREF) pour son investissement dans la relecture de ce mémoire qui a nettement contribué à en améliorer la version finale.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée à réaliser ce travail et notamment :

- Jean-Claude Block (Pr., UHP), qui a encadré mes travaux de recherche avec un intérêt et un enthousiasme constant.  
Merci de la confiance et de la liberté que tu m'as accordées. Merci pour les discussions qui ont toujours enrichi ma réflexion et les conseils qui ont nettement amélioré la qualité de mes présentations. Merci aussi de ta générosité, de ta sincérité et de ton écoute.
- Jean-Jacques Ehrhardt (Dir. CNRS), pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et son accueil chaleureux au sein du Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement.

- Tous les membres du LCPME, pour leur accueil chaleureux et leur disponibilité, pour leurs conseils et leur aide technique, pour leur gentillesse et leur amitié.

Un grand merci à Monique Braconot, Joël Coulon, Marie-Antoinette Dziurla, Hélène Guilloteau, Jean-Paul Moulin, David Santilli et Carolina Yanez.

- Les stagiaires qui ont pris en main une partie du travail expérimental. Merci Sélim pour ta témérité et ta bonne humeur communicative.

Merci Cuong pour ton investissement dans la réflexion scientifique, mais aussi philosophique.

- Per Halkjær Nielsen et Amare Gessesse pour leur accueil chaleureux à l'Université d'Aalborg et leur investissement pour répondre à mes attentes.

- Merja Kontro-Suutari de l'Université d'Helsinki pour sa collaboration active et son amitié.

- Anne Le Flèche (Institut Pasteur de Paris) et Jean-Marc Strub (Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Strasbourg) pour leur disponibilité.

- Les membres du LEM-GRESO pour leur appui technique et scientifique et leur convivialité.

- Sylvain Fass et à Athanase Visvikis d'avoir donné un peu de leur temps et beaucoup de leur amitié.

- Dominique Decolin et Janine Schwartzbrod qui ont encouragé mes premiers pas sur le chemin de la recherche et de l'enseignement.

- Tous les thésards dont j'ai croisé la route, qui ont rendu ce voyage inoubliable.

Merci à Brice, Damien, Georges, Sylvain et Yann et tous mes encouragements pour ceux qui courent toujours.

Je remercie Arnaud, mes amis et mes parents pour leur soutien et leur patience.



## TABLE DES MATIERES

<b>1. PRESENTATION DE LA PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS.</b> .....	<b>15</b>
<b>2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 LES AGREGATS BACTERIENS (FLOCS DE BOUES ACTIVEES).</b> .....	<b>22</b>
2.1.1. ORGANISATION ET COMPOSITION DES AGREGATS BACTERIENS. ....	22
2.1.2. CARACTERISTIQUES MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES DES FLOCS DE BOUES ACTIVEES. ....	22
2.1.3. POPULATIONS BACTERIENNES DES FLOCS DE BOUES ACTIVEES. ....	24
<b>2.2. LES POLYMERES EXTRACELLULAIRES DES FLOCS DE BOUES ACTIVEES.</b> .....	<b>26</b>
2.2.1. CARACTERISATION DE LA MATRICE DE POLYMERES EXTRACELLULAIRES. ....	26
2.2.2. FONCTION DES POLYMERES EXTRACELLULAIRES (EPS). ....	29
<b>2.3. ELIMINATION DE LA MATIERE ORGANIQUE PAR LES BACTERIES DES AGREGATS BACTERIENS (BOUES ACTIVEES).</b> .....	<b>32</b>
2.3.1. MATIERE ORGANIQUE VEHICULEE PAR LES EAUX USEES. ....	32
2.3.2. ADSORPTION DES COMPOSES ORGANIQUES PAR LES AGREGATS BACTERIENS. ....	34
2.3.3. HYDROLYSE DE LA MATIERE ORGANIQUE PAR LES ENZYMES EXTRACELLULAIRES. ....	35
2.3.4. DIFFUSION DES SUBSTRATS AU SEIN DES AGREGATS. ....	37
<b>2.4. ACTIVITES ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES BACTERIENNES.</b> .....	<b>39</b>
2.4.1. MISE EN EVIDENCE DES ENZYMES EXTRACELLULAIRES BACTERIENNES. ....	39
2.4.2. NATURE DES ENZYMES HYDROLYTIQUES EXTRACELLULAIRES DES BOUES ACTIVEES. ....	42
2.4.2.1. <i>Hydrolyse des protéines.</i> .....	43
2.4.2.2. <i>Hydrolyse des polysaccharides.</i> .....	43
2.4.3. LOCALISATION DES ENZYMES HYDROLYTIQUES EXTRACELLULAIRES BACTERIENNES. ....	44
2.4.4. EXPRESSION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES EN FONCTION DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES. ....	47
2.4.4.1. <i>Effet direct des conditions environnementales.</i> ....	47
2.4.4.2. <i>Réponse des bactéries aux conditions environnementales.</i> ....	48
<b>3. MATERIEL ET METHODES.</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1. PRELEVEMENT DES BOUES ACTIVEES.</b> .....	<b>52</b>
<b>3.2. LAVAGE DES BOUES ACTIVEES.</b> .....	<b>52</b>
<b>3.3. CARACTERISATION DES ECHANTILLONS DE BOUES ACTIVEES.</b> .....	<b>52</b>
3.3.1. MATIERES SECHES ET MATIERES VOLATILES DES BOUES ACTIVEES. ....	52
3.3.2. TEST DE DECANTABILITE. ....	53

3.3.3. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES BOUES ACTIVEES (TEMPERATURE, PH ET CONDUCTIVITE).....	53
3.3.4. DISTRIBUTION DE TAILLE DES FLOCS DE BOUES ACTIVEES. ....	53
<b>3.4. ESSAIS EN BIOFERMENTEURS DE TYPE BATCH.....</b>	<b>53</b>
<b>3.5. EXTRACTION DES POLYMERES EXTRACELLULAIRES (EPS) DES BOUES.....</b>	<b>54</b>
3.5.1. EXTRACTION DES EPS PAR UN DETERGENT NON IONIQUE (TRITON X-100). ....	54
3.5.2. EXTRACTION DES EPS PAR ULTRASONS ET RESINE ECHANGEUSE DE CATIONS. ....	54
3.5.3. ETALONNAGE DE LA PUISSANCE DU GENERATEUR A ULTRASONS.....	55
<b>3.6. CARACTERISATION DES POLYMERES EXTRACELLULAIRES DES BOUES ACTIVEES (EPS).....</b>	<b>57</b>
3.6.1. FILTRATION DES EPS. ....	57
3.6.2. MATIERES SECHES ET MATIERES VOLATILES DES EPS.....	57
3.6.3. CARACTERISATION BIOCHIMIQUES DES EPS. ....	57
3.6.3.1. <i>Dosage des protéines</i> .....	57
3.6.3.1.1. Méthode de Lowry <i>et al.</i> (1951).....	57
3.6.3.1.2. Méthode de Bradford (1976). ....	58
3.6.3.2. <i>Dosage des polysaccharides</i> .....	58
3.6.3.3. <i>Dosages des acides désoxyribonucléiques (ADN)</i> .....	58
3.6.3.4. <i>Dosage des NH<sub>2</sub>-terminaux (acides aminés)</i> . ....	59
<b>3.7. ACTIVITES ENZYMATIQUES. ....</b>	<b>59</b>
3.7.1. EXPRESSION ET STANDARDISATION DES MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES. ....	59
3.7.2. CINETIQUE ENZYMATIQUE.....	60
3.7.3. MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DES BOUES ACTIVEES. ....	61
3.7.3.1. <i>Activité L-Leu-aminopeptidase des boues activées</i> .....	61
3.7.3.2. <i>Activité α-glucosidase des boues activées</i> . ....	61
3.7.3.3. <i>Activité protéase des boues activées</i> .....	61
3.7.3.4. <i>Activité α-amylase des boues activées</i> .....	62
3.7.4. MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUE DES POLYMERES EXTRACELLULAIRES (EPS). ....	62
3.7.4.1. <i>Galleries API ZYM<sup>®</sup></i> . ....	62
3.7.4.2. <i>Activité L-Leu-aminopeptidase des polymères extracellulaires</i> . ....	63
3.7.4.3. <i>Activité α-glucosidase des polymères extracellulaires</i> .....	63
3.7.4.4. <i>Activité protéase des polymères extracellulaires</i> .....	64
3.7.4.5. <i>Activité α-amylase des polymères extracellulaires</i> .....	64
3.7.4.6. <i>Activité β-glucosidase des polymères extracellulaires</i> . ....	64
3.7.4.7. <i>Activité α-galactosidase des polymères extracellulaires</i> .....	64
3.7.4.8. <i>Activité C4-estérase des polymères extracellulaires</i> . ....	64
3.7.4.9. <i>Activité Ala-aminopeptidase des polymères extracellulaires</i> . ....	64

3.7.4.10. <i>Activité Glucose-6-phosphate-deshydrogénase des polymères extracellulaires</i> .....	65
<b>3.8. BACTERIOLOGIE</b> .....	<b>65</b>
3.8.1. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE. ....	65
3.8.1.1. <i>R2A Agar (DIFCO 218263)</i> .....	65
3.8.1.2. <i>Plate count agar (PCA) (DIFCO 247940)</i> . ....	65
3.8.1.3. <i>R2A Agar modifié pour sélection des souches protéolytiques</i> . ....	65
3.8.1.4. <i>CASO-bouillon (Merck 1.0549)</i> .....	66
3.8.2. CULTURES BACTERIENNES. ....	66
3.8.3. NUMERATION DES BACTERIES CULTIVABLES (UFC). ....	66
3.8.4. ISOLEMENT DES BACTERIES DES BOUES ACTIVEES.....	66
3.8.5. COLORATION DE GRAM ET OBSERVATION MICROSCOPIQUE. ....	67
3.8.6. IDENTIFICATION DES BACTERIES. ....	67
3.8.6.1. <i>Tests d'identification rapide des bactéries</i> . ....	67
3.8.6.1.1. <i>Galerie API 20 E (bioMérieux 20 100)</i> .....	67
3.8.6.1.2. <i>Galerie API 20 NE (bioMérieux 20 050)</i> .....	68
3.8.6.2. <i>Identification par séquençage de l'ADN ribosomique (Institut Pasteur)</i> . ....	68
<b>3.9. SEPARATION DES ENZYMES EXTRACELLULAIRES</b> . ....	<b>68</b>
3.9.1. CONCENTRATION DES PROTEINES PAR LE SULFATE D'AMMONIUM. ....	68
3.9.2. DIALYSE DES SOLUTIONS CONCENTREES EN SULFATE D'AMMONIUM. ....	69
3.9.3. CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS. ....	69
3.9.4. ULTRAFILTRATION PAR CENTRIFUGATION.....	70
3.9.5. FILTRATION SUR GEL.....	71
3.9.6. ELECTROPHORESE DES PROTEINES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN CONDITIONS DENATURANTES(SDS-PAGE).....	72
3.9.6.1. <i>Préparation des gels</i> .....	72
3.9.6.2. <i>Préparation des échantillons et migration</i> . ....	73
3.9.6.3. <i>Coloration des protéines dans le gel</i> . ....	73
3.9.7 HPLC-MS-MS.....	73
3.9.7.1. <i>Digestion trypsique</i> .....	73
3.9.7.2. <i>Nano HPLC</i> .....	74
3.9.7.3. <i>Spectrométrie de masse</i> . ....	74
3.9.7.4. <i>Le traitement et l'analyse des données</i> . ....	75
<b>3.10. ELIMINATION DE L'AZOCASEINE PAR LES BOUES ACTIVEES</b> .....	<b>75</b>
<b>4. CARACTERISATION D'ENZYMES EXTRACELLULAIRES ASSOCIEES AUX POLYMERES EXTRACELLULAIRES (EPS) DES FLOCS DE BOUES ACTIVEES</b> . ....	<b>77</b>
<b>4.1. INTRODUCTION</b> . ....	<b>78</b>

<b>4.2. CHOIX D'UNE TECHNIQUE D'EXTRACTION.....</b>	<b>79</b>
<b>4.3. CARACTERISATION CHIMIQUE DES POLYMERES EXTRACELLULAIRES (EPS) EXTRAITS DES BOUES ACTIVEES. ....</b>	<b>83</b>
4.3.1. <i>Caractérisation des boues activées. ....</i>	83
4.3.2. <i>Caractérisation chimique des polymères extracellulaires (EPS). ....</i>	84
<b>4.4. DIVERSITE ET VARIABILITE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES ASSOCIEES AUX EPS.....</b>	<b>87</b>
<b>4.5. CARACTERISTIQUES CINETIQUES DES ENZYMES EXTRACELLULAIRES LEU- AMINOPEPTIDASE ET <math>\alpha</math>-GLUCOSIDASE. ....</b>	<b>90</b>
<b>4.6. EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES (LEU-AMINOPEPTIDASE, PROTEASE ET <math>\alpha</math>-GLUCOSIDASE) DES BOUES ET DES EPS. ....</b>	<b>94</b>
4.6.1. EFFET DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION DES BOUES SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES LEU- AMINOPEPTIDASE, PROTEASE ET $\alpha$ -GLUCOSIDASE. ....	95
4.6.2. EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES LEU- AMINOPEPTIDASE, PROTEASE ET $\alpha$ -GLUCOSIDASE ASSOCIEES AUX EPS. ....	97
<b>4.7. DISCUSSION.....</b>	<b>100</b>
<b>5. COMPARAISON DES PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES DES PROTEINES EXTRACELLULAIRES DOTEES D'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE : EPS <i>VERSUS</i> SOUCHES PURES ISOLEES DES BOUES.....</b>	<b>103</b>
<b>5.1. INTRODUCTION. ....</b>	<b>104</b>
<b>5.2. ENZYMES PROTEOLYTIQUES DES BACTERIES ISOLEES DES BOUES. ....</b>	<b>107</b>
5.2.1. ISOLEMENT DE SOUCHES PROTEOLYTIQUES DES BOUES ACTIVEES.....	107
5.2.2. CARACTERISATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES. ....	111
5.2.3. SECRETION DES ENZYMES ALA-AMINOPEPTIDASE ET LEU-AMINOPEPTIDASE.....	115
<b>5.3. COMPARAISON DES PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES DES PROTEINES EXTRACELLULAIRES DOTEES D'ACTIVITES ALA-AMINOPEPTIDASE OU LEU- AMINOPEPTIDASE : SOUCHES PUREES <i>VERSUS</i> EPS.....</b>	<b>119</b>
5.3.1. CONCENTRATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM DES ENZYMES EXTRACELLULAIRES DES SOUCHES PURES ISOLEES DES BOUES ET DES EPS. ....	119
5.3.2. CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS DES PROTEINES EXTRACELLULAIRES DE CINQ SOUCHES PURES ISOLEES DES BOUES DOTEES D'ACTIVITE ALA-AMINOPEPTIDASE OU LEU-AMINOPEPTIDASE. ....	119
5.3.3. CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS DES PROTEINES EXTRACELLULAIRES DES EPS EXTRAITS DES BOUES DOTEES D'ACTIVITES ALA-AMINOPEPTIDASE ET LEU-AMINOPEPTIDASE. ....	128

<b>5.4. DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES DES PROTEINES DOTEES D'ACTIVITES ALA-AMINOPEPTIDASE ET LEU-AMINOPEPTIDASE PAR FILTRATION SUR GEL.</b> .....	<b>133</b>
5.4.1. <i>Masses moléculaires des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase sécrétées par les souches protéolytiques isolées des boues.</i> .....	133
5.4.2. <i>Masses molaires des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase associées aux EPS.</i> .....	138
<b>5.5. IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES DE QUELQUES PROTEINES.</b> .....	<b>140</b>
<b>5.6. DISCUSSION</b> .....	<b>143</b>
<b>6. ACCESSIBILITE DES SUBSTRATS AUX ENZYMES EXTRACELLULAIRES ASSOCIEES AUX EPS.</b> .....	<b>145</b>
<b>6.1. INTRODUCTION.</b> .....	<b>146</b>
<b>6.2. PROPORTION D'ACTIVITE ENZYMATIQUE EXTRACELLULAIRE ASSOCIEE AUX EPS EXTRAITS DES BOUES.</b> .....	<b>148</b>
<b>6.3. ACCESSIBILITE DES SUBSTRATS MACROMOLECULAIRES AUX ENZYMES EXTRACELLULAIRES ASSOCIEES AUX EPS.</b> .....	<b>149</b>
6.3.1. CARACTERISATION DES BOUES BRUTES ET DES BOUES DISPERSEES. ....	149
6.3.2. ACTIVITES ENZYMATIQUES DES BOUES BRUTES ET DES BOUES DISPERSEES. ....	150
<b>6.4. DISCUSSION</b> .....	<b>151</b>
<b>6.5. ARTICLE PUBLIE DANS <i>ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY</i>, 2002, 31(2), 179-186.</b> 153	
<b>7. EFFET DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES HYDROLYTIQUES.</b> .....	<b>161</b>
<b>7.1. INTRODUCTION.</b> .....	<b>162</b>
<b>7.2. EFFET DU STRESS OXYDANT SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES DES BOUES ACTIVEES.</b> .....	<b>163</b>
<b>7.3. EFFET DE LA FAMINE.</b> .....	<b>168</b>
7.3.1. EFFET DE LA FAMINE SUR LA COMPOSITION DES EPS DES BOUES. ....	169
7.3.2. EFFET DE LA FAMINE SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES ASSOCIEES AUX EPS. ....	170
<b>7.4. EFFET DE L'AJOUT D'AZOCASEINE</b> .....	<b>172</b>
7.4.1. ELIMINATION DE L'AZOCASEINE PAR LES FLOCS DE BOUES ACTIVEES. ....	173
7.4.2. INDUCTION DE L'ACTIVITE LEU-AMINOPEPTIDASE EN PRESENCE D'AZOCASEINE. ....	175

7.4.2. EFFET DE LA CONCENTRATION EN AZOCASEINE SUR L'ACTIVITE LEU-AMINOPEPTIDASE DES BOUES.	179
<b>7.5. DISCUSSION.....</b>	<b>181</b>
<b>8. CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>183</b>
<b>9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES. ....</b>	<b>187</b>
<b>ANNEXE 1. ....</b>	<b>199</b>
<b>ANNEXE 2 .....</b>	<b>201</b>
<b>ANNEXE 3 .....</b>	<b>207</b>
<b>ANNEXE 4 .....</b>	<b>208</b>
<b>ANNEXE 5 .....</b>	<b>210</b>
<b>ANNEXE 6 .....</b>	<b>211</b>
<b>ANNEXE 7 .....</b>	<b>212</b>

## LISTE DES ABBREVIATIONS.

ADN :	Acide désoxyribonucléique.
ADNr :	Acide désoxyribonucléique ribosomique.
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique.
COD :	Carbone organique dissous.
COD <sub>B</sub> :	Carbone organique dissous biodégradable.
COP :	Carbone organique particulaire.
DAPI :	4',6-diamidino-2-phénylindole.
DCO :	Demande chimique en oxygène.
DBO5 :	Demande biologique en oxygène en cinq jours
DLVO :	Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek.
EPS :	Substances polymériques extracellulaires.
G-6-PDH :	Glucose-6-phosphate déshydrogénase.
HAP :	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
K <sub>m</sub> :	Constante de Michaelis
LAS :	Sulfonates d'alkylbenzènes linéaires.
Mr :	Masse moléculaire.
MS :	Matières sèches.
MV :	Matières volatiles.
PCR :	Polymerase chain reaction.
PVDF :	Fluorure de polyvinylidène.
R :	Coefficient de corrélation.
REC :	Résine échangeuse de cations.
SVI :	Sludge volume index (Indice de décantabilité des boues).
US :	Ultrasons.
V <sub>m</sub> :	Vitesse d'hydrolyse maximale.







---

# 1. PRESENTATION DE LA PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS.

---

Une large fraction des micro-organismes issus des milieux environnementaux sont systématiquement retrouvés sous forme de biofilms ou d'agrégats. Ces structures complexes sont formées par l'association de micro-organismes différents au sein d'une matrice extracellulaire constituée de polymères organiques (EPS) et d'une fraction inorganique. Ainsi, les agrégats microbiens issus des stations d'épuration, appelés floccs de boues activées, regroupent plus d'une centaine d'espèces bactériennes différentes (Seviour et Blackall, 1999), entourées d'un réseau de macromolécules (protéines, polysaccharides, substances humiques, ADN et lipides) (Conrad *et al.*, 2003b ; Jorand *et al.*, 1995).

Cette matrice de polymères extracellulaires (EPS) assure la cohésion des agrégats, maintient sous un faible espace une importante diversité bactérienne et crée un micro-environnement favorable à leur développement. En particulier, les EPS seraient impliqués dans l'adsorption des substrats organiques macromoléculaires (Guellil *et al.*, 2001b ; Jorand *et al.*, 1995) et dans la rétention et la stabilisation des enzymes hydrolytiques extracellulaires (Frølund *et al.*, 1995 ; Guellil *et al.*, 2001a). Ainsi, l'hypothèse couramment formulée aujourd'hui est que le développement de la biomasse bactérienne sous forme agrégée est une réponse des micro-organismes aux variations des conditions environnementales et constitue en particulier une stratégie pour améliorer l'accès aux substrats macromoléculaires majoritairement présents dans les milieux environnementaux (Block, 1999).

L'hydrolyse des polymères organiques par des enzymes extracellulaires apparaît alors comme l'étape clef de l'élimination par les floccs de boues activées de la matière organique véhiculée par les eaux usées (Ubukata, 1997, 1998, 1999). Différents types d'activités enzymatiques ont été rapportés, comme des aminopeptidases, des galactosidases, des glucosidases, des lipases et des phosphatases, dans les boues activées (Boczar *et al.*, 1992 ; Teuber et Brodisch, 1977) et dans les EPS extraits des boues (Frølund *et al.*, 1995). Comme l'ont déjà montré Confer et Logan (1997a, b), la mise en commun de ces enzymes extracellulaires au sein des agrégats confère aux bactéries qui s'y développent la capacité à mobiliser des substrats de structure complexe et une vitesse d'hydrolyse accrue, par rapport à des micro-organismes en suspension et à des cultures pures. Néanmoins, la vitesse d'hydrolyse des composés particuliers est systématiquement plus faible que celle des composés solubles (Orhon et Çokgör, 1997), suggérant que le réseau de polymères extracellulaires limite l'accessibilité des substrats aux enzymes extracellulaires. En effet, la vitesse de diffusion est d'une manière générale réduite à l'intérieur des biofilms bactériens (Lawrence *et al.*, 1994) et la limite de diffusion a été estimée à une masse de 20 000 dans un gel d'alginate utilisé comme modèle d'EPS (Tanaka *et al.*, 1984). Cependant, non seulement la répartition de ces enzymes entre la surface cellulaire et les EPS des boues, mais aussi la limite diffusionnelle dans les floccs de boues activées ne sont pas connues.

Différents paramètres sont susceptibles d'influencer l'expression des activités enzymatiques extracellulaires des bactéries. En particulier, la synthèse d'enzymes hydrolytiques est stimulée par la présence de substrat macromoléculaire, alors que la présence d'une source de carbone directement assimilable inhibe la production d'enzymes (Priest, 1992). Ainsi, l'étude du profil des activités enzymatiques de biomasses de différentes stations d'épuration suggère une relation entre

la composition de certaines eaux usées industrielles et la nature des activités enzymatiques dominantes (Nybroe *et al.*, 1992). Cependant, l'effet des substrats macromoléculaires sur l'expression des activités enzymatiques extracellulaires des boues activées n'a jamais été clairement démontré.

L'objectif général de notre travail est de qualifier et de quantifier une partie des enzymes extracellulaires hydrolytiques associées aux EPS extraits des boues activées, d'étudier leur variabilité temporelle et quelques paramètres environnementaux qui déterminent ces variations. Les boues activées issues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines ont été utilisées comme modèles d'agrégats biologiques relativement faciles à prélever. L'objectif de ce travail n'a pas été à ce niveau de relier les caractéristiques des agrégats aux caractéristiques du procédé d'épuration et à son fonctionnement. La démarche expérimentale est organisée en quatre étapes, qui correspondent aux quatre parties expérimentales présentées dans ce mémoire (chapitres 4 à 7).

### **1) Activités enzymatiques extracellulaires associées aux EPS extraits des boues activées et leurs variations temporelles sur un système industriel.**

La capacité hydrolytique des EPS a été démontrée vis-à-vis de substrats de synthèse (Frølund *et al.*, 1995) et de substrats naturels (fraction colloïdale des eaux usées (Guellil *et al.*, 2001a), mais la variabilité temporelle du domaine extracellulaire semble n'avoir fait l'objet d'aucune étude. Ainsi, la composition et les activités hydrolytiques des EPS des boues activées de la station d'épuration de Nancy-Maxéville a été suivie sur une période de 10 mois. Les composés analysés sont des polymères classiquement retrouvés dans ce type de mélange, comme les protéines, les substances humiques, les polysaccharides et les acides nucléiques. 19 activités enzymatiques hydrolytiques ont été systématiquement déterminées à l'aide d'une méthode semi-quantitative et 7 activités hydrolytiques différentes (Leu-aminopeptidase, protéase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -amylase et  $C_4$ -estérase) ont été déterminées à l'aide de substrats de synthèse spécifiques.

Malgré la complexité du mélange, les paramètres cinétiques (constante de Michaelis  $K_m$  et la vitesse maximale d'hydrolyse  $V_m$ ) des activités Leu-aminopeptidase et  $\alpha$ -glucosidase ont pu être estimés.

### **2) Caractérisation d'une enzyme cible au sein du mélange complexe d'enzymes associées aux EPS extraits des boues activées.**

L'idée est d'isoler et de caractériser une enzyme au sein du mélange complexe d'enzymes associées aux EPS, afin de disposer d'une enzyme cible au sein des agrégats bactériens. Ceci permettrait à terme de déterminer *in situ* sa localisation et les paramètres qui influencent son expression, *via* des outils de biologie moléculaire.

A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée à la purification d'enzymes (lipases) directement à partir des EPS (Gessesse *et al.*, 2000). Malgré la complexité de la démarche, il nous a semblé essentiel d'isoler des enzymes directement de l'environnement, car la plupart des micro-

organismes des boues activées ne sont pas cultivables sur milieu gélosé (Amann *et al.*, 1998). Parmi le mélange d'activités hydrolytiques associées aux EPS, nous avons concentré notre étude sur la séparation des protéines dotées d'activités Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase des autres composés des EPS. Le protocole de séparation utilisé a fait appel à la chromatographie d'échange d'ions afin de capturer les enzymes d'intérêt et à la filtration sur gel, qui permet la séparation des composés en fonction de leur masse molaire.

En parallèle, l'isolement de quelques souches protéolytiques sur un milieu R2A additionné de caséine (1%) et la séparation des protéines extracellulaires dotées d'activité Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase de cinq souches a permis d'établir une sorte de référence, sans toutefois considérer les micro-organismes isolés comme parfaitement représentatifs de la communauté bactérienne des boues.

### **3) Accessibilité des substrats macromoléculaires aux enzymes extracellulaires associées aux EPS.**

Les EPS des boues activées favoriseraient la sécrétion des enzymes hydrolytiques, dans la mesure où ils permettent leur confinement à proximité des cellules, comme le suggère l'induction de la sécrétion de lipase chez *Pseudomonas aeruginosa* par la présence d'alginate, qu'il soit produit par la cellule ou apporté de manière exogène (Wingender *et al.*, 1999). Cependant, il est classiquement admis que la diffusion des substrats macromoléculaires au sein des agrégats est limitée par la présence du réseau de polymères extracellulaires. La diffusion des molécules au sein des agrégats bactériens limiterait alors considérablement leur vitesse d'hydrolyse. Cependant, aucune étude ne semble avoir vérifié cette hypothèse dans les flocs de boues activées.

La proportion d'activité enzymatique associée aux EPS a été estimée en comparant l'activité hydrolytique des EPS extraits des boues à celle des boues totales pour quatre activités différentes : Leu-aminopeptidase, protéase,  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase.

L'accessibilité des macromolécules aux enzymes extracellulaires a été évaluée par l'effet de la dispersion des agrégats sur la vitesse d'hydrolyse de substrats de masse molaire différentes : Leu-*p*-nitroanilide ( $M_r = 251$ ), azocaséine ( $M_r = 25\ 000$ ), *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside ( $M_r = 301$ ), amylose azure ( $32\ 000 \leq M_r \leq 86\ 000$ ). Les substrats testés sont des substrats de nature protéique, déterminant respectivement les activités Leu-aminopeptidase et protéase, et des substrats de nature saccharidique, déterminant les activités  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase.

### **4) Effet du « stress » oxydant, de la famine et de l'ajout de substrat macromoléculaire sur l'expression des enzymes extracellulaires.**

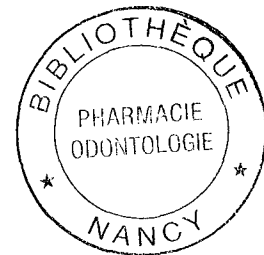
D'une manière générale, l'activité hydrolytique dans les milieux aquatiques a montré des variations spatio-temporelles marquées (Martinez *et al.*, 1996 ; Debroas, 1998), suggérant une réponse des bactéries aux conditions environnementales. En particulier, la synthèse d'enzymes serait induite par l'apport de matière organique macromoléculaire (Worm and Nybroe, 2001). Ce genre d'informations reste assez rare en ce qui concerne les boues activées. Aussi notre travail s'est attaché à estimer l'effet de différents paramètres environnementaux sur l'expression des activités

## 1. Présentation de la problématique et objectifs.

---

hydrolytiques des boues activées. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'effet de certains paramètres impliqués dans la réduction de production de boues, comme le « stress » oxydant et la famine, sur les activités Leu-aminopeptidase,  $\alpha$ -glucosidase et protéase des EPS. De plus, l'effet de l'ajout de substrat (azocaséine,  $M_r = 25\ 000$ ) a été déterminé sur l'activité Leu-aminopeptidase des boues. Ces essais ont été réalisés en conditions contrôlées de type batch, et sur une période courte (3 jours) afin de limiter la dérive du système, typiquement observée dans ces conditions.

Ces différents aspects renforcent la compréhension du rôle du compartiment extracellulaire des agrégats bactériens (EPS) dans l'adaptation des bactéries aux conditions environnementales et dans la mobilisation de composés organiques macromoléculaires en particulier.





---

## 2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.

---

## 2.1 LES AGREGATS BACTERIENS (FLOCS DE BOUES ACTIVEES).

### 2.1.1. Organisation et composition des agrégats bactériens.

Le procédé d'épuration à boues activées est l'un des procédés d'épuration biologique le plus fréquemment utilisé pour éliminer la pollution organique des eaux usées urbaines. Les micro-organismes naturellement présents dans les eaux usées sont maintenus dans des bassins aérés et brassés. Le procédé d'épuration est basé sur la croissance de la biomasse bactérienne à partir de la matière organique apportée par les eaux usées. Dans ces conditions, les micro-organismes se développent sous forme d'agrégats, appelés floccs de boues activées (Figure 2. 1). L'intérêt de la formation de ces agrégats pour l'exploitant de la station d'épuration est de permettre leur séparation de l'eau épurée simplement par décantation dans un clarificateur.

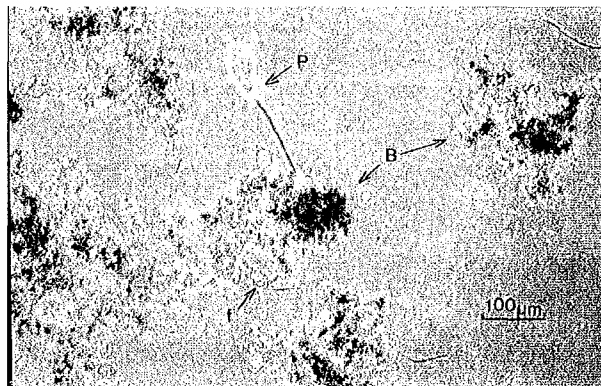


Figure 2. 1 : Observation microscopique de floccs de boue activées (B), montrant un protozoaire (P) du genre *Vorticella* et des bactéries filamenteuses (f) (photographie réalisée par F. Jorand).

### 2.1.2. Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des floccs de boues activées.

Les floccs de boues activées sont composés d'une communauté microbienne complexe, piégée dans une matrice de polymères extracellulaires, qui assure la cohésion des agrégats. Les bactéries hétérotrophes sont les micro-organismes qui dominent en nombre et en masse et sont les principaux acteurs de la biodégradation. Des bactéries filamenteuses (Ericksson *et al.*, 1992), des algues, des protozoaires (Gschlößl *et al.*, 1997) et des métazoaires sont aussi étroitement associés aux floccs de boues activées. Des polymères organiques (Liss *et al.*, 1996) et des particules minérales comme l'argile (Droppo *et al.*, 1997) sont systématiquement observés au sein des floccs de boues activées. L'eau est aussi un constituant essentiel des floccs (90 à 95%) en raison de leur degré de porosité important.

Le contour des floccs est très irrégulier et l'observation en microscopie optique permet de mettre en évidence de nombreux pores. Le degré de porosité augmente avec la taille du flocc (Droppo *et al.*, 1997). La distribution de taille des floccs est très large, allant de quelques micromètres à plusieurs millimètres de diamètre. L'analyse granulométrique par diffraction laser montre que les agrégats de 68 à 183 µm de diamètre occupent 44% du volume des boues activées brutes (Jorand



*et al.*, 1995). Les floccs de petite taille sont majoritaires en nombre, mais la majeure partie du volume total est occupée par des floccs de grande taille (Droppo *et al.*, 1996; Droppo *et al.*, 1997; Jorand *et al.*, 1995; Li et Ganczarczyk, 1991). La distribution de taille des floccs résulte des phénomènes dynamiques d'agrégation et de désagrégation des particules ou parties entre elles. Le modèle d'agrégat proposé par Jorand *et al.* (1995) est basé en partie sur l'observation de ces phénomènes, à savoir que les agrégats sont composés de macrofloccs (125  $\mu\text{m}$  de diamètre en moyenne) qui peuvent se dissocier en microfloccs (13  $\mu\text{m}$ ), assimilés à des microcolonies bactériennes très cohésives et considérées comme l'unité de base des agrégats.

L'organisation des agrégats apparaît relativement variable dans l'espace et dans le temps (Droppo *et al.*, 1997). La morphologie des agrégats est influencée par les conditions du milieu comme la charge organique et le temps de séjour des boues (Eriksson *et al.*, 1992). Ainsi, des structures lâches et en forme de chaîne sont préférentiellement observées lorsque le temps de séjour des boues dans la station d'épuration est court, en opposition à des structures agrégées plus compactes et plus denses, observées lorsque l'âge des boues est élevé (Figure 2. 2).

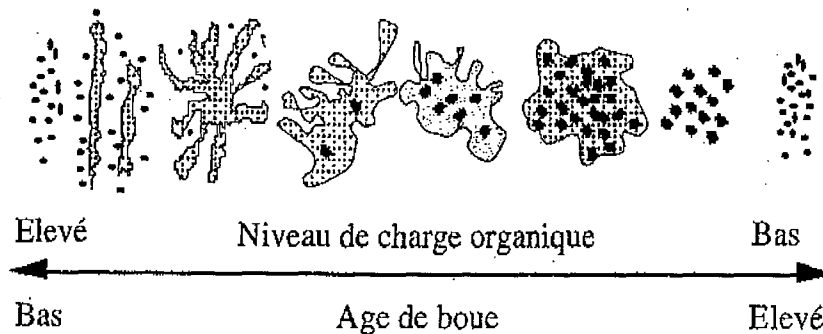


Figure 2. 2 : Représentation schématique de la morphologie générale des floccs de boues activées en fonction de l'âge des boues (temps de séjour) et de la charge organique des eaux usées (Eriksson *et al.*, 1992).

Les changements morphologiques des floccs en fonction de l'âge des boues pourraient s'expliquer par des forces d'interactions différentes entre les particules. Ainsi, la faible cohésion des agrégats a été corrélée à la prédominance d'interactions de type ionique lorsque le temps de séjour est court (4 à 9 jours), alors qu'ils sont plus cohésifs lorsque le temps de séjour est long (16 à 20 jours) probablement en relation avec un caractère hydrophobe et un enchevêtrement des particules plus marqués (Liao *et al.*, 2002). La taille et la morphologie des agrégats influencent nettement l'efficacité de décantation de la biomasse (Schmid *et al.*, 2003; Toh *et al.*, 2003). En clair, la composition des floccs de boues activées dépend du lieu et de la date de prélèvement (Urbain *et al.*, 1993b), et en particulier de la composition des eaux usées. Par exemple, l'augmentation du ratio N/C du substrat conduit à une augmentation de la population bactérienne nitrifiante (Liu *et al.*, 2003).

### 2.1.3. Populations bactériennes des flocs de boues activées.

Les populations microbiennes agrégées forment des communautés très complexes. Il est classiquement reconnu que seulement 1 à 10 % des bactéries des boues activées se multiplient sur milieu nutritif gélosé, ce qui rend difficile l'identification et la quantification des espèces présentes par les méthodes traditionnelles d'analyse bactériologique (Amann *et al.*, 1998). Ainsi, les bactéries de genres appartenant au sous-groupe des  $\gamma$ -*Proteobacteria*, comme *Aeromonas* spp. et *Acinetobacter* spp., majoritairement isolées au sein des boues activées (plus de 50 % des genres isolés sur R2A-Agar) représenteraient en réalité une très faible proportion de la communauté bactérienne totale (Kämpfer *et al.*, 1996). De la même manière, *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, ont longtemps été considérées comme les espèces représentatives des bactéries nitrifiantes des système d'épuration mais des résultats récents ont montré que *Nitrosococcus mobilis* et *Nitrospira* sp. sont les espèces dominantes à forte concentration en ammonium (Juretschko *et al.*, 1998) et *Nitrosospira* sp. et *Nitrospira* sp. sont les espèces dominantes à faible concentration en ammonium (Schramm *et al.*, 1998).

Les techniques d'analyse moléculaire récemment développées sont essentielles pour appréhender la diversité, la dynamique et les activités spécifiques des différentes populations microbiennes qui composent l'écosystème (Amann *et al.*, 1998; Boon *et al.*, 2002; Dabert *et al.*, 2002; Eschenhagen *et al.*, 2003; Jeon *et al.*, 2003; Juretschko *et al.*, 1998; Kämpfer *et al.*, 1996; Mobarry *et al.*, 1996; Schramm *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1996; Yuan et Blackall, 2002). Deux approches différentes sont utilisées. Elles sont basées essentiellement sur la détection des molécules d'ARN ribosomal bactérien (ARNr 16 S) ou sur l'analyse des gènes codants l'ARN ribosomique bactérien (ADNr). La première approche est un marquage de l'ARNr 16S, par des sondes oligonucléotidiques fluorescentes spécifiques, soit *in situ* (FISH) (Eschenhagen *et al.*, 2003; Kämpfer *et al.*, 1996; Mobarry *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1996), soit après extraction des acides nucléiques (dot-blot) (Jeon *et al.*, 2003). Ce marquage cible généralement un groupe bactérien mais le développement de sondes spécifiques d'un genre bactérien contribue nettement à la compréhension de l'organisation des différentes populations (Juretschko *et al.*, 1998; Mobarry *et al.*, 1996; Schramm *et al.*, 1998). La seconde approche repose sur l'extraction des acides nucléiques, l'amplification des séquences d'ADNr par PCR, puis leur séparation. La séparation des acides nucléiques est basée sur la stabilité de l'ADN double-brin dans un gradient dénaturant chimique (DGGE) (Boon *et al.*, 2002) ou thermique (TGGE), sur la taille des fragments de restrictions (T-RLFP) (Eschenhagen *et al.*, 2003) ou sur la structure secondaire de l'ADN simple-brin. Cette seconde approche permet éventuellement l'identification des micro-organismes par comparaison des séquences obtenues avec une base de données (Eschenhagen *et al.*, 2003; Jeon *et al.*, 2003).

Les résultats de l'approche par sondes moléculaires (FISH) montrent une légère prédominance dans les boues de bactéries appartenant au groupe des  $\beta$ -*Proteobacteria* (20 à 33 % des bactéries dénombrées en épifluorescence après marquage au DAPI), par rapport au groupe des  $\alpha$ -*Proteobacteria* (15 %), au groupe des bactéries à Gram positif et faible contenu en bases G+C

(15 %), au groupe *Cytophaga-Flavobacteria* (15 %) et au groupe des  $\gamma$ -*Proteobacteria* (moins de 10 %) (Eschenhagen *et al.*, 2003; Kämpfer *et al.*, 1996). Les résultats de l'approche par analyse des séquences d'ADNr montrent une prédominance des bactéries du groupe des  $\alpha$ -*Proteobacteria* (22 à 30 %) et des bactéries à réaction positive à la coloration de Gram (23 à 31 %), avec seulement 8 % de bactéries appartenant au groupe des  $\beta$ -*Proteobacteria* (Eschenhagen *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent que les connaissances actuelles sur la communauté bactérienne des boues activées sont encore loin de la réalité et que la combinaison des différentes techniques moléculaires est essentielle pour appréhender la diversité des populations bactériennes présentes. De plus, l'efficacité de biodégradation ne repose certainement pas sur la dominance de quelques espèces bactériennes mais sur la coopération de la multitude de populations. C'est pourquoi l'étude des activités spécifiques des populations bactériennes présentes est certainement plus intéressante que de détecter simplement la dominance d'un groupe bactérien au sein des boues.

Il est en effet possible d'attribuer une activité métabolique *in situ* à une population bactérienne grâce à l'utilisation simultanée des techniques de détection et des techniques permettant la caractérisation de l'activité métabolique, comme la micro-autoradiographie qui a permis d'étudier l'assimilation de substrats radioactifs par une bactérie filamenteuse sous différentes conditions (Nielsen *et al.*, 1999). La combinaison de la détection *in situ* (FISH) avec des techniques comme la microscopie à balayage laser et des micro-électrodes a révélé une image précise de la dynamique des populations nitrifiantes d'un biofilm, avec la présence de bactéries oxydant l'ammonium (*Nitrosomonas*) plutôt à l'extérieur du biofilm et la présence de bactéries oxydant les nitrites (*Nitrobacter*) à l'intérieur du biofilm (Schramm *et al.*, 1996).

## 2.2. LES POLYMERES EXTRACELLULAIRES DES FLOCS DE BOUES ACTIVEES.

### 2.2.1. Caractérisation de la matrice de polymères extracellulaires.

Les bactéries des agrégats bactériens sont piégées dans une matrice de polymères extracellulaires qui assure la cohésion des agrégats. D'une manière générale, l'ensemble de ces macromolécules extracellulaires est désigné par le terme EPS, c'est-à-dire substances polymériques extracellulaires. L'observation des agrégats en microscopie électronique montre un aspect hétérogène correspondant à des polymères plus ou moins denses autour des bactéries (Figure 2. 3).

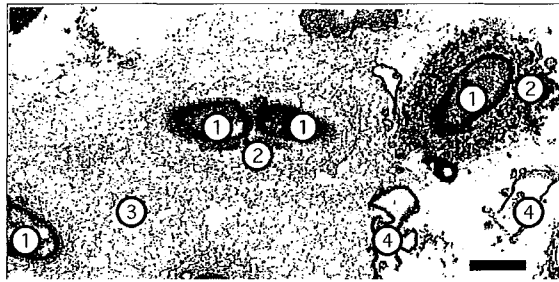


Figure 2. 3 : Photographie d'une coupe ultrafine de floc de boues activées observé en microscopie électronique après marquage des polysaccharides (Bleich et Nehrkorn, 1989) montrant des bactéries ① entourées de zones d'aspects différents correspondant à des polymères plus ou moins denses ② et ③ ou des lysats cellulaires ④. Barre = 0,5  $\mu$ m.

La microscopie confocale à balayage laser permet l'observation de la structure en trois dimensions et de la dynamique des biofilms et des agrégats bactériens sous leur forme hydratée et l'étude de la composition des polymères extracellulaires, en particulier par le marquage des polysaccharides à l'aide de sondes fluorescentes de nature lectinique (Johnsen *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 1998; Neu et Lawrence, 1999; Wolfaardt *et al.*, 1998). Toutefois la spécificité des lectines vis-à-vis des polysaccharides extracellulaires est encore difficilement assurée dans le milieu complexe que sont les cultures mixtes (Johnsen *et al.*, 2000).

La caractérisation chimique des polymères extracellulaires nécessite au préalable une étape d'extraction et de séparation des composés extracellulaires de la biomasse bactérienne. Les méthodes utilisées pour extraire les substances extracellulaires sont très nombreuses. L'application d'ultrasons (Jorand *et al.*, 1995; Urbain *et al.*, 1993a), l'application de vapeur (Brown et Lester, 1980) et l'augmentation de la température sont les principales méthodes physiques utilisées. L'utilisation de glutaraldéhyde (Azeredo *et al.*, 1999a; Azeredo *et al.*, 1998), de formaldéhyde et de soude (Liu et Fang, 2002), d'éther de couronne (Wuertz *et al.*, 2001), d'un mélange soude/chlorure de sodium (Esparza-Soto et Westerhoff, 2001; Higgins et Novak, 1997) sont les principales méthodes chimiques employées. Certaines techniques combinent les deux approches, comme l'utilisation d'une résine échangeuse de cations associée à des forces de cisaillement (Frølund *et al.*, 1996; Jahn et Nielsen, 1995; Jorand *et al.*, 1998).

Cette diversité de techniques d'extraction traduit leur relative imperfection. Premièrement, un point faible commun à toutes ces techniques d'extraction est la difficulté à évaluer le rendement d'extraction : une partie des polymères, difficilement quantifiable mais certainement non négligeable, reste associée à la biomasse. La quantité d'EPS extraite a été estimée d'une manière globale à 14 % (Urbain *et al.*, 1993a) et 16,5 % (Liu et Fang, 2002) en masse des matières volatiles des boues, alors que la quantité totale d'EPS atteindrait de 43,7 % (Liu et Fang, 2002) à 89 % (Zhang et Fang, 2001) en masse des matières volatiles des boues et de 70 à 98 % en masse du carbone total de biofilms développés en eaux usées (Jahn et Nielsen, 1998). Deuxièmement, la plupart des méthodes d'extraction utilisées ne permettent sans doute pas de récupérer les molécules les plus hydrophobes comme les lipides. Troisièmement, la lyse cellulaire n'est pas toujours maîtrisée et la plupart des méthodes d'extraction physiques provoquent sans doute une contamination importante de l'extrait par des composés intracellulaires.

La matrice extracellulaire des agrégats bactériens est composée de diverses macromolécules organiques, comme des protéines, des polysaccharides, des acides nucléiques, des lipides (Conrad *et al.*, 2003b) et des substances humiques (Tableau 2. 1). Une partie des protéines possède une activité hydrolytique (enzymes extracellulaires). Les polysaccharides sont composés d'oses neutres et d'acides uroniques. L'analyse des lipides montre des glycolipides (61 %), des phospholipides (21 %), des lipides neutres (16 %) et des lipopolysaccharides (2 %), composés essentiellement d'acides gras de 16 et 18 carbones (Conrad *et al.*, 2003b). La plupart de ces composés seraient associés sous forme d'hétéropolymères comme des glycolipides résultant de l'association d'oligosaccharides et d'acides gras et des glycoprotéines résultant de l'association de protéines et d'oligosaccharides. De plus, des composés inorganiques et des ions divalents sont systématiquement mis en évidence. L'hétérogénéité de la composition de cette matrice s'explique par les origines multiples des molécules qui la composent, à savoir le métabolisme bactérien, la lyse cellulaire et l'adsorption de composés issus des eaux usées.

Il est très difficile de comparer la composition des EPS de différents échantillons de boues activées, car il n'existe aucun consensus concernant la méthode d'extraction utilisées (Tableau 2.1). Cependant, lorsque la même technique d'extraction est employée, la composition de la matrice de polymères extracellulaires des boues activées varie considérablement en fonction de l'origine de l'échantillon (Bura *et al.*, 1998; Sponza, 2002, 2003; Urbain *et al.*, 1993a) et en particulier en fonction de la composition des eaux usées. En effet, la prédominance des protéines dans les EPS a été mise en évidence lorsque le ratio C/N des eaux usées est faible (5 à 20), alors que la prédominance des polysaccharides a été observée pour une déficience en azote (ratio C/N de 40 à 100) (Bura *et al.*, 1998; Durmaz et Sanin, 2001). Ainsi, l'analyse des EPS extraits de cultures mixtes comme les boues activées (Bura *et al.*, 1998; Frølund *et al.*, 1996; Jorand *et al.*, 1998; Sponza, 2002, 2003; Urbain *et al.*, 1993a; Wilen *et al.*, 2003), les biofilms en eaux usées (Jahn et Nielsen, 1995), ou les boues méthanogènes (Grotenhuis *et al.*, 1991) montre systématiquement une quantité de protéines supérieure à la quantité de polysaccharides (de 3 à 6 fois en moyenne) en relation avec la concentration limitante en carbone généralement observée dans ces systèmes.

Tableau 2. 1 : Composition en  $\text{mg g}^{-1}$  MV des EPS extraits de boues activées de stations d'épuration d'eaux usées urbaines. (ND, non déterminé. US, ultrasons. REC, résine échangeuse de cations. MV, matières volatiles).

Méthodes d'extraction	Protéines	Polysaccharides	ADN	Subst. Humiques	Ac. Uroniques	Références
Température (80 °C, 1h)	121	8	ND	ND	2,2	Frølund <i>et al.</i> , 1996
Vapeur 10 min	77,1	15,8	3,7	ND	ND	Brown et Lester, 1980
US (50 W, 2 x 15 s)	279,9	60,5	67,3	ND	ND	Urbain <i>et al.</i> , 1993a
US (60 s, 37 W, glace) puis REC (60g/g MS, 180 tr $\text{min}^{-1}$ , 1h, 4 °C)	90,3	27,5	ND	ND	ND	Jorand <i>et al.</i> , 1998
REC (70-75g/g MV, 900 tr $\text{min}^{-1}$ , 1h, 4 °C)	85,0	28,2	0,52	ND	1,2	Bura <i>et al.</i> , 1998
REC (70-75g/g MV, 900 tr $\text{min}^{-1}$ , 1h, 4 °C)	70	14	7	70	3,9	Frølund <i>et al.</i> , 1996
REC (70-75g/g MV, 900 tr $\text{min}^{-1}$ , 17h, 4 °C)	243	48	ND	126	6,1	Frølund <i>et al.</i> , 1996
REC (70 g/g MV, 4 °C, 600 tr $\text{min}^{-1}$ , 1h)	17,6	12,7	0,14	16,4	1,2	Liu et Fang, 2002
REC (75 g/g MV, 4 °C, 900 tr $\text{min}^{-1}$ , 4h)	68,7	12,2	4,3	53,7	2,0	Wilen <i>et al.</i> , 2003
REC (75 g/g MV, 4 °C, 900 tr $\text{min}^{-1}$ , 4h)	51,9	8,9	3,0	29,1	1,6	Wilen <i>et al.</i> , 2003
REC (75 g/g MV, 4 °C, 900 tr $\text{min}^{-1}$ , 4h)	63,4	12,9	5,6	46,5	1,4	Wilen <i>et al.</i> , 2003
REC (10 g/g MS, 3h, glace)	68	11	ND	ND	ND	Wuertz <i>et al.</i> , 2001
ETDA (30 mM, 10 mL, 3h, glace)	21	3	ND	ND	ND	Wuertz <i>et al.</i> , 2001
EDTA 2 % (10 mL, 4 °C, 3 h)	22,9	12,4	0,47	59,2	2,1	Liu et Fang, 2002
NaOH (pH 11, 1h)	96	22	ND	ND	3,1	Frølund <i>et al.</i> , 1996
Formaldéhyde 36,5 % (0,06 mL, 4 °C, 1 h) puis soude 1 N (4 mL, 4 °C, 3h)	54,6	40,5	0,35	50,4	4,2	Liu et Fang, 2002
Formaldéhyde 36,5 % (0,06 mL, 4 °C, 1 h) puis US (60 W, 2,5 min)	20,4	28,9	0,13	18,9	1,8	Liu et Fang, 2002
Formaldéhyde 36,5 % (0,06 mL, 4 °C, 1 h)	12,3	15,9	0,07	10,9	1,1	Liu et Fang, 2002
Glutaraldéhyde (3 % v/v, 4 °C, 12 h, 50 tr $\text{min}^{-1}$ )	71	17	6,2	ND	ND	Sponza, 2002
Ether de couronne (30 mM, 10 mL/g MS, 400 tr $\text{min}^{-1}$ , 1h, glace)	44	7	ND	ND	ND	Wuertz <i>et al.</i> , 2001

### 2.2.2. Fonction des polymères extracellulaires (EPS).

Les polymères extracellulaires sont les éléments clefs responsables de l'adhésion des bactéries aux surfaces solides, de la stabilité des biofilms et de la cohésion des agrégats bactériens (Tay *et al.*, 2001; Tsuneda *et al.*, 2003). Les polysaccharides produits par de nombreuses bactéries agissent comme des bioflocculants (Deng *et al.*, 2003). Si les bactéries expriment à la surface de leur membrane externe des fonctions chimiques qui leur permettent d'adhérer entre elles ou sur des surfaces par le biais d'interactions électrostatiques, seule la production de polymères extracellulaires permettrait une adhésion irréversible (Azeredo *et al.*, 1999b). Ainsi, des *E. coli* K12 acquièrent la capacité à coloniser des surfaces inertes grâce à la synthèse de structures fibrillaires d'adhérence de type pili, les curli (Vidal *et al.*, 1998). Les *E. coli* K12, incapables de produire des EPS, peuvent adhérer sur une surface mais ne peuvent pas se développer sous forme de biofilm comme le font les micro-organismes non déficients en EPS (Danese *et al.*, 2000). Les EPS participent à l'agrégation de bactéries appartenant à une même espèce et de bactéries appartenant à des espèces différentes, formant alors de véritables consortiums, voire l'agrégation de micro-organismes producteurs d'EPS avec des bactéries incapables de produire des EPS (Allison *et al.*, 2000).

La cohésion des agrégats bactériens est assurée par les nombreuses interactions qui ont lieu entre les bactéries, entre les polymères et les bactéries et entre les polymères. C'est la multiplicité de ces interactions qui crée la force de cohésion de la matrice. La plupart des molécules présentes portent des fonctions chargées négativement à pH 7, par exemple, des fonctions carboxyles qui sont portées par les protéines et les polysaccharides, et des groupements phosphates, portés par les acides nucléiques. Les polysaccharides, du fait de leur nature fibreuse, forment ainsi un maillage dense (Figure 2. 4) voire un gel par rétention d'eau (Hart *et al.*, 1999) et de calcium (Gregor *et al.*, 1996). Les forces de cohésion qui existent entre ces macromolécules poly-anioniques sont principalement des interactions physico-chimiques de faible énergie, comme les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogènes et les forces de dispersion de London (Chen et Steward, 2002; Flemming *et al.*, 2000). De plus, le rôle des ions multivalents a été clairement démontré dans le mécanisme de floculation : ils forment des ponts entre les différentes macromolécules portant des charges négatives. En effet, le piégeage du calcium (Bruus *et al.*, 1992; Keiding et Nielsen, 1997; Sanin et Vesilind, 2000) et du fer (Novak *et al.*, 2001) entraîne rapidement la défloculation des agrégats et une désorption de matière.

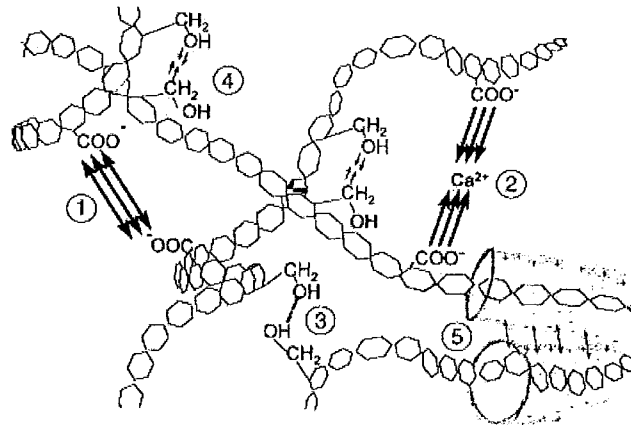


Figure 2. 4 : Schéma des interactions entre les polysaccharides qui composent les EPS : ① répulsion entre deux groupes carboxyles ; ② attraction entre deux groupes carboxyles par le biais d'un cation divalent ; ③ liaison hydrogène ; ④ interaction électrostatique ; ⑤ forces de dispersion (Flemming *et al.*, 2000).

Cependant, la théorie DLVO, qui prend en compte les interactions électrostatiques à faible distance, ne suffit pas à interpréter les mécanismes de floculation irréversibles et les interactions hydrophobes doivent être prises en compte (Azeredo *et al.*, 1999b). Expérimentalement, deux types de polymères ont été mis en évidence, des composés chargés, participant aux interactions électrostatiques, et des composés qui ne sont pas ou peu faiblement chargés (Eriksson *et al.*, 1992), qui participeraient aux interactions hydrophobes. Le caractère hydrophobe des agrégats, mis en évidence par un test d'agrégation au sulfate d'ammonium, a été corrélé avec la capacité des floccs à décanter (Urbain *et al.*, 1993a). Il semble que le rôle des protéines dans ce type d'interaction soit essentiel. En effet, l'efficacité de la décantation est corrélée positivement à la concentration en protéines totales des boues et des EPS (Wilén *et al.*, 2003). 12 % des protéines des EPS extraits font partie des molécules qualifiées d'hydrophobes par analyse chromatographique d'interaction hydrophobe (Jorand *et al.*, 1998). De plus, la modification de la fluorescence d'un composé hydrophobe (pyrène) lorsqu'il est adsorbé dans des agrégats bactériens, issus de boues activées ou de sols, a démontré la présence de zones plus apolaires au sein des agrégats (Ganaye *et al.*, 1997). La présence de zones fortement hydrophobes a été confirmée par une mise en évidence directe, avec l'adsorption de bactéries fluorescentes fortement hydrophobes au sein des floccs de boues activées (Olofsson *et al.*, 1998; Zita et Hermansson, 1997a, b), et l'adsorption d'un polluant organique fluorescent (diclofop) dans un biofilm bactérien (Wolfaardt *et al.*, 1998).

Par ailleurs, d'autres interactions plus spécifiques contribueraient à la floculation bactérienne, en particulier par l'intermédiaire de certaines protéines, les lectines, capables de former des liaisons spécifiques avec les sucres portés par l'enveloppe bactérienne. Ainsi, l'addition de sucres simples a montré un effet réversible sur l'agrégation de certaines bactéries aquatiques, suggérant le rôle de ces lectines dans la formation des agrégats bactériens (Buswell *et al.*, 1997; Rickard *et al.*, 2000). De la même manière, l'addition de sucres simples a provoqué la défloculation des floccs



de boues activées et une protéine dont la séquence en acides aminés serait comparable à celle d'une lectine a été mise en évidence au sein des EPS (Higgins et Novak, 1997).

Les capacités d'adhésion et d'accumulation des EPS des micro-organismes conditionnent parfois leur aptitude à biodégrader certains composés aromatiques hydrophobes. C'est le cas des *Mycobacterium* spp., qui adhèrent à ces substrats particuliers peu solubles par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes avec l'acide mycolique qu'elles expriment à leur surface (Wick *et al.*, 2002). La production d'EPS permet aussi la solubilisation de ces composés aromatiques hydrophobes. Ainsi la production de certaines macromolécules spécifiques (gluco-sphingolipides), jouant le rôle de bio-surfactants, augmente considérablement la solubilité des substrats hydrophobes et par conséquent leur biodégradabilité. Cette propriété a été observée chez *Sphingomonas* (Johnsen et Karlson, 2003), chez *Rhodococcus rodochrous* S-2 (Iwabuchi *et al.*, 2002) et dans un biofilm mixte (Wolfaardt *et al.*, 1994; Wolfaardt *et al.*, 1995).

Les EPS assurent d'une manière générale la rétention de nombreuses molécules, substrats ou produits d'hydrolyse, à proximité des bactéries agrégées. Certains polysaccharides extracellulaires assurent la rétention d'une importante quantité d'eau (Hart *et al.*, 1999) et par conséquent une protection contre la dessiccation. La production de polysaccharides extracellulaires est parfois stimulée par des conditions de dessiccation chez *Pseudomonas* sp. isolée d'un sol (Roberson et Firestone, 1992). Les polysaccharides sont aussi responsables du piégeage des ions, comme le calcium et le magnésium. Ainsi, les EPS augmenteraient la biodisponibilité des minéraux et des ions métalliques, comme le fer. Ils piègent aussi des polluants, comme des pesticides ou des détergents, et des métaux lourds, par interaction avec les fonctions carboxyliques des polysaccharides en particulier.

L'activité hydrolytique des bactéries qui adhèrent sur des particules en suspension est généralement nettement supérieure à celle des bactéries planctoniques. En effet, les polymères extracellulaires concentrent à proximité des cellules des enzymes hydrolytiques extracellulaires. Les activités enzymatiques extracellulaires des agrégats bactériens seraient stabilisées par la présence du gel hydraté et des ions nécessaires à leur fonctionnement. A titre d'exemple, la production de lipase extracellulaire par *Pseudomonas aeruginosa* est significativement stimulée par la présence d'alginate qu'il soit produit par la cellule ou apporté de manière exogène (Wicker-Böckelmann *et al.*, 1987; Wingender, 1990; Wingender *et al.*, 1987; Wingender et Winkler, 1984).

En résumé, les EPS ont un important pouvoir tampon, du fait de leur capacité à créer un micro-environnement protecteur vis-à-vis des variations parfois brutales des conditions environnementales. Toutes ses fonctions convergent vers une seule : la survie en environnement hostile.

## 2.3. ELIMINATION DE LA MATIÈRE ORGANIQUE PAR LES BACTÉRIES DES AGREGATS BACTÉRIENS (BOUES ACTIVEES).

### 2.3.1. Matière organique véhiculée par les eaux usées.

La matière organique véhiculée par les eaux usées est très diverse en terme de taille et de nature chimique des composés. La distribution de taille des composés organiques véhiculés par les eaux usées varie de moins de  $10^{-3}$   $\mu\text{m}$  à plus de 100  $\mu\text{m}$  avec les fractions particulaire et colloïdale représentant 60 % de la matière organique totale (Figure 2. 5). La plupart des macromolécules présentes ont une masse molaire comprise entre  $10^3$  et  $10^7$ . Au-delà, il s'agit principalement de micro-organismes et de débris organiques. Les composés suivants sont systématiquement détectés dans les eaux usées urbaines : des protéines, des polysaccharides comme la cellulose et l'amidon, des lipides et surfactants (sulfonate d'alkyl benzène) et dans une moindre mesure, substances humiques, des acides nucléiques, des acides aminés, et des acides organiques (Tableau 2.2). Cependant, la plupart des composés véhiculés par les eaux usées restent difficiles à caractériser et seuls 55 % du carbone total peuvent être véritablement identifiés à l'aide des techniques analytiques actuelles (Dignac *et al.*, 2000).

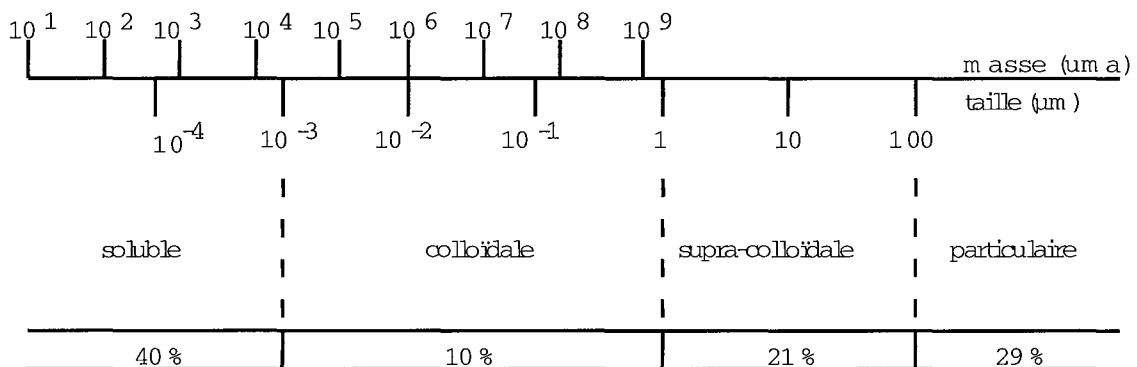


Figure 2. 5 : Fractionnement de la matière organique des eaux usées en fonction de la taille des particules et correspondance de la taille avec la masse molaire apparente des molécules (Levine *et al.*, 1991a, b).

Ces données laissent supposer que la matière organique réellement disponible pour les micro-organismes est minime, la fraction soluble ne représentant qu'une faible partie de la matière organique totale. De fait, seuls 9 à 13 % de la matière organique sont directement assimilables par les micro-organismes (Ohron et Çokgör, 1997). Il s'agit de molécules de petite masse molaire (inférieure à  $10^3$ ) comme les sucres simples, les acides aminés, les alcools et les acides gras volatiles, comme l'acétate. Les autres composés doivent être dégradés avant assimilation.

Tableau 2. 2: Composition chimique des eaux usées urbaines (Henze, 1992; Nielsen *et al.*, 1992; Raunkjær *et al.*, 1994). DCO : demande chimique en oxygène ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ).

Paramètres	Concentration (% de la DCO)
Protéines	8 à 28
Polysaccharides	9 à 18
Lipides	10 à 31
Acides gras volatiles	2,5 à 19
Acétate	6
Alcools (éthanol, méthanol)	1
Acides aminés	2,5
Sucres simples	2,5

La fraction biodégradable par le système biologique représente environ 80 % de la matière organique (Dignac *et al.*, 2000; Henze, 1992; Ohron et Çokgör, 1997; Servais *et al.*, 1995). La fraction biodégradable se répartit pour moitié dans la fraction soluble et dans la fraction particulaire (Figure 2. 6). La fraction biodégradable soluble est définie comme rapidement hydrolysable au contraire de la fraction biodégradable particulaire considérée comme lentement biodégradable (Henze, 1992; Ohron et Çokgör, 1997). Cette dernière représente la plus grande part de la matière organique des effluents urbains. C'est pourquoi son élimination constitue l'étape déterminante du traitement par voie biologique. La fraction réfractaire à la biodégradation se répartit dans les fractions soluble (9 à 21 %) et particulaire (17 à 33 %). La fraction résiduelle, en sortie de station d'épuration, est constituée de résidus de biodégradation, de produits non biodégradables ou très lentement biodégradables.

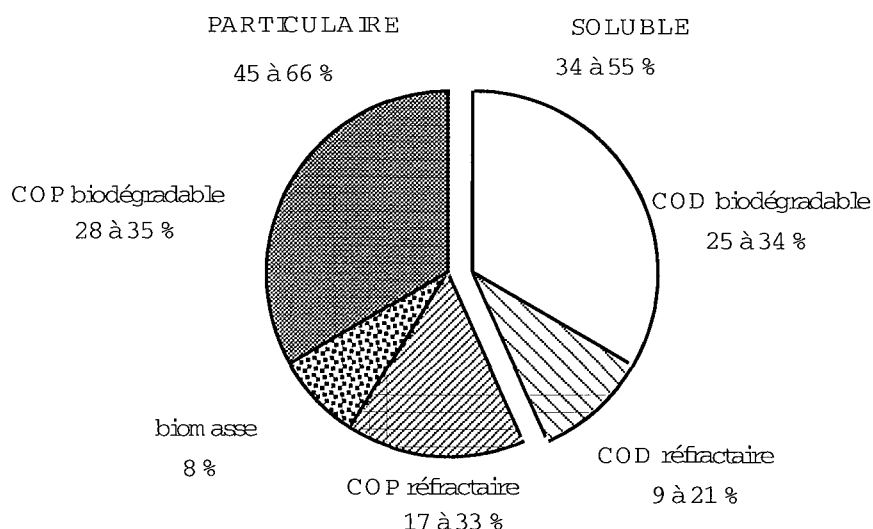


Figure 2. 6 : Fractionnement du carbone organique des eaux usées urbaines en fonction de sa biodégradabilité, pourcentages exprimés par rapport au carbone organique total (COT) (n=3 échantillons) (Servais *et al.*, 1995). COD : carbone organique dissous ; COP : carbone organique particulaire.

L'élimination de la matière organique par les agrégats bactériens résulte de mécanismes physiques comme l'adsorption par les agrégats et de mécanismes biologiques comme l'hydrolyse enzymatique. Trois phénomènes principaux sont étroitement liés (Figure 2. 7) :

- 1) l'adsorption de la matière organique par les agrégats bactériens,
- 2) la biodégradation par les enzymes hydrolytiques extracellulaires,
- 3) le transport des composés et des produits d'hydrolyse au sein des agrégats par convection au sein des pores et diffusion au sein des EPS.

L'adsorption est une étape préliminaire et nécessaire à la biodégradation. L'hydrolyse enzymatique des macromolécules en composés de plus petite taille est essentielle à leur diffusion et à leur assimilation par les micro-organismes, qui conduit à la production de biomasse et de CO<sub>2</sub>.

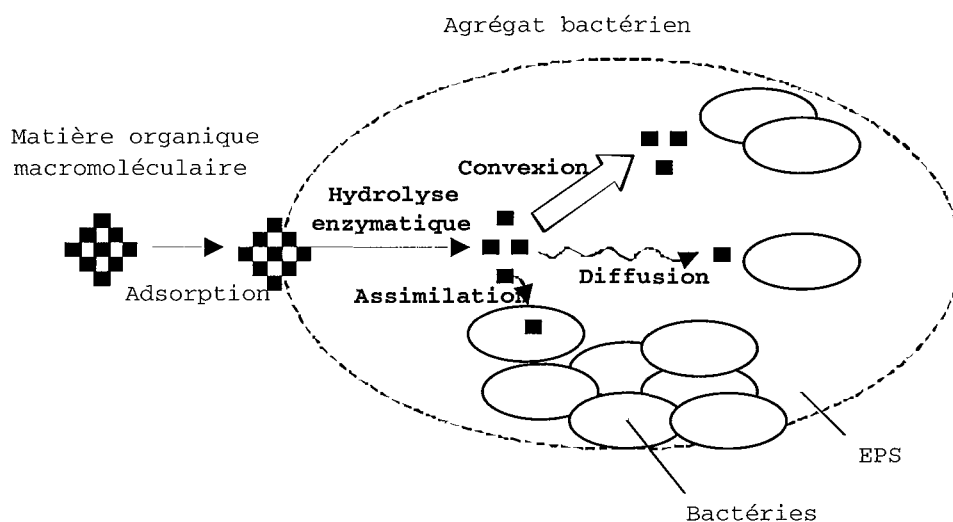


Figure 2. 7 : Représentation schématique de l'élimination de la matière organique par les agrégats bactériens, montrant les différentes étapes (adsorption, hydrolyse enzymatique extracellulaire et transport).

### 2.3.2. Adsorption des composés organiques par les agrégats bactériens.

L'adsorption est un phénomène essentiellement physico-chimique, qui met en jeu des interactions de nature électrostatiques et hydrophobes entre les composés organiques et les polymères extracellulaires des agrégats bactériens. Les paramètres physico-chimiques susceptibles de modifier la charge des molécules, comme le pH et la force ionique, affectent fortement les capacités d'adsorption (Wang *et al.*, 1998). La diminution de l'adsorption lorsque les molécules sont chargées négativement (Carlson et Silverstein, 1998) s'explique par des phénomènes de répulsions électrostatiques entre ces molécules et les floccs de boues activées, globalement chargés négativement (Urbain *et al.*, 1993a).

Le transfert de la matière organique de la phase aqueuse vers les floccs est rapide. En effet, 45 % de la matière organique non décantable des eaux usées (dont 26 % de matière colloïdale) sont éliminés par les floccs de boues activées en une dizaine de minutes (Guellil *et al.*, 2001b). La disparition de 2 à 42 % d'albumine bovine du surnageant des floccs de boues activées a été aussi

attribuée à ce phénomène d'adsorption (Crombie-Quilty et McLoughlin, 1983). L'adsorption est une des étapes clés du procédé d'épuration biologique, car elle joue un rôle prépondérant dans l'élimination des molécules réfractaires à la biodégradation bactérienne (Wang *et al.*, 1998) et des polluants hydrophobes (Struijs *et al.*, 1991). En effet, selon le modèle proposé par Struijs *et al.* (1991), 30,8 % des sulfonates d'alkylbenzène linéaires (LAS) seraient éliminés par adsorption par les boues, bien que ces molécules soient considérées comme biodégradables à hauteur de 95 %. De plus, des essais réalisés en batch ont montré qu'à faible concentration ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), environ 73 % des LAS sont éliminés par adsorption par les boues (Conrad *et al.*, 2003a). Cependant, si l'adsorption permet d'augmenter le temps de rétention des composés organiques dans le système, elle pourrait aussi limiter la biodégradation de certaines molécules. En effet, l'adsorption d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par des micro-organismes incapables de les biodégrader limite leur vitesse de biodégradation *in vitro* (Stringfellow et Alvarez-Cohen, 1999). Selon le modèle de Struijs *et al.* (2001), l'élimination par biodégradation diminuerait de 70 % à moins de 10 % lorsque la capacité d'adsorption des boues augmente de 20 % à 55 %. L'immobilisation par adsorption des composés organiques au sein des floccs de boues activées n'est donc pas exclue, mais les proportions dans lesquelles l'adsorption limite l'accès aux enzymes extracellulaires et aux bactéries ne sont pas connues.

L'adsorption n'est pas un phénomène irréversible, il s'agit d'un équilibre. Le transfert de matière organique des agrégats vers la phase aqueuse dépend de la nature des composés adsorbés et des paramètres physico-chimiques du milieu récepteur. En effet, la désorption de matière organique colloïdale a été observée lors du mélange de boues activées et d'eaux usées faiblement chargées (Guellil *et al.*, 2001b), d'eau déminéralisée (Keiding et Nielsen, 1997) et la désorption de LAS a été observée lorsque les boues sont mises en suspension dans de l'eau de rivière (Conrad *et al.*, 2003a).

### **2.3.3. Hydrolyse de la matière organique par les enzymes extracellulaires.**

La majorité des composés présents dans les eaux usées ne sont pas directement assimilables par les bactéries. Ainsi, l'assimilation par les bactéries marines de composés de la taille d'hexasaccharides (masse molaire 900) reste exceptionnelle (Arnosti et Repeta, 1994) et celles-ci ne peuvent assimiler directement que des petits peptides de masse molaire inférieure à 600-700 (Hollibaugh et Azam, 1983; Pantoja et Lee, 1999). En effet, seuls des monomères ou des petits oligomères sont capables de traverser la membrane bactérienne (Egli, 1995). L'assimilation met en jeu une structure de transport spécifique appelée d'une manière générale porine (Nikaido, 1992). Il s'agit de pores d'environ 1 nm de diamètre, remplis d'eau, qui permettent le transport par diffusion de petits composés solubles. La limite d'exclusion de ces porines est d'environ 600, c'est-à-dire qu'elles n'acceptent le passage que de tri- ou tétra-saccharides et de peptides de 7 à 8 acides aminés. La vitesse de transport est fortement affectée par des faibles variations de taille, de forme, de caractère hydrophobe et de charge. Le transport des substrats au travers de la membrane constitue une étape limitant leur catabolisme intracellulaire (Martinez *et al.*, 1999). La présence de ligands spécifiques accélère la pénétration au travers des porines, appelées dans ce cas particulier

canaux spécifiques de transport. Les différents systèmes de transport peuvent co-exister, à titre d'exemple, chez *Listeria monocytogenes* Scott A, l'un est dédié aux di- et tri-peptides, l'autre aux oligopeptides jusqu'à 8 acides aminés (Verheul *et al.*, 1998).

L'hydrolyse des composés organiques par les enzymes bactériennes extracellulaires est l'étape déterminante du processus de biodégradation biologique de la matière organique. Les composés organiques particuliers sont hydrolysés en composés organiques solubles (de taille inférieure à 0,45  $\mu\text{m}$ ) (Canziani *et al.*, 1999; Janning *et al.*, 1997) et les polymères (protéines, polysaccharides et lipides) en oligomères et monomères (Dueholm *et al.*, 2001; Miron *et al.*, 2000), jusqu'à ce qu'ils puissent être assimilés par les bactéries. La vitesse d'assimilation est étroitement couplée à la vitesse d'hydrolyse lorsque la concentration du substrat reste faible, mais lorsque celle-ci devient élevée, la production de produits d'hydrolyse dépasse nettement les capacités d'assimilation (Hoppe *et al.*, 1988). Ceci s'expliquerait par une régulation de la vitesse d'assimilation, avec une affinité forte du système d'assimilation pour le substrat lorsque sa concentration est faible et une affinité faible lorsque la concentration de substrat est élevée (Unanue *et al.*, 1999).

Les enzymes extracellulaires bactériennes sont responsables de l'hydrolyse de la matière organique par les biofilms formés en eaux usées (Confer et Logan, 1997a, b; Janning *et al.*, 1997; Larsen et Harremoës, 1994) et par les floccs de boues activées (Dold *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1997; Henze et Mladenovski, 1991; Mcloughlin et Crombie-Quilty, 1983; Sanders *et al.*, 2000). La localisation de ces enzymes au sein des floccs de boues activées n'a pas été clairement établie. Quelques études ont démontré la présence d'enzymes hydrolytiques associées aux EPS extraits des floccs de boues activées (Conrad *et al.*, 2000; Frølund *et al.*, 1995; Gessesse *et al.*, 2000; Guellil *et al.*, 2001a). Cependant, la distribution de ces enzymes, entre la surface cellulaire et les EPS, n'est pas connue.

L'hydrolyse enzymatique est une étape dont la cinétique s'avère limitante de l'élimination de la matière organique par les floccs de boues activées. En effet, des essais réalisés en batch ont démontré que la constante spécifique d'hydrolyse de la matière organique colloïdale ( $\leq 1 \mu\text{m}$ ) par les boues est de l'ordre de  $10^{-4} \text{ L mg}^{-1} \text{ j}^{-1}$ , c'est-à-dire environ 1000 fois supérieure à celle de la matière organique macro-colloïdale (1 à 10  $\mu\text{m}$ ) (Levine *et al.*, 1991b). De plus, l'élimination des polymères (peptone, amidon, et dextrine) est plus lente que celle des monomères qui les composent (acides aminés et glucose respectivement) ajoutés dans les mêmes proportions (Ubukata, 1997, 1998, 1999). Ainsi, l'hypothèse classiquement formulée est que la vitesse d'hydrolyse est inversement proportionnelle à la taille des molécules. Cependant, la constante spécifique d'hydrolyse en flux continu de la matière organique particulaire des eaux usées par les boues a été estimée à  $3 \cdot 10^{-3} \text{ L mg}^{-1} \text{ j}^{-1}$ , une valeur nettement plus élevée qu'en batch (Eliosov et Argaman, 1995), ce qui suggère que les conditions hydrodynamiques influencent considérablement la vitesse de biodégradation, en particulier en favorisant les échanges de matière entre les agrégats et par conséquent l'accessibilité des substrats aux enzymes et aux bactéries.

### 2.3.4. Diffusion des substrats au sein des agrégats.

L'hypothèse couramment formulée est que la matrice d'EPS, formant un maillage plus ou moins dense autour des micro-organismes, limiterait la diffusion des substrats au sein des biofilms ou des agrégats bactériens. Ainsi, la vitesse de diffusion, conditionnant à la fois l'accessibilité des substrats aux enzymes extracellulaires et l'accessibilité des produits d'hydrolyse aux bactéries, diminuerait la vitesse de biodégradation.

En effet, la vitesse de diffusion au sein des biofilms est de 2 à 50 fois inférieure à celle observée dans l'eau, en fonction de la masse molaire de la molécule, et elle est inversement proportionnelle à la taille ou plus exactement au rayon hydrodynamique des molécules (Tableau 2.3). Seules les petites molécules, de masse molaire inférieure à  $10^3$ , comme les monosaccharides, les acides aminés, les acides gras, sont considérées comme diffusibles au sein des agrégats bactériens (Levine *et al.*, 1985). La vitesse de diffusion des polymères de taille supérieure à  $10^3$  est considérablement ralentie. Quelle que soit la taille de la molécule, si les interactions avec les polymères sont fortes, la diffusion est nulle.

Tanaka *et al.* (1984) ont estimé à environ 20 000 la masse molaire limite de diffusion dans un gel d'alginate utilisé comme modèle de polymères extracellulaires. Cependant les résultats obtenus par Longo *et al.* (1992) ont mis en évidence la capacité de protéases ayant une masse molaire nettement supérieure à 20 000 à diffuser dans ce type de gel (Tableau 2. 4). De plus, d'autres essais de diffusion, de l'intérieur du gel vers le milieu extérieur, ont montré que toutes les molécules précédemment testées étaient capables de diffuser hors du gel, ayant toutefois un coefficient de diffusion de sept à deux cent fois inférieur à celui de la plus petite molécule testée (Tanaka *et al.*, 1984).

Tableau 2. 3: Masses molaires, tailles et paramètres de diffusion de différents composés dans l'eau et dans des biofilms bactériens mixtes (Garcia-Lopez et Veiga, 2000; Lawrence *et al.*, 1994).  $R_H$  rayon hydrodynamique apparent ;  $R_G$  rayon de gyration ;  $D_{aq}$  coefficient de diffusion en solution aqueuse à 22 °C ;  $D_{bfm}$  coefficient de diffusion apparent dans le biofilm à  $23 \pm 2$  °C.

Composé	Masse molaire	$R_H$ (Å)	$R_G$ (Å)	$D_{aq}$ (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	$D_{bfm}$ (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
Lithium	3			$10 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$
fluorescéine	289	6,5	9,8	$3,3 \cdot 10^{-6}$	$7,7 \cdot 10^{-8}$
Dextrane fluoré	4 000	14,5	21,8	$1,48 \cdot 10^{-6}$	$3,1 \cdot 10^{-8}$
Dextrane fluoré	40 000	31	46,5	$0,70 \cdot 10^{-6}$	$1,7 \cdot 10^{-8}$
Dextrane fluoré	70 000	60	90,2	$0,36 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-8}$
Dextrane fluoré	500 000	70	105,3	$0,31 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-8}$
Dextrane fluoré	2 000 000	386	579,0	$0,056 \cdot 10^{-6}$	$0,7 \cdot 10^{-8}$

## 2. Analyse bibliographique.

Tableau 2. 4: Paramètres de diffusion de composés de différentes masses molaires dans un gel d'alginate de calcium 2% (Longo *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1984).  $D_{aq}$  coefficient de diffusion en solution aqueuse à 30 °C ;  $D_{into}$  coefficient de diffusion apparent du milieu extérieur vers le gel d'alginate de calcium 2 % à 30 °C ;  $D_{from}$  coefficient de diffusion apparent du gel d'alginate de calcium 2 % vers le milieu extérieur à 30 °C.

Composé	Masse molaire	$D_{into}$ (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	$D_{from}$ (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
Glucose	180	6,83 10 <sup>-6</sup>	6,83 10 <sup>-6</sup>
Tryptophane	204	6,67 10 <sup>-6</sup>	Non mesuré
$\alpha$ -lacto-albumine	15 600	1,02 10 <sup>-6</sup>	1,02 10 <sup>-6</sup>
Albumine sérique de boeuf	69 000	Pas de diffusion	0,35 10 <sup>-6</sup>
$\gamma$ -globuline	154 000	Pas de diffusion	0,2 10 <sup>-6</sup>
Fibrinogène	341 000	Pas de diffusion	0,03 10 <sup>-6</sup>
Protéase totale de <i>Bacillus subtilis</i>	30 000	1,04 10 <sup>-6</sup>	Non mesuré
Métalloprotéase de <i>Bacillus subtilis</i>	35 000	1,40 10 <sup>-6</sup>	Non mesuré
Protéase totale de <i>Serratia marcescens</i>	60 000	0,89 10 <sup>-6</sup>	Non mesuré

A l'intérieur des biofilms et des agrégats bactériens, la vitesse de diffusion n'est pas homogène (Lawrence *et al.*, 1994; Vogt *et al.*, 2000). Certaines régions ne laissent pénétrer que les composés les plus petits alors que d'autres montrent une diffusion rapide de toutes les molécules. Ces résultats suggèrent que la présence de pores augmente les échanges de matière à l'intérieur des agrégats en favorisant le transport par convection (De Beer *et al.*, 1996). La convection semble ainsi déterminante par rapport à la diffusion pour le transport des macromolécules au sein des agrégats (Li *et al.*, 2003).



## 2.4. ACTIVITES ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES BACTERIENNES.

### 2.4.1. Mise en évidence des enzymes extracellulaires bactériennes.

La détection d'activités enzymatiques extracellulaires révèle la présence de populations bactériennes dans tous les milieux environnementaux, comme la mer (Chróst et Rai, 1993; Chróst et Riemann, 1994; Huston et Deming, 2002; Karner et Rassoulzadegan, 1995; Pantoja et Lee, 1999; Somville, 1984; Stepanauskas *et al.*, 1999; Tholosan *et al.*, 1999), les glaces arctiques (Huston *et al.*, 2000), les fjords (Hoppe *et al.*, 1998), les rivières (Ainsworth et Goulder, 2000; Chappell et Goulder, 1995; Romani, 2000; Romani et Sabater, 2000; Somville, 1984), les lacs (Chróst *et al.*, 1986; Debroas, 1998), les sédiments (Coolen et Overmann, 2000; Fabiano et Danovaro, 1998; Mallet et Debroas, 1999; Tholosan *et al.*, 1999) et les sols (Burns, 1989; Frankenberger et Johanson, 1986; Morra, 1997; Rad *et al.*, 1999). De plus, différentes activités enzymatiques ont été mises en évidence dans des systèmes industriels exploitant les capacités de biodégradation des micro-organismes, comme les filtres à sable des usines de potabilisation de l'eau (Hebert *et al.*, 2000), les biofilms en eau potable (Hendel *et al.*, 2001), les biofilms en eaux usées (Confer et Logan, 1997a, b; Gschlößl *et al.*, 1997; Janning *et al.*, 1997; Mustafa et Sörensson, 2001), les floccs de boues activées (Tableau 2. 5), les boues de digesteur anaérobie (Sanders *et al.*, 2000; Thiel et Hattingh, 1967; Whiteley *et al.*, 2003; Whiteley *et al.*, 2002) et les boues hygiénisées (Häner *et al.*, 1994).

Une liste non exhaustive des activités enzymatiques mesurées dans les boues est présentée dans le Tableau 2. 5. La mesure des activités hydrolytiques des boues se fait principalement à l'aide de substrats de synthèse libérant par hydrolyse enzymatique un chromophore ou un fluorophore quantifiables. Les vitesses d'hydrolyse obtenues avec ces substrats de synthèse sont difficilement comparables avec celles obtenues avec des substrats naturels, car ils ne reflètent pas la complexité et la diversité des composés organiques véhiculés par les eaux usées. En particulier, ces substrats ne correspondent pas à la structure macromoléculaire de la matière organique des eaux usées, dont l'hydrolyse nécessite l'intervention de plusieurs enzymes de spécificité différente. Cependant, l'utilisation de ces substrats artificiels est indispensable pour définir le profil enzymatique du système, c'est-à-dire pour qualifier et quantifier une partie des activités enzymatiques des boues. Les profils sont très différents en fonction des échantillons testés, suggérant la présence de populations bactériennes différentes ou des propriétés physiologiques différentes. Les vitesses d'hydrolyse sont également très variables d'un échantillon à l'autre.

Tableau 2. 5: Activités hydrolytiques extracellulaires des boues activées, substrats utilisés pour leur mise en évidence et vitesses d'hydrolyse correspondantes. (MS matières sèches, MV matières volatiles). nd : non déterminé.

Activité enzymatique	Substrat	Vitesse d'hydrolyse	Références bibliographiques
Protéase	Sérum albumine bovine	80 µg Tyrosine mg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup>	Mcloughlin et Crombie-Quilty, 1983
Protéase	caséine	640 µmol produits solubles mg <sup>-1</sup> N h <sup>-1</sup>	Sridhar et Pillai, 1973
Protéase	Azocaséine	0,057 mg azocaséine mg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup>	Goel <i>et al.</i> , 1998b
Protéase	Azocaséine	0,05 à 0,18 mg azocaséine mg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup>	Richards <i>et al.</i> , 1984
Protéase	Azocaséine	0,1 mg azocaséine mg <sup>-1</sup> MV h <sup>-1</sup>	Goel <i>et al.</i> , 1998a
Protéase	gélatine	0,459 µmol Glycine mg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup>	Garcia <i>et al.</i> , 1997
Protéase	gélatine	0,15 à 0,60 µmol Glycine mg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup>	Garcia-Gonzales <i>et al.</i> , 2001
Protéase	peptone	nd	Ubukata, 1998
L-Ala-aminopeptidase	L-Ala-4-nitroanilide	10,5 à 57,8 µmol p-nitrophénol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protéines	Teuber et Broditsch, 1977
L-Ala-aminopeptidase	L-Ala-4-nitroanilide	77,1 µmol p-nitrophénol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> MS	Lemmer <i>et al.</i> , 1994
L-Ala-aminopeptidase	L-Ala-4-nitroanilide	0,05 à 0,37 µmol p-nitrophénol mg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup>	Richards <i>et al.</i> , 1984
L-Ala-aminopeptidase	L-Ala-4-nitroanilide	1,06 µmol p-nitrophénol g <sup>-1</sup> MV h <sup>-1</sup>	Nybroe <i>et al.</i> , 1992
L-Leu-aminopeptidase	L-Ala-4-nitroanilide	17,3 à 38,0 µmol p-nitrophénol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protéines	Teuber et Broditsch, 1977
L-Leu-aminopeptidase	L-Leu-β-naphthylamide	6,8 à 28,4 µmol β-naphthylamide g <sup>-1</sup> MV min <sup>-1</sup>	Bauda <i>et al.</i> , 1990
L-Lys-aminopeptidase	L-Lys-4-nitroanilide	10,0 à 18,5 µmol p-nitrophénol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protéines	Teuber et Broditsch, 1977
L-Glu-aminopeptidase	L-Glu-1(4)-nitroanilide	3,0 à 9,0 µmol p-nitrophénol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protéines	Teuber et Broditsch, 1977
L-Phe-aminopeptidase	L-Phe-4-nitroanilide	1,0 à 5,5 µmol p-nitrophénol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protéines	Teuber et Broditsch, 1977
Estérase	Diacétate de fluorescéine	1,6 µmol fluorescéine min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> MS	Lemmer <i>et al.</i> , 1994
Estérase	Diacétate de fluorescéine	0,12 µmol fluorescéine g <sup>-1</sup> MV h <sup>-1</sup>	Nybroe <i>et al.</i> , 1992
Estérase	p-nitrophényl-butyrate	142 nmol p-nitrophénol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protéines	Boczar <i>et al.</i> , 1992
Estérase	α-naphthyl- butyrate	14 nmol α-naphitol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protéines	Boczar <i>et al.</i> , 1992
Estérase	Dibutyrate de fluorescéine	3 nmol fluorescéine min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protéines	Boczar <i>et al.</i> , 1992
Phosphatase acide	4-nitrophénylphosphate	8,1 µmol p-nitrophénol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> MS	Lemmer <i>et al.</i> , 1994
Phosphatase acide	p-nitrophénylphosphate	0,5 µmol p-nitrophénolmg <sup>-1</sup> MV h <sup>-1</sup>	Goel <i>et al.</i> , 1998a
Phosphatase alcaline	p-nitrophénylphosphate	0,22 à 0,7 µmol p-nitrophénolmg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup>	Richards <i>et al.</i> , 1984)
Phosphatase alcaline	p-nitrophénylphosphate	0,2 µmol p-nitrophénolmg <sup>-1</sup> MV h <sup>-1</sup>	Goel <i>et al.</i> , 1998a
Phosphatase alcaline	p-nitrophénylphosphate	19,5 à 47,3 µmol p-nitrophénol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protéines	Teuber et Broditsch, 1977
Phosphatase alcaline	p-nitrophénylphosphate	0,6 à 1,6 µmol p-nitrophénol mg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup>	Richards <i>et al.</i> , 1984
cyclophosphodiesterase	bis-p-nitrophénylphosphate	9,3 à 28 µmol p-nitrophénol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protéines	Teuber et Broditsch, 1977

Tableau 2.5 (suite) : Activités hydrolytiques extracellulaires des boues activées, substrats utilisés pour leur mise en évidence et vitesses d'hydrolyse correspondantes. (MS matières sèches. MV matières volatiles). nd : non déterminé.

Activité enzymatique	Substrat	Vitesse d'hydrolyse	Références bibliographiques
amylase	Amyloze azure	0,60 $\mu\text{mol RBB g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$	Dold <i>et al.</i> , 1995
amylase	amidon	0,15 mg amidon $\text{mg}^{-1} \text{MS h}^{-1}$	Goel <i>et al.</i> , 1998
amylase	amidon	nd	Ubukata, 1999
$\alpha$ -glucosidase	p-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	0,4 $\mu\text{mol p-nitrophénolmg}^{-1} \text{MV h}^{-1}$	Goel <i>et al.</i> , 1998a
$\alpha$ -glucosidase	p-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	2,45 $\mu\text{g p-nitrophénol mg MS h}^{-1}$	Dold <i>et al.</i> , 1991
$\alpha$ -glucosidase	p-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	0,04 $\mu\text{mol p-nitrophénol g}^{-1} \text{MV h}^{-1}$	Nybroe <i>et al.</i> , 1992
$\alpha$ -glucosidase	p-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	3,5 $\mu\text{mol p-nitrophénol min-1 mg}^{-1} \text{MS}$	Lemmer <i>et al.</i> , 1994
$\alpha$ -glucosidase	p-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	0,017 à 0,10 $\mu\text{mol p-nitrophénol mg}^{-1} \text{MS h}^{-1}$	Richards <i>et al.</i> , 1984
$\alpha$ -glucosidase	4-méthylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glucoside	29,1 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MV h}^{-1}$	Mustafa <i>et al.</i> , 2002
$\beta$ -glucosidase	p-nitrophényl- $\beta$ -D-glucopyranoside	5,0 à 13,0 $\mu\text{mol p-nitrophénol min-1mg-1 protéines}$	Teuber et Brodisch, 1977
$\beta$ -glucosidase	p-nitrophényl- $\beta$ -D-glucopyranoside	2,6 $\mu\text{mol p-nitrophénol min-1 mg}^{-1} \text{MS}$	Lemmer <i>et al.</i> , 1994
$\alpha$ -galactosidase	p-nitrophényl- $\alpha$ -D-galactopyranoside	3,0 à 8,8 $\mu\text{mol p-nitrophénol min-1mg-1 protéines}$	Teuber et Brodisch, 1977
$\beta$ -galactosidase	o-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside	1,5 à 5,3 $\mu\text{mol p-nitrophénol min-1mg-1 protéines}$	Teuber et Brodisch, 1977

La distribution spatiale des activités enzymatiques montre une forte diminution avec la profondeur, dans les lacs (Debroas, 1998; Fabiano et Danovaro, 1998), dans les sédiments (Mallet et Debroas, 1999) et dans les filtres à sables (Hebert *et al.*, 2000), manifestement liée à la diminution du nombre de bactéries. La détection *in situ* au sein des agrégats bactériens a montré une répartition hétérogène de l'activité phosphatase (Van Ommen Kloeke et Geesey, 1999). La topographie de cette activité montre qu'elle n'est pas répartie de manière homogène mais correspond à des zones de 4 à 40 µm de diamètre, et principalement associée à des cellules ou amas de cellules viables (marquées au Syto-9) (Figure 2. 8).

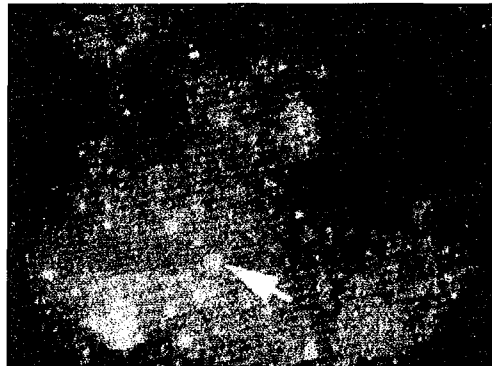


Figure 2. 8 : Microphotographie en épifluorescence d'un floccule de boues activées montrant des zones d'activité phosphatase intense (spots jaunes correspondant aux cristaux des produits d'hydrolyse, zones vertes correspondant à une activité phosphatase moins intense, zones bleues traduisant la présence de substrat adsorbé) (Van Ommen Kloeke et Geesey, 1999).

#### **2.4.2. Nature des enzymes hydrolytiques extracellulaires des boues activées.**

L'étude des enzymes extracellulaires des bactéries issues des milieux environnementaux révèle une grande diversité d'activités catalytiques. En particulier, les populations microbiennes mixtes, comme celles des boues activées, sont capables d'hydrolyser un grand nombre de substrats de nature et de structure complexes par la mise en commun d'enzymes extracellulaires de spécificités différentes (Tableau 2. 5). Si des tests qualitatifs permettent la détection simultanée d'une vingtaine d'activités enzymatiques différentes (Boczar *et al.*, 1992), le nombre et la nature des enzymes hydrolytiques des boues ne sont pas connus. De plus, les activités hydrolytiques détectées dans un système aussi complexe ne sont en aucun cas spécifiques et la vitesse d'hydrolyse mesurée est le résultat de l'activité hydrolytique de différentes enzymes. Une seule étude a mis en évidence l'activité protéolytique des EPS extraits des boues vis-à-vis de leur substrat naturel, à savoir la fraction colloïdale de la matière organique des eaux usées (Guellil *et al.*, 2001a)

D'une manière générale, les hydrolases extracellulaires catalysent la coupure de liaisons covalentes comme les liaisons C-N (protéines et peptides), C-O (glycosides et esters) et O-P (phosphates). Les hydrolases sont classées en fonction du produit qu'elles libèrent : les endoenzymes catalysant la coupure d'une liaison à l'intérieur de la molécule, libérant des peptides à

partir des protéines ou des oligosaccharides à partir des polysaccharides, et les exo-enzymes catalysant la libération d'un résidu terminal, acide aminé ou monosaccharide.

### 2.4.2.1. Hydrolyse des protéines.

Les protéases catalysent l'hydrolyse de la chaîne polypeptidique des protéines en peptides (endo-peptidases) et en acide aminés (exo-peptidases) (Gonzales et Robert-Baudouy, 1996). Le groupe des protéases est composé d'enzymes très diverses, qui sont globalement classées sur la base de leurs propriétés catalytiques en quatre groupes : sérine-protéases, métallo-protéases, cystéine-protéases (ou thiol-protéases) et aspartique-protéases (ou protéases acides) (Rao *et al.*, 1998). Les cystéine et aspartique-protéases sont peu fréquemment rencontrées chez les bactéries, les premières étant essentiellement produites par des plantes et les secondes par des levures. Le pH optimal de fonctionnement est en général alcalin pour les sérine protéases et proche de la neutralité pour les métalloprotéases. La classification des protéases tient compte aussi de la spécificité primaire, c'est-à-dire du type d'acides aminés impliqués dans la liaison peptidique hydrolysée (Gupta *et al.*, 2002).

Les protéines non structurales comme l'albumine, la caséine ou l'hémoglobine, sont hydrolysées par la plupart des protéases bactériennes. Par contre, l'hydrolyse des protéines de structure des tissus animaux (le collagène, l'élastine et la kératine) requiert des enzymes spécifiques (des collagénases, des élastases et des kératinases, respectivement), produites en particulier par des bactéries pathogènes (Law, 1980).

L'activité protéolytique globale des boues activées a été mise en évidence par l'hydrolyse de la caséine, de la gélatine, de l'albumine et de la peptone (Tableau 2. 5). De plus, différentes aminopeptidases de spécificité différentes ont aussi été mises en évidence dans les boues à l'aide de substrats de synthèse.

### 2.4.2.2. Hydrolyse des polysaccharides.

Les enzymes impliquées dans l'hydrolyse des polysaccharides sont des polysaccharases, hydrolysant les polysaccharides en oligosaccharides, et des glycosidases hydrolysant les oligosaccharides en monosaccharides. Ces enzymes sont regroupées sur la base du mécanisme de leur hydrolyse en deux groupes : les « retaining » enzymes et les invertases. Chacun de ces groupes est subdivisé en deux sous-groupes selon que la liaison hydrolysée est une liaison  $\alpha$ - ou  $\beta$ -glycosidique. Il existe ainsi plus de 800 enzymes différentes groupées en 50 familles en fonction de la séquence d'acides aminés du site catalytique et des produits qu'elles libèrent (Warren, 1996). Il est rare de trouver une culture bactérienne pure capable d'hydrolyser complètement les polysaccharides naturels composés d'un mélange complexe d'homopolysaccharides et d'hétéropolysaccharides (Sutherland, 1999). Ces derniers étant composés de monosaccharides différents, leur hydrolyse requiert l'intervention de nombreuses enzymes de spécificité différente. Ainsi, les bactéries capables d'utiliser les polysaccharides possèdent généralement de véritables systèmes catalytiques comprenant plusieurs enzymes (jusqu'à une vingtaine) ainsi que des protéines qui fixent le substrat. A titre d'exemple, chez les bactéries anaérobies du genre

*Clostridium* sp., il existe des systèmes hydrolytiques particuliers appelés cellulosomes comprenant un complexe catalytique formé de  $\beta$ -glucosidases, endoglucosidases, xylanases, lichenases, laminarases et cellobiohydrolases (Mayer, 1993).

La cellulose, polysaccharide de structure des végétaux, est un homopolymère de glucoses liés en  $\beta$ -1,4 en une chaîne linéaire comprenant des milliers de résidus. Sa biodégradation requiert différentes enzymes, comme des  $\beta$ -1,4-endoglucanases, des cellobiohydrolases et des  $\beta$ -D-glucosidases (Priest, 1992). La biodégradation de la cellulose est relativement difficile car c'est une molécule rigide et difficilement accessible, qui forme fréquemment une structure cristalline très résistante à l'hydrolyse.

L'amidon est un polysaccharide d'origine essentiellement végétale, présent sous forme de granules de 25 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre. L'amidon est un mélange de deux polymères de glucopyranoses: l'amylose, qui est une molécule linéaire formée de milliers de résidus liés en  $\alpha$ -1,4 et l'amylopectine, qui est une molécule fortement branchée comprenant au total  $10^4$  à  $10^5$  résidus, formée de chaînes d'une vingtaine de résidus en moyenne liés en  $\alpha$ -1,4, et branchées en  $\alpha$ -1,6. La proportion de ces deux molécules dans l'amidon varie en fonction de son origine mais elle est en général de 70 % d'amylopectine. L'enzyme la plus couramment rencontrée chez les bactéries capables d'hydrolyser l'amidon est l' $\alpha$ -amylase (Priest, 1992). C'est une endo-enzyme, capable d'hydrolyser les liaisons  $\alpha$ -1,4 de l'amidon libérant des oligosaccharides qui sont ensuite hydrolysés par des glucoamylases, des  $\beta$ -amylases et des exo- $\alpha$ -1,4-glucanases. D'autres enzymes, comme les pullulanases et les iso-amylases (enzymes débranchantes), sont responsables de l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,6.

La chitine, particulièrement abondante dans le milieu marin, consiste en des résidus  $\beta$ -1,4-N-acetylglucosamine formant des chaînes antiparallèle ( $\alpha$ ), parallèle ( $\beta$ ) et mixtes ( $\gamma$ ), la configuration  $\alpha$  étant la plus abondante. Le degré de dé-acétylation est variable. La chitine est toujours trouvée sous forme d'hétéropolymères en liaison avec des protéines et des sucres. Les chitinases hydrolysent chitine et chitosanes. Les bactéries hydrolysant la chitine comme *Vibrio harveyi* possèdent plus de 10 enzymes différentes (Svitil *et al.*, 1997).

L'hydrolyse de la pectine requiert des pectinases (Hoondal *et al.*, 2002) et les xylanases, homopolymères de xylopyranoses liés en  $\beta$ -1,4, sont hydrolysés par des  $\beta$ -xylanases,  $\beta$ -xylosidases,  $\alpha$ -arabinosidases,  $\beta$ -glucosidases et  $\beta$ -mannosidases en xylose (Beg *et al.*, 2001).

Seule l'activité  $\alpha$ -amylase a été mise en évidence dans les boues activées à l'aide du substrat naturel de l'enzyme, l'amidon (Tableau 2. 5). Les activités  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase et  $\beta$ -galactosidase ont été déterminées à l'aide de substrats de synthèse ne comprenant qu'une liaison à hydrolyser.

### 2.4.3. Localisation des enzymes hydrolytiques extracellulaires bactériennes.

Les enzymes hydrolytiques catalysent l'hydrolyse des macromolécules à l'extérieur de la cellule bactérienne en composés de plus petite taille, afin qu'ils puissent être assimilés. Quatre stratégies enzymatiques sont classiquement observées : les ecto-enzymes, les exo-enzymes, les complexes enzymatiques extracellulaires et les vésicules d'hydrolyse membranaires (Figure 2. 9).

Les ecto-enzymes sont par définition des enzymes extracellulaires qui restent associées à la membrane du micro-organisme producteur (Chróst, 1991). Néanmoins elles peuvent être libérées dans le milieu, que cette libération soit volontaire ou le résultat d'un décrochement d'origine physique ou chimique, ou encore soit dû à la lyse cellulaire. Chez les bactéries à réaction négative à la coloration de Gram, il est vraisemblable qu'une partie des ecto-enzymes soient localisées dans l'espace périplasmique (Priest, 1992).

Les exo-enzymes sont libérées dans le milieu extracellulaires sous une forme libre de tout lien avec le micro-organisme producteur (Hoppe *et al.*, 1988; Priest, 1992). Toutefois, une fois libérées, ces enzymes seraient rapidement immobilisées dans des complexes formés avec les polymères extracellulaires (Frøund *et al.*, 1995) ou avec les substances humiques (Morra, 1997; Wetzell, 1991) et les argiles (Burns, 1989; Demanèche *et al.*, 2001; Geiger *et al.*, 1999).

Les complexes enzymatiques extracellulaires sont observés exclusivement chez les bactéries à réaction positive à la coloration de Gram du genre *Clostridium* métabolisant la cellulose (Blair et Anderson, 1999; Mayer, 1993; Murashima *et al.*, 2002). La surface bactérienne est ainsi recouverte de protubérances, appelée cellulosomes, qui peuvent être libérées dans le milieu extracellulaires. Ces cellulosomes regroupent plus de quatorze activités enzymatiques différentes, comme les activité endoglucanases, cellobiohydrolases et hémicellulase, associées à des structures protéiques qui permettent la fixation des protubérances sur la cellulose. La synthèse de ces protubérances est réprimée en présence d'une source de carbone directement assimilable, comme le glucose (Blair et Anderson, 1999). La composition du complexe enzymatique à l'intérieur du cellulosome est variable en fonction de la source de carbone disponible : la synthèse de xylanases par exemple est induite en présence de xylane (Kosugi *et al.*, 2001).

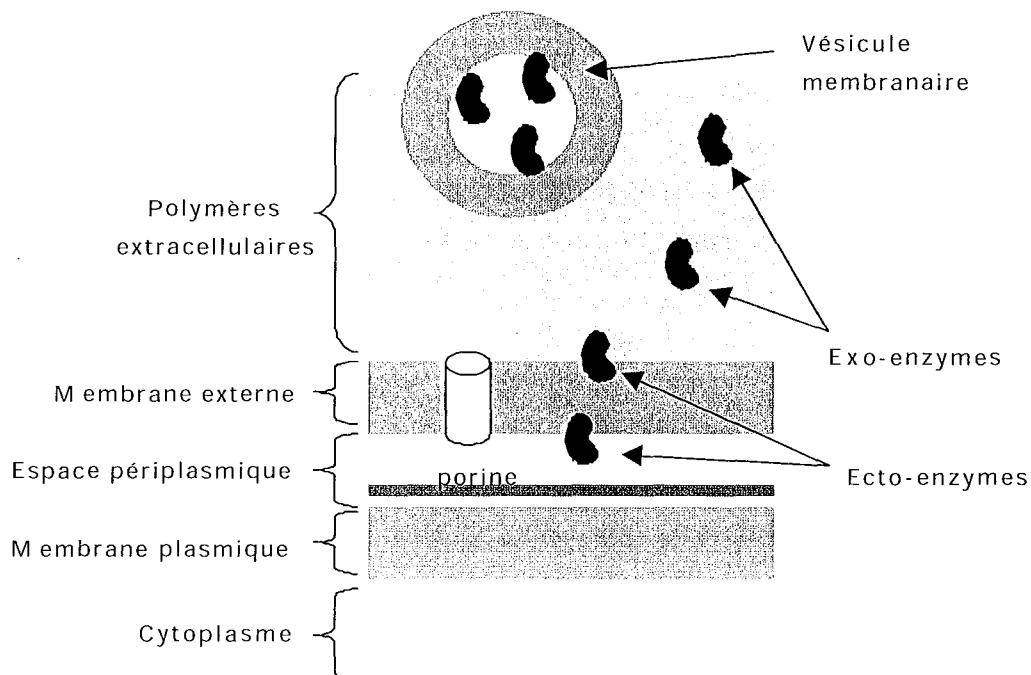


Figure 2. 9 : Représentation schématique de la localisation des enzymes extracellulaires d'une bactérie à réaction négative à la coloration de Gram.

Les vésicules d'hydrolyse membranaires sont formées à partir de la membrane externe de nombreuses espèces bactériennes à réaction négative à la coloration de Gram, en particulier les genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* et principalement *Pseudomonas aeruginosa* (Kadurugamuwa et Beveridge, 1996; Li *et al.*, 1998). Lorsqu'elles sont libérées de la surface bactérienne, elles piègent une partie du périplasme et des composés qu'il contient, en particulier des enzymes hydrolytiques, comme des peptidoglycanases, des protéases, des élastases et des phosphatases alcalines (Kadurugamuwa et Beveridge, 1995; Li *et al.*, 1998). L'excrétion de ces vésicules d'hydrolyse pourrait être un moyen pour la bactérie qui les produit de récupérer des composés organiques en lysant les cellules voisines lorsque les conditions environnementales sont défavorables, en particulier en cas de famine (Beveridge, 1999). L'excrétion de ces vésicules serait associée à des mécanismes de compétition et de prédation, favorisant le développement des bactéries capables de les produire aux dépens du reste de la communauté microbienne ou d'un hôte. Ainsi, la pathogénicité des bactéries gram négatives reposerait principalement sur l'excrétion de ces vésicules exportant des facteurs de virulence sous couvert d'une protection membranaire.

Aucune spécificité de stratégie ecto-enzymes *versus* exo-enzymes en fonction du phylum bactérien n'a été démontrée et les deux stratégies peuvent co-exister chez le même micro-organisme. A titre d'exemple, *Bacillus* sp. est capable d'hydrolyser le xanthane (masse molaire  $10^6$ ) grâce à des exo-enzymes et le gellane (masse molaire  $5 \cdot 10^4$ ) grâce à des ecto-enzymes (Hashimoto *et al.*, 1999). La phase de croissance influence directement la localisation des enzymes hydrolytiques extracellulaires. Ainsi, la fixation de l'amylase sur la membrane externe de *Bacillus stearthermophilus* est inhibée en phase stationnaire et l'enzyme est alors libérée dans le milieu sous forme d'exo-enzyme (Egelseer *et al.*, 1996). La stratégie ecto-enzymes *versus* exo-enzymes pourrait aussi dépendre des conditions environnementales. Ainsi, la libération d'exo-enzymes serait observée lorsque leur diffusion dans le milieu extérieur est limitée par la formation d'agrégats ou de biofilms, confinant les exo-enzymes à proximité de la cellule (Vetter et Deming, 1999; Vetter *et al.*, 1998). L'hypothèse est que, dans ce cas, le retour des produits d'hydrolyse vers la bactérie serait potentiellement élevé par rapport à la libération d'exo-enzymes dans le milieu extérieur qui constituerait une perte énergétique importante. De plus, la rétention et la mise en commun des exo-enzymes de spécificités différentes au sein des agrégats bactériens mixtes suggère une coopération des différentes populations, qui augmenterait nettement les capacités d'hydrolyse du consortium par rapport à une bactérie isolée, voire une coopération entre micro-organismes producteurs d'exo-enzymes et micro-organismes non producteurs (Worm *et al.*, 2000).



#### **2.4.4. Expression des activités enzymatiques extracellulaires en fonction des conditions environnementales.**

##### 2.4.4.1. Effet direct des conditions environnementales.

Dans les milieux aquatiques, les activités hydrolytiques bactériennes montrent des variations saisonnières marquées et des variations journalières de grande amplitude (Kärner et Rassoulzadegan, 1995; Martinez *et al.*, 1996). Elles ont en partie pour origine l'action directe des paramètres environnementaux sur l'activité enzymatique. Ainsi, la température du milieu semble être un des facteurs responsables de ces variations, avec une constante de vitesse d'hydrolyse systématiquement plus importante au printemps et en été qu'en hiver (Pantoja et Lee, 1999), sans que ces variations soient corrélées avec l'abondance bactérienne, paramètre fortement influencé par la température du milieu (Debroas, 1998; Hollibaugh et Azam, 1983; Romaní et Sabater, 2000).

Lorsque la température des boues activées diminue au-dessous de 20 °C, la matière organique a tendance à s'accumuler car la vitesse de biodégradation est inférieure au taux de mort cellulaire (Lishman et Murphy, 1994). Inversement, l'augmentation de la température a pour conséquence une augmentation globale de la vitesse de biodégradation de la matière organique (Mines et Sherrard, 1999) et une augmentation des vitesses d'hydrolyse de substrats de synthèse (Teuber et Brodisch, 1977). En particulier, l'activité protéase des boues activées est multipliée par quatre lorsque la température augmente de 10 à 25 °C (Garcia *et al.*, 1997).

De plus, des modifications des conditions physico-chimiques du milieu sont à l'origine des variations de l'activité enzymatique. D'une manière générale, l'activité optimale des enzymes est observée dans un domaine de pH étroit. Les changements de salinité des eaux d'estuaires affectent directement les activités enzymatiques (Cunha *et al.*, 2001). L'activité enzymatique bactérienne des boues activées est fortement inhibée en présence de métaux lourds (Hg) (Teuber et Brodisch, 1977) et de certains ions ( $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ) à forte concentration (Garcia *et al.*, 1997; Teuber et Brodisch, 1977). L'immobilisation des enzymes par des substances humiques (Morra, 1997; Wetzel, 1991) ou des particules d'argiles (Burns, 1989; Demanèche *et al.*, 2001; Geiger *et al.*, 1999) conduit aussi à leur inactivation.

La vitesse de biodégradation de la matière organique par les boues activées dépend du type d'accepteur d'électrons. Ainsi le modèle de biodégradation ASM 2 recommande d'utiliser pour la vitesse d'hydrolyse en anaérobie et en anoxie des valeurs correspondant à 10 et 60 % respectivement de la vitesse d'hydrolyse en aérobie (Henze *et al.*, 1995). Cependant, des essais comparatifs récents ont montré une vitesse de biodégradation quasi égale en anoxie et en aérobie, avec la fraction biodégradable du COT inférieure de seulement 7 % en anoxie par rapport à la fraction déterminée en aérobie. L'effet des conditions d'accepteur d'électrons sur les activités enzymatiques des boues activées est variable en fonction de l'activité étudiée, avec par exemple, une activité  $\alpha$ -amylase maximale observée en conditions anaérobies (Dold *et al.*, 1995) et une activité  $\alpha$ -glucosidase maximale observée en anoxie (Dold *et al.*, 1991).

#### 2.4.4.2. Réponse des bactéries aux conditions environnementales.

Des modifications de la composition des enzymes extracellulaires ayant pour but de favoriser leur stabilité sont observées chez certaines bactéries ayant à faire face à des températures extrêmes. Ainsi, les micro-organismes thermophiles possèdent des enzymes plus riches en acides aminés hydrophobes que les enzymes des micro-organismes psychrophiles (Russel, 1998). De plus, l'adaptation des micro-organismes aux basses températures a pour conséquence la modification des caractéristiques des enzymes avec par exemple une température optimale de fonctionnement et une température d'expression maximale relativement basses (Huston *et al.*, 2000).

Dans les milieux environnementaux aquatiques, l'augmentation de l'activité enzymatique totale est corrélée avec une augmentation de la disponibilité en matière organique, correspondant par exemple aux blooms alguaux (Chróst, 1991; Chróst *et al.*, 1986; Debroas, 1998; Romaní et Sabater, 2000), à la mise en suspension, suite à une tempête, de composés organiques adsorbés sur les sédiments (Chróst et Riemann, 1994) ou à l'inondation des sols (Burns et Ryder, 2001). Ainsi l'apport de matière organique stimule la synthèse des enzymes responsables de son hydrolyse. La présence d'azote organique stimule la production d'aminopeptidase dans les eaux marines (Stepanauskas *et al.*, 1999) et la synthèse des activités  $\alpha$ - et  $\beta$ -glucosidase est stimulée par la présence d'amidon et de cellobiose (Somville, 1984).

La plupart des micro-organismes sont capables de contrôler la production de leurs enzymes. La synthèse des enzymes est ainsi inhibée lorsque les conditions environnementales sont défavorables. Inversement, la présence de substrats induit la synthèse d'enzymes, favorisant l'acquisition rapide des produits d'hydrolyse, particulièrement nécessaire en présence de micro-organismes compétiteurs. Il existe deux principaux systèmes de régulation : l'induction par les produits d'hydrolyse et la répression catabolique (Priest, 1992). Dans le premier cas, l'expression des enzymes, produites à un niveau basal, augmente en présence de produits d'hydrolyse comme des oligosaccharides ou des peptides. A titre d'exemple, l'activité glucosidase des boues activées est plus importante lorsque les eaux usées sont enrichies en substrats de nature saccharidique (Nybroe *et al.*, 1992). Dans le second cas, la synthèse d'enzymes est réprimée en présence d'une source de carbone directement assimilable, en particulier le glucose. A titre d'exemple, l'expression de l'activité protéase est réprimée par le glucose et l'ammonium chez *Bacillus licheniformis* (Hanlon *et al.*, 1982), par des peptides chez *Lactobacillus helveticus* CRL 1062 (Hebert *et al.*, 2000), l'expression de l'activité xylanase est réprimée chez *Bacillus* sp. par le xylose (Gessesse et Mamo, 1999). Des conditions de déplétion en carbone, azote ou phosphore impliquent d'autres systèmes de régulation qui stimulent l'acquisition de nutriments, en induisant par exemple la production d'enzymes extracellulaires chez *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Chatterjee *et al.*, 1995) ou une augmentation de l'affinité des enzymes extracellulaires pour leur substrat (Unanue *et al.*, 1999).

En conclusion, les agrégats bactériens issus des milieux environnementaux sont des structures très complexes, regroupant des populations microbiennes diverses associées à une matrice de polymères extracellulaires de composition très hétérogène. Ces agrégats constituent des communautés microbiennes dont l'organisation et les fonctions sont encore peu connues. L'hypothèse est que la structure agrégée est une adaptation des micro-organismes à leur environnement, créant un micro-environnement qui leur procure en particulier un maximum d'efficacité de piégeage des substrats macromoléculaires et le confinement des exo-enzymes à proximité de cellules. Cependant, la limite de diffusion des substrats au sein du réseau de polymères extracellulaires n'est pas connue. La présence d'activités hydrolytiques associées aux EPS extraits des boues activées a été clairement démontrée, mais la part d'activité exo-enzymatique n'est pas connue.

L'efficacité du procédé d'épuration repose pour une grande partie sur l'hydrolyse de la matière organique par les enzymes extracellulaires des floes de boues activées. Quelques auteurs ont observé au sein des agrégats une diversité enzymatique très importante, suggérant une capacité hydrolytique accrue pour les populations bactériennes mixtes par la mise en commun des différentes activités hydrolytiques. Si les activités enzymatiques montrent des variations saisonnières très marquées dans les milieux aquatiques, les variations temporelles des activités hydrolytiques des boues ne sont pas connues. De plus, les facteurs environnementaux susceptibles de modifier l'expression des activités hydrolytiques n'ont pas été clairement définis.



---

### 3. MATERIEL ET METHODES.

---

### 3.1. PRELEVEMENT DES BOUES ACTIVEES.

Moins d'une heure avant l'expérimentation, les échantillons de boues activées sont prélevés dans les bassins d'aération de la station d'épuration de Nancy-Maxéville (du 01/10/1999 au 31/12/2001) et de la station d'épuration de Toul (du 01/01/2002 au 30/06/2003) à l'aide d'une perche télescopique munie d'un bécher. Les caractéristiques principales des deux stations d'épuration sont présentées dans le Tableau 3.1.

Tableau 3. 1: Caractéristiques de fonctionnement des stations d'épuration de Nancy-Maxéville et de Toul.

	Stations	
	Nancy-Maxéville	Toul
Capacité (Equivalent-Habitant)	480000	25375
Débit (m <sup>3</sup> /j)	118110	4544
Charge de DBO <sub>5</sub> admissible (kg/j)	28857	1522
Type de station	Forte charge.	Aération prolongée.
	Réseau unitaire.	Réseau unitaire.

### 3.2. LAVAGE DES BOUES ACTIVEES.

Les boues activées sont lavées afin d'éliminer la matière organique faiblement adsorbée.

Après décantation pendant 30 min à 20 °C dans une éprouvette en verre de 1 L, 500 mL de surnageant sont éliminés par aspiration et remplacés par 500 mL d'eau déminéralisée. L'homogénéisation du mélange se fait par retournement manuel de l'éprouvette. L'opération est renouvelée une fois.

### 3.3. CARACTERISATION DES ECHANTILLONS DE BOUES ACTIVEES.

#### 3.3.1. Matières sèches et matières volatiles des boues activées.

Les mesures sont effectuées en triplicata selon les procédures standardisées (Clesceri *et al.*, 1998). 25 mL de boues activées sont introduits dans des capsules pré-pesées. Les capsules sont placées à l'étuve à 105 °C pendant 24 heures, pesées, puis placées au four à 550 °C pendant 3,5 heures. Les matières sèches (MS) exprimées en g L<sup>-1</sup> de boues correspondent à la différence de masse entre les capsules passées à 105 °C et les capsules vides. Les matières volatiles (MV) exprimées en g L<sup>-1</sup> de boues correspondent à la différence de masse entre les capsules passées à 105 °C et les capsules passées à 550 °C.

Les valeurs des matières sèches et des matières volatiles des boues activées sont évaluées en parallèle de manière plus rapide pour les besoins de certaines expériences, en particulier l'extraction des polymères extracellulaires par une résine échangeuse de cations (*cf.* 3.2.2). 10 mL de boues sont filtrés à l'aide d'une fiole Büchner sur un filtre en microfibre de verre de porosité

1,2 µm (Whatman GF/C 1822047) préalablement pesé. Le filtre est placé à l'étuve à 105 °C pendant 45 min, pesé, puis placé au four à 550 °C pendant 20 min.

Les capsules en aluminium et les filtres utilisés pour réaliser ces mesures sont préalablement passées au four à 550 °C pendant 3,5 heures et sont stockées dans l'étuve à 105 °C.

#### **3.3.2. Test de décantabilité.**

La capacité à décanter des boues activées est estimée par le volume occupé par les boues après sédimentation dans une éprouvette en verre de 1 L pendant 30 minutes à  $20 \pm 1$  °C (Clesceri *et al.*, 1998). L'indice de Molhmann (Im) ou sludge volume index (SVI) s'exprime en mL g<sup>-1</sup> de matières sèches. Plus la valeur de l'indice est faible, plus les boues ont une bonne capacité à décanter.

#### **3.3.3. Caractéristiques physico-chimiques des boues activées (température, pH et conductivité).**

La température des boues est mesurée immédiatement après le prélèvement à l'aide d'un thermomètre à alcool.

Les mesures de pH (pH-mètre HANNA instruments HI 9321) et de conductivité (conductivimètre Bioblock WTW LF320, sonde WTW A325) sont effectuées sur le surnageant de décantation des boues (*cf.* 3.3.2).

#### **3.3.4. Distribution de taille des floccs de boues activées.**

La distribution granulométrique des floccs de boues activées est mesurée à l'aide d'un granulomètre à diffraction laser (Horiba LA 920) dont la fenêtre de mesure est comprise entre 0,02 et 2000 µm. Les mesures sont effectuées après dilution de la boue dans le surnageant de décantation (*cf.* 3.3.2). L'intensité du bruit de fond est mesurée sur de l'eau ultrapure (Millipore).

Un logiciel permet d'interpréter les signaux angulaires de diffusion considérant les particules comme des sphères. L'indice de réfraction utilisé est celui qui est répertorié pour la matière organique  $n_s=1,596$ . La distribution de taille est ainsi calculée à partir de la lumière diffusée et présentée sous forme de courbe de distribution du volume occupé par les particules (exprimé en pourcentage du volume total) en fonction du diamètre équivalent des particules. La médiane de distribution  $d_{50}$ , autour de laquelle se répartissent les valeurs observées est calculée par le logiciel. Considérant les particules comme des sphères, la distribution en volume permet de représenter la distribution en termes de nombre de particules.

#### **3.4. ESSAIS EN BIOFERMENTEURS DE TYPE BATCH.**

Les essais en batch sont réalisés à l'aide de deux réacteurs en verre (Applikon, Z61104CT05) de contenance 5 L, placés dans une pièce climatisée ( $20 \pm 1$  °C). L'agitation est assurée par une turbine à hélice marine à la vitesse de 200 tr min<sup>-1</sup>. Des filtres de porosité 0,22 µm (Millipore, SLFG05010) sont placés à l'entrée et à la sortie des gaz. La teneur en oxygène dissous est mesurée (sonde Ingold Mettler-Toledo 5307042) et peut être régulée de 0 à 100 % de la teneur en

oxygène à saturation (AirLiquide, qualité 5). Le pH est mesuré (sonde Mettler-Toledo 104054481). Le contrôle des paramètres est assuré par le système Biocontroller 1030 (Applikon) et l'acquisition des données s'effectue grâce au logiciel BioXpert (Applikon).

### **3.5. EXTRACTION DES POLYMERES EXTRACELLULAIRES (EPS) DES BOUES.**

#### **3.5.1. Extraction des EPS par un détergent non ionique (Triton X-100).**

Les floccs de boues activées sont mélangés avec le détergent Triton X-100 et un tampon Tris HCl (pH 8) dans des proportions telles que la concentration finale en Triton X-100 soit de 0,5 % et la concentration du tampon de 0,01 M (Gessesse *et al.*, 2000). Les boues sont agitées à l'aide d'une pale plate pendant 45 min à 400 tr min<sup>-1</sup> à 4 °C dans un bécher à baffles c Les boues dispersées sont centrifugées à 35000 x g pendant 1 h à 4 °C pour séparer les polymères extracellulaires de la biomasse. Les EPS sont récupérés par un prélèvement soigneux du surnageant afin de s'affranchir au mieux des micro-organismes présents dans le culot. Les échantillons sont conservés dans la glace jusqu'à leur utilisation.

#### **3.5.2. Extraction des EPS par ultrasons et résine échangeuse de cations.**

L'extraction des EPS combine l'application d'ultrasons (Jorand *et al.*, 1995) l'utilisation d'une résine échangeuse de cations (Frølund *et al.*, 1995).

50 mL de boues, préalablement refroidis dans un bain de glace pendant 15 minutes, sont soumis aux ultrasons pendant 20 secondes sous une puissance de 39 W (*cf.* 3.5.3) à l'aide d'une sonde de 19 mm de diamètre (Labsonic 2000U, B. Braun) immergée de 15 mm dans le liquide. Les boues dispersées (au minimum 300 mL) sont mises en contact avec une résine échangeuse de cations (Dowex-Na<sup>+</sup> 50 x 8, Merck 44445) à raison de 70 g de résine par g de matières volatiles et agitées par une pale plate pendant 45 min à 400 tr min<sup>-1</sup> à 4 °C dans un bécher à baffles de 99 mm de diamètre et 131 mm de hauteur (Frølund *et al.*, 1995). de 99 mm de diamètre et 131 mm de hauteur (Frølund *et al.*, 1995). Après sédimentation de la résine, les boues dispersées sont centrifugées à 35000 x g pendant 1 h à 4 °C pour séparer les polymères extracellulaires de la biomasse. Les EPS sont récupérés par un prélèvement soigneux du surnageant afin de s'affranchir au mieux des micro-organismes présents dans le culot. Les échantillons sont conservés dans la glace jusqu'à leur utilisation.

Pour les besoins de certaines expériences, en particulier lorsque le volume d'échantillon disponible pour l'extraction est inférieur à 300 mL, il a été nécessaire de réaliser l'extraction par la résine échangeuse d'ions dans des flacons Schott de contenance 100 mL. L'agitation du mélange boues dispersées (50 mL)/résine est réalisée à l'aide d'un barreau aimanté à 400 tr min<sup>-1</sup> à 4 °C pendant 45 min. La comparaison des deux méthodes n'a pas montré de différence significative de la composition des extraits.

Avant utilisation, la résine est lavée par un tampon phosphate 0,2 M (pH 7,1). 1 kg de résine est placée sous agitation (180 rpm) dans 2 L de tampon pendant 1 heure. Après 5 minutes de



décantation, le surnageant est éliminé. On répète trois fois ce lavage avec de l'eau déminéralisée. L'eau est éliminée par filtration à l'aide d'une fiole Büchner avant pesée de la résine.

### 3.5.3. Etalonnage de la puissance du générateur à ultrasons.

Des mesures de transfert de chaleur ont été effectuées à l'aide d'un calorimètre selon la méthode décrite par North (1976), dans le but de connaître la puissance de la sonde à ultrasons utilisée pour disperser les agrégats (cf.3.5.2).

Dans un premier temps, la capacité calorifique ( $\mu$ ) du calorimètre est déterminée par la méthode des mélanges. Une masse connue d'eau froide ( $m_f$ ) à la température  $T_f$  est mélangée avec une masse connue d'eau chaude ( $m_c$ ) à la température  $T_c$ , la température à l'équilibre ( $T_{eq}$ ) correspondant à l'ordonnée à l'origine de la droite (Figure 3. 1).

$$\mu = \frac{m_c \times c_{eau} \times (T_c - T_{eq}) - m_f \times c_{eau} \times (T_{eq} - T_f)}{T_{eq} - T_f} \text{ (J K}^{-1}\text{)}$$

avec  $c_{eau}=4,18 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$

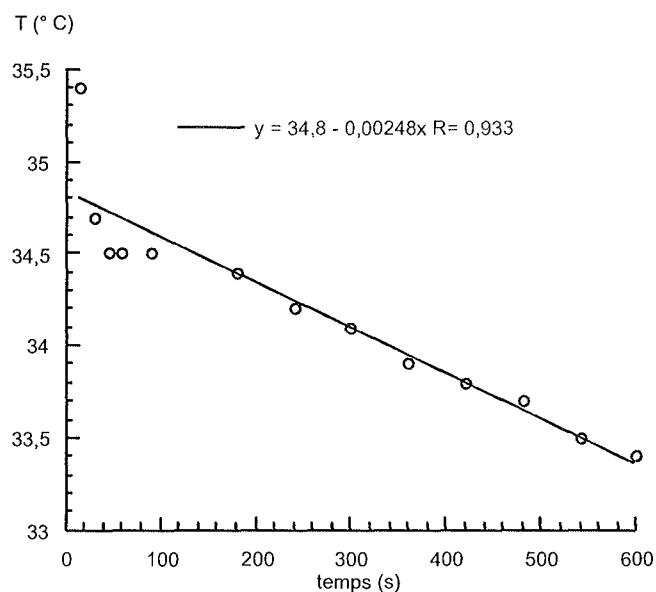


Figure 3. 1 : Détermination de la température d'équilibre après mélange de l'eau chaude et de l'eau froide dans le calorimètre.

Ensuite, la perte de chaleur ( $H$ ) est déduite de la pente ( $a$ ) de diminution de la température d'une masse d'eau chaude en fonction du temps (Figure 3. 2).

$$H = m_c \times c_{eau} \times a \text{ (J s}^{-1}\text{)}$$

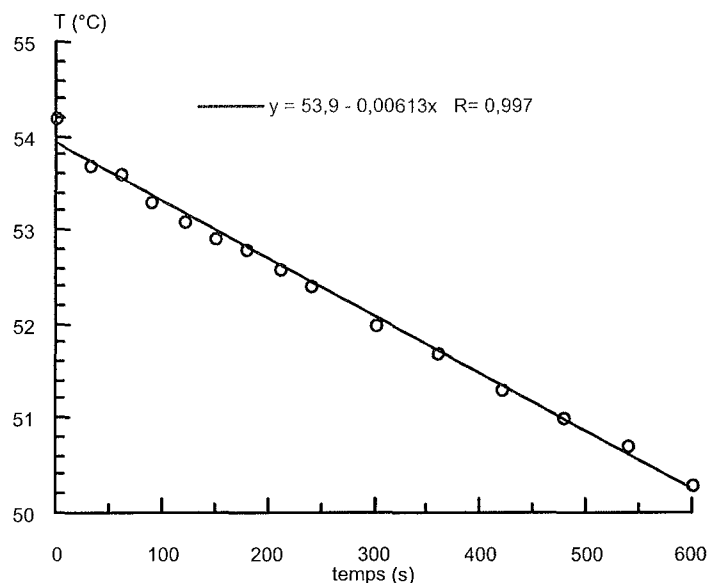


Figure 3. 2 : Diminution de la température de l'eau chaude placée dans le calorimètre en fonction du temps.

Enfin, la puissance ( $P$ ) de la sonde est déterminée par l'augmentation de la température ( $\Delta T/t$ ) produite par l'application d'ultrasons à une masse connue d'eau ultrapure ( $m_{H_2O}$ ) de capacité calorifique  $c_{eau}$  ( $c_{eau} = 4,18 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) dans le calorimètre (Figure 3. 3). L'augmentation de température est importante et de l'ordre de  $1,5 \text{ °C}$  par  $10 \text{ s}$  d'application d'ultrasons.

$$P = (m_{eau} \times c_{eau} + \mu) \times \frac{\Delta T}{t} + H \text{ (W)}$$

Ainsi, la puissance de la sonde de  $19 \text{ mm}$  de diamètre est estimée à  $39 \text{ W}$  lorsque le régulateur de puissance de l'appareil est réglé sur la position 100.

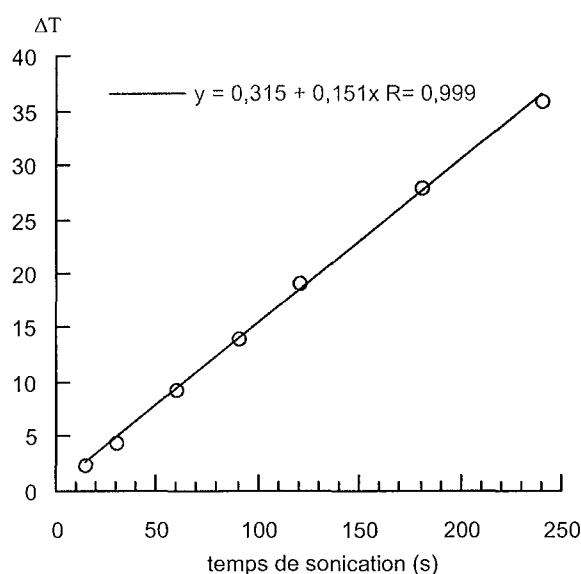


Figure 3. 3 : Augmentation de la température de l'eau ultrapure placée dans le calorimètre en fonction du temps d'application des ultrasons.

### 3.6. CARACTERISATION DES POLYMERES EXTRACELLULAIRES DES BOUES ACTIVEES (EPS).

#### 3.6.1. Filtration des EPS.

Les échantillons de polymères extracellulaires sont filtrés sur une membrane hydrophile en fluorure de polyvinylidène modifié (PVDF) de 0,45 µm de porosité (Durapore® HVLP 047 00) dans le but d'éliminer les bactéries résiduelles et les débris cellulaires qui restent associés aux EPS après centrifugation. Ce type de membrane a été choisi en raison de la faible absorption protéique du matériau.

#### 3.6.2. Matières sèches et matières volatiles des EPS.

Les matières sèches ( $MS_{EPS}$ ) et les matières volatiles ( $MV_{EPS}$ ) des EPS sont mesurées selon la méthode décrite pour les boues activées (cf. 3.3.1).

Les capsules en aluminium contenant 25 mL d'EPS sont passées successivement à 105 °C pendant 24 h et à 550 °C pendant 3,5 heures, pour déterminer par différence de masse les matières sèches des EPS exprimées en  $g L^{-1}$  et les matières volatiles exprimées en  $g L^{-1}$ .

#### 3.6.3. Caractérisation biochimiques des EPS.

##### 3.6.3.1. Dosage des protéines.

###### 3.6.3.1.1. Méthode de Lowry *et al.* (1951).

Le dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al.* (1951) fait intervenir le réactif de Folin-Ciocalteu. Les complexes protéines/cuivre formés à l'aide d'une solution cuivrique alcaline (réaction de Biuret) réduisent le réactif contenant un mélange d'acide phosphomolybdique et d'acide phosphotungstique.

La solution suivante est préparée extemporanément avant chaque dosage : hydroxyde de sodium 0,2 M, carbonate de sodium 4 % (m/v), sulfate de cuivre 1% (m/v), tartrate de sodium et de potassium 2 % (m/v) (49:49:1:1 ; vol/vol/vol/vol).

2,5 mL de cette solution sont ajoutés à 0,5 mL d'échantillon. Le mélange est agité soigneusement au vortex. Au bout de 10 minutes, 0,25 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma F9252) dilué au demi dans de l'eau ultrapure sont ajoutés. Après agitation au vortex les tubes sont placés à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est lue à 750 nm contre un blanc réactif.

Comme cela a été proposé par Frølund *et al.* (1995), les dosages sont réalisés en présence et en absence de cuivre et les valeurs d'absorbance obtenues sont corrigées afin de prendre en compte le développement de couleur non spécifique, qui serait dû principalement à la réaction du sulfate de cuivre avec les composés dit humiques et les acides aminés chromogènes.

$$Abs_{\text{protéines}} = 1.25 \times (Abs_{\text{avec CuSO}_4} - Abs_{\text{sans CuSO}_4})$$

$$Abs_{\text{humiques}} = Abs_{\text{sans CuSO}_4} - 0.2 \times Abs_{\text{protéines}}$$

La concentration en protéines est calculée à partir d'une gamme étalon réalisée avec de l'albumine sérique de boeuf (Sigma A7906). Les résultats sont exprimés en mg équivalent albumine L<sup>-1</sup> ou mg équivalent albumine g<sup>-1</sup> MV<sub>EPS</sub>. La limite de détection des protéines par cette méthode est estimée à 3,5 mg L<sup>-1</sup>.

La concentration en substances humiques est calculée à partir d'une gamme étalon réalisée avec des acides humiques (Aldrich H-1675-2). Les résultats sont exprimés en mg équivalent acides humiques L<sup>-1</sup> ou mg équivalent acides humiques g<sup>-1</sup> MV<sub>EPS</sub>. La limite de détection a été estimée à 3,6 mg L<sup>-1</sup>.

#### 3.6.3.1.2. Méthode de Bradford (1976).

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) fait intervenir un colorant qui se fixe sur certains acides aminés des protéines, en particulier l'arginine.

Le réactif de Bradford est préparé à partir de 50 mg de bleu de Coomassie dilué dans un mélange de 25 mL d'éthanol et de 50 mL d'acide phosphorique puis le volume est complété à 500 mL avec de l'eau ultrapure. La solution est ensuite filtrée sur une membrane de 0,45 µm de porosité (Whatman GF/C 1822047) et stockée à l'obscurité et à 4 °C.

1 mL de ce réactif est ajouté à 0,1 mL d'échantillon. Le mélange est agité. Au bout de 5 minutes exactement, l'absorbance est lue à 595 nm contre un blanc réactif.

La concentration en protéines est calculée à partir d'une gamme étalon réalisée avec de l'albumine sérique de boeuf (Sigma A7906). Les résultats sont exprimés en mg équivalent albumine L<sup>-1</sup> ou mg équivalent albumine g<sup>-1</sup> MV<sub>EPS</sub>. La limite de détection a été estimée à 0,2 mg L<sup>-1</sup>.

#### 3.6.3.2. Dosage des polysaccharides.

Le dosage des oses neutres est effectué selon la méthode de Dubois *et al.* (1956). Cette méthode est basée sur l'hydrolyse en milieu acide des polysaccharides en monosaccharides, qui sont déshydratés en dérivés furfural par le phénol.

1 mL de l'échantillon est mélangé avec 1 mL de phénol 5 % (m/v) et 5 mL d'acide sulfurique concentré dans un tube à vis. Les tubes sont bouchés, agités et placés dans un bain-marie à 100°C pendant exactement 5 minutes. Après refroidissement à l'obscurité pendant 30 minutes, l'absorbance est lue à 492 nm contre un blanc réactif.

La concentration en polysaccharides est calculée à partir d'une gamme étalon réalisée avec une solution de glucose (Prolabo 24379.294). Les résultats sont exprimés en mg équivalent glucose L<sup>-1</sup> ou mg équivalent glucose g<sup>-1</sup> MV<sub>EPS</sub>. La limite de détection a été estimée à 1,2 mg L<sup>-1</sup>.

#### 3.6.3.3. Dosages des acides désoxyribonucléiques (ADN).

Le dosage de l'ADN est effectué selon la méthode de Deriaz *et al.* (1949) qui fait intervenir la réaction de Dische (diphénylamine) après hydrolyse acide de l'ADN à chaud.

Une solution de diphénylamine 1 % est préparée dans un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique (97,25:2,75 ; v/v). 2 mL de cette solution sont ajoutés à 1 mL d'échantillon dans un tube à

### 3. Matériel et méthodes.

vis. Les tubes sont bouchés, agités et placés à 90 °C pendant 10 minutes. Après 1 heure à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lue à 595 nm contre un blanc réactif.

La concentration en ADN est calculée à partir d'une gamme étalon réalisée avec une solution d'ADN de thymus de veau (Sigma D1501). Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide nucléique L<sup>-1</sup> ou mg équivalent acide nucléique g<sup>-1</sup> MV<sub>EPS</sub>.

#### 3.6.3.4. Dosage des NH<sub>2</sub>-terminaux (acides aminés).

Le dosage des acides aminés s'effectue par la méthode dite de Sanger (Ghuysen *et al.*, 1965). A 100 µL d'échantillon sont ajoutés 25 µL d'une solution de tétraborate de potassium (Sigma P-5754) (5% m/v) et 10 µL d'une solution alcoolique de dinitrofluorobenzène (Sigma D-1529) (1,3% v/v). Après agitation, les tubes sont placés au bain-marie à 60°C pendant 30 min. 1,5 mL d'acide chlorhydrique 2 M (Prolabo 1789) est ajouté après refroidissement à température ambiante. Après agitation, l'absorbance est lue à 420 nm contre un blanc réactif.

La concentration en acides aminés est calculée à partir d'une gamme étalon réalisée avec une solution de L-Alanine (Merck 1007). Les résultats sont exprimés en mg équivalent L-Alanine L<sup>-1</sup> ou mg équivalent L-Alanine g<sup>-1</sup> MV<sub>EPS</sub>.

### 3.7. ACTIVITES ENZYMATIQUES.

#### 3.7.1. Expression et standardisation des mesures des activités enzymatiques.

Les mesures d'activités enzymatiques sont basées sur le suivi au cours du temps de la libération par clivage enzymatique d'un produit coloré à partir de substrats de synthèse dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 3. 2. La quantité de produit libéré est calculée à partir du coefficient d'absorption molaire  $\epsilon$  (L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) obtenu en réalisant une gamme étalon avec une solution de chromophore libre.

Tableau 3. 2 : Caractéristiques des substrats utilisés pour mesurer l'activité enzymatique des boues activées et des polymères extracellulaires.

Activités enzymatiques	Substrat (référence)	Produit libéré ( $\epsilon$ ) (L mmol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
Protéase	Azocaséine (Sigma A2765)	Peptide-sulfanilamide
L-Leu-aminopeptidase	L-Leu- <i>p</i> -nitroanilide (Sigma L9125)	<i>p</i> -nitroaniline (8,1729)
L-Ala-aminopeptidase	L-Ala- <i>p</i> -nitroanilide (Sigma A9325)	<i>p</i> -nitroaniline (8,1729)
$\alpha$ -glucosidase	<i>p</i> -nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (Sigma N1377)	<i>p</i> -nitrophénol (7,7975)
$\beta$ -glucosidase	<i>p</i> -nitrophényl- $\beta$ -D-glucopyranoside (Sigma N7006)	<i>p</i> -nitrophénol (7,7975)
C <sub>4</sub> -estérase	<i>p</i> -nitrophényl-butyrates (Sigma N9876)	<i>p</i> -nitrophénol (7,7975)
$\alpha$ -galactosidase	<i>p</i> -nitrophényl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (Sigma N0877)	<i>p</i> -nitrophénol (7,7975)
$\alpha$ -amylase	Amylose azure (Sigma A3508)	Rémazol bleu brillant (4,9179)

L'augmentation de l'absorbance au cours du temps détermine la vitesse initiale de la réaction. Les essais sont réalisés à concentration saturante en substrat, qui permet d'assurer la linéarité de

la courbe  $\Delta\text{Abs}=f(t)$  pendant le temps requis pour les mesures et de mesurer la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse.

L'activité enzymatique ( $z$ ) correspond à la quantité de produit libéré par minute et par litre.

$$z = \frac{\Delta\text{Abs} \times V \times 1000}{\varepsilon \times l \times \Delta t \times v} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1})$$

$\varepsilon$  : coefficient d'absorption molaire ( $\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

$l$  : longueur du trajet optique dans la cuve (cm)

$t$  : temps de réaction (min)

$V$  : volume total (mL)

$v$  : volume de la prise d'essai (mL)

$\Delta\text{Abs}/\Delta t$  : tangente à la courbe au point 0, vitesse initiale de la réaction.

L'activité enzymatique spécifique correspond à la quantité de produit libéré par minute et par g de matières volatiles ou par g de protéines.

Les essais sont réalisés à  $25 \pm 1$  °C. Avant mélange, les échantillons contenant les enzymes et les substrats sont préchauffés dans un bain marie à 25 °C. La verrerie utilisée est passée préalablement au four à 550 °C pendant 3,5 heures.

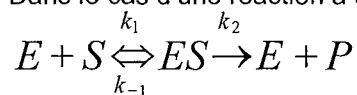
Des essais témoins sont réalisés avec les échantillon de boues ou d'EPS préalablement placés dans un bain marie bouillant pendant 10 minutes.

### 3.7.2. Cinétique enzymatique.

Michaelis et Menten ont défini la grandeur fondamentale de la cinétique enzymatique enzymatique comme étant la constante de dissociation ( $K_s$ ) du complexe enzyme-substrat [ES] formé à partir de l'enzyme E et du substrat S :

$$K_s = \frac{[E] + [S]}{[ES]}$$

Dans le cas d'une réaction à un substrat :



$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

La constante de Michaelis ( $K_m$ ) représente la concentration du substrat pour laquelle la vitesse de la réaction ( $v$ ) est la moitié de la vitesse maximale ( $V_{\text{max}}$ ) :

$$\text{si } [S] = K_m \text{ alors } v = \frac{V_{\text{max}} \times S}{K_m + S} = \frac{V_{\text{max}}}{2}$$

Les valeurs de  $K_m$  des réactions sont déterminées en mesurant la vitesse de réaction pour des concentrations croissantes en substrat soit  $v_i = f(S)$ .

La relation entre les vitesses obtenues ( $v$ ) et la concentration en substrat ( $S$ ) détermine une hyperbole dont l'équation correspond à l'équation de Michaelis-Menten :  $V = \frac{V_m \times S}{K_m + S}$ .

La représentation de Lineweaver et Burk  $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{S}\right) = \frac{1}{S}\left(\frac{K_m}{V_m}\right) + \frac{1}{V_m}$  est l'équation d'une droite

de pente  $K_m/V_m$  et d'ordonnée à l'origine  $1/V_m$ .

Certains composés présents dans le milieu peuvent être hydrolysés en même temps que le substrat de synthèse et jouer ainsi le rôle d'inhibiteurs compétitifs, augmentant la valeur du  $K_m$  tel que  $K_{m(\text{apparent})} = K_{m(\text{réel})} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$ , avec  $[I]$ , la concentration en substrat inhibiteur et  $K_i$ , la constante d'inhibition ou constante d'affinité du substrat naturel pour l'enzyme.

#### 3.7.3. Mesures des activités enzymatiques des boues activées.

Les activités enzymatiques mesurées dans les boues activées sont les activités L-leu-aminopeptidase (Teuber et Brodisch, 1977), protéase (Iversen et Jørgensen, 1995),  $\alpha$ -glucosidase (Dold *et al.*, 1991) et  $\alpha$ -amylase (Dold *et al.*, 1995).

##### 3.7.3.1. Activité L-Leu-aminopeptidase des boues activées.

L'échantillon de boues activées est placé dans un flacon Pyrex de contenance 100 mL (Prolabo 09833.053) sur une table d'agitation ( $150 \text{ tr min}^{-1}$ ) à  $25^\circ\text{C}$ . La réaction est initiée par l'ajout de L-Leu-*p*-nitroanilide à 0,05 % (m/v) préparé dans du tampon Tris-HCl 0,02 M (pH 7,6). La concentration finale en substrat est de  $0,25 \text{ g L}^{-1}$ . Des prélèvements de 2,5 mL sont réalisés au cours du temps et immédiatement plongés dans un bain marie bouillant pendant 3 min. Après centrifugation à  $2500 \times g$  pendant 5 min, l'absorbance des surnageants est lue à 410 nm. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MV}$ .

##### 3.7.3.2. Activité $\alpha$ -glucosidase des boues activées.

L'échantillon de boues activées est placé dans un flacon Pyrex de contenance 100 mL (Prolabo 09833.053) sur une table d'agitation ( $150 \text{ tr min}^{-1}$ ) à  $25^\circ\text{C}$ . La réaction est initiée par l'ajout de *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside à 0,5 % (m/v) préparé dans du tampon Tris-HCl 0,02 M (pH 7,2). La concentration finale en substrat est de  $0,75 \text{ g L}^{-1}$ . Des prélèvements de 2,5 mL sont réalisés au cours du temps et immédiatement plongés dans un bain marie bouillant pendant 3 min. Après centrifugation à  $2500 \times g$  pendant 5 min, l'absorbance des surnageants est lue à 410 nm. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MV}$ .

##### 3.7.3.3. Activité protéase des boues activées.

L'échantillon de boues activées est placé dans un flacon Pyrex de contenance 100 mL (Prolabo 09833.053) sur une table d'agitation ( $150 \text{ tr min}^{-1}$ ) à  $25^\circ\text{C}$ . La réaction est initiée par l'ajout d'azocaséine à 0,2 % (m/v) préparée dans du tampon phosphate 0,02 M (pH 7,6). La concentration finale en substrat est de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ . Des prélèvements de 0,5 mL sont réalisés au

cours du temps et 0,5 mL d'acide trichloracétique 10 % (m/v) glacé sont ajoutés pour arrêter la réaction. Les échantillons sont conservés au moins 10 min dans la glace puis centrifugés à  $2500 \times g$  pendant 5 min. L'absorbance des surnageants est lue à 340 nm. Les résultats sont exprimés en  $\text{Abs}_{340\text{ nm}} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MV}$ .

#### 3.7.3.4. Activité $\alpha$ -amylase des boues activées.

L'amylose azure 0,15 % (m/v) préparé dans un tampon phosphate 0,02 M (pH 7,2) est placé dans un flacon Pyrex de contenance 100 mL (Prolabo 09833.053) sur une table d'agitation ( $150 \text{ tr min}^{-1}$ ) à  $25^\circ\text{C}$  au moins 15 heures avant l'essai pour permettre son hydratation (Sauter *et al.*, 1998). La réaction est initiée par l'ajout de l'échantillon de boues activées. La concentration finale en substrat est de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ . Des prélèvements de 2 mL sont réalisés au cours du temps et 2 mL d'acide trichloracétique 10 % (m/v) glacé sont ajoutés pour arrêter la réaction. Les échantillons sont conservés au moins 10 min dans la glace puis centrifugés à  $2500 \times g$  pendant 5 min. L'absorbance des surnageants est lue à 620 nm. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MV}$ .

#### **3.7.4. Mesures des activités enzymatique des polymères extracellulaires (EPS).**

Les activités enzymatiques des polymères extracellulaires sont mises en évidence de manière rapide semi-quantitative à l'aide du kit API ZYM<sup>®</sup>. Certaines de ces activités sont mesurées à l'aide de substrats de synthèse spécifiques, à savoir les activités protéase,  $\alpha$ -glucosidase (Frønd *et al.*, 1995),  $\alpha$ -galactosidase (LeBihan et Lessard, 1998),  $\beta$ -glucosidase (LeBihan et Lessard, 1998), C4-estérase (LeBihan et Lessard, 1998), L-Leu-aminopeptidase (Frønd *et al.*, 1995),  $\alpha$ -amylase, déshydrogénase (Urbain *et al.*, 1993b).

##### 3.7.4.1. Galeries API ZYM<sup>®</sup>.

Les galeries API ZYM<sup>®</sup> (Biomérieux - 2 520 0) permettent la mise en évidence de 19 activités enzymatiques différentes dans un échantillon liquide (Tableau 3. 3).

Le fond de la boîte d'incubation de la galerie est rempli préalablement avec 5 mL d'eau ultrapure. L'inoculation de chaque cupule se fait ensuite avec 100  $\mu\text{L}$  d'échantillon. Après 24 heures d'incubation de la galerie à  $37^\circ\text{C}$ , une goutte du réactif ZYM A (Biomérieux - 7 047 0) et une goutte du réactif ZYM B (Biomérieux - 7 048 0) sont déposées dans chaque cupule. La galerie est laissée au repos 5 minutes précisément à l'obscurité. La lecture des résultats se fait selon l'échelle colorimétrique API ZYM<sup>®</sup> quantifiée de 1 à 5. La galerie API ZYM<sup>®</sup> permet une mesure semi-quantitative des activités présentes.



### 3. Matériel et méthodes.

Tableau 3. 3 : Activités enzymatiques détectées par une galerie API ZYM<sup>®</sup> et substrats correspondants.

Activités enzymatiques	Substrats
phosphatase alcaline	2-naphtyl-phosphate
estérase C4,	2-naphtyl-butyrate
estérase lipase	2-naphtyl-caprylate
lipase	2-naphtyl-myristate
L-Leucine-aminopeptidase	L-Leucyl-naphtylamide
L-Valine-aminopeptidase	L-Valyl-naphtylamide
L-Cystine-aminopeptidase	L-cystyl-naphtylamide
Trypsine	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide
$\alpha$ -chymotrypsine	N-glutaryl-phénylalanine-2-naphtylamide
phosphatase acide	2-naphtyl-phosphate
naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	naphtol-AS-BI-phosphate
$\alpha$ -galactosidase	6-Br-2-naphtyl- $\alpha$ D-galactopyranoside
$\beta$ - galactosidase	2-naphtyl- $\beta$ D- galactopyranoside
$\beta$ -glucuronidase	naphtol-AS-BI- $\beta$ D-glucuronide
$\alpha$ -glucosidase	2-naphtyl- $\alpha$ D-glucopyranoside
$\beta$ - glucosidase	6-Br-2-naphtyl- $\beta$ D-glucopyranoside
N-acétyl- $\beta$ -glucosamidase	1-naphtyl-N-acétyl- $\beta$ D-glucosaminide
$\alpha$ -mannosidase	6-Br-2-naphtyl- $\alpha$ D-mannopyranoside
$\alpha$ -fucosidase	2-naphtyl- $\alpha$ L-fucopyranoside

#### 3.7.4.2. Activité L-Leu-aminopeptidase des polymères extracellulaires.

Le substrat L-Leu-*p*-nitroanilide 0,05 % (m/v) préparé dans du tampon Tris-HCl 0,02 M (pH 7,6) est ajouté à l'échantillon d'EPS dans une cuve à usage unique en polystyrène pour spectrophotométrie. La concentration finale en substrat est de 0,25 g L<sup>-1</sup>. L'augmentation d'absorbance à 410 nm est enregistrée automatiquement au cours du temps. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MV}$  ou en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines}$ .

#### 3.7.4.3. Activité $\alpha$ -glucosidase des polymères extracellulaires.

Le substrat *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside à 0,5 % (m/v) préparé dans du tampon Tris-HCl 0,02 M (pH 7,2) est ajouté à l'échantillon d'EPS dans une cuve à usage unique en polystyrène pour spectrophotométrie. La concentration finale en substrat est de 0,75 g L<sup>-1</sup>. L'augmentation d'absorbance à 410 nm est enregistrée automatiquement au cours du temps. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MV}$  ou en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines}$ .

#### 3.7.4.4. Activité protéase des polymères extracellulaires.

Le substrat azocaséine à 0,2 % (m/v) préparé dans du tampon phosphate 0,02 M (pH 7,6) est ajouté à l'échantillon. La concentration finale en substrat est de 0,5 g L<sup>-1</sup>. Des prélèvements de 2 mL sont réalisés au cours du temps et 2 mL d'acide trichloracétique 10 % (m/v) glacé sont ajoutés pour arrêter la réaction. Les échantillons sont conservés au moins 10 min dans la glace puis centrifugés à 2500 x *g* pendant 5 min. L'absorbance des surnageants est lue à 340 nm. Les résultats sont exprimés en Abs<sub>340 nm</sub> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MV ou en Abs<sub>340 nm</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protéines.

#### 3.7.4.5. Activité α-amylase des polymères extracellulaires.

L'échantillon est ajouté au substrat amyloze azure à 0,15 % (m/v) préparé dans du tampon phosphate 0,02 M (pH 7,2), préalablement hydraté pendant 15 heures. La concentration finale en substrat est de 0,5 g L<sup>-1</sup>. Des prélèvements de 2 mL sont réalisés au cours du temps et 2 mL d'acide trichloracétique 10 % (m/v) glacé sont ajoutés pour arrêter la réaction. Les échantillons sont conservés au moins 10 min dans la glace puis centrifugés à 2500 x *g* pendant 5 min. L'absorbance des surnageants est lue à 620 nm. Les résultats sont exprimés en μmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MV ou en μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protéines.

#### 3.7.4.6. Activité β-glucosidase des polymères extracellulaires.

Le substrat *p*-nitrophényl-β-D-glucopyranoside à 0,1 % (m/v) préparé dans du tampon acétate 0,1 M (pH 5) est ajouté à l'échantillon dans un flacon en verre de 10 mL. La concentration finale en substrat est de 0,5 g L<sup>-1</sup>. L'absorbance à 405 nm est lue au cours du temps. Les résultats sont exprimés en μmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MV ou en μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protéines.

#### 3.7.4.7. Activité α-galactosidase des polymères extracellulaires.

Le substrat *p*-nitrophényl-α-D-galactopyranoside à 0,1 % (m/v) préparé dans du tampon acétate 0,1 M (pH 5) est ajouté à l'échantillon dans un flacon en verre de 10 mL. La concentration finale en substrat est de 0,5 g L<sup>-1</sup>. L'absorbance à 405 nm est lue au cours du temps. Les résultats sont exprimés en μmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MV ou en μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protéines.

#### 3.7.4.8. Activité C4-estérase des polymères extracellulaires.

Le substrat *p*-nitrophényl-butyrate à 0,1 % (m/v) préparé dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,6) est ajouté à l'échantillon dans un flacon en verre de 10 mL. La concentration finale en substrat est de 0,25 g L<sup>-1</sup>. L'absorbance à 405 nm est lue au cours du temps. Les résultats sont exprimés en μmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MV ou en μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protéines.

#### 3.7.4.9. Activité Ala-aminopeptidase des polymères extracellulaires.

Le substrat L-Ala-*p*-nitroanilide 0,1 % (m/v) préparé dans du tampon Tris-HCl 0,02 M (pH 7,6) est ajouté à l'échantillon dans une cuve à usage unique en polystyrène pour spectrophotométrie. La concentration finale en substrat est de 0,25 g L<sup>-1</sup>. L'augmentation d'absorbance à 410 nm est

### 3. Matériel et méthodes.

---

enregistrée automatiquement au cours du temps. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MV}$  ou en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines}$ .

#### 3.7.4.10. Activité Glucose-6-phosphate-deshydrogénase des polymères extracellulaires.

L'activité Glucose-6-Phosphate deshydrogénase (G-6-PDH) est évaluée à l'aide d'un kit (Sigma 345-A). Cette enzyme intracellulaire catalyse l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate, associée à la réduction du NADP en NADPH (Lessie et Wyk, 1972).

L'essai enzymatique est basé sur la mesure en spectrophotométrie de la vitesse de formation de NADPH provenant de la réduction enzymatique de NADP en présence de glucose-6-phosphate. La solution de NADP est préparée extemporanément par ajout de 1 mL d'eau apyrogène (Aqua B-Braun) dans le flacon réactif (Sigma 345-1) afin d'obtenir une solution de NADP de concentration  $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ . 5 mL d'échantillon sont ajoutés. Après agitation, le flacon est laissé 5 min à  $20^\circ\text{C}$ . 2 mL de solution de substrat prête à l'emploi glucose-6-phosphate  $1,05 \text{ mmol L}^{-1}$  (Sigma 345-8) sont ajoutés et doucement mélangés. Après 5 min d'incubation à  $30^\circ\text{C}$ , le mélange est versé dans une cuvette en quartz et l'absorbance est lue à 340 nm au cours du temps. Le coefficient d'absorption millimolaire du NADPH à 340 nm est égal à 6,22 dans l'eau ultrapure.

### **3.8. BACTERIOLOGIE.**

#### **3.8.1. Composition des milieux de culture.**

##### 3.8.1.1. R2A Agar (DIFCO 218263).

Le milieu R2A est utilisé classiquement pour la numération des bactéries hétérotrophes de l'eau potable. Le milieu est reconstitué dans de l'eau déminéralisée à la concentration de  $18,2 \text{ g L}^{-1}$  et autoclavé à  $121^\circ\text{C}$  pendant 15 min. Sa composition est la suivante : Agar  $15,0 \text{ g L}^{-1}$  ; Extrait de levure  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  ; Hydrolysate acide de caséine  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  ; Glucose  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  ; Amidon soluble  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $0,3 \text{ g L}^{-1}$  ; Pyruvate de sodium  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  ; Hydrolysate pancréatique de caséine  $0,25 \text{ g L}^{-1}$  ; Hydrolysate peptique de tissu animal  $0,25 \text{ g L}^{-1}$  ;  $\text{MgSO}_4$  anhydre  $0,024 \text{ g L}^{-1}$  (pH  $7,2 \pm 0,2$  à  $25^\circ\text{C}$ ).

##### 3.8.1.2. Plate count agar (PCA) (DIFCO 247940).

Le milieu PCA est utilisé pour la numération des bactéries de l'eau et du lait. Le milieu est reconstitué dans de l'eau déminéralisée à la concentration de  $23,5 \text{ g L}^{-1}$  et autoclavé à  $121^\circ\text{C}$  pendant 15 min. Sa composition est la suivante : Agar  $15,0 \text{ g L}^{-1}$  ; Hydrolysate pancréatique de caséine  $5,0 \text{ g L}^{-1}$  ; Extrait de levure  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  ; Glucose  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  (pH  $7,0 \pm 0,2$  à  $25^\circ\text{C}$ ).

##### 3.8.1.3. R2A Agar modifié pour sélection des souches protéolytiques.

Il s'agit d'un milieu R2A Agar dans lequel est incorporé un substrat de nature protéique, la caséine (1 %) (Acros 27607-1000). Les souches ayant une forte activité protéolytique sont sélectionnées

sur la base de plages circulaires de protéolyse autour des colonies bactériennes, du fait de la décoloration de la gélose blanche qui devient transparente lorsque la caséine est hydrolysée.

#### 3.8.1.4. CASO-bouillon (Merck 1.0549).

Le bouillon CASO est un milieu de culture liquide utilisé pour la culture de nombreux micro-organismes et en particulier pour l'estimation rapide de la qualité de l'eau. Le milieu est reconstitué dans de l'eau déminéralisée à la concentration de 30 g L<sup>-1</sup> et autoclavé à 121 °C pendant 15 min. Sa composition est la suivante : Hydrolysate pancréatique de caséine 17,0 g L<sup>-1</sup> ; NaCl 5,0 g L<sup>-1</sup> ; Peptone de farine de soja 3,0 g L<sup>-1</sup> ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g L<sup>-1</sup> ; Glucose 2,5 g L<sup>-1</sup> (pH 7,3 ± 0,2 à 25 °C).

#### **3.8.2. Cultures bactériennes.**

Les souches bactériennes, issues de stocks conservés à – 80 °C, sont cultivées directement sur un milieu R2A Agar (cf. 3.8.1.1) pendant 24 h à 30 °C. Les colonies sont repiquées sur le même milieu et cultivées pendant 24 h à 30 °C.

Une préculture de 24 h à 25 °C est réalisée en ensemençant 250 mL de milieu liquide CASO-bouillon (cf. 3.8.1.4) avec des colonies prélevées sur milieu gélosé après deux repicages.

La culture est réalisée à 25 °C avec bullage d'air dans des ballons de 4 L contenant 2 L de milieu liquide CASO-bouillon (cf. 3.8.1.4). La culture estensemencée par un volume de préculture de 24 h correspondant à 5 % du volume final. L'agitation est réalisée à l'aide d'un barreau magnétique à 250 tr min<sup>-1</sup>.

#### **3.8.3. Numération des bactéries cultivables (UFC).**

Le nombre de bactéries cultivables est déterminé par leur capacité à croître sur milieu gélosé. 1 mL d'échantillon dilué ou non est incorporé au milieu gélosé dans des boîtes de Petri stériles (57 cm<sup>2</sup>). Les dilutions sont effectuées en triplicata en cascade dans des tubes à essai en verre contenant de l'eau préalablement stérilisée à l'autoclave. Les colonies sont comptées (entre 20 et 200 par boîte) et les résultats sont exprimés en unités formant colonie par mL (UFC mL<sup>-1</sup>).

#### **3.8.4. Isolement des bactéries des boues activées.**

Les boues activées sont dispersées par l'application d'ultrasons. 50 mL de boues, préalablement refroidis dans un bain de glace pendant 15 minutes, sont soumis aux ultrasons pendant 20 secondes sous une puissance de 39 W à l'aide d'une sonde de 19 mm de diamètre (Labsonic 2000U, B. Braun) immergée de 15 mm dans le liquide.

Les agrégats préalablement dispersés sont lavés à l'aide d'un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,1) de conductivité de l'ordre de 800 µS cm<sup>-1</sup>. Les boues sont centrifugées à 5000 x g pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et remplacé par la solution de lavage. L'homogénéisation du mélange se fait par retournement manuel. L'opération est renouvelée une fois.

La suspension obtenue après dispersion et lavage des agrégats est étalée sur un milieu R2A Agar. L'incubation des boîtes de Petri se fait dans une étuve à 30 °C. Les colonies isolées sont

repiquées plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une culture pure, c'est-à-dire d'une culture dont les colonies semblent similaires. La sélection des souches protéolytiques est réalisée par étalement sur un milieu R2A Agar modifié, contenant de la caséine à la concentration de 1 % ( cf. 3.5.1.3).

### **3.8.5. Coloration de Gram et observation microscopique.**

L'observation microscopique des bactéries est utilisée pour vérifier la similitude des cellules quant à leur apparence et leur réaction à la coloration de Gram.

Avant la coloration, un frottis est réalisé sur une lame en verre. Une microcolonie isolée, prélevée sur milieu R2A ( cf. 3.5.1.) après 24 h de culture à 30 °C, est étalée dans une gouttelette sur la lame de verre à l'aide d'une öse d'eau. Après séchage de la lame en verre à l'air, le frottis est fixé par écrasement rapide de la flamme du bec Bunsen avec le dos de la lame en verre.

Après refroidissement, les micro-organismes sont colorés en violet par le cristal violet oxalaté (bioMérieux 55 545) pendant 1 min. Après lavage à l'eau, le frottis est mis en contact pendant 1 min avec la solution de Lugol-P.V.P. (bioMérieux 55 546). L'iode libérée va fixer le colorant précédent. Le complexe iode-cristal violet ainsi formé est solubilisé lors de la décoloration par l'alcool-acétone (bioMérieux 55 547) uniquement pour les bactéries ayant une réaction négative à la coloration de Gram. Le frottis est mis en contact pendant 1 min avec la safranine (bioMérieux 55 548) qui agit comme colorant de contraste : les bactéries ayant une réaction négative à la coloration de Gram apparaissent rose, les bactéries ayant une réaction positive à la coloration de Gram qui n'ont pas été décolorées restent violettes. Le frottis est lavé à l'eau ultrapure et séché soigneusement. L'observation du frottis est réalisée en microscopie optique (objectif à immersion x 100, oculaire x 10).

### **3.8.6. Identification des bactéries.**

#### 3.8.6.1. Tests d'identification rapide des bactéries.

Les caractéristiques physiologiques et métaboliques des souches isolées sont évaluées par des tests biochimiques miniaturisés standardisés permettant l'identification rapides des bactéries. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture des résultats est réalisée à l'aide d'un tableau attribuant un chiffre à chaque réaction et l'identification est obtenue par comparaison avec une banque de données.

##### 3.8.6.1.1. Galerie API 20 E (bioMérieux 20 100).

La galerie API 20 E se compose de 20 microtubes contenant des milieux et des substrats déshydratés. Elle est utilisée pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à réaction négative à la coloration de Gram non fastidieux, comme *E. coli*.

Les 20 tests sont inoculés avec une suspension bactérienne préparée à partir d'une microcolonie isolée mise en suspension dans une solution saline (NaCl 0,85 %) qui reconstitue le milieu. Les galeries sont incubées à 37 °C pendant 24 h. L'identification est obtenue par

comparaison du profil numérique déterminé par la lecture des 20 tests et la réaction à l'oxydase (21<sup>ème</sup> test) et de la banque de donnée (catalogue analytique bioMérieux 20 190).

#### 3.8.6.1.2. Galerie API 20 NE (bioMérieux 20 050).

La galerie API 20 NE se compose de 20 microtubes contenant des milieux et des substrats déshydratés. Elle est utilisée pour l'identification des bacilles à réaction négative à la coloration de Gram non entérobactéries et non fastidieux, comme *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*.

Les 8 tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne préparée à partir d'une microcolonie isolée mise en suspension dans une solution saline (NaCl 0,85 %) qui reconstitue le milieu. Les 12 tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum pour que les bactéries ne poussent que si elles sont capables d'utiliser le substrat. Les galeries sont incubées à 30 °C pendant 24 h. L'identification est obtenue par comparaison du profil numérique déterminé par la lecture des 20 tests et la réaction à l'oxydase (21<sup>ème</sup> test) et de la banque de donnée (catalogue analytique bioMérieux 2 009 0).

#### 3.8.6.2. Identification par séquençage de l'ADN ribosomique (Institut Pasteur).

L'identification des micro-organismes est réalisée par séquençage de l'ADN ribosomal (ADNr). Les séquences sont vérifiées, comparées à une base de données et permettent la construction de l'arbre phylogénétique.

L'isolement de l'ADN bactérien, l'amplification du gène *rrs* codant l'ARNr 16 S par PCR (polymerase chain reaction), la purification et le séquençage des produits de PCR ont été réalisés à l'Institut Pasteur (Paris). Les deux amorces utilisées pour l'amplification sont l'amorce A correspondant à la position 8 à 28 de l'ARNr 16 S de *Escherichia coli* et l'amorce rJ 5'-GGT-TACCTTGTTACGACTT-3' correspondant aux positions complémentaires 1510 à 1492 (Janvier et Grimont, 1995).

### **3.9. SEPARATION DES ENZYMES EXTRACELLULAIRES.**

La séparation des enzymes extracellulaires fait intervenir quatre étapes successives:

- 1) la concentration des protéines extracellulaires par précipitation au sulfate d'ammonium
- 2) la dialyse des solutions concentrées
- 3) une chromatographie d'échange d'ions pour capturer les enzymes d'intérêt
- 4) une filtration sur gel pour estimer la masse molaire.

#### **3.9.1. Concentration des protéines par le sulfate d'ammonium.**

Les protéines sont concentrées par l'ajout d'un sel structurant, le sulfate d'ammonium  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ . La masse de sel à ajouter à l'échantillon est déterminée à l'aide d'une table des pourcentages de saturation (Tableau 3. 4).

Les essais sont réalisés à 4°C. Les cristaux de sulfate d'ammonium sont ajoutés à l'échantillon. Après dissolution complète, les solutions sont agitées à 200  $\text{tr min}^{-1}$  pendant 60 min. Les protéines

précipitées sont récupérées dans le culot de centrifugation à 5000 x g pendant 30 min à 4 °C. Les culots sont resuspendus dans un volume faible de tampon 0,05 M Tris-HCl (pH 8) (cf. Annexe 5).

Tableau 3. 4 : Masses de sulfate d'ammonium (g) à ajouter à 1 L de solution à 0 °C et concentrations correspondantes exprimées en pourcentage de saturation (Englard et Seiffter, 1990). Une solution saturée en sulfate d'ammonium a une concentration d'environ 3,9 M à 0 °C.

concentration initiale en sulfate d'ammonium (pourcentage de saturation à 0 °C)	concentration finale en sulfate d'ammonium (pourcentages de saturation à 0 °C)																		
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100		
	sulfate d'ammonium solide (g) à ajouter à 1 L de solution																		
0	106	134	164	194	226	259	292	327	364	401	440	481	523	567	613	660	710		
5	79	107	137	167	198	230	263	298	333	370	409	449	490	534	579	626	675		
10	53	81	109	139	169	201	234	268	303	340	377	417	458	500	545	591	639		
15	26	54	82	111	141	172	205	238	273	309	346	385	425	467	511	556	604		
20	0	27	55	83	113	144	175	208	242	278	315	353	392	434	477	521	568		
25		0	27	56	85	115	146	179	212	247	283	321	360	400	443	487	533		
30			0	28	56	86	117	149	182	216	252	289	327	367	408	452	497		
35				0	28	57	88	119	152	185	220	257	294	334	374	417	462		
40					0	29	58	89	121	154	189	224	262	300	340	382	426		
45						0	29	60	91	123	157	192	229	267	306	348	391		
50							0	30	61	93	126	160	196	233	272	313	355		
55								0	30	62	94	128	163	200	238	278	320		
60									0	31	63	96	131	167	204	243	284		
65										0	31	64	98	133	170	209	249		
70											0	32	65	100	136	174	213		
75												0	33	67	102	139	178		
80													0	33	68	104	142		
85														0	34	70	107		
90															0	35	71		
95																0	36		
100																	0		

### 3.9.2. Dialyse des solutions concentrées en sulfate d'ammonium.

Le volume de l'échantillon est mesuré avant et après dialyse. Les solutions concentrées en sel (culots et/ou surnageants de centrifugation après précipitation par le sulfate d'ammonium) sont dialysées à 4 °C sous agitation douce pendant 2 h dans de l'eau ultrapure (5 L) puis pendant 14 h dans du tampon Tris-HCl 0,05 M (pH 8) (5 L). Les membranes de dialyse ont un seuil de coupure compris entre 6000 et 8000 uma (Spectra/Por 1<sup>®</sup> 132 655).

La membrane de dialyse est lavée avant utilisation. Les membranes sont placées dans 2 L de solution de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M et EDTA disodique 0,01 M pendant 120 min à 60 °C sous agitation. L'opération est renouvelée une fois avec la même solution préchauffée pour éviter les changements brusques de température puis avec de l'eau désionisée jusqu'à ce que l'eau de lavage soit limpide.

### 3.9.3. Chromatographie d'échange d'ions.

La chromatographie d'échange d'ions permet de séparer les protéines en fonction de leur charge. La séparation est basée sur des interactions de nature électrostatique réversibles entre les protéines chargées et le gel portant des charges opposées. Les protéines sont éluées de la colonne à l'aide d'un gradient de sel. D'une manière générale, la stabilité des protéines n'étant vérifiée qu'à des valeurs de pH comprises entre 5 et 8, la chromatographie d'échange d'anions s'impose comme technique de choix : à un pH supérieur au point isoélectrique, la plupart des protéines sont chargées négativement et sont adsorbées sur des échangeurs d'anions.

### 3. Matériel et méthodes.

L'échantillon dialysé est centrifugé à 16000 x g pendant 15 min à 4 °C et filtré sur une membrane en PVDF de 0,45 µm de porosité (cf. 3.3.1) immédiatement avant d'être injecté à l'aide d'une boucle de 5 mL sur une colonne (XK 26/20, Amersham Biosciences) contenant un gel de DEAE-Sépharose (Amersham Biosciences) préalablement équilibré avec du tampon 0,05 M Tris-HCl (pH 8) à 20 °C. La colonne est éluée avec le même tampon à un débit de 60 mL h<sup>-1</sup> et les protéines adsorbées sont éluées grâce à un gradient linéaire de NaCl de 0 à 1M (Tableau 3. 5). Des fractions (4 mL) sont collectées au cours de l'éluion et des aliquots sont prélevés pour mesurer la concentration en protéines (cf. 3.3.2.1.2) et/ou l'activité enzymatique (cf. 3.4.4). Les fractions actives sont poolées et les protéines sont concentrées par ultracentrifugation sur une membrane de seuil de coupure 10000 uma (Vivaspin 20 mL Concentrator, Vivascience 7081172).

La capacité du gel varie de 150 mg mL<sup>-1</sup> pour l'alpha-lactoalbumine (Mr = 14300) à 170 mg mL<sup>-1</sup> pour l'albumine humaine (Mr = 68000) à seulement 2 mg mL<sup>-1</sup> pour la thyroglobuline (Mr = 669000) (Amersham Biosciences). Le volume du gel ayant été estimé à  $v = \pi \times r^2 \times h = \pi \times 1,3^2 \times 15 = 79,6 \text{ mL}$ , la quantité maximale de protéines dans l'échantillon doit être inférieure à 159,2 mg. Les quantités de protéines déposées sont présentées en annexe 5 et 6.

Le lavage de la colonne entre chaque injection est effectué en faisant passer successivement sur la colonne à un débit de 60 mL h<sup>-1</sup> : 300 mL de soude 1 M, 100 mL d'eau ultrapure, 150 mL de Triton 0,5 % dans de l'acide acétique 1 M, 450 mL d'éthanol 70 % et 300 mL d'eau ultrapure. La colonne est ensuite équilibrée avec 300 mL de tampon 0,05 M Tris-HCl (pH 8).

Tableau 3. 5 : Programme d'éluion de la chromatographie d'échanges d'ions.

	Volume	NaCl 1M	Débit	Fraction	Valve d'injection	Remarques
	(mL)	(%)	(mL.min <sup>-1</sup> )	(mL)	(position)	
1	0	0	1	0	load	équilibration
2	10	0	0,5	4	injection	injection
3	15	0	1	4	injection	Lavage de la boucle
4	35	0	1	4	load	Elution/lavage
5	85	0	1	4	load	Elution/gradient
6	225	50	1	4	load	
7	249	100	1	4	load	Lavage colonne
8	365	100	1	4	load	
9	365,1	0	40	0	waste	
10	375,1	0	1	0	Load	équilibration
11	385,1	0	1	0	load	

#### 3.9.4. Ultrafiltration par centrifugation.

Les fractions d'intérêt sont concentrées par ultrafiltration à l'aide de tubes de concentration Vivaspin 20 mL (Vivascience, VS2001) possédant une membrane de seuil de coupure 10000 uma. Les tubes sont centrifugés pendant 15 min à 3000 x g à 4 °C.



### 3.9.5. Filtration sur gel.

La filtration sur gel est une technique qui permet de séparer des molécules en solution en fonction de leur taille et sans les dénaturer. Les molécules les plus petites ont accès aux pores du gel et leur élution est retardée. Les molécules de grande taille sont totalement exclues du gel et sont éluées en premier.

Le poids moléculaire des protéines natives est déterminé par filtration sur gel du pool de fractions actives obtenu après l'étape de chromatographie d'échange d'ions. L'échantillon est déposé sur une colonne (XK 16/100, Amersham Biosciences) de gel Sephacryl S-300 (Amersham Biosciences) préalablement équilibré par du tampon 0,05 M Tris-HCl (pH 8) contenant 0,15 M NaCl et élué à 60 mL/h avec le même tampon. Des fractions sont collectées au cours de l'élution et des aliquots sont prélevés pour mesurer la concentration en protéines (*cf.* 3.3.2.1.2) et/ou l'activité enzymatique (*cf.* 3.4.4).

La calibration est réalisée à l'aide d'un mélange de protéines de masse molaire connue (Bio-Rad): la thyroglobuline bovine ( $M_r = 670000$ ), la  $\gamma$ -globuline bovine ( $M_r = 158000$ ), l'ovalbumine de poulet ( $M_r = 44000$ ), la myoglobine équine ( $M_r = 17000$ ) et la vitamine B-12 ( $M_r = 1350$ ) (Figure 3. 4). La droite d'étalonnage obtenue permet d'estimer la masse molaire en fonction du volume d'élution (Figure 3. 5). La calibration de la colonne est effectuée avant chaque utilisation.

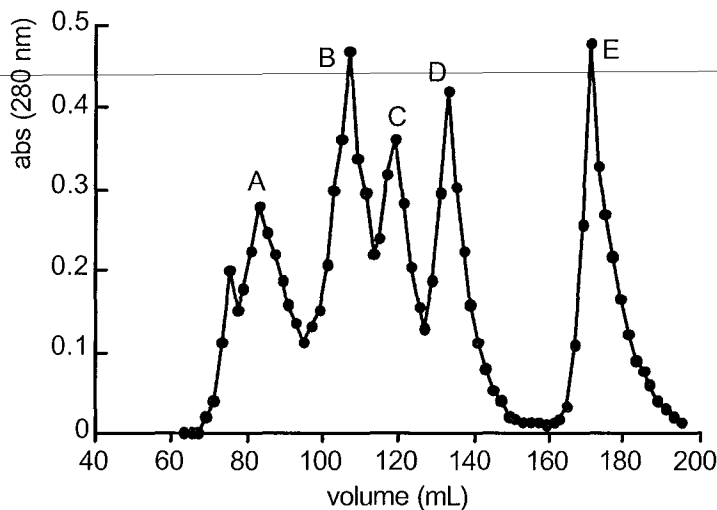


Figure 3. 4 : Profil d'élution de la colonne de filtration sur gel d'un mélange de protéines de masse molaire connue : A) thyroglobuline bovine ( $M_r = 670000$ ) ; B)  $\gamma$ -globuline bovine ( $M_r = 158000$ ) ; C) ovalbumine de poulet ( $M_r = 44000$ ) ; D) la myoglobine équine ( $M_r = 17000$ ) et E) vitamine B-12 ( $M_r = 1350$ ).

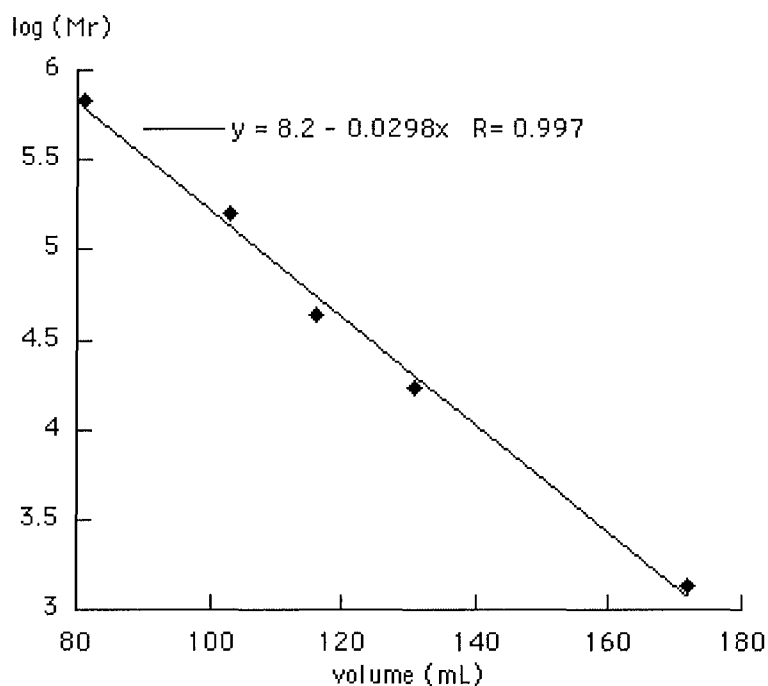


Figure 3. 5 : Exemple de droite d'étalonnage de la colonne de filtration sur gel.

### 3.9.6. Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes(SDS-PAGE).

L'électrophorèse des protéines permet de suivre les protéines durant la purification et de déterminer la pureté des fractions purifiées. Elle permet aussi d'estimer la masse molaire des différentes sous-unités des protéines. L'électrophorèse est aussi utilisée comme étape de préparation des échantillon avant l'analyse HPLC-MS-MS.

#### 3.9.6.1. Préparation des gels.

La cellule utilisée pour réaliser la SDS-PAGE est une mini cellule à migration verticale (Mini-PROTEAN II Biorad). Le gel de séparation (Tableau 3. 6) est d'abord coulé entre deux plaques de verre et recouvert de butanol pendant 1 h. Après polymérisation, le butanol est éliminé et le sommet du gel est rincé à l'eau ultrapure et séché. Le gel de concentration (Tableau 3.7) est alors coulé et le peigne est positionné.

Tableau 3. 6 : Composition du gel de séparation à 12 % (10 mL).

Composés	Volume
Eau ultrapure	3,35 mL
Protogel 30 % Acrylamide/Bis acrylamide (37,5 : 1) (Prolabo 37035,261)	4,0 mL
Tampon 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 mL
SDS 10 %	0,1 mL
Persulfate d'ammonium 10 %	0,1 mL
TEMED	0,004 mL

Tableau 3. 7 : Composition du gel de concentration (4 mL).

Composés	Volume
Eau ultrapure	2,7 mL
Protogel 30 % Acrylamide/Bis acrylamide (37,5 : 1) (Prolabo 37035,261)	0,67 mL
Tampon 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 mL
SDS 10 %	0,04 mL
Persulfate d'ammonium 10 %	0,04 mL
TEMED	0,004 mL

#### 3.9.6.2. Préparation des échantillons et migration.

Les échantillons sont dilués au 1 : 1 dans le tampon de Laemmli (Sigma S3401) contenant du SDS 4 %, du glycérol 20 %, du 2-mercaptoéthanol 10 %, du bleu de bromophénol 0,004 % et du Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) (Laemmli, 1970). Les standards de masses molaires (Biorad 161-0304) sont dilués au 1 : 20 dans le tampon de Laemmli (Sigma S3401). Les standards se composent de 6 protéines différentes, la phosphorylase b (97400), l'albumine sérique (66200), l'ovalbumine (45000), l'anhydrase carbonique (31000), l'inhibiteur de trypsine (21500) et le lysozyme (14400).

Les échantillons et les standards dilués sont placés dans un bain marie à 95 °C pendant 5 min. Après refroidissement 20 à 30 µL d'échantillon et de standards sont déposés dans les puits dans le tampon de migration 0,025 M Tris / 0,192 M Glycine / 0,1 % SDS (pH 8,6) contenu dans la cuve de migration. La migration a lieu pendant 45 min à 200 V.

#### 3.9.6.3. Coloration des protéines dans le gel.

Le gel est immergé pendant 20 min dans une solution de fixation composée d'un mélange méthanol/acide acétique/eau (40/10/50, m:m:m). Le gel est ensuite immergé pendant 120 min dans la solution de coloration au Bleu de Coomassie (Sigma B6529). Le gel est enfin décoloré par la solution de décoloration composée d'un mélange méthanol/acide acétique/eau (40/10/50, m:m:m). Des changements de la solution de décoloration sont effectués jusqu'à ce que le gel soit clair.

### **3.9.7 HPLC-MS-MS.**

L'analyse des acides aminés des protéines a été effectuée par HPLC-MS-MS par le Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (ECPM, Strasbourg).

Les bandes découpées dans le gel d'électrophorèse sont soumises à une digestion trypsique. Les peptides obtenus sont séparés par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse.

#### 3.9.7.1. Digestion trypsique.

Chaque spot subit une déshydratation par de l'acétonitrile suivie d'une réhydratation par du carbonate d'ammonium 25 mM (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). Cette opération, qui dure 10 min par solvant, est faite

à 2 reprises. Les morceaux de gels sont séchés pendant 15 min, au SpeedVac, puis traités au dithiotriéthol (DTT) 10 mM, dissous dans du  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM, durant 1 h à 56°C (étape de réduction). Après élimination du DTT, 100  $\mu\text{L}$  de iodoacétamide 55 mM dissous dans du  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM est ajouté dans le même tampon que le DTT pendant 45 min à température ambiante et à l'obscurité (étape d'alkylation). Après une série de six lavages successifs et alternatifs de 10 min chacun, par du  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM et de l'acétonitrile, les fragments de gels sont séchés au SpeedVac pendant 30 min et sont alors prêts à être digérés.

L'enzyme utilisée est la trypsine (Sequencing Grade Modified Trypsin Promega V5111). C'est une Sérine endopeptidase qui clive les protéines du côté carboxyl des acide aminés basiques (Arginine et Lysine). Son milieu réactionnel est le tampon carbonate d'ammonium 25 mM pH=8. La trypsine (20  $\mu\text{g}$ ) est reprise par 50 $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM, 30 $\mu\text{L}$  sont prélevés et dilués dans 970  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM. La concentration finale en trypsine est 12,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Chaque morceau de gel est réhydraté par un volume de solution de digestion trypsique. Après réhydratation, il doit rester 4 à 5  $\mu\text{L}$  non réabsorbés par le gel, dans le cas contraire on ajoute 4 à 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM. La digestion est réalisée à 25°C durant 17 heures. Les peptides sont extraits du gel par 5  $\mu\text{L}$  d'une solution  $\text{H}_2\text{O}/\text{acétonitrile}/\text{HCOOH}$  (35/60/5 ; v/v/v).

#### 3.9.7.2. Nano HPLC

Le système HPLC utilisé est une CapLC (Micromass Ltd., Manchester, UK) qui permet l'injection automatique des échantillons et leur concentration sur une pré-colonne. L'échantillon injecté est concentré et dessalé sur une pré-colonne de 1mm de long et 300  $\mu\text{m}$  de diamètre interne remplie d'une phase stationnaire de type PepMap C18 de granulométrie 5  $\mu\text{m}$  et de porosité de 100 Å (LC-Pakings) à un débit de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  durant 3 minutes par une solution d'eau acidifiée par 0,1 % d'acide formique.

La pré-colonne est ensuite mise automatiquement à l'aide du "Stream Select" (Micromass Ltd., Manchester, UK) en ligne avec la colonne analytique. Les peptides retenus sur la pré-colonne sont élués à contre sens vers la colonne analytique. Les peptides sont séparés sur la colonne analytique de 15 cm long et 75  $\mu\text{m}$  de diamètre interne remplie d'une phase stationnaire de type PepMap C18 de granulométrie 3 $\mu\text{m}$  et de porosité 100 Å (LC-Packings).

La phase mobile A est une solution d'eau acidifiée par 0,1 % d'acide formique, la phase mobile B est une solution d'acétonitrile acidifiée par 0,1 % d'acide formique. L'éluion des peptides est réalisée à un débit de 200 nl/min par un gradient de 5 à 45 % de solvant B durant 35 minutes, puis 95 % de solvant B durant 15 minutes et ré-équilibrée 20 minutes par une solution d'eau acidifiée par 0,1 % d'acide formique.

#### 3.9.7.3. Spectrométrie de masse.

Les analyses MS et MS/MS sont réalisées sur un Q/TOF 2 (Micromass Ltd., Manchester, UK) équipé d'une source Z-spray et d'une jonction liquide. L'instrument se compose d'une source à ionisation électrospray, d'un quadropôle jouant un rôle de filtre de masse, d'un hexapôle qui est la cellule de collision et d'un tube de vol placé de manière orthogonale qui est l'analyseur. Les

données de nano LC/MS/MS sont acquises en utilisant une énergie de collision propre à chaque ion précurseur doublement ou triplement chargé détecté par l'analyseur à temps de vol puis isolé par le quadropôle et fragmenté par l'hexapôle.

#### 3.9.7.4. Le traitement et l'analyse des données.

Le traitement des données MS/MS est réalisées automatiquement par l'application Process du logiciel ProteinLynx (Micromass Ltd., Manchester, UK).

Les données ainsi générées sont ensuite utilisées pour réaliser des recherches dans la banque NCBI à l'aide de deux moteurs de recherche : Global Server (MicroMass, Ltd., Manchester, UK) et Mascot (Matrix Science Ltd., London UK).

#### **3.10. ELIMINATION DE L'AZOCASEINE PAR LES BOUES ACTIVEES .**

5 mL de boues sont prélevés et centrifugés à 3 000 x g pendant 10 min. 1 mL de surnageant est prélevé est mélangé avec 1 mL de NaOH 0,1 M. L'absorbance est lue à 440 nm. La concentration en azocaséine est déterminée à partir d'une gamme étalon de 10 à 150 mg L<sup>-1</sup> (Sarath *et al.*, 1989).



---

4. CARACTERISATION D'ENZYMES  
EXTRACELLULAIRES ASSOCIEES AUX  
POLYMERES EXTRACELLULAIRES (EPS) DES  
FLOCS DE BOUES ACTIVEES.

---

#### 4.1. INTRODUCTION.

Les agrégats biologiques issus des stations d'épuration à boues activées sont composés d'une communauté microbienne très hétérogène (Seviour et Blackall, 1999). La matrice extracellulaire des agrégats est essentielle à leur cohésion et d'une manière générale à la stabilité de l'écosystème (Flemming *et al.*, 2000). Cette matrice est formée de macromolécules organiques regroupées sous le terme global de substances polymériques extracellulaires (EPS), associés à une fraction inorganique, en particulier des cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) (Bruus *et al.*, 1992). Les EPS ont pour origine le métabolisme bactérien, la lyse cellulaire et les eaux usées. Ainsi, les EPS sont composés en particulier de protéines, de polysaccharides, de substances humiques, d'acides nucléiques, et de lipides (Conrad *et al.*, 2003b; Frønd *et al.*, 1996; Jorand *et al.*, 1995). La capacité hydrolytique des EPS a été clairement démontrée à l'aide de substrats de synthèse, permettant la mise en évidence de sept activités enzymatiques différentes (estérase, Leu-aminopeptidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase, chitinase et lipase) (Frønd *et al.*, 1995), et à l'aide de substrats naturels (fraction colloïdale des eaux usées) (Guellil *et al.*, 2001a).

Notre hypothèse est que la structure agrégée est avantageuse pour les micro-organismes puisque les EPS permettraient simultanément :

- 1) l'adsorption des substrats macromoléculaires (Guellil *et al.*, 2001b),
- 2) la rétention et la stabilisation d'exo-enzymes hydrolytiques (Frønd *et al.*, 1995).

L'hydrolyse des composés organiques par les exo-enzymes bactériennes constitue *a priori* l'étape clef de l'élimination de la matière organique par les flocs de boues activées. Cependant, relativement peu de travaux se sont intéressés aux enzymes hydrolytiques extracellulaires associées aux EPS des agrégats bactériens. Aussi, les objectifs de cette partie expérimentale ont été de :

- 1) choisir une technique d'extraction des EPS compatibles avec l'analyse des activités enzymatiques,
- 2) qualifier les enzymes hydrolytiques extracellulaires associées aux EPS des flocs de boues activées, à l'aide de tests semi-quantitatifs permettant la mise en évidence de 19 activités enzymatiques différentes, en particulier des activités protéolytiques, glycolytiques et lipolytiques,
- 3) quantifier l'activité hydrolytique de quelques-unes de ces enzymes (Leu-aminopeptidase, protéase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -amylase et  $\text{C}_4$ -estérase), à l'aide de substrats de synthèse chromogènes spécifiques,
- 4) déterminer les paramètres cinétiques (constante de Michaelis et vitesse d'hydrolyse maximale) de deux des activités enzymatiques (Leu-aminopeptidase et  $\alpha$ -glucosidase),
- 5) déterminer la température optimale de certaines enzymes (Leu-aminopeptidase,  $\alpha$ -glucosidase et protéase).



#### 4.2. CHOIX D'UNE TECHNIQUE D'EXTRACTION.

Un nombre considérable de techniques d'extraction des EPS des agrégats ou des biofilms bactériens sont répertoriées dans la littérature (cf. Tableau 2.1). L'objet de notre travail visant à l'étude des enzymes extracellulaires associées aux EPS, nous avons orienté le choix de la méthode d'extraction sur des techniques réputées peu destructives, avec un enjeu double, qui consiste d'une part à conserver l'intégrité des enzymes extraites et d'autre part à limiter la contamination de l'extrait par des enzymes intracellulaires issues de la lyse bactérienne.

La dispersion des floccs de boues activées par l'application d'ultrasons conduit à la dispersion des floccs et à la libération de cellules bactériennes et de polymères extracellulaires (Brown et Lester, 1980; Jorand *et al.*, 1995).

L'extraction des polymères extracellulaires à l'aide d'une résine échangeuse de cations (Dowex-Na<sup>+</sup>, 50x8) combinée à des forces de cisaillement (Jahn et Nielsen, 1995) est basée sur la destruction des agrégats par le piégeage des cations divalents comme le calcium. C'est une technique intéressante car elle n'implique pas l'ajout d'un composé chimique. Elle s'avère être une méthode de référence concernant l'extraction des enzymes extracellulaires des floccs de boues activées (Frøund *et al.*, 1995).

Des détergents non ioniques, comme le Triton X-100 sont classiquement utilisés pour extraire les molécules associées aux membranes bactériennes, en particulier les ecto-enzymes (Tavares et Sellstedt, 2000). L'ajout de Triton X-100 à une suspension bactérienne issue d'un milieu aqueux libère la quasi-totalité des activités aminopeptidase,  $\beta$ -glucosidase et phosphatase alcaline dans le milieu aqueux (Chróst, 1991; Vives Rego *et al.*, 1985). Ce détergent a aussi montré son efficacité à libérer de boues anaérobies les activités uréase (50 %), phosphatase acide (40 %), protéase (45 %), et cellulase (30 %) (Maunoir *et al.*, 1991). L'utilisation de Triton X-100 combinée à l'application d'ultrasons (200 W, 15 fois 2 min) permet de libérer une grande quantité d'activités protéase et lipase des floccs de boues activées en comparaison avec d'autres méthodes comme l'utilisation d'une résine échangeuse de cations ou d'EDTA (Gessesse *et al.*, 2003). Cependant, considérant la puissance et le temps d'application des ultrasons utilisés, cette méthode provoque certainement une lyse cellulaire importante et la contamination des extraits par des enzymes intracellulaires.

##### Protocole.

L'effet de trois méthodes d'extraction différentes sur la libération des polymères extracellulaires (EPS) et des enzymes associées a été testé (cf. 3.5):

- 1) l'application d'ultrasons (sonde de 19 mm ; 39 W ; 20 s) (US),
- 2) l'application d'ultrasons (sonde de 19 mm ; 39 W ; 20 s) suivie de l'utilisation d'une résine échangeuse de cations (Dowex-Na<sup>+</sup> 50 x 8 ; 45 min ; 400 tr min<sup>-1</sup>) (US + résine),
- 3) l'application d'ultrasons (sonde de 19 mm ; 39 W ; 20 s) suivie de l'utilisation d'un détergent non ionique (Triton X-100 ; 0,5 % ; 45 min ; 400 tr min<sup>-1</sup>) (US + détergent).

Résultats.

Nos résultats montrent que la fraction protéique est plus importante dans les extraits US + résine (31,6 %) que dans les extraits US (23,8 %), les extraits US + détergent (9,9 %) et le témoin c'est-à-dire la boue non traitée (quantité non détectable) (Tableau 4. 1). La quantité de protéines libérée dans les extraits US + détergent est de deux à trois fois plus faible en comparaison des deux autres techniques. Il est vraisemblable que la quantité de protéines dans l'extrait US + détergent ait été sous-évaluée en raison de l'interférence du Triton X-100 avec le dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al.* (1951. A partir d'une concentration de détergent de 0,01 mg mL<sup>-1</sup>, la valeur de l'absorbance du blanc est augmentée (Peterson, 1979).

Tableau 4. 1 : Comparaison de la composition chimique et des activités enzymatiques des EPS extraits des boues n° 37 (*cf.* Annexe 1) par trois techniques d'extraction (n = 1; moyenne ± erreur sur la mesure) : l'application d'ultrasons (US), l'application d'ultrasons suivie de l'utilisation d'une résine échangeuse de cation (US + résine) et l'application d'ultrasons suivie de l'utilisation d'un détergent (US + détergent).

Paramètres	Boue non traitée	US	US+résine	US + détergent
Protéines <sup>(1)</sup>	nd	238 ± 2,7	316 ± 3,1	98,6 ± 0,3
Subst. humiques <sup>(2)</sup>	nd	92,8 ± 2,3	272 ± 2,4	91,1 ± 0,3
Protéase <sup>(3)</sup>	nd	8,43 ± 0,5	5,83 ± 0,1	4,80 ± 0,3
Leu-aminopeptidase <sup>(4)</sup>	nd	10,2 ± 0,04	12,4 ± 0,02	3,7 ± 0,02
α-glucosidase <sup>(4)</sup>	nd	0,54 ± 0,07	1,27 ± 0,03	0,16 ± 0,003

<sup>(1)</sup> mg équivalent albumine bovine g<sup>-1</sup> MV<sub>EPS</sub>; <sup>(2)</sup> mg équivalent acide humique g<sup>-1</sup> MV<sub>EPS</sub>;

<sup>(3)</sup> abs min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> MV<sub>EPS</sub>; <sup>(4)</sup> μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> MV<sub>EPS</sub>; nd : non détectable.

La quantité d'enzyme extraite varie en fonction de l'activité enzymatique testée, mais la méthode d'extraction combinant l'utilisation d'ultrasons et de résine est globalement la plus efficace. L'utilisation de détergent a probablement un effet négatif direct sur les activités enzymatiques puisque les trois activités enzymatiques des extraits US + détergent sont inférieures à celles des extraits US. En effet, le Triton X-100 n'a aucun effet sur l'activité d'enzymes purifiées, par contre la plupart des enzymes sont inhibées par ce détergent lorsque leur activité est détectée dans un échantillon de sol (Frankenberger et Johanson, 1986). La diminution de l'activité protéase d'environ 30 % dans l'extrait US + résine par rapport à l'extrait US peut s'expliquer par le piégeage des cations divalents (Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) qui sont nécessaires au fonctionnement des métalloprotéases ou par l'adsorption sur la résine de protéines portant des charges positives comme l'a suggéré Azeredo *et al.* (1998). L'activité Leu-aminopeptidase semble plus facilement extractible que l'activité α-glucosidase, car la seule application d'ultrasons permet de récupérer respectivement dans l'extrait US 82 % et 42 % des activités Leu-aminopeptidase et α-glucosidase présentes dans l'extrait US + résine.

L'extraction des polymères extracellulaires présente a priori deux inconvénients :

- 1) la lyse cellulaire par les ultrasons et les forces de cisaillement dues au mélange avec les billes de résine, ayant pour conséquence la contamination des extraits par des enzymes intracellulaires,
- 2) la contamination des extraits par des cellules bactériennes.

##### Estimation de la lyse cellulaire.

L'utilisation d'un marqueur ayant une localisation exclusivement intracellulaire, comme la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), a montré que la lyse cellulaire était relativement faible (Tableau 4. 2). Ainsi, l'activité G-6-PDH (cf. 3.7.4.10) des extraits US + résine (cf. 3.5.2) correspond à 23 % de l'activité mesurée dans un témoin positif correspondant à un extrait obtenu après une extraction prolongée de 180 min au lieu de 45 min. En effet, l'agitation des boues en présence de la résine échangeuse de cations provoque une lyse cellulaire significative à partir de 60 min d'agitation (Frøund *et al.*, 1996).

Tableau 4. 2 : Activité glucose-6-phosphate déshydrogénase des EPS, extraits par l'application d'ultrasons (sonde de 19 mm ; 39 W ; 20 s) et par une résine échangeuse de cations (Dowex-Na<sup>+</sup> 50x8 ; 45 min ; 400 tr min<sup>-1</sup>). Le contrôle positif correspond à des EPS extraits par l'application d'ultrasons (sonde de 19 mm ; 39 W ; 20 s) et par la résine échangeuse de cations pendant un temps prolongé (Dowex-Na<sup>+</sup> 50x8 ; 180 min ; 400 tr min<sup>-1</sup>).

Echantillons	G-6-PDH ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}$ )
EPS (US + résine 45 min)	0,33
EPS (US + résine 180 min)	1,46

##### Estimation de la contamination bactérienne des EPS.

La contamination des extraits par des cellules bactériennes est cependant inévitable. Cette contamination ( $2,2 \cdot 10^4 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) a été estimée à moins de 1 % du nombre total de cellules de la boue, mais cela reste une quantité de bactéries relativement importante. La filtration des EPS sur une membrane hydrophile en fluorure de polyvinylidène (PVDF) de  $0,45 \mu\text{m}$  de porosité permet d'éliminer la totalité des bactéries cultivables, sans éliminer les macromolécules d'intérêt comme les protéines (pas de différence significative entre EPS filtrés et non filtrés) (Tableau 4.3). D'autre part, les bactéries présentes dans les extraits ne semblent pas contribuer à l'activité enzymatique, puisque la comparaison des activités enzymatiques des extraits filtrés et non filtrés ne montre pas non plus de différence significative.

#### 4. Caractérisation de quelques enzymes extracellulaires associées aux EPS.

Tableau 4. 3: Comparaison des caractéristiques des EPS et des EPS filtrés sur une membrane de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosité (filtre en PVDF Durapore® HVLP 047 00). n : nombre d'extraits ; UFC : unités formant colonies sur milieu PCA (cf. 3.8.1.2) au bout de 7 jours à  $22 \pm 1$  °C ( cf. 3.8.3).

	n	EPS	EPS filtrés
Bactéries (UFC/mL)	3	$2,2 \cdot 10^4 \pm 6,8 \cdot 10^3$	0
Protéines <sup>(1)</sup>	6	$75,2 \pm 34,0$	$68,5 \pm 22,5$
Substances humiques <sup>(2)</sup>	6	$20,8 \pm 23,1$	$13,1 \pm 7,0$
Polysaccharides <sup>(3)</sup>	6	$29,4 \pm 10,4$	$28,3 \pm 9,0$
Leu-aminopeptidase <sup>(4)</sup>	8	$1,8 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,6$
$\alpha$ -glucosidase <sup>(4)</sup>	4	$0,28 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,04$
Protéase <sup>(5)</sup>	5	$1,4 \pm 0,3$	$1,33 \pm 0,3$
$\alpha$ -amylase	3	$0,38 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,01$

<sup>(1)</sup> mg équivalent albumine bovine  $\text{g}^{-1} \text{MV}_{\text{boues}}$ ; <sup>(2)</sup> mg équivalent acide humique  $\text{g}^{-1} \text{MV}_{\text{boues}}$ ; <sup>(3)</sup> mg équivalent glucose  $\text{g}^{-1} \text{MV}_{\text{boues}}$ ; <sup>(4)</sup>  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{MV}_{\text{boues}}$ ; <sup>(5)</sup>  $\text{abs}_{340 \text{ nm}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{MV}_{\text{boues}}$ .

Au vu de l'ensemble de ces résultats, l'application d'ultrasons combinée à la résine échangeuse de cations est la méthode retenue pour l'extraction des EPS. Cette technique d'extraction permet de récupérer principalement des molécules extracellulaires solubles dans l'eau, libérées lors de la déstructuration des agrégats par l'action des ultrasons, des forces de cisaillement et le piégeage des cations divalents.

### 4.3. CARACTERISATION CHIMIQUE DES POLYMERES EXTRACELLULAIRES (EPS) EXTRAITS DES BOUES ACTIVEES.

Les boues activées prélevées à la station d'épuration de Nancy-Maxéville (cf. 3.1) ont été systématiquement caractérisées par leur teneur en matières sèches et en matières volatiles (cf. 3.3.1), leur capacité à décanter (cf. 3.3.2) et des analyses physico-chimiques (cf. 3.3.3). Les polymères extracellulaires ont été extraits des boues activées par une méthode combinant l'application d'ultrasons et une résine échangeuse de cations (cf. 3.5.2). Les EPS ont été caractérisés par leur composition chimique en protéines (cf. 3.6.3.1.1), substances humiques (cf. 3.6.3.1.1), polysaccharides (cf. 3.6.3.2), en acides nucléiques (cf. 3.6.3.3), et en acides aminés (cf. 3.6.3.4).

#### 4.3.1. Caractérisation des boues activées.

L'analyse d'une trentaine d'échantillons de boues activées prélevés à la station d'épuration de Nancy-Maxéville sur une période de trois ans montre une valeur de matières sèches (MS) moyenne de  $2,3 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$  et de matières volatiles (MV) moyenne de  $1,6 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$  (Tableau 4. 4). Ces valeurs sont relativement constantes parce qu'elles sont régulées par les exploitants de la station d'épuration. Par contre, les variations de température sont évidemment dépendantes des variations saisonnières. Les valeurs de pH du surnageant sont comprises entre 6,7 et 7,9. La conductivité (k) moyenne du surnageant est de  $811 \mu\text{S cm}^{-1}$ , mais peut varier du simple au triple. La capacité des boues à décanter, estimée par l'indice de décantation des boues (SVI), montre une valeur moyenne ( $124 \text{ mL g}^{-1}$ ) correspondant à une bonne capacité de décantation, mais la valeur maximale ( $212 \text{ mL g}^{-1}$ ) traduit l'existence de périodes de dysfonctionnement.

Tableau 4. 4 : Caractéristiques physico-chimiques moyennes des boues activées de la station d'épuration de Nancy-Maxéville prélevées sur une période de 3 ans.

Paramètres	n	Moyenne	Ecart-type	Valeur max.	Valeur min.	Variabilité
T (° C)	40	<b>14,0</b>	3,6	24,0	9,0	26%
pH	40	<b>7,4</b>	0,2	7,9	6,7	3%
k ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	39	<b>811</b>	176	1510	457	22%
MS ( $\text{g L}^{-1}$ )	45	<b>2,3</b>	0,6	4,7	1,2	25%
MV ( $\text{g L}^{-1}$ )	45	<b>1,6</b>	0,4	3,3	0,9	25%
MV/MS (%)	45	<b>70</b>	6	83	56	8%
SVI ( $\text{mL g}^{-1}$ )	43	<b>124</b>	33	212	71	26%

T : température ; k : conductivité ; MS : matières sèches ; MV : matières volatiles.

Les valeurs brutes sont présentées en Annexe 1.

4.3.2. Caractérisation chimique des polymères extracellulaires (EPS).

Les polymères extracellulaires (EPS) extraits des boues activées représentent en masse 10 à 24 % des matières volatiles des boues, la valeur moyenne des matières volatiles des EPS étant de  $0,24 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$  ( $n=15$ ) et variant de  $0,16 \text{ g L}^{-1}$  au minimum à  $0,39 \text{ g L}^{-1}$  au maximum. A titre d'exemple, la quantité d'EPS extraits a été estimée d'une manière globale à 14 % (Urbain *et al.*, 1993a) et 16,5 % (Liu et Fang, 2002) en masse des matières volatiles des boues, alors que la quantité totale d'EPS atteindrait de 43,7 % (Liu et Fang, 2002) à 89 % (Zhang et Fang, 2001).

Les EPS extraits des boues activées ont été caractérisés par leur composition en protéines, en substances humiques, en polysaccharides, en acides nucléiques et en acides aminés, qui représentent les composés classiquement recherchés dans ce type de mélange (Tableau 4. 5). L'analyse montre que les protéines sont le groupe dominant, avec une concentration moyenne d'environ 50 à 60  $\text{mg g}^{-1}$  MV. La prédominance des protéines sur les autres composés est classiquement observée pour des EPS issus de systèmes bactériens mixtes, comme les boues activées (Bura *et al.*, 1998; Frølund *et al.*, 1996; Jorand *et al.*, 1995; Sponza, 2002; Urbain *et al.*, 1993b; Wilen *et al.*, 2003). La concentration en protéines est systématiquement supérieure à la concentration en polysaccharides avec un ratio moyen protéines/polysaccharides de  $3,3 \pm 1,0$  ( $cv = 31 \%$ ). La concentration en protéines des EPS des boues est ainsi corrélée à la concentration en polysaccharides au seuil de 99 % ( $p=0,0001$ ) avec un coefficient de corrélation linéaire de 0,74. La concentration en acides nucléiques des EPS des boues est aussi fortement corrélée avec la concentration en polysaccharides au seuil de 95 % ( $p=0,0045$ ) avec un coefficient de corrélation linéaire de 0,94 et un ratio acides nucléiques/polysaccharides moyen de  $0,93 \pm 0,12$  ( $cv = 13 \%$ ). Cette forte corrélation a été observée par Urbain *et al.* (1993a) avec un ratio acides nucléiques/polysaccharides moyen de  $1,19 \pm 0,18$  ( $cv = 15 \%$ ). La concentration élevée en ADN extracellulaire peut s'expliquer par la stabilisation des acides nucléiques et l'inactivation des nucléases par d'autres composés des EPS, comme c'est le cas dans les sols en présence de particules d'argiles (Demanèche *et al.*, 2001).

Tableau 4. 5 : Composition chimique moyenne des extraits de polymères extracellulaires issus des floccs de boues activées de la station d'épuration de Nancy-Maxéville (années 1999 à 2001)

Composés	n	Moyenne	Ecart-type	Valeur max.	Valeur min.	Variabilité
<b>Protéines</b> <sup>(1)</sup>	30	<b>59,2</b>	21,6	131,8	16,9	36%
<b>Subst. Humiques</b> <sup>(2)</sup>	29	<b>16,1</b>	22,2	84,8	1,7	139%
<b>Polysaccharides</b> <sup>(3)</sup>	29	<b>21,7</b>	9,5	38,7	10,4	44%
<b>Ac. nucléiques</b> <sup>(4)</sup>	15	<b>15,4</b>	4,4	25,7	7,7	29%
<b>NH2-terminaux</b> <sup>(5)</sup>	10	<b>13,2</b>	2	15,7	9,7	15%

<sup>(1)</sup> mg équivalent albumine bovine  $\text{g}^{-1}$  MV ; <sup>(2)</sup> mg équivalent acide humique  $\text{g}^{-1}$  MV ; <sup>(3)</sup> mg équivalent glucose  $\text{g}^{-1}$  MV ; <sup>(4)</sup> mg équivalent ADN de thymus de veau  $\text{g}^{-1}$  MV ; <sup>(5)</sup> mg équivalent Alanine  $\text{g}^{-1}$  MV. Les valeurs brutes sont présentées en Annexe 2.

La variabilité temporelle est relativement peu marquée considérant qu'il s'agit d'un système soumis constamment aux variations des conditions environnementales, avec par exemple 50 % des valeurs de la concentration en protéines comprises entre 49 et 68 mg g<sup>-1</sup> MV (Figure 4.1). Certains points semblent cependant s'écarter plus fortement de la distribution des valeurs, suggérant une modification de la composition du système, probablement en réponse à certains paramètres environnementaux comme la composition des eaux usées. La recherche de corrélations entre la composition des EPS et les caractéristiques physico-chimiques des boues présentées dans la tableau 4.4 n'a pas abouti.

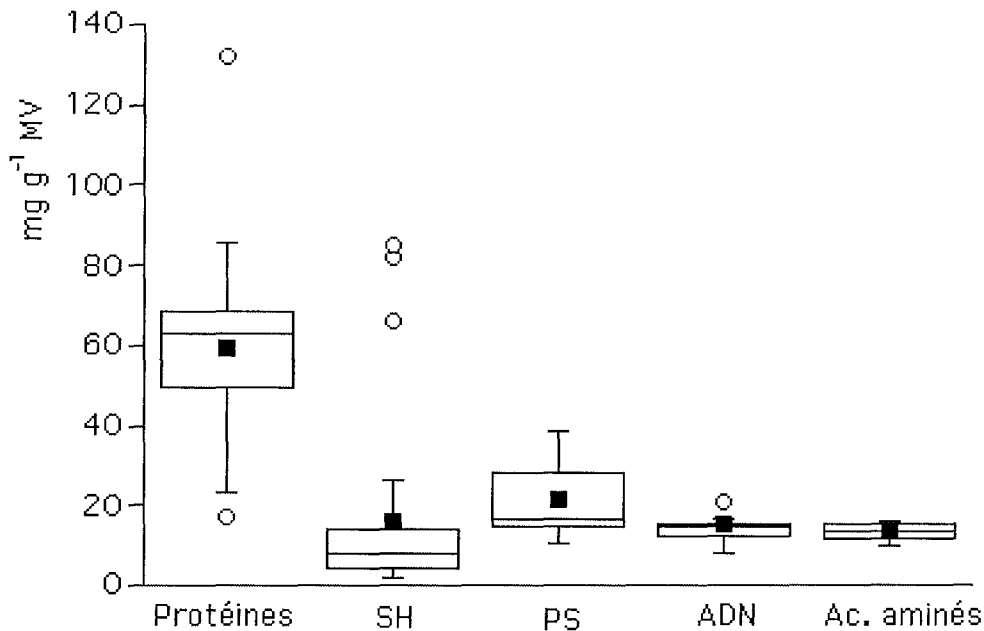


Figure 4. 1 : Variabilité de la composition chimique des extraits de polymères extracellulaires issus des floccs de boues activées de la station d'épuration de Nancy-Maxéville (années 1999 à 2001) : valeurs moyennes (■) de la composition en protéines exprimée en mg équivalent albumine bovine g<sup>-1</sup> MV, en substances humiques (SH) exprimée en mg équivalent acide humique g<sup>-1</sup> MV, en polysaccharides (PS) exprimée en mg équivalent glucose g<sup>-1</sup> MV, en ADN exprimée en mg équivalent ADN de thymus de veau g<sup>-1</sup> MV, en acides aminés exprimée en mg équivalent Alanine g<sup>-1</sup> MV. Chaque boîte contient 50 % des données avec la valeur médiane matérialisée par une ligne horizontale. La barre verticale représente l'intervalle entre la valeur maximale et minimale de la distribution. Les points considérés comme hors de la distribution des valeurs (O) ont une valeur supérieure à la valeur correspondant au quartile supérieur + 1,5 x la distance interquartile (DIQ) ou une valeur inférieure à la valeur correspondant au quartile inférieur - 1,5 x la distance interquartile (DIQ). Les valeurs brutes sont présentées en Annexe 2.

#### 4. Caractérisation de quelques enzymes extracellulaires associées aux EPS.

D'une manière générale, la composition des échantillons issus des milieux environnementaux dépend fortement de la méthode de dosage et des étalons utilisés (Raunkjær *et al.*, 1994). Les EPS extraits des boues forment un mélange très complexe, qui contient en particulier des hétéropolymères et des composés pouvant interférer avec les dosages biochimiques. Ainsi, les dosages biochimiques utilisés ne permettent pas de quantifier spécifiquement les hétéropolymères, comme les glycoprotéines ou les glycolipides. Comme cela a été proposé par Frølund *et al.*, (1996), les valeurs d'absorbance obtenues lors du dosage des protéines par la méthode de Lowry ont été corrigées afin de prendre en compte le développement de couleur non spécifique, qui serait dû principalement à des acides humiques ou des acides aminés chromogènes (*cf.* 3.6.3.1.1). La concentration en protéines est ainsi surestimée de 9 à 56 % selon la date de prélèvement lorsque ces interférences ne sont pas prises en compte (Annexe 2). Tous les composés qui interfèrent avec le dosage des protéines par la méthode de Lowry ont été regroupés sous le terme de substances humiques, bien qu'il soit abusif étant donné les nombreux composés qui sont susceptibles d'interférer avec ce dosage (Peterson, 1979).

Afin d'estimer approximativement la quantité de polymères non analysés par les essais biochimiques, le bilan en masse de carbone (C) a été déterminé à partir des concentrations des différents composés rapportées à la quantité de carbone organique total (COT), égale à  $0,49 \text{ g C}^{-1} \text{ MV}_{\text{EPS}}$  (Tableau 4. 6). La quantité de carbone contenue dans chacun des composés a été estimée à l'aide des facteurs de conversion suivants (Nielsen et Jahn, 1999):

- $0,375 \text{ g C g}^{-1}$  équivalent albumine,
- $0,28 \text{ g C / g}$  équivalent acide humique,
- $0,378 \text{ g C g}^{-1}$  équivalent glucose,
- $0,25 \text{ g C g}^{-1}$  équivalent ADN de thymus de veau,
- $0,409 \text{ g C g}^{-1}$  équivalent Alanine.

Tableau 4. 6 : Composition des EPS extraits des boues n° 35 (*cf.* Annexe 1) rapportée en quantité de carbone (C) par rapport à la quantité de carbone organique total (COT) estimée à  $0,49 \text{ g C g}^{-1} \text{ MV}_{\text{EPS}}$ , exprimée en  $\text{g C g}^{-1} \text{ COT}$  et en pourcentage.

Composés	$\text{mg g}^{-1} \text{ MV}_{\text{EPS}}$	$\text{mg g}^{-1} \text{ COT}$	$\text{g C g}^{-1} \text{ COT}$	
Protéines	318,1	654	0,245	(24,5 %)
Polysaccharides	95,8	197	0,074	(7,4 %)
Subst. Humiques	82,8	170	0,048	(4,8 %)
Ac. nucléiques	72,0	148	0,037	(3,7 %)
Ac. aminés	94,2	194	0,079	(7,9 %)

Ainsi, le bilan en masse de carbone montre que seuls 48,4 % du COT a été attribué aux composés analysés, le carbone apporté par les protéines comptant pour la moitié du carbone analysé (24,5 %). A titre d'exemple, parmi les composés non analysés, les acides gras représentent  $0,018 \text{ g g}^{-1} \text{ MV}_{\text{EPS}}$  de la matière organique des EPS (Conrad *et al.*, 2003b).



#### **4.4. DIVERSITE ET VARIABILITE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES ASSOCIEES AUX EPS.**

La capacité hydrolytique des EPS extraits des boues a été déterminée de manière qualitative par la détection de 19 activités enzymatiques différentes et de manière quantitative à l'aide de substrats de synthèse. Si la variation spatiale des activités hydrolytiques des bous activées a été démontrée (Boczar *et al.*, 1992; Nybroe *et al.*, 1992), la variation temporelle des activités enzymatiques extracellulaires associées aux EPS n'a jamais été étudiée.

##### Protocole.

Deux approches ont été utilisées pour caractériser la diversité et la variabilité des activités enzymatiques extracellulaires associées aux EPS :

- 1) La première approche, de type semi-quantitative, a consisté à mesurer les activités enzymatiques extracellulaires associées aux EPS à l'aide d'une méthode colorimétrique semi-quantitative, les galeries API ZYM<sup>®</sup>, permettant la mise en évidence de 19 activités différentes (cf. 3.7.4.1).
- 2) La seconde approche a été une démarche quantitative. Sept activités enzymatiques ont été mesurées à l'aide de substrats de synthèse spécifiques des activités enzymatiques protéolytique (protéase et Leu-aminopeptidase), glycolytique ( $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase et  $\alpha$ -amylase) et lipolytique (C<sub>4</sub>-estérase) (cf. 3.7.4.2 à 3.7.4.8).

##### Résultats.

Les résultats obtenus traduisent une importante diversité enzymatique avec plus de 16 activités différentes systématiquement présentes (Tableau 4. 7). L'intensité de la coloration obtenue permet de distinguer clairement trois groupes d'enzymes en fonction de leur activité :

- 1) un groupe d'enzymes ayant des activités systématiquement très importantes (unités arbitraires supérieures ou égales à 4) à savoir les activités phosphatase alcaline, Leu-aminopeptidase, phosphatase acide, naphтол-AS-BI-phosphohydrolase,  $\beta$ -galactosidase et N-acétyl- $\beta$ -glucosamidase,
- 2) un groupe d'enzymes dont les activités sont variables en fonction de l'échantillon (unités arbitraires comprises entre 2 et 4) à savoir les activités C<sub>4</sub>-estérase, estérase lipase, lipase, Valine-aminopeptidase, Cystine-aminopeptidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase et  $\beta$ -glucosidase,
- 3) un groupe d'enzymes dont les activités sont très faibles (unités arbitraires inférieures ou égales à 1) à savoir les activités trypsine,  $\alpha$ -chymotrypsine et  $\alpha$ -mannosidase ou systématiquement nulles ( $\alpha$ -fucosidase).

#### 4. Caractérisation de quelques enzymes extracellulaires associées aux EPS.

Tableau 4. 7: Signature enzymatique semi-quantitative (échelle arbitraire de 0 à 5) des EPS extraits de 10 boues différentes mesurée à l'aide de galeries API ZYM®. Les caractéristiques physico-chimiques des boues sont présentées en Annexe 1 et la composition chimique des EPS en Annexe 2.

	EPS									
	A6	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16
Phosphatase alcaline	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
C <sub>4</sub> -estérase	3	3	1	3	1	3	3	1	1	1
Estérase lipase	3	4	2	3	5	4	4	4	5	4
Lipase	2	5	0	3	3	3	3	3	3	1
Leu-aminopeptidase	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Valine-aminopeptidase	2	3	1	4	2	2	3	3	4	3
Cystine-aminopeptidase	2	1	0	2	1	1	2	2	3	2
Trypsine	1	1	0	2	1	1	1	1	2	1
Chymotrypsine	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1
Phosphatase acide	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5
$\alpha$ -galactosidase	1	3	4	2	3	3	3	1	3	1
$\beta$ -galactosidase	5	5	4	5	5	5	4	4	5	5
$\beta$ -glucuronidase	0	1	0	5	4	1	2	0	2	1
$\alpha$ -glucosidase	2	2	1	5	4	3	2	1	3	2
$\beta$ -glucosidase	3	4	2	5	5	4	1	1	3	2
N-acétyl- $\beta$ -glucosamidase	5	5	3	5	5	3	5	5	5	5
$\alpha$ -mannosidase	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
$\alpha$ -fucosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Les variations temporelles des activités enzymatiques extracellulaires associées aux EPS ont été étudiées de manière quantitative sur une période de trois ans pour les activités protéase, Leu-aminopeptidase et une période de 9 mois pour l'activité  $\alpha$ -glucosidase et de 6 mois pour les activités C<sub>4</sub>-estérase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase et  $\alpha$ -amylase (Figure 4. 2). La variabilité temporelle est relativement peu marquée considérant qu'il s'agit d'un système soumis constamment aux variations des conditions environnementales. Le rapport entre la valeur maximale et la valeur minimale est de l'ordre de 2 pour les activités  $\alpha$ -galactosidase et  $\alpha$ -amylase, égal à 3,4 pour l'activité Leu-aminopeptidase, de l'ordre de 5 pour les activités  $\alpha$ -glucosidase et  $\beta$ -glucosidase, égal à 7,8 pour l'activité C<sub>4</sub>-estérase et de 15,8 pour l'activité protéase. Certains points semblent cependant s'écarter plus fortement de la distribution des valeurs, suggérant une modification de la composition du système, probablement en réponse à certains paramètres environnementaux comme la composition des eaux usées. La recherche de corrélations entre les activités enzymatiques extracellulaires associées aux EPS et la composition des EPS présentées

dans le tableau 4.5 ou les caractéristiques physico-chimiques des boues présentées dans la tableau 4.4 n'a pas abouti.

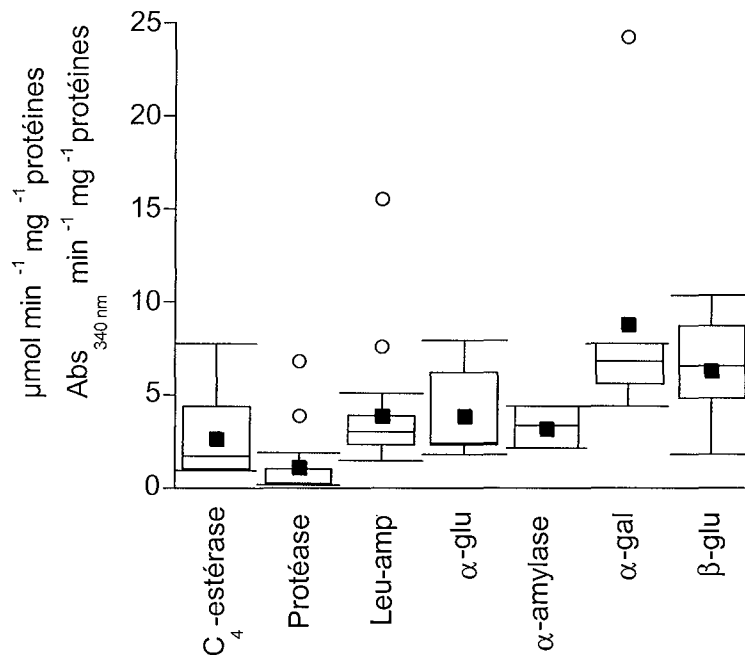


Figure 4. 2 : Variabilité temporelle des activités enzymatiques extracellulaires associées aux EPS : valeurs moyennes (■) des activités C<sub>4</sub>-estérase exprimée en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines} \times 10$ , protéase exprimée en  $\text{Abs}_{340 \text{ nm}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines} \times 10$ , Leu-aminopeptidase (Leu-amp) exprimée en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines} \times 100$ ,  $\alpha$ -glucosidase ( $\alpha$ -glu) exprimée en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines} \times 1000$ ,  $\alpha$ -amylase exprimée en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines} \times 10000$ ,  $\alpha$ -galactosidase ( $\alpha$ -gal) exprimée en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines} \times 100000$  et  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -glu) exprimée en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines} \times 100000$ . Chaque boîte contient 50 % des données avec la valeur médiane matérialisée par une ligne horizontale. La barre verticale représente l'intervalle entre la valeur maximale et minimale de la distribution. Les points considérés comme hors de la distribution des valeurs (O) ont une valeur supérieure à la valeur correspondant au quartile supérieur + 1,5 x la distance interquartile (DIQ) ou une valeur inférieure à la valeur correspondant au quartile inférieur - 1,5 x la distance interquartile (DIQ). Les valeurs brutes sont présentées en Annexe 3.

La diversité des activités hydrolytiques présentes et les vitesses observées reflètent la capacité des agrégats bactériens à dégrader rapidement des composés organiques complexes et de nature variée, protéique, polysaccharidique ou lipidique. La plupart de ces activités enzymatiques ont été mises en évidence dans les boues activées (cf. Tableau 2.5), avec en particulier une prédominance des activités phosphatases et Leu-aminopeptidase (Boczar *et al.*, 1992). Cependant, seules deux études se sont intéressées aux enzymes extracellulaires associées aux EPS. Ainsi, à titre de comparaison, l'étude de Freund *et al.* (1995) montre la même hiérarchie des activités enzymatiques associées aux EPS, avec par ordre d'importance les activités lipolytiques et protéolytiques, puis glycolytiques. Toutefois, les activités observées sont nettement plus faibles, avec une activité estérase moyenne dans les extraits d'EPS de l'ordre de  $1,29 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines}$ , une activité Leu-aminopeptidase de l'ordre de  $5,18 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines}$ , une

activité  $\beta$ -glucosidase de l'ordre de  $2,96 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protéines et une activité  $\alpha$ -glucosidase de l'ordre de  $1,11 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protéines (Frøund *et al.*, 1995). L'étude de Gessesse *et al.* (2003) montre une activité lipase dans les extraits d'EPS de l'ordre de  $213,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  MV et une activité protéase de l'ordre de  $3,3 \text{Abs}_{340 \text{ nm}} \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  MV.

Les profils enzymatiques sont caractéristiques des EPS étudiés. Ils dépendent évidemment de la population microbienne qui compose les agrégats biologiques. La contribution des protozoaires à l'activité enzymatique extracellulaire associée aux EPS des boues activées ne peut pas être infirmée, mais les enzymes hydrolytiques des protozoaires sont généralement présentes dans des vacuoles de digestion intracellulaires et seraient inactives hors du micro-organisme, en particulier en raison du changement de pH dans le milieu externe (Vrba *et al.*, 1993). De plus, la production d'enzymes est certainement en relation avec la concentration dans les eaux usées des substrats naturels qu'elles hydrolysent. Ainsi, la prédominance des activités lipolytiques et protéolytiques sur les activités glycolytiques pourrait être en relation avec les proportions de lipides et de protéines qui semblent prédominer sur les polysaccharides dans les eaux usées (Henze, 1992; Raunkjær *et al.*, 1994).

#### 4.5. CARACTERISTIQUES CINÉTIQUES DES ENZYMES EXTRACELLULAIRES LEU-AMINOPEPTIDASE ET $\alpha$ -GLUCOSIDASE.

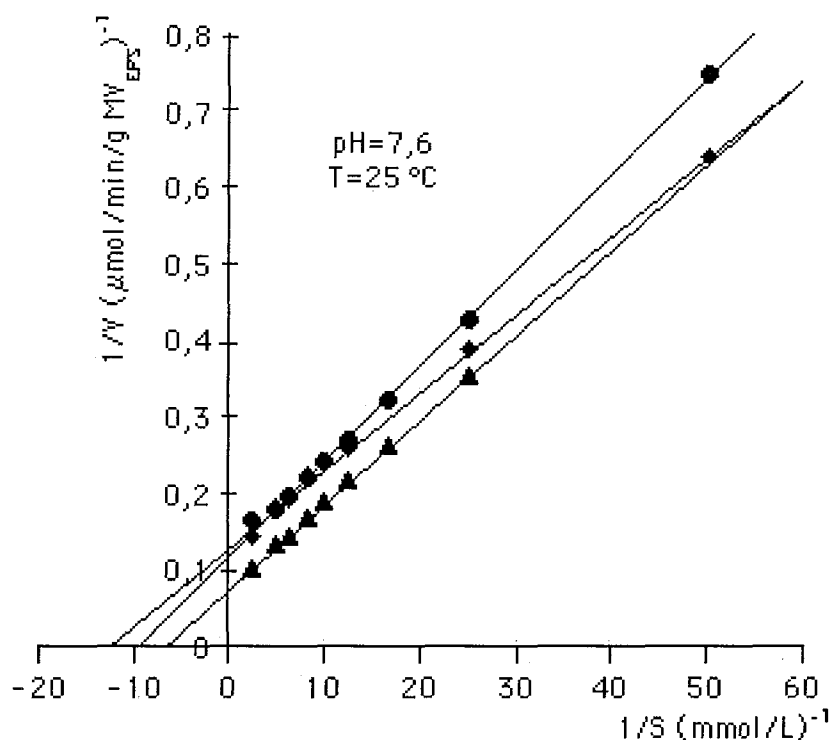
Les caractéristiques cinétiques des activités enzymatiques extracellulaires ont été étudiées pour deux substrats comportant une seule liaison à hydrolyser (L-Leu-*p*-nitroanilide et *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) correspondant aux activités Leu-aminopeptidase (*cf.* 3.7.4.2) et  $\alpha$ -glucosidase (*cf.* 3.7.4.3). Les substrats polymériques ont été exclus de cette étude, car leurs produits d'hydrolyse constituent un mélange complexe de composés qui peuvent être utilisés comme substrats et ne répondent pas au modèle d'hydrolyse de Michaelis et Menten.

##### Protocole.

Le modèle de Michaelis et Menten a été utilisé pour établir la courbe de saturation des activités Leu-aminopeptidase et  $\alpha$ -glucosidase, déterminant la constante de Michaelis ou affinité apparente ( $K_m$  app) et la vitesse maximale ( $V_m$ ) (*cf.* 3.7.2). Les vitesses d'hydrolyse ont été mesurées pour des concentrations croissantes en substrat, de 5 à 100 mg L<sup>-1</sup> en L-Leu-*p*-nitroanilide et de 20 à 400 mg L<sup>-1</sup> en *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside. Ce sont des vitesses apparentes globales correspondant à l'hydrolyse du substrat par toutes les enzymes qui en sont capables. Les paramètres cinétiques des activités Leu-aminopeptidase et  $\alpha$ -glucosidase ont été déterminés par régression linéaire à l'aide de la représentation de Lineweaver et Burk (*cf.* 3.7.2).

##### Résultats.

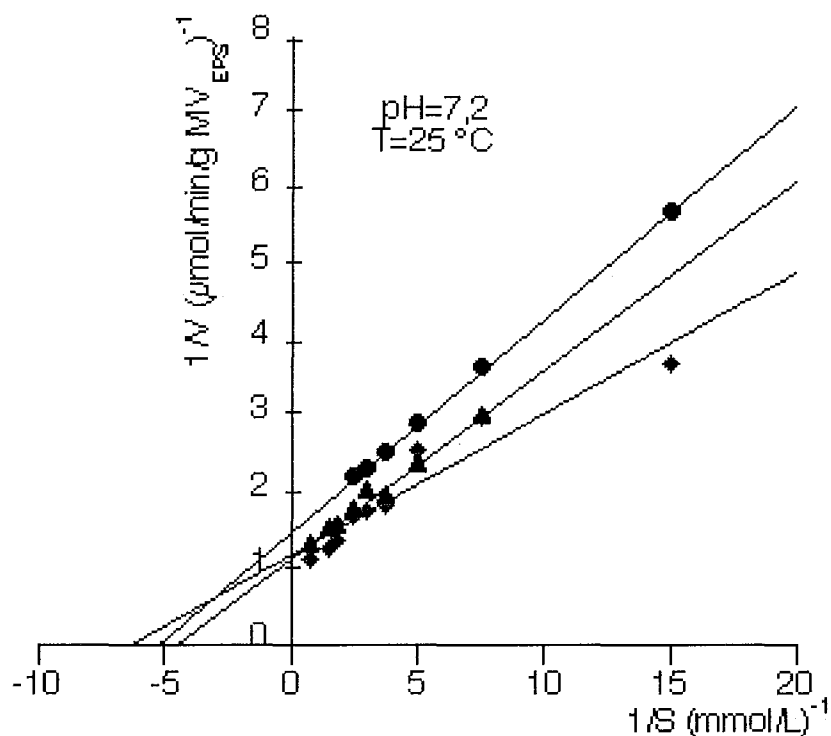
L'activité enzymatique Leu-aminopeptidase présente une constante de Michaelis apparente ( $K_m$  apparent) deux fois plus faible que celle de l'activité enzymatique  $\alpha$ -glucosidase (Figure 4. 3 et Figure 4. 4).



Essais	$K_m$ app ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$V_m$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MV}_{\text{EPS}}$ )	R
1	105,6	7,8	1,00
2	78,2	7,7	0,99
3	146,1	13,2	1,00
Moyenne	<b>110,0</b>	<b>9,6</b>	
Ecart-type	34,2	6,2	

$K_m$  app : constante de Michaelis apparente ou affinité apparente ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) ;  $V_m$  : vitesse d'hydrolyse maximale ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MV}_{\text{EPS}}$ ) ; R : coefficient de corrélation linéaire.

Figure 4. 3 : Détermination des paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_m$ ) de l'activité Leu-aminopeptidase des EPS à l'aide de la représentation de Lineweaver et Burk ( $n = 3$  extraits : n° 21, 24 et 25). Les caractéristiques physico-chimiques des boues sont présentées en Annexe 1 et la composition chimique des EPS est présentée en Annexe 3.



Essais	$K_m$ app ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$V_m$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MV}_{\text{EPS}}$ )	R
1	196,6	0,7	1,00
2	332,5	1,1	0,98
3	172,6	0,8	0,99
Moyenne	<b>233,9</b>	<b>0,9</b>	
Ecart-type	86,2	0,2	

$K_m$  app : constante de Michaelis apparente ou affinité apparente ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) ;  $V_m$  : vitesse d'hydrolyse maximale ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MV}_{\text{EPS}}$ ) ; R : coefficient de corrélation linéaire.

Figure 4. 4 : Détermination des paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_m$ ) de l'activité  $\alpha$ -glucosidase des EPS à l'aide de la représentation de Lineweaver et Burk ( $n = 3$  extraits : n° 20, 25 et 26). Les caractéristiques physico-chimiques des boues sont présentées en Annexe 1 et la composition chimique des EPS est présentée en Annexe 2.

Ainsi, l'affinité pour le substrat est deux fois plus importante pour l'activité Leu-aminopeptidase que pour l'activité  $\alpha$ -glucosidase. Les enzymes protéolytiques ont une activité maximale ( $V_m$ ) dix fois plus importante que les enzymes glycolytiques. Ce cas de figure a été observé dans le milieu marin où l'activité Leu-aminopeptidase a montré une affinité 2 à 5 fois plus importante et une vitesse maximale 8 à 25 fois plus importante que celles de l'activité  $\alpha$ -glucosidase (Unanue *et al.*, 1999).

Le temps de cycle  $T_t = \frac{K_m}{V_m}$  permet de comparer les activités enzymatiques de différents environnements. Le  $T_t$  de l'activité Leu-aminopeptidase associées aux EPS est en moyenne de

#### 4. Caractérisation de quelques enzymes extracellulaires associées aux EPS.

7 min, c'est-à-dire 20 fois moins important que celui de l'activité  $\alpha$ -glucosidase (161 min). Ainsi la biodégradation des composés de nature protéique par les enzymes extracellulaires associées aux EPS apparaît nettement plus rapide que la biodégradation des composés de nature polysaccharidique. La vitesse de biodégradation par les enzymes associées aux EPS des boues activées est d'une manière générale très élevée, traduisant une intense activité métabolique, par rapport aux temps de cycle répertoriés dans d'autres systèmes environnementaux, qui sont de l'ordre de plusieurs heures (Billen, 1991; Romani, 2000; Tholosan *et al.*, 1999) voire de plusieurs jours (Unanue *et al.*, 1999).

Les vitesses d'hydrolyse obtenues ne sont certainement pas représentatives des vitesses d'hydrolyse des substrats naturellement présents dans les eaux usées, mais la détermination des paramètres cinétiques a permis de comparer les activités enzymatiques du système à boues activées avec les activités bactériennes d'autres milieux naturels.

De plus, la valeur du  $K_m$  est certainement surestimée du fait de la présence de substrats naturels des enzymes (protéines et polysaccharides) dans les EPS, qui peuvent jouer le rôle d'inhibiteur compétitif et augmenter la valeur du  $K_m$  (*cf.* 3.7.2). Une relation linéaire a été observée seulement dans le cas de l'activité Leu-aminopeptidase, traduisant l'influence des substrats naturels de nature protéique sur la mesure des paramètres cinétiques (Figure 4. 5).

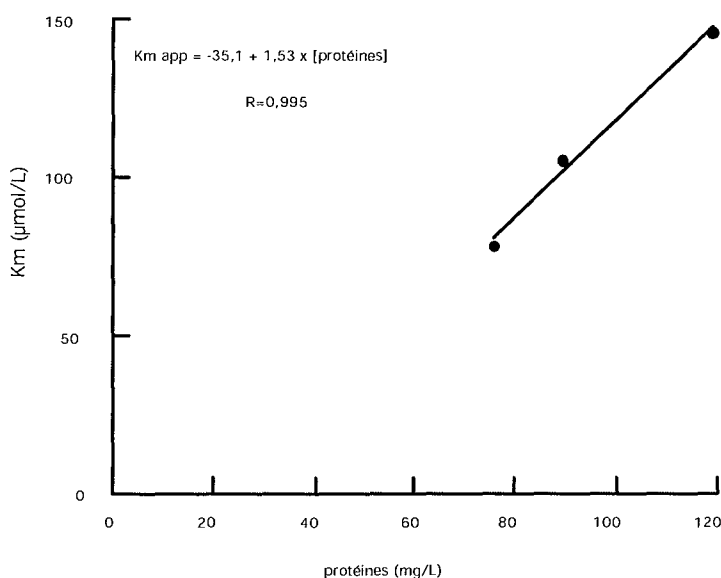


Figure 4. 5 : Relation entre le  $K_m$  apparent correspondant à l'activité Leu-aminopeptidase des EPS n° 21, 24 et 25 et la concentration en protéines des EPS. Les caractéristiques physico-chimiques des boues sont présentées en Annexe 1 et la composition chimique des EPS est présentée en Annexe 2.

#### 4.6. EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES (LEU-AMINOPEPTIDASE, PROTEASE ET $\alpha$ -GLUCOSIDASE) DES BOUES ET DES EPS.

Il est classiquement reconnu que les variations de température ont un effet marqué sur l'activité biologique des boues (Mines et Sherrard, 1999) et en particulier sur l'activité hydrolytique des boues (Garcia *et al.*, 1997; Pantoja et Lee, 1999; Teuber et Brodisch, 1977). Cependant, l'effet de la température sur la part d'activité enzymatique associées aux EPS n'a jamais été démontrée.

##### Protocole.

L'effet de la température sur trois activités enzymatiques des boues activées (Leu-aminopeptidase, protéase et  $\alpha$ -glucosidase) a été évalué (Figure 4. 6):

- 1) de manière directe en mesurant à sept températures différentes (de 4 à 50 °C) les activités des boues préalablement incubées pendant 120 min à chacune des températures (activité enzymatique totale),
- 2) sur la part d'enzymes associées aux EPS après incubation des boues pendant 240 min à chacune des sept températures (activité enzymatique extracellulaire). L'activité hydrolytique des sept échantillons d'EPS a été mesurée à 25 °C afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux.

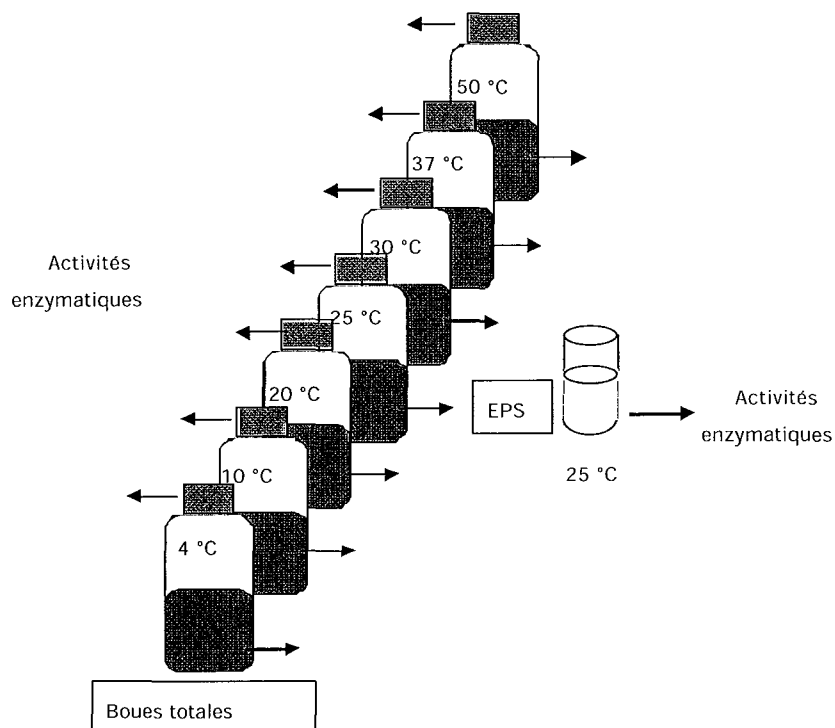


Figure 4. 6 : Protocole d'incubation des boues à sept températures différentes, de 4 à 50 °C, permettant de déterminer l'effet direct de la température sur les activités enzymatiques (Leu-aminopeptidase, protéase et  $\alpha$ -glucosidase) des boues et l'effet de la température sur la part d'activités enzymatiques extracellulaires associées aux EPS.



**4.6.1. Effet de la température d'incubation des boues sur les activités enzymatiques Leu-aminopeptidase, protéase et  $\alpha$ -glucosidase.**

Relation entre la vitesse d'hydrolyse et la température.

Les profils d'activité enzymatique en fonction de la température d'incubation des boues sont différents selon les enzymes étudiées (Figure 4. 7). L'activité Leu-aminopeptidase présente une température optimale de fonctionnement voisine de 30 °C. L'activité  $\alpha$ -glucosidase augmente constamment avec l'augmentation de la température, jusqu'à un maximum d'activité à 50 °C, correspondant à 1,5 fois l'activité à 25 °C. L'activité protéase est très faible à 4 °C et reste faible entre 10 et 30 °C. Elle augmente fortement entre 40 et 50 °C, l'activité à 50 °C correspondant à 3,7 fois l'activité à 25 °C. Ces résultats sont en accord avec la littérature, avec une température optimale de fonctionnement de l'ordre de 50 à 60 °C pour les enzymes issues des boues activées (Jung *et al.*, 2001; Whiteley *et al.*, 2002) et jusqu'à 85 °C pour les enzymes issues des boues tertiaires (Häner *et al.*, 1994). La stabilité de ces enzymes à haute température serait due à la stabilisation des protéines par association avec la matière organique. Par contre, les enzymes protéolytiques issues du milieu marin, ont généralement une température optimale de fonctionnement relativement basse, de l'ordre de 20 °C (Huston *et al.*, 2000; Little *et al.*, 1979).

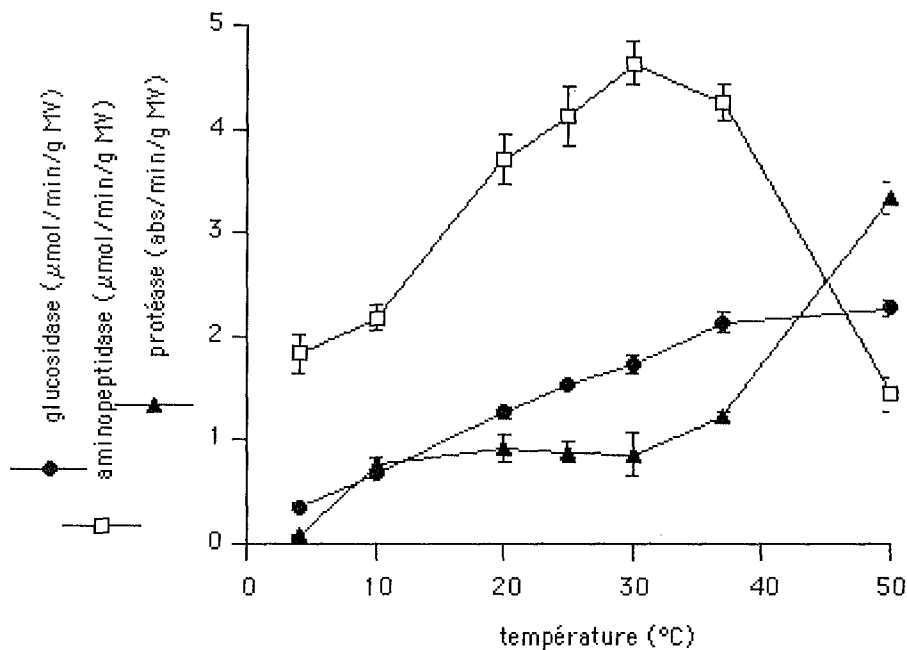


Figure 4. 7 : Activités enzymatiques Leu-aminopeptidase, protéase et  $\alpha$ -glucosidase des boues activées en fonction de la température d'incubation des boues (n = 3 essais avec la même boue, n° 45). Les caractéristiques physico-chimiques des boues sont présentées en Annexe 1 et la composition chimique des EPS est présentée en Annexe 2.

Ces résultats nous ont permis de d'établir une relation entre la vitesse d'hydrolyse ( $V_T$ ) et la température :  $V_T = V_{20} \times \theta^{(T-20)}$ . La linéarisation de cette équation permet d'estimer la constante de température  $\theta$  :  $\ln\left(\frac{V_T}{V_{20}}\right) = \ln(\theta) \times T - 20 \times \ln(\theta)$  (Figure 4. 8).  $\theta$  est un

coefficient multiplicateur permettant d'estimer la valeur théorique de l'activité enzymatique à une température donnée ( $V_T$ ) à partir de la valeur mesurée à 20 °C ( $V_{20}$ ). Ainsi, la valeur de  $\theta$  a été estimée par régression linéaire à 1,043 pour l'activité  $\alpha$ -glucosidase (valeur calculée de 10 à 37 °C), à 1,038 pour l'activité Leu-aminopeptidase (de 4 à 30 °C) et 1,034 pour l'activité protéase (de 10 à 50 °C), ce qui correspond en théorie à une multiplication par environ 1,5 de ces activités lorsque la température augmente de 10 °C. A titre de comparaison, la constante de température,  $\theta$ , a été estimée à 1,07 pour la biodégradation hétérotrophe, ce qui correspond à une multiplication par deux de la vitesse de biodégradation lorsque la température augmente de 10 °C (Henze *et al.*, 1986; Henze *et al.*, 1995).

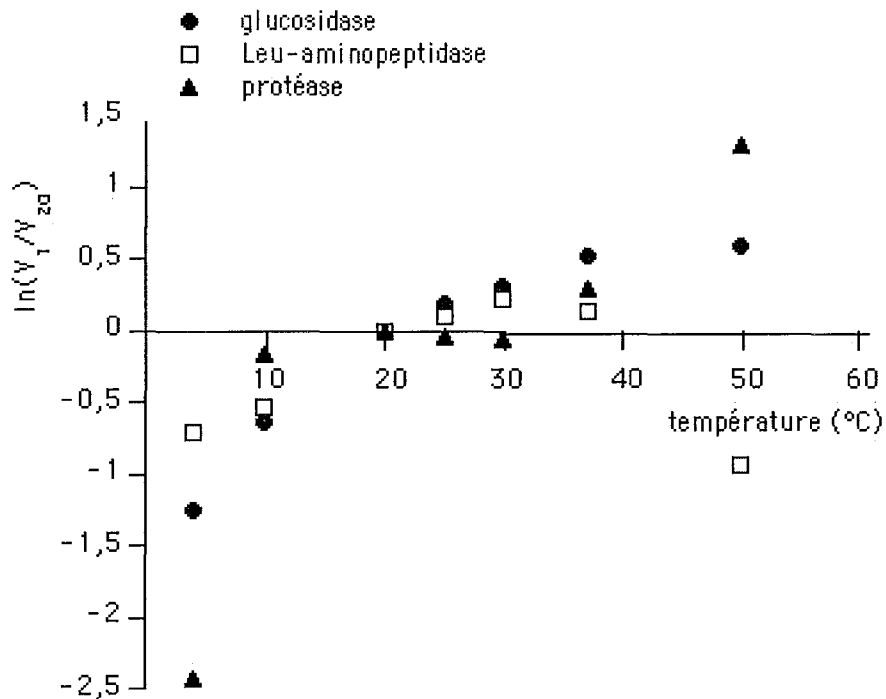


Figure 4. 8 : Détermination de la constante de température  $\theta$  par linéarisation de la relation entre la vitesse d'hydrolyse et la température, pour les activités Leu-aminopeptidase,  $\alpha$ -glucosidase et protéase.

#### Estimation de l'énergie d'activation apparente.

La vitesse d'hydrolyse augmentant avec la température, l'énergie d'activation apparente ( $E_{a,app}$ ) de la réaction d'hydrolyse a été estimée à partir de l'équation d'Arrhénius  $V = Ae^{\frac{-E_{a,app}}{RT}}$ , avec  $V$  la vitesse d'hydrolyse, et  $R$  la constante des gaz parfait ( $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ). La linéarisation de cette équation permet de déterminer l'énergie d'activation apparente :  $\ln(V) = \ln(A) - \frac{E_{a,app}}{R} \times \frac{1}{T}$  (Figure 4. 9). Ainsi, l'énergie d'activation apparente obtenue par régression linéaire (calculée pour les températures de 4 à 30 °C,  $R = 0,99$ ) pour l'activité Leu-aminopeptidase est de  $26,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ . De même, l'énergie d'activation apparente pour l'activité  $\alpha$ -glucosidase est de  $37,8 \text{ kJ mol}^{-1}$  (calculée pour les températures de 4 à 37 °C,  $R = 0,97$ ). Plus

l'énergie d'activation est élevée, plus l'enzyme est sensible aux variations de température. A titre d'exemple, l'énergie d'activation de l'activité Leu-aminopeptidase d'une bactérie marine a été estimée à  $50 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Huston *et al.*, 2000) et l'énergie d'activation de l'activité protéase de *Yersinia ruckeri* a été estimée à  $63 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Secades et Guijarro, 1999). De plus, l'énergie d'activation permet d'estimer la valeur de l'enthalpie d'activation  $\Delta H^*$  telle que  $E_a = \Delta H^* + RT$ , qui est généralement de l'ordre de  $40$  à  $60 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Pelmont, 1993). Ainsi l'enthalpie d'activation de l'activité Leu-aminopeptidase est estimée à  $24 \text{ kJ mol}^{-1}$  et celle de l'activité  $\alpha$ -glucosidase est estimée à  $35,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

Le diagramme d'Arrhénius de l'activité  $\alpha$ -glucosidase semble montrer une rupture de pente de part et d'autre d'une température comprise entre  $10$  et  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  soit pour  $\frac{1}{T}$  compris entre  $3,41 \cdot 10^{-3}$  et  $3,53 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ . Cette température est appelée température de transition. Ce type de graphique biphasique a été observée pour des enzymes membranaires, la température correspondant à la rupture de pente étant caractéristique de l'environnement en acide gras de l'enzyme (Mcelhane, 1982). La rupture observée correspond au passage d'un état ordonné des lipides membranaires à un état moins ordonné. Néanmoins, l'interprétation de cette rupture de pente reste controversée, et pourrait aussi avoir pour origine la dissociation ou l'association de sous-unités de l'enzyme (Pelmont, 1993).

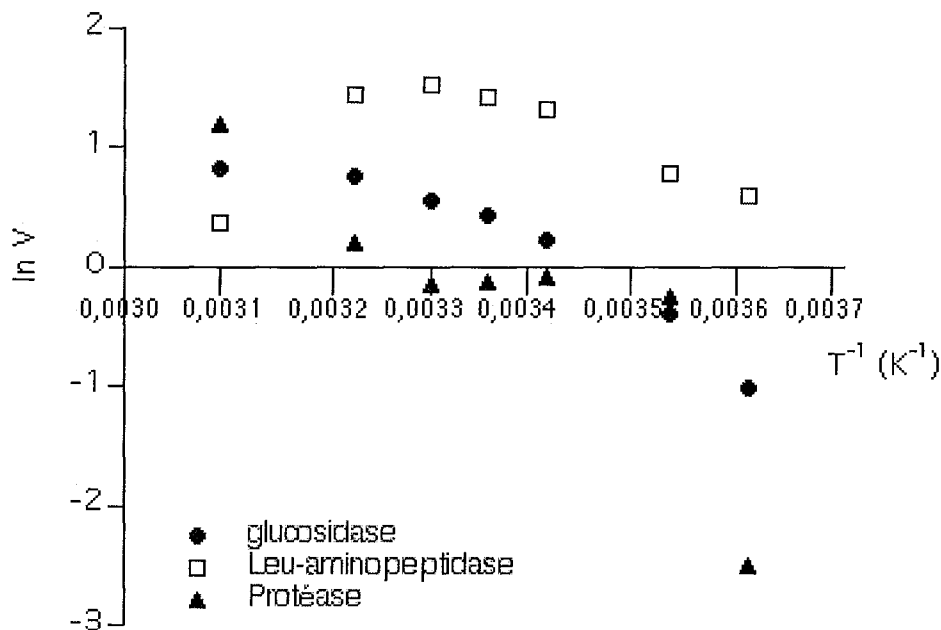


Figure 4. 9: Diagramme d'Arrhénius des activités enzymatiques Leu-aminopeptidase,  $\alpha$ -glucosidase et protéase des floccs de boues activées.

#### 4.6.2. Effet de la température sur les activités enzymatiques extracellulaires Leu-aminopeptidase, protéase et $\alpha$ -glucosidase associées aux EPS.

L'incubation des boues pendant 240 min à différentes températures a un effet marqué sur la composition des EPS, sauf sur la concentration en acides nucléiques (Figure 4. 10). La concentration en protéines des EPS montre une diminution quasi linéaire lorsque la température

d'incubation des boues augmente de 4 à 50 °C, qui serait en relation avec une activité protéolytique totale accrue lorsque la température augmente (cf. 4.6.1) ou en relation avec une dénaturation physique. La concentration en polysaccharides des EPS varie peu avec la température, seule l'incubation des boues à 50 °C montre une concentration en polysaccharides environ deux fois plus importante. La concentration en substances humiques des EPS augmente lorsque la température d'incubation des boues augmente, en particulier lorsque les boues sont incubées à 50 °C, la concentration en substances humiques augmente d'environ 3,5 fois. La défloculation des agrégats bactériens, observée lors de l'incubation 50 °C, est probablement à l'origine de l'augmentation de la concentration en polysaccharides et en substances humiques des EPS à cette température. La défloculation des boues a ainsi été rapportée lors d'un stockage à basse température (4 °C) (Wilén *et al.*, 2000) ou lorsque la température est élevée (35 à 45 °C) (Krishna et Van Loosdrecht, 1999; Morgan-Sagastume et Allen, 2003).

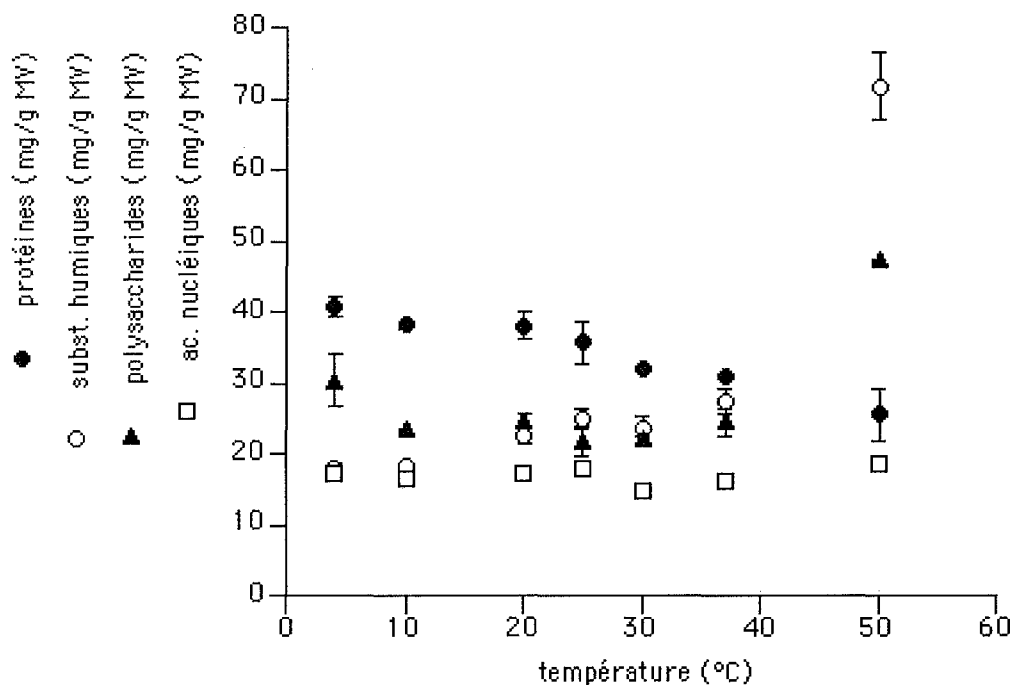


Figure 4. 10 : Composition des EPS extraits en fonction de la température d'incubation des boues avant l'extraction (n = 2 extractions sur la même boue, n° 45, les barres correspondent aux écarts à la moyenne). Les caractéristiques physico-chimiques des boues sont présentées en Annexe 1.

L'effet de la température sur la part d'activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires, Leu-aminopeptidase,  $\alpha$ -glucosidase et protéase, associées aux EPS est peu marqué, à l'exception des températures extrêmes d'incubation des boues, avec une activité Leu-aminopeptidase moyenne d'environ  $1,2 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protéines, une activité  $\alpha$ -glucosidase moyenne de  $3 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protéines et une activité protéase de  $10^{-2} \text{abs min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protéines (Figure 4. 11). L'effet de l'incubation des boues à différentes températures sur la part d'activités enzymatiques extracellulaires varie en fonction de l'activité enzymatique testée. Ainsi, à 4, 10 et 50 °C, l'activité protéase extracellulaire est environ 2 à 3 fois plus importante. Par contre, les activités Leu-aminopeptidase et  $\alpha$ -glucosidase extracellulaires diminuent de 33 et 66 % respectivement à 50 °C.

La diminution des activités enzymatiques Leu-aminopeptidase et  $\alpha$ -glucosidase peut s'expliquer soit par la dénaturation physique des enzymes lorsque la température d'incubation des boues augmente, soit par l'inactivation des enzymes, par exemple par la formation de complexes avec les substances humiques, dont la concentration dans les EPS augmente fortement à 50 °C ( cf. 4.6.2).

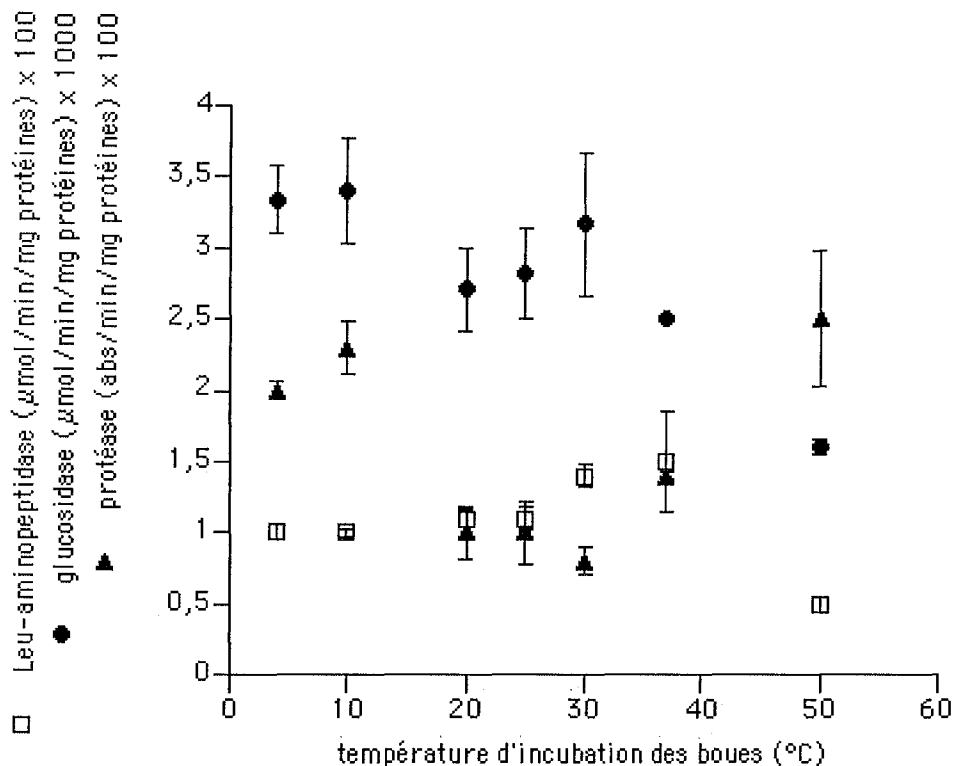


Figure 4. 11 : Effet de la température d'incubation des boues sur les activités enzymatiques associées aux EPS extraits (n = 2 extraits sur la même boue, les barres représentent les écarts à la moyenne).

Considérant l'amplitude de la variation de température des boues observée sur une période de trois ans, à savoir de 9 à 24 °C au maximum ( cf. Tableau 4.4), la composition des EPS varie peu dans cette fourchette de température. Par contre l'effet de la température sur les activités enzymatiques associées aux EPS est plus marqué, suggérant une régulation de l'expression des exo-enzymes en fonction des conditions environnementales.

#### 4.7. DISCUSSION.

L'analyse des polymères extracellulaires extraits des floccs de boues activées a montré systématiquement la présence de protéines, substances humiques, polysaccharides, et ADN, en accord avec la littérature (Frøund *et al.*, 1996; Jahn et Nielsen, 1995; Jorand *et al.*, 1995). Contrairement aux cultures pures, la proportion de protéines associées aux EPS des agrégats bactériens issus des boues activées est systématiquement supérieure à celle des polysaccharides (Frøund *et al.*, 1996; Jahn et Nielsen, 1995; Jorand *et al.*, 1995). Les variations des concentrations en polymères observées sur une période de trois ans sont relativement faibles, considérant les boues activées comme un système biologique très variable en fonction des conditions environnementales. Les corrélations observées entre les différents paramètres, en particulier protéines / polysaccharides et ADN / polysaccharides, sont en relation avec les interactions fortes qui existent entre les différents polymères. L'extraction ne permet pas de récupérer spécifiquement l'un ou l'autre des composés. Les EPS forment ainsi une matrice très complexe et très cohésive.

Les protéines jouent un rôle majeur au sein des EPS : une vingtaine d'activités enzymatiques différentes ont été mises en évidence. Cette diversité enzymatique confère aux agrégats bactériens une importante capacité hydrolytique. Par rapport à un micro-organisme isolé, les bactéries issues de cultures mixtes sont capables de mobiliser des composés organiques complexes, les EPS concentrant à proximité des cellules des activités protéolytiques, glycolytiques et lipolytiques. La prédominance des activités protéolytiques et estérasiqes sur les activités glycolytiques a été systématiquement observée, comme l'a mis en évidence Frøund *et al.* (1995), mais les vitesses d'hydrolyse sont environ dix fois plus importantes dans notre étude. Le profil d'activités enzymatiques de chaque station d'épuration est différent (Boczar *et al.*, 1992; Gessesse *et al.*, 2000; Nybroe *et al.*, 1992). Il dépend en particulier de la nature des micro-organismes présents et de la composition des eaux usées. De plus, la variation temporelle des activités enzymatiques associées aux EPS est très importante. Elle peut s'expliquer par un changement de la composition de la communauté microbienne dominante (Le Bihan et Lessard, 2000) ou par la régulation bactérienne des activités hydrolytiques en réponse aux conditions environnementales. Les paramètres environnementaux qui expliquent ces variations sont multiples, comme par exemple des variations de température et des conditions d'accepteurs d'électrons et principalement la nature de la matière organique disponible dans les eaux usées, certains substrats semblant stimuler l'expression des activités enzymatiques (Boczar *et al.*, 1992; Nybroe *et al.*, 1992).

Les paramètres cinétiques déterminés pour les activités Leu-aminopeptidase et  $\alpha$ -glucosidase sont des paramètres apparents, correspondant à l'activité d'un groupe d'enzymes hydrolysant les substrats testés et qui peuvent être issues de différents micro-organismes. Malgré la complexité du système, il apparaît que l'affinité des enzymes est plus importante pour les substrats de nature protéique que pour les substrats de nature saccharidique. Cependant, l'interprétation des résultats est difficile, d'autant plus qu'aucune donnée concernant les paramètres cinétiques des enzymes associées aux EPS des boues n'est disponible dans la littérature. Bien que l'utilisation de substrats

#### 4. Caractérisation de quelques enzymes extracellulaires associées aux EPS.

---

de synthèse ne laisse en rien présager de la vitesse d'hydrolyse des substrats naturels, la vitesse d'hydrolyse des enzymes des EPS est d'une manière générale très élevée en comparaison avec la vitesse d'hydrolyse d'enzymes issues d'autres systèmes environnementaux. L'effet de la température sur les activités enzymatiques des boues est très marqué, la vitesse d'hydrolyse étant généralement plus importante à température élevée, avec une température optimale voisine de 30 °C pour l'activité Leu-aminopeptidase et d'au moins 50 °C pour les activités  $\alpha$ -glucosidase et protéase.

En conclusion, les EPS des boues activées forment une matrice très cohésive et très complexe, dont les protéines et les polysaccharides semblent être les composés majoritaires. L'agrégation bactérienne apparaît comme une structure avantageuse pour les micro-organismes, car les EPS permettent non seulement la rétention de composés organiques, mais aussi la rétention des enzymes extracellulaires à proximité des cellules. Ainsi, une vingtaine d'activités hydrolytiques différentes ont été mises en évidence au sein des EPS. La mise en commun de ces activités confère aux agrégats bactériens une capacité hydrolytique accrue vis-à-vis des substrats organiques complexes. Les variations temporelles de ces activités sont très marquées, en relation avec les variations des conditions environnementales, comme la température, ou en relation avec des modifications de la structure de la communauté bactérienne.





---

5. COMPARAISON DES PROFILS  
CHROMATOGRAPHIQUES DES PROTEINES  
EXTRACELLULAIRES DOTEES D'ACTIVITE  
PROTEOLYTIQUE : EPS *VERSUS* SOUCHES  
PURES ISOLEES DES BOUES.

---

### 5.1. INTRODUCTION.

Il a été clairement montré que les enzymes extracellulaires associées aux EPS des boues activées constituent un mélange dont la composition est complexe et variable. Il existe relativement peu d'information concernant la nature et l'origine de ces activités enzymatiques. La plupart des études se sont focalisées sur l'activité hydrolytique globale comme indicateur de l'activité métabolique bactérienne et donc de l'efficacité du procédé de biodégradation sous différentes conditions (Boczar et al., 1992; Dold et al., 1995; Garcia et al., 1997; Goel et al., 1998; Nybroe et al., 1992). A ce jour, en dépit du rôle essentiel dans le cycle de la matière organique, une seule étude s'est intéressée à la séparation directe des enzymes extracellulaires (lipases) de telles niches écologiques (Gessesse et al., 2000). Une seule étude concerne la purification d'enzymes (phosphatases) à partir d'une souche pure isolée des boues activées, *Microlunatus phosphovorus* (Lichko et al., 2002). Cependant, la séparation d'enzymes d'intérêt au sein des EPS permettrait de déterminer :

- 1) les conditions environnementales qui influencent leur production,
- 2) la nature et la concentration minimale d'inhibiteurs ou d'activateurs de ces enzymes,
- 3) la localisation de ces enzymes in situ au sein des agrégats bactériens,
- 4) la nature et la localisation des micro-organismes qui les produisent,
- 5) l'abondance et l'importance écologique des bactéries qui les produisent,
- 6) les conditions qui favorisent le développement des bactéries qui les produisent,
- 7) les paramètres qui influencent la production et la sécrétion de ces enzymes.

Parmi les nombreuses activités enzymatiques extracellulaires associées aux EPS des boues activées, nous avons ainsi choisi de concentrer notre étude sur les activités protéolytiques. D'une part, ces activités sont essentielles au turn-over de la matière organique azotée, les protéines représentant plus d'un tiers de la composition des eaux usées (Raunkjær et al., 1994). D'autre part, nos résultats ont montré que les activités protéolytiques associées aux EPS présentent une variabilité importante (cf. 4.3), mais les facteurs environnementaux responsables de ces variations ne sont pas connus.

La diversité des enzymes protéolytiques des systèmes bactériens agrégés mixtes est sans aucun doute très importante, comme le montre par exemple la capacité des boues à hydrolyser différentes protéines, comme la gélatine, l'albumine, la caséine et la peptone, déterminant des activités protéases et des peptides, déterminant des activités aminopeptidases, comme les activités Ala-, Cyst-, Glu-, Leu-, Phe-, Val-aminopeptidase (cf. Tableau 2.5). Au sein de ce mélange complexe, nous avons limité notre étude aux activités, Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase. Les aminopeptidases bactériennes jouent un rôle important dans le catabolisme des peptides intracellulaires et dans la biodégradation extracellulaire de la matière organique protéique. Parmi les 102 aminopeptidases bactériennes purifiées à ce jour, 65 % sont localisées dans le cytoplasme et 16 % sont sécrétées dans le milieu extracellulaire (Gonzales et Robert-Baudouy, 1996). Les aminopeptidases sécrétées sont principalement sous forme de monomères. Peu d'informations sont disponibles concernant la régulation de la production de ces

aminopeptidases. Leur synthèse dépendrait en particulier de la phase, de la température de croissance et de la composition du milieu de culture (Gonzales et Robert-Baudouy, 1996). De plus, certains facteurs sont susceptibles soit d'augmenter la production de ces enzymes, comme des conditions anaérobies ou une déficience en azote, soit de la diminuer, comme la présence d'une source de carbone directement assimilable.

L'objectif de cette partie expérimentale est ainsi de réaliser une étude préliminaire de la caractérisation de quelques enzymes protéolytiques d'intérêt (Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase) au sein du mélange complexe d'activités enzymatiques associées aux EPS. La séparation directe des enzymes extracellulaires associées aux EPS extraits des boues n'ayant jamais été abordée et la complexité du mélange limitant considérablement la possibilité d'isoler une ou plusieurs enzymes d'intérêt, nous nous sommes principalement attachés à comparer de manière qualitative les profils chromatographiques des protéines possédant les activités Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase obtenus pour les EPS à ceux obtenus pour quelques souches pures protéolytiques isolées des boues. Ainsi, deux approches complémentaires ont été suivies :

- 1) l'isolement de souches pures protéolytiques à partir des boues (cf. 3.8.4) sur la base de leur capacité à hydrolyser la caséine et la séparation de leurs enzymes extracellulaires possédant une activité Leu-aminopeptidase ou Ala-aminopeptidase,
- 2) la séparation directe des enzymes protéolytiques possédant une activité Leu-aminopeptidase ou Ala-aminopeptidase associées aux EPS extraits des boues.

La technique de séparation choisie a mis en œuvre des méthodes classiquement utilisées pour la purification des protéines extracellulaires bactériennes (Figure 5. 1). Les surnageants de culture des souches pures isolées des boues et les EPS extraits des boues ont été traités de la même manière.

- 1) La première étape a consisté à concentrer les protéines extracellulaires par précipitation différentielle à l'aide d'un sel structurant, le sulfate d'ammonium (cf. 3.9.1).
- 2) Ensuite, les protéines d'intérêt ont été séparées par chromatographie d'échange d'ions (cf. 3.9.3), et les fractions dotées de l'activité enzymatique d'intérêt ont été concentrées par ultrafiltration (cf. 3.9.4). Cette étape a pour objectif de séparer les enzymes d'intérêt du reste des protéines dans les échantillons concentrés par le sulfate d'ammonium. Il s'agit d'une séparation de groupe, c'est-à-dire que les protéines ayant les mêmes propriétés physico-chimiques sont isolées dans les mêmes fractions. La chromatographie d'échange d'ions a été retenue pour sa forte capacité de charge et de rétention et la résistance du gel à des lavages drastiques entre chaque utilisation, nécessaires dans le cas d'échantillons bruts comme les EPS extraits des boues.
- 3) Enfin, les fractions retenant le maximum d'activité ont été poolées et les enzymes ont été séparées en fonction de leur masse par filtration sur gel (cf. 3.9.5). Le choix du gel s'est porté sur un gel offrant une gamme de fractionnement large, permettant de séparer des protéines de masse moléculaire comprise entre  $10^4$  et  $5 \cdot 10^6$ .

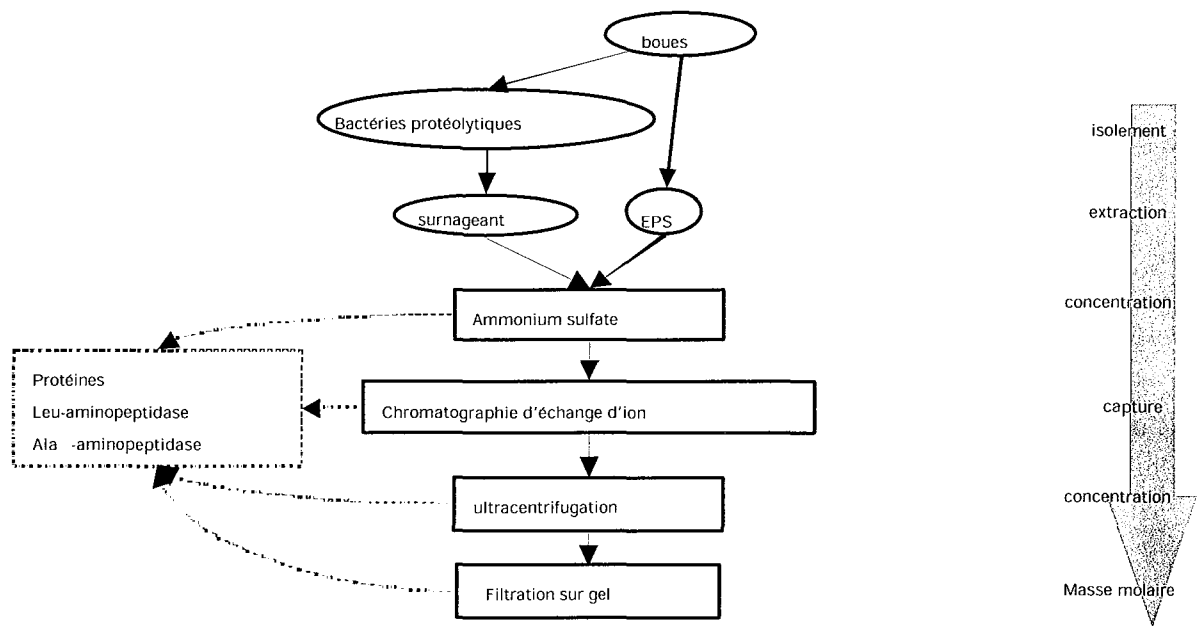


Figure 5. 1 : Schéma des différentes étapes de séparation des enzymes protéolytiques extracellulaires des souches bactériennes isolées des boues activées et des EPS extraits des boues.

Malgré la complexité de la démarche, il nous a semblé essentiel d'isoler les enzymes directement de l'environnement, car la plupart des micro-organismes des boues activées (90 %) ne sont pas cultivables sur milieu gélosé (Amann et al., 1998), limitant ainsi fortement la possibilité d'isoler des micro-organismes produisant des enzymes d'intérêt pour l'écosystème.

Malgré la complexité évidente des profils de chromatographie d'échange d'ions obtenus pour les EPS, nous avons tenté de séparer en fonction de leur masse molaire les enzymes contenues dans les fractions ayant le maximum d'activité, afin de comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus pour les souches pures et éventuellement isoler des fractions d'intérêt.

## 5.2. ENZYMES PROTEOLYTIQUES DES BACTERIES ISOLEES DES BOUES .

### 5.2.1. Isolement de souches protéolytiques des boues activées.

Quinze souches bactériennes ont été isolées des boues activées sur un milieu R2A-Agar. Les souches retenues comme protéolytiques ont démontré la capacité à hydrolyser la caséine incorporée dans le milieu R2A (cf. 3.8.1.3), en formant une plage d'hydrolyse autour des colonies (Figure 5. 2).

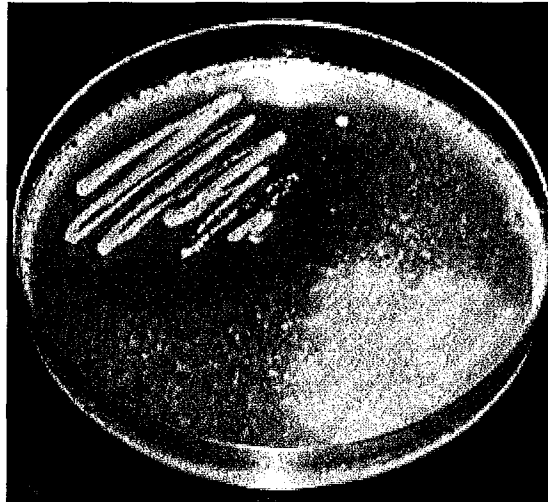


Figure 5. 2 : Photographie montrant des colonies bactériennes protéolytiques de couleur jaunes en haut à gauche (*Chryseobacterium indologenes/gleum*) et non protéolytiques de couleur blanche (souche B) en bas à droite sur milieu R2A modifié contenant de la caséine à la concentration de 1 %.

Les quinze souches ont été caractérisées par l'examen macroscopique des colonies (Tableau 5.1). L'examen microscopique des cellules a permis de déterminer leur morphologie et leur réaction à la coloration de Gram (cf. 3.8.4.). La plupart des souches isolées ont présenté une réaction négative à la coloration de Gram, deux souches seulement ont présenté une réaction positive. Cinq souches d'intérêt ont été soumises à l'Institut Pasteur pour identification (cf. 3.8.6.2). La capacité hydrolytique des souches isolées a été caractérisée de manière qualitative par un test d'hydrolyse de la caséine en milieu gélosé, et par des galeries API 20 E et API 20 NE (cf. 3.8.6.1.1 et 3.8.6.1.2) qui comportent entre autres des tests enzymatiques permettant de déterminer les activités gélatinase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase et Arg-dihydrolase (Tableau 5. 2).

Tableau 5. 1 : Examen macroscopique des colonies des bactéries protéolytiques isolées des boues activées et examen microscopique des cellules après coloration de Gram (cf. 3.8.5). Cinq souches ont été identifiées par séquençage de l'ADN ribosomal (cf. 3.8.6.2). nd : non déterminé.

souches	Caractéristiques macroscopiques des colonies (48 h)						Caractéristiques microscopiques		Identification (séquençage ADNr)
	Taille	Contours	Opacité	Relief	Surface	Couleur	Gram	Morphologie	
A	2 mm	Réguliers	Oui	Bombé	Muqueuse	blanc	-	Cocci (grappe)	nd
B	2 mm	Irréguliers	Non	Plat	Lisse	Blanc bleuté	-	Cocci	nd
C	2 mm	Irréguliers	Oui	Bombé	Lisse	Orange	-	Bâtonnets (grappe)	<i>Aeromonas media</i>
E	2 mm	Irréguliers	Oui	Plat	Lisse	Blanc	-	Bâtonnets (chaîne)	nd
F	< 1 mm	Réguliers	Non	Plat	Lisse	Blanc	-	Bâtonnets	nd
G	2 mm	Irréguliers	Oui	Bombé	Muqueuse	Blanc/jaune	-	Coccobacilles	<i>Aeromonas hydrophila/media</i>
H1	2 mm	Réguliers	Oui	bombé	Muqueuse	Blanc	+	Bâtonnets	nd
H2	0,1 mm	Réguliers	Oui	Plat	Lisse	Blanc	+	Coccobacilles	nd
J	2 mm	Réguliers	Oui	Bombé	Muqueuse	Jaune/orange	-	Bâtonnets	<i>Chryseobacterium indologenes/gleum</i>
K	2 mm	Irréguliers	Non	Plat	Lisse	Jaune	-	Bâtonnets	nd
L	0,1 mm	Réguliers	Oui	Bombé	Muqueuse	Blanc	-	Bâtonnets	<i>Serratia marcescens</i>
M	2 mm	Réguliers	Non	Plat	Lisse	Blanc	-	Coccobacilles	nd
N	2 mm	Réguliers	Oui	Bombé	Muqueuse	Blanc/jaune	-	Bâtonnets	<i>Aeromonas hydrophila/media</i>
R1	< 1 mm	Réguliers	Oui	Plat	Lisse	Rose	-	Bâtonnets	nd
R2	0,1 mm	Réguliers	Non	Plat	Lisse	Jaune pale	-	Cocci (grappe)	nd

5. Séparation des enzymes protéolytiques extracellulaires.

Tableau 5. 2 : Résultats du test d'hydrolyse de la caséine incorporée en milieu gélosé (cf. 3.8.1.3) et des tests enzymatiques qualitatifs et d'assimilation des sucres des galeries API 20 E et API 20 NE (cf. 3.8.6.1.1 et 3.5.6.1.2) des 15 souches bactériennes isolées des boues activées (n = 2).

	Souches															
	A	B	C	E	F	G	H1	H2	J	K	L	M	N	R1	R2	
<b>Activités enzymatiques</b>																
caséinase	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	
gélatinase	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
β-glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	
β-galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	
Arg-dihydrolase	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
<b>Assimilation</b>																
Glucose	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	
Arabinose	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	
Mannose	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	
N-Acétyle-glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
Gluconate	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	
Caprate	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	
Adipate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Malate	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	
Citrate	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	
Phényl-acétate	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Inositol	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sorbitol	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	
Rhamnose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	
Melbiose	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	
Amygdaline	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	

La séquence de l'ADN ribosomique (ADNr) de la souche J a montré une forte homologie avec celles des bactéries appartenant à la famille des *Flavobacteriaceae*, en particulier *Chryseobacterium indologenes* SB1 (97,2 % de similitude), *Chryseobacterium indologenes* ATCC 29897T (95,8 % de similitude) et *Chryseobacterium gleum* (95,0 % de similitude). A l'heure actuelle les techniques de biologie moléculaire ou l'électrophorèse des enzymes intracellulaires ne permettent pas de différencier *C. indologenes* de *C. gleum*. (Hugo et Jooste, 1997). *Chryseobacterium indologenes/gleum* est un bâtonnet à Gram négatif légèrement pléomorphe, aérobie, oxydant le glucose, le maltose et le tréhalose, oxydase positif et produisant un pigment jaune/orange (Murray et al., 1984). D'une manière générale, les espèces du genre *Chryseobacterium* font partie de la population psychrotrophe et protéolytique du lait. Ces bactéries sont aussi largement distribuées dans les sols et les milieux aquatiques. Elles sont aussi parfois responsables de maladies nosocomiales. Ce genre bactérien est connu pour sa production d'enzymes extracellulaires possédant une activité protéase (caséinase et gélatinase) et amylase et *Chryseobacterium gleum* possède une importante activité  $\alpha$ -glucosidase (Bellais et al., 1999; Lijnen et al., 2000; Venter et al., 1999; Yamaguchi et al., 2001).

La séquence de l'ADNr de la souche G a montré une forte homologie avec celles des bactéries appartenant à la famille des *Vibrionaceae*, en particulier *Aeromonas media* ATCC 33907T (99,3 % de similitude) et *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC T (99,5 % de similitude).

La séquence de l'ADNr de la souche N a montré une forte homologie avec celles des bactéries appartenant à la famille des *Vibrionaceae*, en particulier *Aeromonas media* ATCC 33907T (99,1 % de similitude) et *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC T (99,2 % de similitude).

La séquence de l'ADNr de la souche C a montré une forte homologie avec celles des bactéries appartenant à la famille des *Vibrionaceae*, en particulier *Aeromonas media* ATCC 33907T (98,5 % de similitude) et *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC T (98,3 % de similitude). Des tests phénotypiques permettant de différencier *A. hydrophila* de *A. media* ont permis d'identifier la souche C comme *A. media*.

Les espèces du genre *Aeromonas* sont des bactéries à Gram négatif, généralement mobiles, présentes sous forme de paire ou de courte chaîne, anaérobies facultatives (Murray et al., 1984). La plupart des souches mobiles ne produisent pas de pigment et présentent des colonies de couleur blanche ou translucides. Leur occurrence est avérée dans les milieux aquatiques, les eaux usées. Elles sont responsables de la détérioration des produits laitiers et d'infections chez les poissons. De nombreuses espèces sont capables de se développer à 4 °C. Leur virulence est due en particulier à la production d'enzymes protéolytiques et d'hémolysines. En effet, l'activité gélatinase n'a pas été observée chez les souches du genre *Aeromonas* issues de l'environnement, contrairement à 50 % des souches cliniques (Singh et al., 2000). De même, 90 % des souches cliniques hydrolysent la caséine contrairement à 50 % des souches issues de l'environnement.

La séquence de l'ADNr de la souche L a montré une forte homologie avec celles des bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, en particulier *Serratia marcescens* (98,1 % de similitude). *Serratia marcescens* est une bactérie à Gram négatif, généralement mobile, anaérobie



facultative, fermentant le glucose (Murray et al., 1984). La souche L n'a pas montré la production de pigment rouge, généralement observé chez les *Serratia* sp.. *Serratia marcescens* est une bactérie pathogène opportuniste, fréquemment retrouvée dans l'environnement hospitalier. Sa virulence est liée à la production de nombreuses enzymes extracellulaires, cas particulier du genre *Serratia* au sein de la famille des *Enterobacteriaceae.*, comme des protéases, lipases, chitinases, nucléases, hémolysines et bactéricines, et aussi la serrapeptase, commercialisée comme anti-inflammatoire.

De nombreux genres bactériens présents dans les milieux aquatiques possèdent une activité protéolytique reconnue, en particulier les genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Cytophaga* et *Enterobacter*. Les souches J (*Chryseobacterium indologenes/gleum*), L (*Serratia marcescens*), G et N (*Aeromonas hydrophila/media*) étant des souches reconnues comme responsables de la détérioration des produits laitiers, elles possèdent en particulier une forte capacité hydrolytique vis-à-vis de la caséine. Le fait que certaines souches hydrolysent préférentiellement la caséine mais pas la gélatine (souches A, H2, M et R1) ou l'inverse (souches R2 et C) est lié à la présence de sites de clivages spécifiques au sein de ces protéines. La gélatine est une protéine plus difficilement hydrolysable en raison de sa structure fibrillaire plus rigide (Law, 1980).

### 5.2.2. Caractérisation des activités enzymatiques extracellulaires.

Les quinze souches ont été cultivées en milieu liquide (cf. 3.8.1.4) à 25 °C afin de confirmer la présence d'activité protéolytique extracellulaire dans le milieu de culture et d'estimer la part d'activité sécrétée par rapport à l'activité totale de la culture. Les activités enzymatiques sont calculées par rapport au nombre de bactéries cultivables (cf. 3.8.3) sur milieu R2A (cf. 3.8.1.1) pendant 3 jours à 30 °C, déterminant l'activité enzymatique spécifique par cellule bactérienne. En faisant l'hypothèse que le nombre de bactéries cultivables correspond au nombre de bactéries produisant des enzymes, l'expression de l'activité enzymatique en terme d'activité spécifique par cellule permet de comparer aisément l'activité enzymatique des différentes souches bactériennes entre elles. Les activités caséinase (cf. 3.7.4.4), Ala-aminopeptidase (cf. 3.7.4.9) et Leu-aminopeptidase (cf. 3.7.4.2) des quinze souches ont ainsi été déterminées après 24 h de culture (Tableau 5. 3) sur la culture totale (= activité enzymatique totale) et sur le surnageant, après centrifugation à 10 000 x g et filtration sur une membrane en PVDF de 0,45 µm de porosité (= activité enzymatique extracellulaire).

Tableau 5. 3 : Comparaison des activités totales et extracellulaires caséinase, Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase des quinze souches isolées des boues activées. La part d'activité extracellulaire est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité totale. (n = 1). nd : non détectable ; ND non déterminé.

Souches	Caséinase		Ala-aminopeptidase		Leu-aminopeptidase	
	Totale (Abs <sub>340 nm</sub> min <sup>-1</sup> 10 <sup>9</sup> cell)	Extracellulaire (Abs <sub>340 nm</sub> min <sup>-1</sup> 10 <sup>9</sup> cell)	Totale (μmol min <sup>-1</sup> 10 <sup>9</sup> cell)	Extracellulaire (μmol min <sup>-1</sup> 10 <sup>9</sup> cell)	Totale (μmol min <sup>-1</sup> 10 <sup>9</sup> cell)	Extracellulaire (μmol min <sup>-1</sup> 10 <sup>9</sup> cell)
A	1,19 ± 0,31	0,12 ± 0,17	22,4 ± 1,2	nd	12,1 ± 2,3	nd
B	0,73 ± 0,06	0,03 ± 0,00	5,6 ± 0,2	33,0 ± 4,2	3,8 ± 0,08	0,05 ± 0,002
C (A, media)	4,44 ± 0,15	0,14 ± 0,01	178,5 ± 2,2	263,7 ± 33,8	114,4 ± 6,2	1,17 ± 0,06
E	nd	nd	20,2 ± 2,1	113,0 ± 21,8	nd	nd
F	0,01 ± 0,001	nd	0,4 ± 0,01	1,0 ± 0,3	0,2 ± 0,01	nd
G (A., hydrophila/media)	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	4,7 ± 0,3	8,5 ± 0,8	3,8 ± 0,2	1,05 ± 0,05
H1	0,38 ± 0,05	0,42 ± 0,02	4,8 ± 0,1	12,3 ± ND	3,9 ± 0,1	0,13 ± ND
H2	nd	nd	6,7 ± 1,0	154,3 ± 50,5	17,2 ± 0,2	0,39 ± 0,003
J (C. indologenes)	1,07 ± 0,05	0,25 ± 0,08	18,0 ± 0,1	441,3 ± 2,1	25,5 ± 1,3	2,18 ± 0,2
K	nd	nd	19,6 ± 0,3	111,3 ± 14,8	61,5 ± 5,8	0,64 ± 0,03
L (S. marcescens)	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	4,5 ± 0,1	7,1 ± 1,1	2,7 ± 0,1	0,02 ± 0,001
M	nd	nd	8,4 ± 0,4	12,4 ± 1,8	5,8 ± 0,3	0,04 ± 0,002
N (A., hydrophila/media)	0,26 ± 0,02	0,25 ± 0,13	0,5 ± 0,0	7,6 ± 0,8	4,8 ± 0,3	0,64 ± 0,01
R1	nd	nd	45,5 ± 6,8	525,9 ± 101	183,2 ± 3,5	2,43 ± 0,2
R2	nd	nd	1,4 ± 0,1	20,4 ± 0,4	22,7 ± 3,6	0,12 ± 0,007

La présence d'activité caséinase après 24 h de culture en milieu liquide a été démontrée pour les souches H1, *A. hydrophilalmedia* (G et N), *S. marcescens* (L), *C. indologenes/gleum* (J), F, A, B et *A. media* (C). La comparaison de l'activité caséinase totale des souches entre elles montre une amplitude de variation d'environ 400 fois. La proportion d'activité caséinase extracellulaire varie considérablement en fonction des souches, de l'ordre de 100 % pour les souches H1, *A. hydrophilalmedia* (G et N) et *S. marcescens* (L), à 23 % pour *C. indologenes/gleum* (J), 14 % pour la souche F, 10 % pour la souche A et de l'ordre de 3 % pour les souches B et *A. media* (C). Les souches F, B et *A. media* (C) déterminées comme caséinase-négatives par le test d'hydrolyse qualitatif en milieu solide, ont cependant montré la présence d'activité caséinase après 24 h de culture en milieu liquide. Inversement, l'hydrolyse de la caséine n'a pas été confirmée en milieu liquide pour les souches R1, M et H2, déterminées comme caséinase-positives par le test d'hydrolyse en milieu gélosé. Par ailleurs, certaines souches déterminées comme caséinase-négatives après 24 h de culture en milieu liquide présentent toutefois des activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase (souches H2, K, M, R1 et R2) ou seulement Ala-aminopeptidase (souche E et R1) et qui sont parfois très importantes.

La présence d'activité Ala-aminopeptidase après 24 h de culture en milieu liquide a été démontrée pour les quinze souches isolées des boues. La comparaison de l'activité Ala-aminopeptidase totale des souches entre elles montre une amplitude de variation d'environ 400 fois, avec une activité relativement importante pour les souches *A. media* (C), R1, A, E, K et *C. indologenes/gleum* (J). La proportion d'activité Ala-aminopeptidase extracellulaire est extrêmement faible, moins de 5 % pour toutes les souches.

La présence d'activité Leu-aminopeptidase après 24 h de culture en milieu liquide a été démontrée pour toutes les souches à l'exception de la souche E. La comparaison de l'activité Leu-aminopeptidase totale des souches entre elles montre une amplitude de variation d'environ 1000 fois, avec une activité relativement importante pour les souches R1, *A. media* (C), K, F, R2, H2 et A. La proportion d'activité Leu-aminopeptidase extracellulaire varie en fonction des souches, de 27 % pour *A. hydrophilalmedia* (G) à 13 % pour *A. hydrophilalmedia* (N), 9 % pour *C. indologenes/gleum* (J) et moins de 5 % pour les autres souches.

Malgré le petit nombre de souches bactériennes et d'activités enzymatiques étudiées, les résultats ont montré une diversité importante de la nature de l'activité des enzymes protéolytiques extracellulaires, avec des protéases comme l'activité caséinase et l'activité gélatinase, et des aminopeptidases, comme l'activité Leu-aminopeptidase et l'activité Ala-aminopeptidase. De plus, la diversité et la part d'activité enzymatique sécrétée diffèrent considérablement d'une souche à l'autre. Ainsi, ces résultats reflètent la complexité des systèmes bactériens agrégés mixtes, dont les polymères extracellulaires concentrent de nombreuses activités enzymatiques différentes.

Cinq souches ont été retenues pour la séparation des enzymes extracellulaires, à savoir les souches *C. indologenes/gleum* (J), *A. media* (C), *A. hydrophilalmedia* (G), *A. hydrophilalmedia* (N) et *S. marcescens* (L), sur la base d'une sécrétion importante d'enzymes protéolytiques dans le

## 5. Séparation des enzymes protéolytiques extracellulaires.

milieu extracellulaire et de leur capacité à former rapidement des colonies sur milieu gélosé. Certaines souches ont été écartées pour des raisons pratiques, en particulier les souches A et H1 qui sont très visqueuses et difficile à sédimenter.

La sécrétion éventuelle d'autres enzymes a été recherchée dans les milieux des cultures filtrés de ces cinq souches, à l'aide de tests semi-quantitatifs qui permettent de déterminer 19 activités hydrolytiques différentes (cf. 3.7.4.1) (Tableau 5. 4).

Tableau 5. 4 : Activités enzymatiques extracellulaires des souches bactériennes *C. indologenes/gleum* (J), *S. marcescens* (L), *A. hydrophila/media* (N et G) et *A. media* (C) déterminées de manière semi-quantitative (échelle de 0 à 5) à l'aide des galeries API ZYM®.

Activités enzymatiques	souches				
	J	L	N	G	C
Phosphatase alcaline	5	5	3	1	0
Estérase C4	0	0	0	0	0
Estérase lipase	1	1	3	1	1
Lipase	0	0	5	3	0
Leucine aminopeptidase	3	3	3	3	0
Valine aminopeptidase	1	0	1	1	0
Cystine aminopeptidase	1	0	0	0	0
Trypsine	1	1	1	0	0
$\alpha$ -Chymotrypsine	3	0	0	0	0
Phosphatase acide	1	5	5	5	0
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	1	1	0	0	0
$\alpha$ -galactosidase	0	0	0	0	0
$\beta$ -galactosidase	0	5	5	3	1
$\beta$ -glucuronidase	0	0	0	0	0
$\alpha$ -glucosidase	3	0	3	3	0
$\beta$ -glucosidase	0	5	5	5	0
N-acétyl- $\beta$ -glucosamidase	0	5	5	3	0
$\alpha$ -mannosidase	0	0	0	0	0
$\alpha$ -fucosidase	0	0	0	0	0

Ainsi, l'analyse du surnageant de chacune de ces souches montre la présence de nombreuses autres enzymes extracellulaires impliquées en particulier dans l'hydrolyse des polysaccharides, avec l'activité  $\beta$ -galactosidase, l'activité  $\beta$ -glucosidase (*S. marcescens* et *A. hydrophila/media*), et l'activité  $\alpha$ -glucosidase (*C. indologenes/gleum* et *A. hydrophila/media*), l'hydrolyse des lipides (*A. hydrophila/media*) et le métabolisme du phosphate (*C. indologenes/gleum*, *A. hydrophila/media* et *S. marcescens*). *A. media* a montré la présence (faible) de deux autres activités extracellulaires seulement, l'activité estérase lipase et l'activité  $\beta$ -galactosidase. Ces résultats sont cohérents avec la littérature (Gruner et al., 1992). Toutes les souches de l'espèce *Aeromonas hydrophila* répertoriées dans cette étude ont montré une activité lipase systématiquement fortement positive, des activités phosphatase alcaline, Leu-aminopeptidase et  $\beta$ -glucosidase systématiquement faiblement positives, des activités phosphatase acide et N-acétyl- $\beta$ -glucosamidase plutôt fortement positives et une activité  $\beta$ -galactosidase plutôt faiblement positive. Toutes les souches de *Chryseobacterium gleum* ont montré la présence des activités phosphatase

## 5. Séparation des enzymes protéolytiques extracellulaires.

---

alcaline et acide, Leu-aminopeptidase, Val-aminopeptidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase et N-acétyl- $\beta$ -glucosamidase. Les différences observées, en particulier l'absence des activités  $\beta$ -glucosidase et N-acétyl- $\beta$ -glucosamidase chez *Chryseobacterium indologenes/gleum*, peut s'expliquer par des différences méthodologiques, comme l'utilisation du surnageant filtré au lieu de la culture totale, ou par des différences phénotypiques observées entre espèces (*C. indologenes* versus *C. gleum*).

### 5.2.2.2. Sécrétion des enzymes Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase.

La sécrétion des enzymes dotées d'activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase a été suivie en fonction du temps de croissance des bactéries (Figure 5.3). Ainsi, les 5 souches retenues pour la séparation des enzymes protéolytiques extracellulaires, *C. indologenes/gleum* (J), *A. hydrophilalmedia* (N), *A. hydrophilalmedia* (G), *A. media* (C) et *S. marcescens* (L), ont été cultivées en milieu liquide (2 L) (cf. 3.8.1.4) à 25 °C pendant environ 24 h avec barbotage d'air. La croissance bactérienne a été suivie au cours du temps par la mesure de la turbidité à 600 nm. Les activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase ont été mesurées au cours du temps dans le milieu de culture centrifugé et filtré sur 0,45  $\mu$ m (activités enzymatiques extracellulaires).

Les activités Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase secrétées par la souche *C. indologenes/gleum* (J) augmentent parallèlement à la croissance cellulaire (Figure 5. 3). Un profil similaire a été observé pour l'activité caséinase de la souche *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov. isolée d'un sol qui augmente parallèlement à la croissance bactérienne, atteint une valeur maximale au bout de 24 h de culture puis diminue lentement, parallèlement à la réduction du nombre de cellules (Yamaguchi et Yokoe, 2000). L'activité Ala-aminopeptidase est extrêmement faible chez les autres souches, étant donné la faible proportion d'activité Ala-aminopeptidase sécrétée dans le milieu extracellulaire (cf. Tableau 5.3). Elle semble parfois produite de manière transitoire en fin de phase exponentielle, par exemple chez *A. hydrophilalmedia* (N et G) et *S. marcescens* (L). Chez *A. hydrophilalmedia* (N), l'activité Leu-aminopeptidase augmente aussi parallèlement à la croissance bactérienne jusqu'à 12 h de culture, mais l'activité déterminée au bout de 24 h de culture est trois fois plus faible. Chez *A. hydrophilalmedia* (G), l'activité Leu-aminopeptidase montre une augmentation quasi linéaire en fonction du temps. Chez les souches *A. media* (C) et *S. marcescens* (L), les activités Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase extracellulaires sont très faibles et varient peu au cours du temps. Une production importante de métalloprotéase a été observée chez *S. marcescens* parallèlement à la croissance cellulaire dans un milieu à base de petit lait, alors que la production de sérine -protéase est transitoire et maximale à la fin de la phase exponentielle de croissance (Romero et al., 2001).

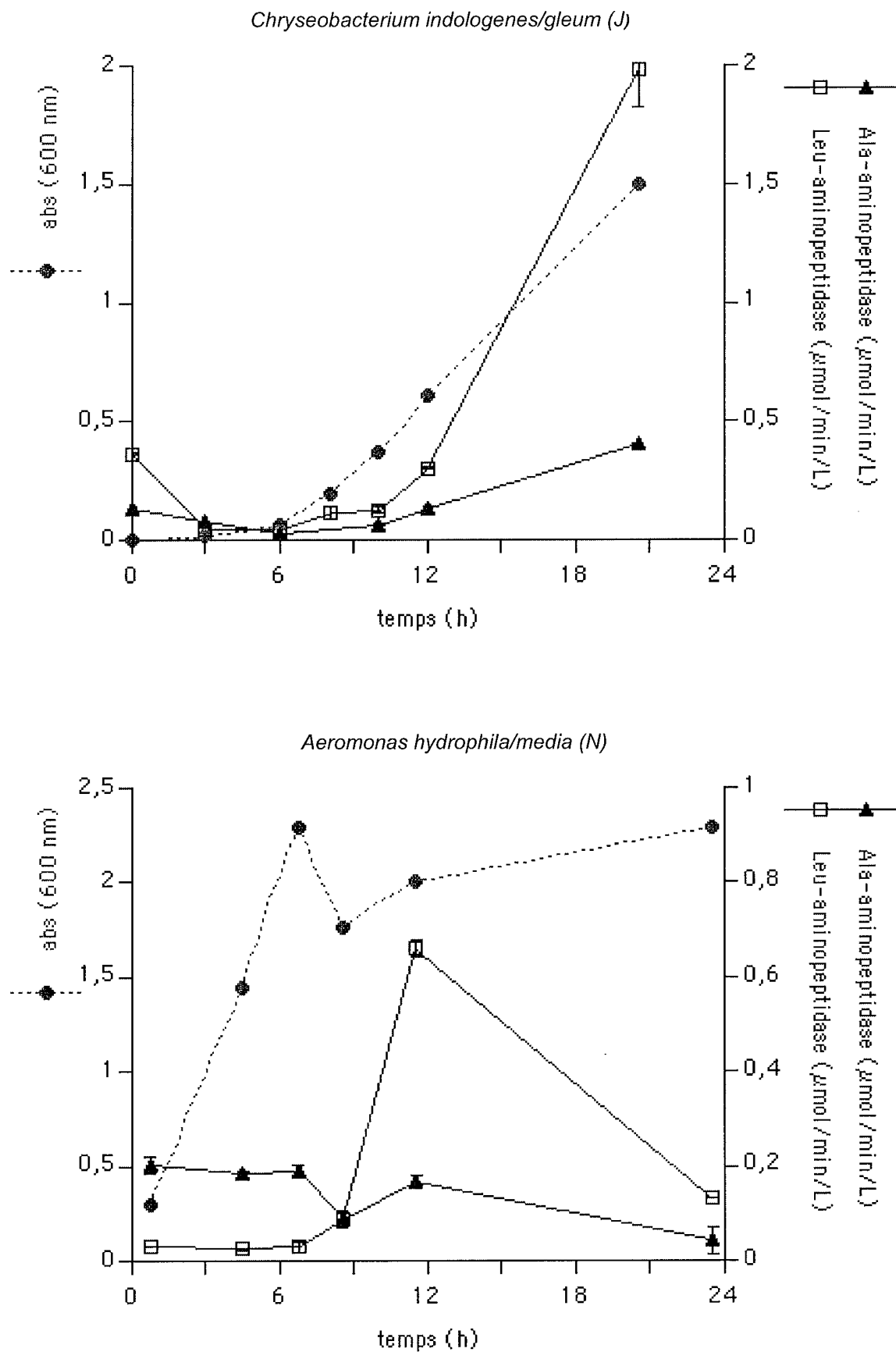


Figure 5. 3 : Suivi de la croissance bactérienne ( $Abs_{600\text{ nm}}$ ) pendant 24 h de culture en milieu liquide et des activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase secrétées dans le milieu de culture (surnageant filtré sur  $0,45\ \mu\text{m}$ ) ( $n = 1$ ).

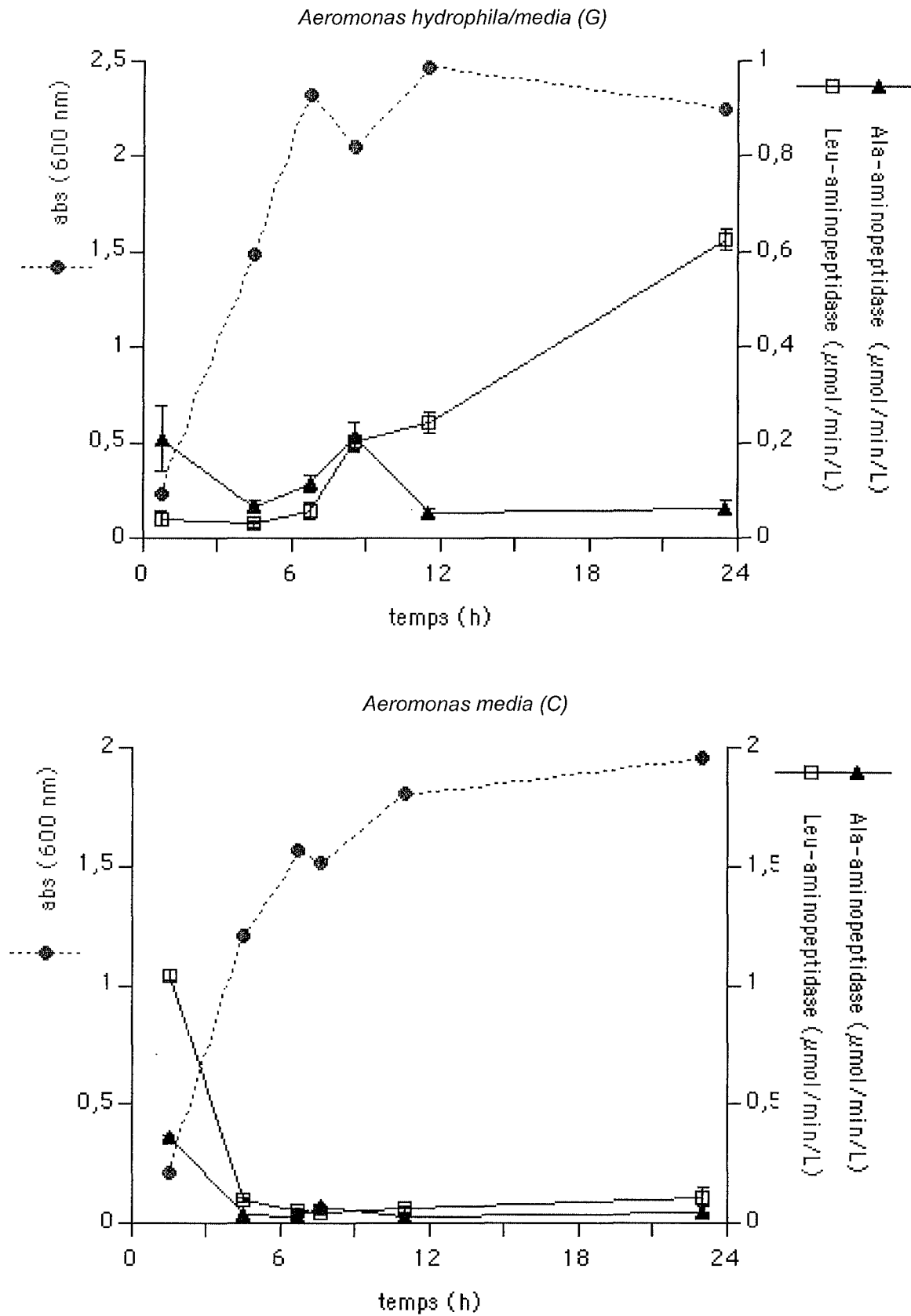


Figure 5.3 (suite) : Suivi de la croissance bactérienne ( $Abs_{600\text{ nm}}$ ) pendant 24 h de culture en milieu liquide et des activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase secrétées dans le milieu de culture (surnageant filtré sur  $0,45\ \mu\text{m}$ ) ( $n = 1$ ).

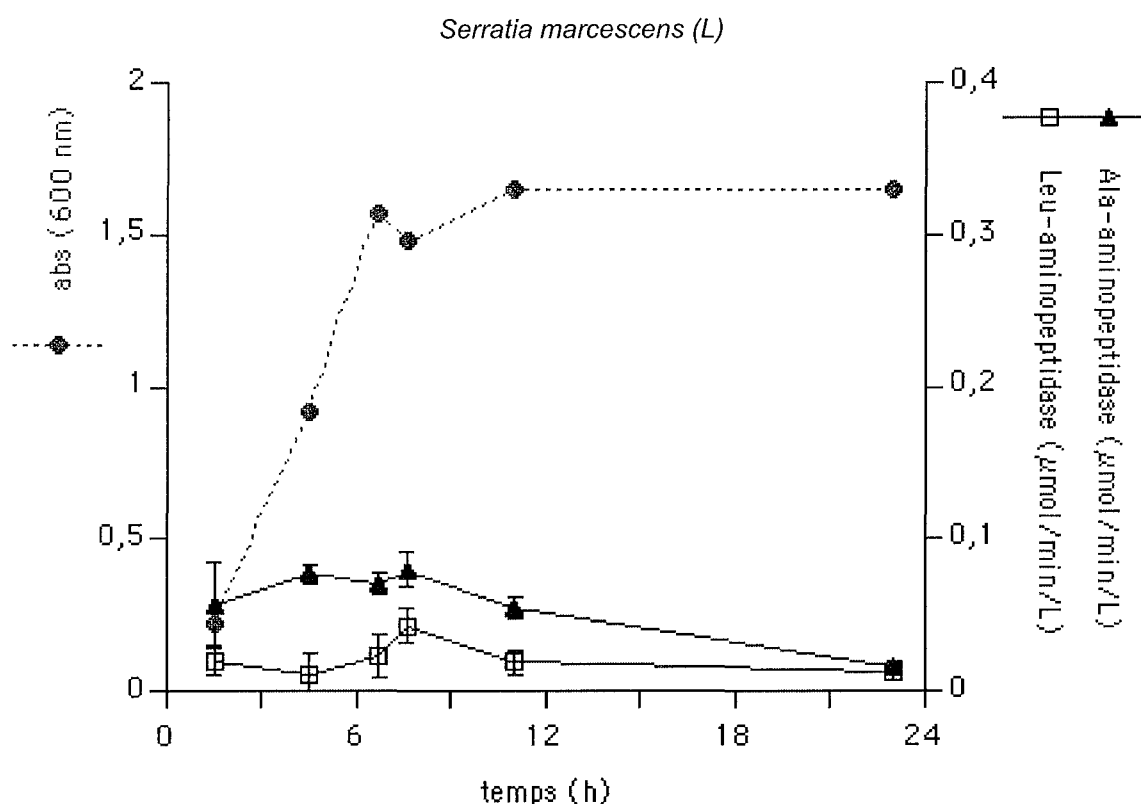


Figure 5.3 (suite) : Suivi de la croissance bactérienne ( $Abs_{600\text{ nm}}$ ) pendant 24 h de culture en milieu liquide et des activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase secrétées dans le milieu de culture (surnageant filtré sur  $0,45\ \mu\text{m}$ ) ( $n = 1$ ).

Les activités enzymatiques sont parfois plus élevées dans les premières heures de culture qu'au bout de 24 h, en particulier pour la souche *A. media* (C), les activités Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase chutent rapidement dès le début de la culture puis restent quasi à la même valeur à partir de 5 h de culture. L'importance de l'activité enzymatique dès le début de la culture pourrait s'expliquer par l'apport d'enzymes de la préculture. La diminution rapide de l'activité s'expliquerait soit par une inhibition de la sécrétion ou de la synthèse des enzymes. Un changement des conditions de culture pourrait être à l'origine de cette inhibition de la production des enzymes. En effet, les conditions d'aération sont différentes entre la culture et la préculture, avec une aération par barbotage d'air dans le cas de la culture et une diffusion libre de l'air dans le cas de la préculture.

Toutefois, ces observations n'ont été réalisées qu'une seule fois et seule une investigation plus poussée permettrait de déterminer quels sont les paramètres qui influencent l'expression ou la sécrétion des enzymes Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase dans le milieu extracellulaire. A titre d'exemple, la production d'enzymes protéolytiques chez *A. hydrophila* dépend de la nature du substrat, avec une production maximale observée généralement pour le substrat correspondant à un taux de croissance maximal (Singh et al., 2000). En particulier, une activité caséinase importante a été observée en présence de caséine, suggérant une induction par la source d'azote de la production de protéases extracellulaires par *A. hydrophila* (Santos et al., 1996; Singh et al., 2000). La production de caséinase varie en fonction de la température. Elle est généralement



maximale à une température correspondant à l'optimum de croissance, de l'ordre de 20 °C pour *A. hydrophila* (Singh et al., 2000) et de l'ordre de 45 °C pour *S. marcescens* (Romero et al., 2001). Enfin, la production d'exo-enzymes protéolytiques est parfois contrôlée par un mécanisme de quorum sensing, comme c'est le cas chez *Serratia liquefaciens* (Givskov et al., 1997) et *A. hydrophila* (Swift et al., 1999).

### **5.3. COMPARAISON DES PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES DES PROTEINES EXTRACELLULAIRES DOTEES D'ACTIVITES ALA-AMINOPEPTIDASE OU LEU-AMINOPEPTIDASE : SOUCHES PURES VERSUS EPS.**

#### **5.3.1. Concentration par le sulfate d'ammonium des enzymes extracellulaires des souches pures isolées des boues et des EPS.**

Les protéines des surnageants des cultures pures et des EPS des floccs de boues activées ont été concentrées en augmentant la force ionique par l'ajout de sulfate d'ammonium (cf. 3.9.1). La précipitation par le sulfate d'ammonium est utilisée de manière classique pour concentrer les protéines extracellulaires issues de cultures bactériennes pures, mais cette méthode n'a jamais été utilisée pour les protéines extracellulaires des EPS des boues. Etant donné la complexité de la composition des EPS, l'effet de la concentration du sulfate d'ammonium a été observé sur les autres molécules, comme les acides nucléiques et les polysaccharides, et trois activités enzymatiques, comme l'activité Leu-aminopeptidase,  $\alpha$ -glucosidase et protéase (Annexe 4).

La précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium s'accompagne d'une précipitation de divers composés présents dans l'extrait d'EPS, comme les acides nucléiques et les polysaccharides. A 30 % de la concentration saturante en sulfate d'ammonium, 32 % des acides nucléiques et 45 % des polysaccharides sont éliminés du surnageant. Il est intéressant de pouvoir éliminer dès la première étape une partie de ces contaminants, qui risquent d'interférer par la suite avec les étapes de chromatographiques.

Ainsi, le protocole retenu pour concentrer les protéines des EPS est une précipitation différentielle, qui bien qu'éliminant aussi une partie des enzymes d'intérêt, permet d'éliminer une partie des contaminants aux faibles concentrations en sel. Une première précipitation est effectuée à 30 % de la concentration de saturation en sulfate d'ammonium. Le culot, qui contient une partie des acides nucléiques et des polysaccharides, ainsi que les protéines les plus hydrophobes, est éliminé. Le surnageant est conservé et la concentration en sel est augmentée à 65 % de la concentration de saturation en sel. Le surnageant est éliminé, il contient les molécules les plus hydrophiles et certains inhibiteurs. Le culot, contenant en particulier les enzymes d'intérêt concentrées est conservé. La même méthode a été utilisée pour précipiter les enzymes extracellulaires des cultures pures.

### 5.3.2. Chromatographie d'échange d'ions des protéines extracellulaires de cinq souches pures isolées des boues dotées d'activité Ala-aminopeptidase ou Leu-aminopeptidase.

Les échantillons concentrés par le sulfate d'ammonium à 65 % ont été dialysés (cf. 3.9.2), centrifugés (cf. 3.9.3) et filtrés (cf. 3.6.1) avant injection sur la colonne de chromatographie d'échange d'anions (cf. 3.9.3). La quantité de protéines déposées et les activités Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase totales sont présentées en Annexe 5 et 6. Les protéines sont détectées en sortie de colonne par la mesure en continu de l'absorbance à 280 nm. Les activités enzymatiques Ala-aminopeptidase (cf. 3.7.4.9) et Leu-aminopeptidase (cf. 3.7.4.2) ont été mesurées dans chacune des fractions (4 mL) en sortie de colonne (Figure 5. 4).

Les profils d'élutions des échantillons provenant des cinq souches étudiées ont montré des pics relativement fins et peu nombreux (un ou deux), correspondant aux protéines dotées de l'activité Leu-aminopeptidase, de l'activité Ala-aminopeptidase ou les deux activités à la fois, comme pour *C. indologenes/gleum* (J) par exemple.

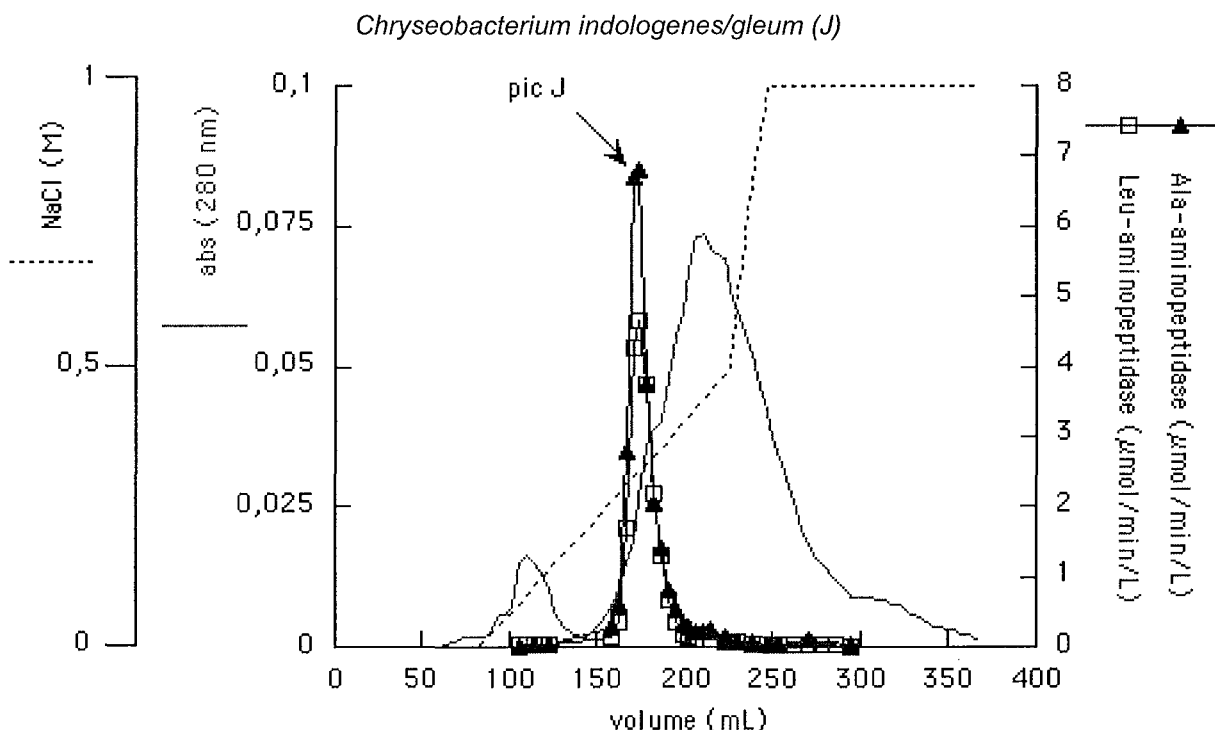


Figure 5. 4 : Profils d'élution de la colonne de chromatographie d'échange d'ions des protéines dotées des activités Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase provenant des souches *C. indologenes/gleum* (J), *A. hydrophila/media* (G et N), *A. media* (C) et *S. marcescens* (L). La concentration en protéine ( $Abs_{280\text{ nm}}$ ) est mesurée en continu. Les protéines sont éluées à l'aide d'un gradient de NaCl de 0 à 1 M.

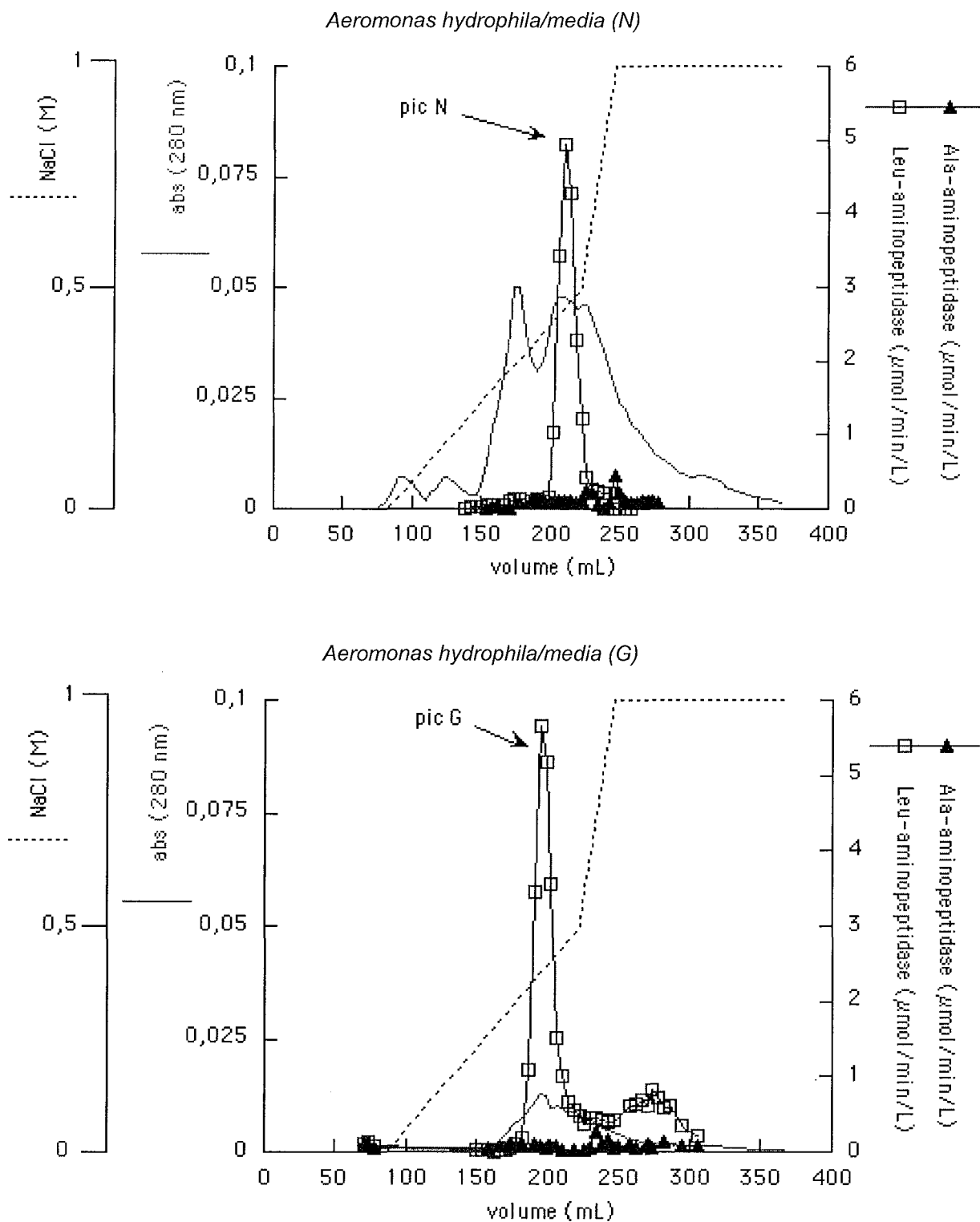


Figure 5. 4 (suite) : Profils d'élution de la colonne de chromatographie d'échange d'ions des protéines dotées des activités Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase provenant des souches *C. indologenes/gleum* (J), *A. hydrophila/media* (G et N), *A. media* (C) et *S. marcescens* (L). La concentration en protéine ( $Abs_{280\text{ nm}}$ ) est mesurée en continu. Les protéines sont éluées à l'aide d'un gradient de NaCl de 0 à 1 M.

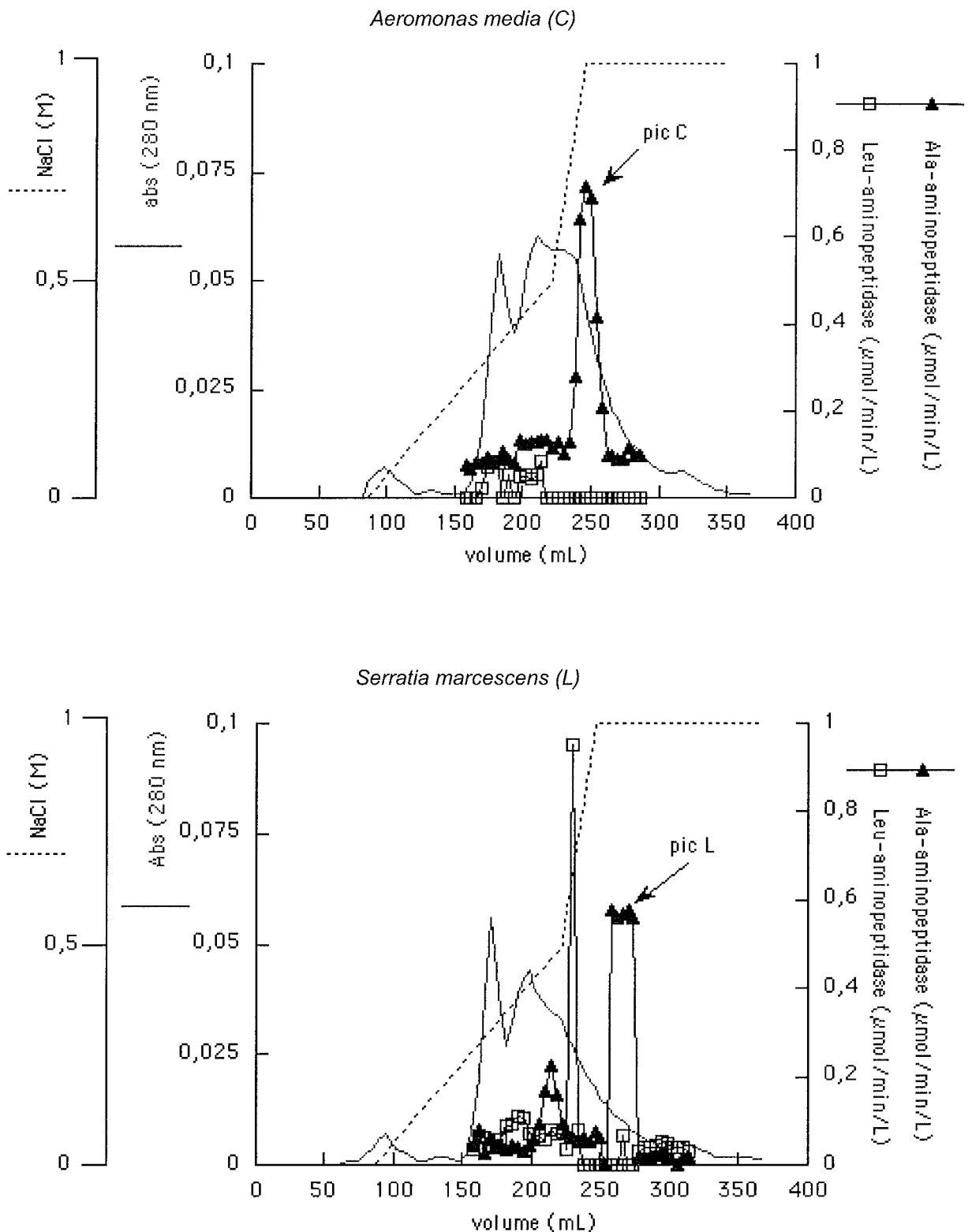


Figure 5. 4 (suite) : Profils d'élution de la colonne de chromatographie d'échange d'ions des protéines dotées des activités Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase provenant des souches *C. indologenes/gleum* (J), *A. hydrophila/media* (G et N), *A. media* (C) et *S. marcescens* (L). La concentration en protéine ( $\text{Abs}_{280 \text{ nm}}$ ) est mesurée en continu. Les protéines sont éluées à l'aide d'un gradient de NaCl de 0 à 1 M.

Le profil chromatographique des protéines extracellulaires provenant du surnageant de culture de la souche *C. indologenes/gleum* (J) montre que des protéines dotées d'activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase sont éluées simultanément dans les mêmes fractions. Le maximum d'activité correspond à la fraction 42 (170 mL) (pic J). Le pic d'éluion de ces enzymes est relativement bien séparé du pool des autres protéines. Il est vraisemblable que les protéines éluées dans la fraction 42 possèdent les deux activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase.

Concernant *A. hydrophila/media* (N), le profil d'éluion des protéines montre un pic d'activité Leu-aminopeptidase dont le maximum correspond à la fraction 51 (210 mL) (pic N) et deux pics d'activité Ala-aminopeptidase très faible correspondant aux fractions 55 (226 mL) et 60 (246 mL).

Concernant *A. hydrophila/media* (G), le profil d'éluion des protéines montre deux pics d'activité Leu-aminopeptidase, la majorité de cette activité étant éluée dans la fraction 47 (194 mL) (pic G), et un pic d'activité Ala-aminopeptidase extrêmement faible dans la fraction 57 (234 mL). Les protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase éluées tardivement (fraction 67 ; 274 mL), peuvent correspondre à des protéines différentes de celles éluées dans la fraction 47, ou aux mêmes protéines associées entre elles ou à d'autres molécules.

Concernant *A. media* (C), le profil d'éluion des protéines montre un pic d'activité Ala-aminopeptidase dont le maximum correspond à la fraction 60 (246 mL) (pic C). Les protéines éluées dans les fractions 43 (178 mL) et 52 (214 mL) sont dotées d'une d'activité Leu-aminopeptidase qui est cependant très faible.

Concernant *S. marcescens* (L), le profil d'éluion des protéines montre un pic fin d'activité Leu-aminopeptidase dont le maximum correspond à la fraction 56 (230 mL) et deux pics plus petits d'activité Ala-aminopeptidase dont les maxima correspondent aux fractions 52 (214 mL) et 63 à 67 (258 à 274 mL). Encore une fois, l'éluion tardive de l'activité Ala-aminopeptidase (fractions 63 à 67) pourrait correspondre à l'éluion d'une partie de l'activité Ala-aminopeptidase qui était adsorbée sur la colonne.

La comparaison des différents profils chromatographiques démontre une relation entre les propriétés physico-chimiques des enzymes et l'activité enzymatique qu'elles portent. En effet, les protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase de la souche *C. indologenes/gleum* (J) sont éluées dans la première partie du gradient en sel, correspondant à un volume d'éluion d'environ 170 mL, et dénotant d'une charge globale faiblement négative dans les conditions choisies (pH 8). Les protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase des souches *A. hydrophila/media* (N), *A. hydrophila/media* (G) et *S. marcescens* (L) sont éluées à la fin de la première partie du gradient en sel, correspondant à un volume d'éluion d'environ 200-230 mL, et dénotant d'une charge globale plus négative que les protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase de *C. indologenes/gleum* (J). Les protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase des souches *A. media* (C) et *S. marcescens* (L) sont éluées à la fin de la deuxième partie du gradient en sel, correspondant à un volume d'éluion d'environ 250-260 mL, et dénotant d'une charge globale encore plus négative.

En résumé, la chromatographie d'échange d'ions a permis de séparer et de concentrer les protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase ou Leu-aminopeptidase issues de souches protéolytiques isolées des boues. Les fractions retenant le maximum d'activité enzymatique ont été poolées et concentrées par ultracentrifugation (cf. 3.9.4) avant l'étape de séparation des protéines en fonction de la taille par filtration sur gel (cf. 5.4). Les fractions retenues sont :

- 1) pour *C. indologenes/gleum* (J), les fractions 39 à 47 (162 à 194 mL) (pic J) contenant des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase (pool J),
- 2) pour *A. hydrophila/media* (N), les fractions 49 à 54 (202 à 222 mL) (pic N) contenant des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase (pool N),
- 3) pour *A. hydrophila/media* (G), les fractions 46 à 52 (190 à 214 mL) (pic G) contenant des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase (pool G),
- 4) pour *A. media* (C), les fractions 58 à 63 (238 à 258 mL) (pic C) contenant des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase (pool C),
- 5) pour *S. marcescens* (L), les fractions 63 à 67 (258 à 274 mL) (pic L) contenant des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase (pool L).

Le suivi de la séparation des enzymes a été déterminé à chacune des étapes (Tableau 5. 5). La concentration en protéines (cf. 3.6.3.1.2) et les activités Leu-aminopeptidase (cf. 3.7.4.2) et Ala-aminopeptidase (cf. 3.7.4.9) ont été mesurées à chaque étape de la séparation (Annexe 5):

- 1) dans les surnageants des cultures bactériennes en milieu liquide,
- 2) dans les échantillons concentrés par le sulfate d'ammonium (cf. 3.9.1), dialysés (cf. 3.9.2), centrifugés (cf. 3.9.3) et filtrés (cf. 3.6.1),
- 3) dans chacun des pools (pools J, N, G, C et L) des fractions de la chromatographie d'échange d'ions contenant des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase ou Ala-aminopeptidase, rassemblées et concentrées par ultracentrifugation (cf. 3.9.4).

Tableau 5. 5 : Bilan des étapes préliminaires de séparation des protéines extracellulaires des souches protéolytiques isolées des boues dotées d'activité Ala-aminopeptidase ou Leu-aminopeptidase. Le facteur de purification correspond au rapport de l'activité spécifique à une étape donnée et de l'activité spécifique de départ. Le rendement correspond au rapport exprimé en pourcentage de l'activité totale à une étape donnée et de l'activité totale de départ. IEC : Chromatographie d'échange d'ions ; GF : filtration sur gel.

	Activité totale (nmol.min <sup>-1</sup> )	Protéines totales (µg)	Activité spécifique (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protéines)	Purification (facteur)	Rendement (%)
<i>C. indologenes/gleum</i> (J)					
milieu de culture					
Leu-aminopeptidase	1871	16074	116	1	100
Ala-aminopeptidase	378	16074	24	1	100
Sulfate d'ammonium					
Leu-aminopeptidase	1218	6924	176	2	65
Ala-aminopeptidase	1691	6924	244	10	448
IEC (pool J)					
Leu-aminopeptidase	35	57	626	5	2
Ala-aminopeptidase	73	57	1285	55	19
Pic J <sub>GF</sub>					
Ala-aminopeptidase	0,67	0,20	3330	142	0,2
<i>A. hydrophila/media</i> (N)					
milieu de culture					
Leu-aminopeptidase	158	4462	35	1	100
Sulfate d'ammonium					
Leu-aminopeptidase	161	3443	47	1	102
IEC (pool N)					
Leu-aminopeptidase	6	7	821	23	3,8
Pic N <sub>GF</sub>					
Leu-aminopeptidase	0,44	0,18	2450	69	0,3

## 5. Séparation des enzymes protéolytiques extracellulaires.

Tableau 5.5 (suite) : Bilan des étapes préliminaires de séparation des protéines extracellulaires des souches protéolytiques isolées des boues dotées d'activité Ala-aminopeptidase ou Leu-aminopeptidase. Le facteur de purification correspond au rapport de l'activité spécifique à une étape donnée et de l'activité spécifique de départ. Le rendement correspond au rapport exprimé en pourcentage de l'activité totale à une étape donnée et de l'activité totale de départ. IEC : Chromatographie d'échange d'ions ; GF : filtration sur gel.

	Activité totale (nmol.min <sup>-1</sup> )	Protéines totales (µg)	Activité spécifique (nmol min <sup>-1</sup> µg <sup>-1</sup> protéines)	Purification (facteur)	Rendement (%)
<i>A. hydrophila/media (G)</i>					
milieu de culture					
Leu-aminopeptidase	674	5718	118	1	100
Sulfate d'ammonium					
Leu-aminopeptidase	754	4945	153	1	112
IEC (pool G)					
Leu-aminopeptidase	10	79	128	1	1,5
<i>A. media (C)</i>					
milieu de culture					
Ala-aminopeptidase	43	5442	8	1	100
Sulfate d'ammonium					
Ala-aminopeptidase	14	1861	7	1	32
IEC (pool C)					
Ala-aminopeptidase	1	4	225	29	2,2
<i>S. marcescens (L)</i>					
milieu de culture					
Ala-aminopeptidase	18	5272	3	1	100
Sulfate d'ammonium					
Ala-aminopeptidase	7	2986	2	1	37
IEC (pool L)					
Ala-aminopeptidase	0,15	0,5	318	93	0,8



Le facteur de purification de l'activité enzymatique d'intérêt après chromatographie d'échange d'ions varie entre 23 et 93, excepté pour *A. hydrophila/media* (G) (Tableau 5. 5). Concernant *C. indologenes/gleum* (J), les protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase sont éluées de la colonne d'échange d'ions avec un facteur de purification de 55 et 5 fois respectivement et un rendement de récupération de 19% et 1,9 % respectivement. Concernant *A. hydrophila/media* (G), les protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase sont éluées dans les fractions correspondant au maximum du pic d'élution des protéines et sont par conséquent mal séparées du reste des protéines, avec un facteur de purification de 1,1 fois et un rendement de récupération de 1,5 %. Dans ce cas, une modification des conditions chromatographiques, comme par exemple une modification du gradient en sel, s'avèrerait nécessaire pour améliorer la séparation des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase par rapport au reste des protéines extracellulaires. Concernant *A. hydrophila/media* (N), les protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase sont éluées de la colonne d'échange d'ions avec un facteur de purification de 23 fois et un rendement de récupération de 3,8 %. Concernant *A media* (C), les protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase sont éluées de la colonne d'échange d'ions avec un facteur de purification de 29 fois et un rendement de récupération de 2,2 %. Concernant *S. marcescens* (L), les protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase sont éluées de la colonne d'échange d'ions avec un facteur de purification de 93 fois et un rendement de récupération de 0,8 %.

L'analyse du bilan des étapes de séparation (Tableau 5.5) montre que la précipitation des protéines extracellulaires par le sulfate d'ammonium est nécessaire pour concentrer les enzymes dans un faible volume mais ne constitue pas réellement une étape de purification. En effet, le facteur de purification est relativement faible (environ 1,5 fois) pour les enzymes des souches *C. indologenes/gleum* (J), *A. hydrophila/media* (N) et *A. hydrophila/media* (G), excepté pour l'activité Ala-aminopeptidase de la souche *C. indologenes/gleum* (J) (10 fois). Pour ces souches, le rendement est correct, compris entre 65 et 100 %. Le rendement de l'activité Ala-aminopeptidase de la souche *C. indologenes/gleum* (J) (448 %) s'expliquerait peut-être par la perte d'un inhibiteur de l'activité qui aurait conduit à une sous estimation de l'activité dans le milieu de culture, mais cette hypothèse n'a pas été vérifiée. Concernant les souches *A media* (C) et *S. marcescens* (L), le rendement est de l'ordre de seulement 35 %, suggérant une perte notable d'environ 65 % de l'activité Ala-aminopeptidase dès la première étape, mais cette éventualité n'a pas été confirmée. L'analyse de l'étape de chromatographie d'échange d'ions montre un rendement de purification de l'activité Ala-aminopeptidase de 93, 55 et 29 fois respectivement pour les souches *S. marcescens* (L), *C. indologenes/gleum* (J) et *A media* (C) et un rendement de purification de l'activité Leu-aminopeptidase de 5 et 23 fois pour les souches *C. indologenes/gleum* (J) et *A. hydrophila/media* (N). Ces facteurs de purification sont corrects, néanmoins la quantité de protéines récupérées après l'étape de chromatographie d'échange d'ions est faible, ce qui compromet l'étape suivante de filtration sur gel. La chromatographie d'échange d'ions dans les conditions choisies n'a cependant pas permis de séparer l'activité Leu-aminopeptidase de la souche *A. hydrophila/media* (G) des autres protéines.

### **5.3.3. Chromatographie d'échange d'ions des protéines extracellulaires des EPS extraits des boues dotées d'activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase.**

Avant l'extraction des EPS (cf. 3.2.2), les boues activées sont concentrées environ trois fois par élimination des 2/3 du surnageant de décantation (2 h à 4 °C). Les EPS extraits sont concentrés par le sulfate d'ammonium (cf. 3.9.1), dialysés (cf. 3.9.2), centrifugés (cf. 3.9.3) et filtrés (cf. 3.6.1) avant injection sur la colonne de chromatographie d'échange d'anions (cf. 3.9.3). La quantité de protéines déposées et les activités Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase totales sont présentées en Annexe 5 et 6. Les protéines sont détectées en sortie de colonne par la mesure en continue de l'absorbance à 280 nm. Les activités enzymatiques caséinase (cf. 3.7.4.4), Leu-aminopeptidase (cf. 3.7.4.2) et Ala-aminopeptidase (cf. 3.7.4.9) ont été mesurées dans chacune des fractions (4 mL) en sortie de colonne.

Le profil d'élution des protéines ( $Abs_{280\text{ nm}}$ ) de la chromatographie d'échange d'anions des EPS extraits des boues est très complexe et montre plusieurs pics majeurs relativement mal séparés (Figure 5. 5). Le profil présente une traînée de pic relativement importante, suggérant la présence de plusieurs protéines ou autres molécules ayant une forte interaction avec le gel. En effet 120 mL de NaCl 1 M ne suffisent pas à éluer tous les composés absorbant à 280 nm. De plus, l'observation visuelle de la colonne a montré une coloration persistante des premiers centimètres de gel. L'utilisation d'une méthode de dosage des protéines plus spécifique que la mesure de l'absorbance à 280 nm, à savoir la méthode de Bradford (cf. 3.6.3.1.2), a montré un pic de protéines moins large, confirmant la présence d'autres composés absorbant à 280 nm et ayant une interaction forte avec le gel. Différents composés sont susceptibles de répondre à ces deux critères, par exemple les substances humiques et les acides nucléiques. L'adsorption des protéines par le gel est aussi très importante et elle a été évaluée à environ  $45\% \pm 10$  ( $n=3$ ) de la quantité de protéines injectée. L'adsorption des protéines et des autres composés affecte la reproductibilité de la méthode chromatographique et rendrait par conséquent discutable la comparaison des profils chromatographiques obtenus pour différents EPS.

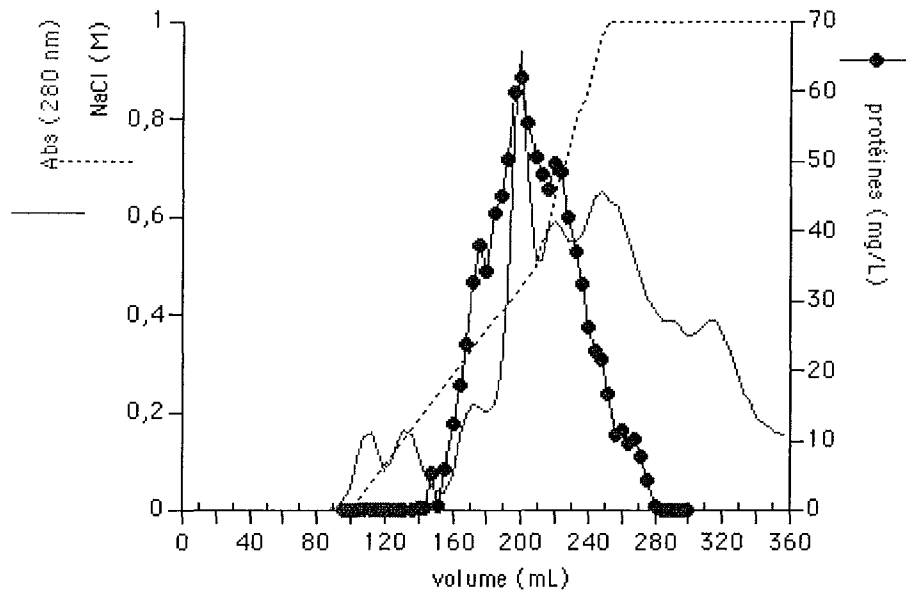


Figure 5. 5 : Profils d'élution des protéines ( $Abs_{280\text{ nm}}$  et dosage de Bradford) de la chromatographie d'échange d'ions des EPS extraits des boues et concentrés par le sulfate d'ammonium.

Le profil d'élution des protéines dotées d'activité caséinase montre deux pics relativement larges relativement mal séparés, correspondant respectivement aux fractions 46 à 61 (194 à 254 mL) (pic A) et aux fractions 62 à 80 (258 à 278 mL) (pic B) (Figure 5. 6). Le pic A correspond approximativement au pic d'élution des protéines, toutes les fractions contenant des protéines ayant montré une activité caséinase. L'activité caséinase du pic B correspond à des fractions contenant relativement peu de protéines mais une quantité importante de composés absorbant à 280 nm. Ces résultats suggèrent ainsi qu'une partie des enzymes des EPS dotées d'activité protéolytique est associée à d'autres composés, comme les substances humiques.

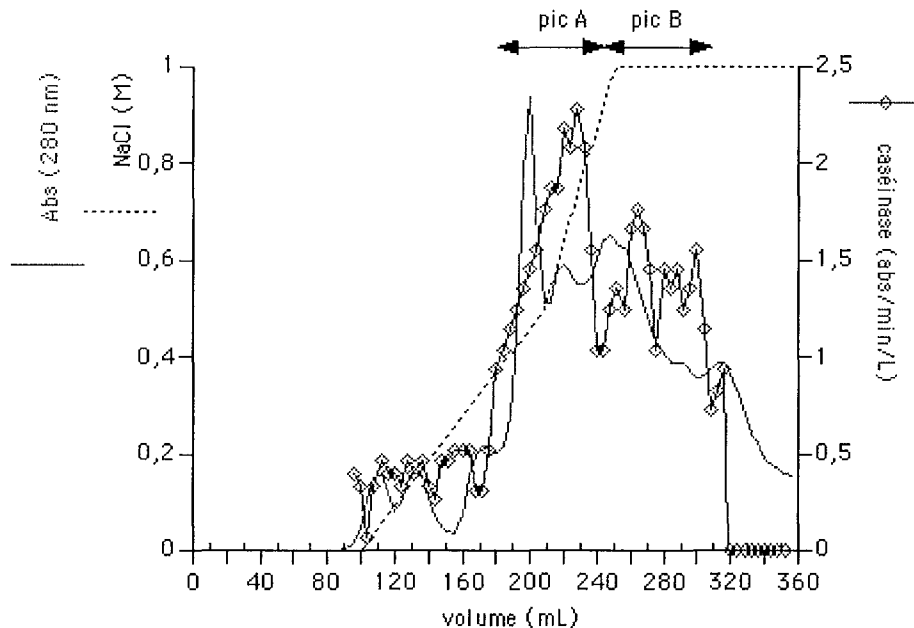


Figure 5. 6 : Profil d'élution de la colonne de chromatographie d'échange d'ions des protéines des EPS dotées d'activité caséinase montrant deux pics relativement mal séparés (pic A et B).

En comparaison des profils chromatographiques obtenus pour les souches pures, les profils d'éluion des protéines des EPS des boues dotées d'activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase sont relativement larges : toutes les fractions contenant des protéines possèdent une activité hydrolytique vis-à-vis des substrats testés (Figure 5. 7 et Figure 5. 8). Le profil d'éluion des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase montre un pic large, qui présente un maximum d'activité dans la fraction 54 (226 mL) (pic 1), correspondant approximativement au pic d'éluion des protéines mesurées spécifiquement par la méthode de Bradford et au pic d'éluion de l'activité caséinase (pic A). Le profil d'éluion des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase montre plusieurs pics mal séparés, dont deux pics majoritaires, présentant respectivement un maximum d'activité dans les fractions 56 et 62 (234 à 258 mL) (pic 2 et 3). Le pic 2 correspond approximativement au pic 1 (Figure 5.7). Par contre, le pic 3 correspond approximativement au pic B (Figure 5.6), qui contient des composés qui ne sont pas de nature protéique mais qui absorbent à 280 nm. Les pics d'éluion des protéines dotées d'activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase sont cependant extrêmement proches, et contiennent vraisemblablement des enzymes capables d'hydrolyser les deux types de substrats correspondant.

La comparaison des profils chromatographiques des protéines des EPS des boues dotées d'activité protéolytiques par rapport aux profils des protéines extracellulaires des souches pures permet de souligner différents points. La présence d'activité protéolytique Leu-aminopeptidase et/ou Ala-aminopeptidase dans quasiment toutes les fractions de la chromatographie d'échange d'ions des protéines des EPS suggère une diversité importante au sein des enzymes protéolytiques associées aux EPS des boues ainsi que l'association des enzymes entre elles ou à d'autres molécules, comme les substances humiques.

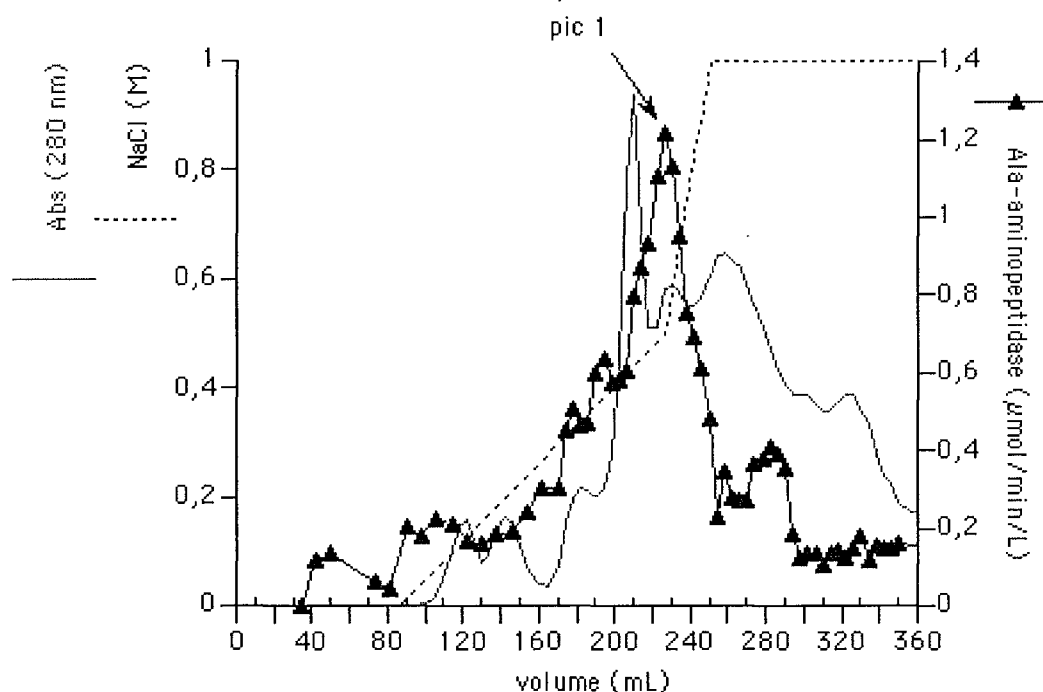


Figure 5. 7 : Profil d'éluion de la colonne de chromatographie d'échange d'ions des protéines des EPS dotées d'activité Ala-aminopeptidase montrant un pic majoritaire (pic 1).

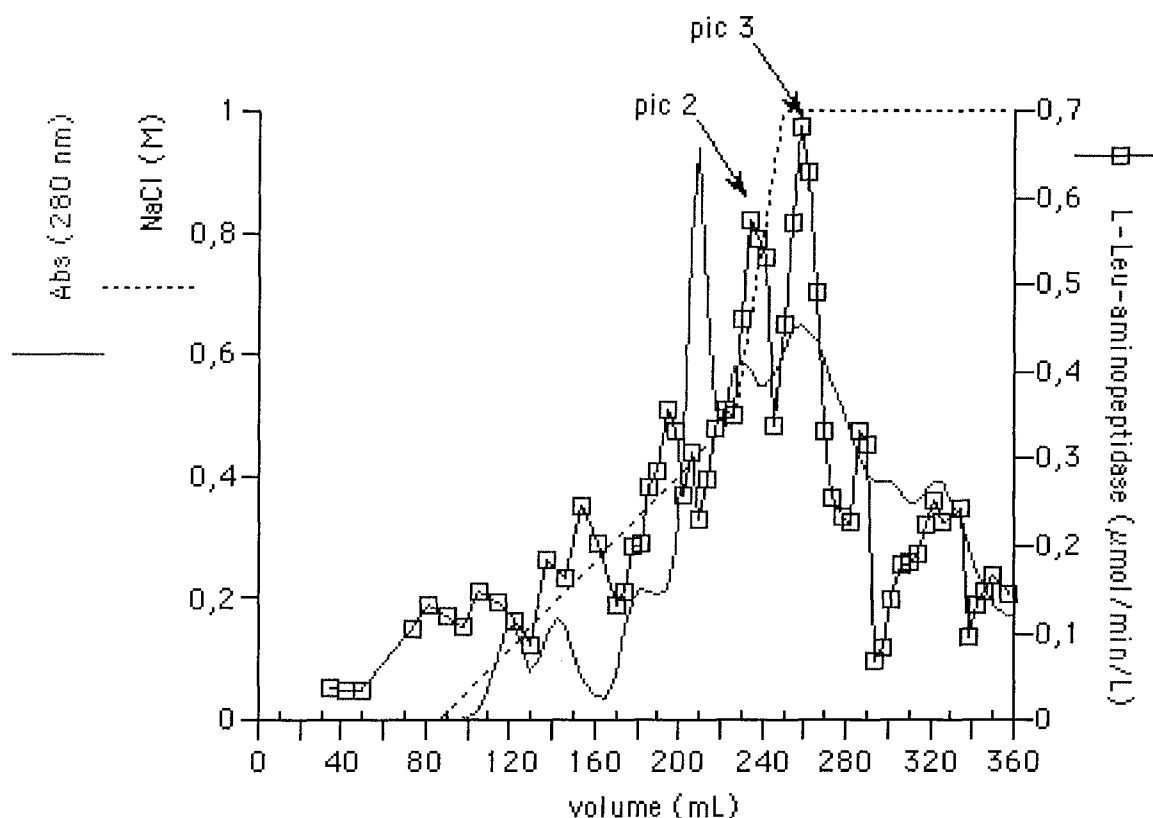


Figure 5. 8 : Profil d'éluion de la colonne de chromatographie d'échange d'ions des protéines des EPS dotées d'activité Leu-aminopeptidase montrant deux pics majoritaires (pics 2 et 3).

Les fractions retenant le maximum d'activité enzymatique ont été poolées et concentrées par ultracentrifugation (cf. 3.9.4) avant l'étape de séparation des protéines en fonction de la taille par filtration sur gel (cf. 5.4). Les fractions retenues sont :

- 1) les fractions 50 à 57 (210 à 238 mL) (pics 1 et 2) contenant des protéines dotées des deux activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase (pool 1),
- 2) les fractions 61 à 65 (254 à 270 mL) (pic 3) contenant des protéines dotées principalement d'activité Leu-aminopeptidase (pool 3).

Malgré le caractère préliminaire de ces résultats, le suivi de la séparation des enzymes a été déterminé à chacune des étapes (Tableau 5. 6). La concentration en protéines (cf. 3.6.3.1.2) et les activités Leu-aminopeptidase (cf. 3.7.4.2) et Ala-aminopeptidase (cf. 3.7.4.9) ont été mesurées à chaque étape de la séparation (Annexe 6):

- 1) dans les EPS extraits des boues,
- 2) dans les EPS concentrés par le sulfate d'ammonium (cf. 3.9.1), dialysés (cf. 3.9.2), centrifugés (cf. 3.9.3) et filtrés (cf. 3.6.1),
- 3) dans les pools 1 et 3 des fractions de la chromatographie d'échange d'ions contenant des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase ou Ala-aminopeptidase, rassemblées et concentrées par ultracentrifugation (cf. 3.9.4).

5. Séparation des enzymes protéolytiques extracellulaires.

Tableau 5. 6 : Bilan des étapes préliminaires de séparation des protéines des EPS dotées d'activité Ala-aminopeptidase ou Leu-aminopeptidase. Le facteur de purification correspond au rapport de l'activité spécifique à une étape donnée et de l'activité spécifique de départ. Le rendement correspond au rapport exprimé en pourcentage de l'activité totale à une étape donnée et de l'activité totale de départ. IEC : Chromatographie d'échange d'ions ; GF : filtration sur gel.

	Activité totale (nmol/min)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (nmol/min/mg protéines)	Purification (facteur)	Rendement (%)
<b>EPS</b>					
Leu-aminopeptidase	4620	60	77	1	100
Ala-aminopeptidase	9910	60	165	1	100
Sulfate d'ammonium					
Leu-aminopeptidase	181	27	66	0,9	39
Ala-aminopeptidase	514	27	189	1,1	52
<b>IEC</b>					
pool 1					
Leu-aminopeptidase	8,3	1,92	43	0,6	0,2
Ala-aminopeptidase	35	1,92	182	1,1	0,4
pool 3					
Leu-aminopeptidase	5,75	1,15	50	0,6	0,1
Ala-aminopeptidase	5,61	1,15	49	0,3	0,1

Contrairement aux résultats obtenus pour les souches pures, la présence de protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et/ou Leu-aminopeptidase dans toutes les fractions de la chromatographie d'échange d'ions n'a pas permis la capture des enzymes d'intérêt de manière séparative. Les rendements de récupération des enzymes après chromatographie d'échange d'ions des EPS sont extrêmement faibles pour les deux activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase. Par exemple pour le pool 1, les protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase sont éluées de la colonne d'échange d'ions avec un rendement de récupération de 0,4 % et les protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase sont éluées avec un rendement de récupération de 0,1 %. L'activité Ala-aminopeptidase semble majoritaire dans le pool 1, alors que les deux activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase sont retrouvées en quantité égale dans le pool 3.

A titre de comparaison avec le bilan des étapes de séparation des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase des souches pures, la quantité totale de protéines et l'activité enzymatique totale des EPS sont environ 10 fois plus importantes. Néanmoins, l'activité spécifique récupérée après chromatographie d'échange d'ions est environ 10 fois moindre, traduisant encore une fois la difficulté à séparer les protéines dotées d'activités d'intérêt des autres protéines.

#### **5.4. DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES DES PROTEINES DOTEES D'ACTIVITES ALA-AMINOPEPTIDASE ET LEU-AMINOPEPTIDASE PAR FILTRATION SUR GEL.**

Les fractions de la chromatographie d'échange d'ions contenant le maximum d'activité ont été rassemblées et concentrées par ultracentrifugation (cf. 3.9.4) :

- 1) pour *C. indologenes/gleum* (J), les fractions 39 à 47 (162 à 194 mL) (pool J) ,
- 2) pour *A. hydrophilal/media* (N), les fraction 49 à 54 (202 à 222 mL) (pool N), ,
- 3) pour *A. hydrophilal/media* (G), les fractions 46 à 52 (190 à 214 mL) (pool G),
- 4) pour *A. media* (C), les fractions 58 à 63 (238 à 258 mL) (pool C),
- 5) pour *S. marcescens* (L), les fractions 63 à 67 (258 à 274 mL)(pool L).
- 6) pour les EPS des boues activées, les fractions 50 à 57 (210 à 238 mL) (pool 1) et 61 à 65 (254 à 270 mL) (pool 3).

Les pools obtenus ont été déposés sur une colonne de filtration sur gel préalablement étalonnée avec des composés de masse connue afin de déterminer les masses moléculaires des enzymes qu'ils contiennent (cf. 3.9.5). Les activités enzymatiques Leu-aminopeptidase (cf. 3.7.4.2) et Ala-aminopeptidase (cf. 3.7.4.9) sont mesurées dans chacune des fractions (3 mL) en sortie de colonne.

##### 5.4.1. Masses moléculaires des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase sécrétées par les souches protéolytiques isolées des boues.

Les profils d'éluion des protéines des souches pures dotées d'activité Ala-aminopeptidase ou Leu-aminopeptidase montrent d'une manière générale plusieurs pics relativement larges, parfois mal séparés suggérant la présence d'enzymes différentes ou la présence de dimères ou d'agrégats de

taille plus importante de la même protéine (Figure 5. 9). Une partie de l'activité est parfois détectée dans les fractions correspondant à des masses molaires élevées. En particulier le profil d'élution des protéines de *A. hydrophilalmedia* (G) montre un pic d'activité correspondant à des protéines de masse moléculaire supérieure à 165000. Dans ce cas, la mauvaise séparation par chromatographie d'échange d'ions des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase du reste des protéines pourrait être à l'origine de la formation d'agrégats de masse moléculaire importante. Par ailleurs, plusieurs profils d'élution des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase ou Ala-aminopeptidase montrent des pics d'activité correspondant à des masses moléculaires faibles. En particulier le profil d'élution des protéines de *A. hydrophilalmedia* (N) montre un pic d'activité important correspondant à des composés de masse moléculaire inférieure à 5000. Cela suggère la présence d'interactions non-spécifiques avec le gel.

Les masses moléculaires correspondant à chacun des pics d'activités enzymatiques ont cependant été systématiquement déterminées (Figure 5. 9). Seules les fractions correspondant à un volume d'élution compris entre 100 et 150 mL, c'est-à-dire une masse moléculaire comprise entre 165000 et 5000, et montrant une activité enzymatique supérieure à la limite de détection (de l'ordre de  $0,06 \mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}$ ) ont été prises en compte.

Ainsi, les résultats des filtrations sur gel des pools des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase ont montré :

- pour *C. indologenes/gleum* (pool J), la présence d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase dans la fraction correspondant à des composés ayant une masse moléculaire d'environ 30000,
- pour *A. hydrophilalmedia* (pool N), la présence d'activité Leu-aminopeptidase dans les fractions correspondant à des composés ayant une masse moléculaire d'environ 52000 et 5000,
- pour *A. hydrophilalmedia* (pool G), la présence d'activité Leu-aminopeptidase dans les fractions correspondant à des composés ayant une masse moléculaire d'environ 165000, 52000 et 5000,
- pour *A. media* (pool C) la présence d'activité Ala-aminopeptidase dans les fractions correspondant à des composés ayant une masse moléculaire d'environ 70000, 22000 et 9000,
- pour *S. marcescens* (pool L) la présence d'activité Ala-aminopeptidase dans les fractions correspondant à des composés ayant une masse moléculaire d'environ 30000.

Malgré le caractère préliminaire de ces résultats, les profils obtenus suggèrent la présence d'enzymes très diverses selon les souches et la sécrétion de différentes enzymes par une même souche. Néanmoins, les valeurs des masses molaires obtenues sont à considérer avec précaution car les expérimentations n'ont pas été répétées. De plus, les activités enzymatiques totales qui ont pu être déposées sur le gel de séparation moléculaire sont extrêmement faibles pour les souches *A. media* et *S. marcescens* (cf. Annexe 5), ce qui explique la difficulté à mettre nettement en évidence les pics d'activité.



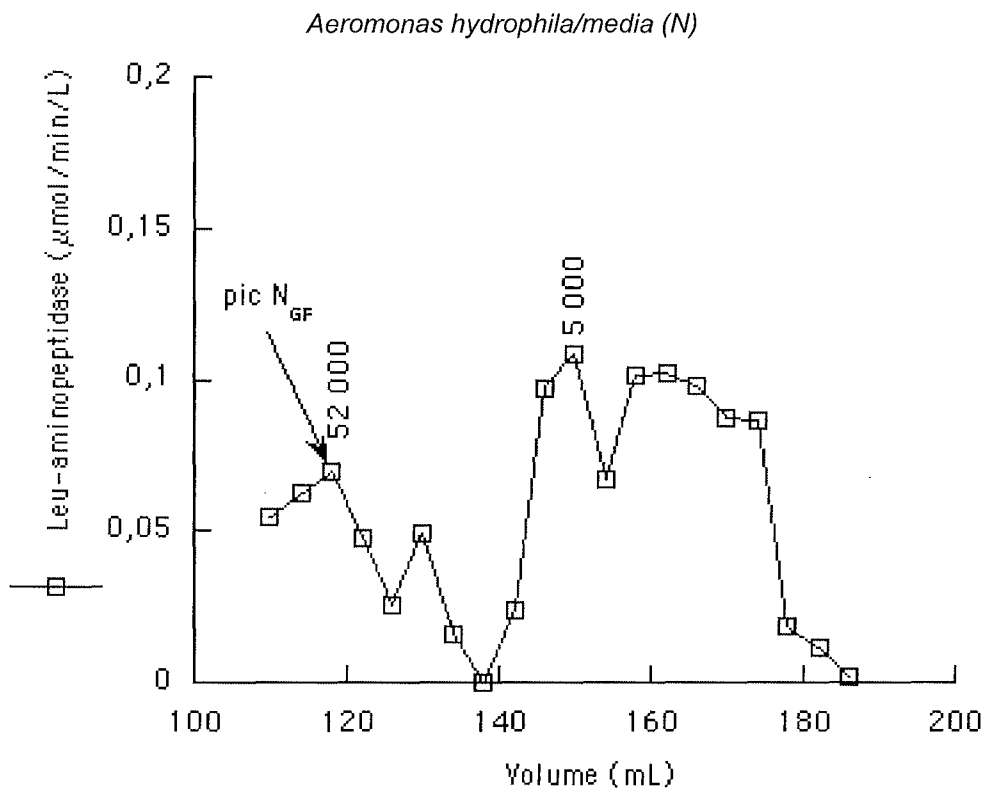
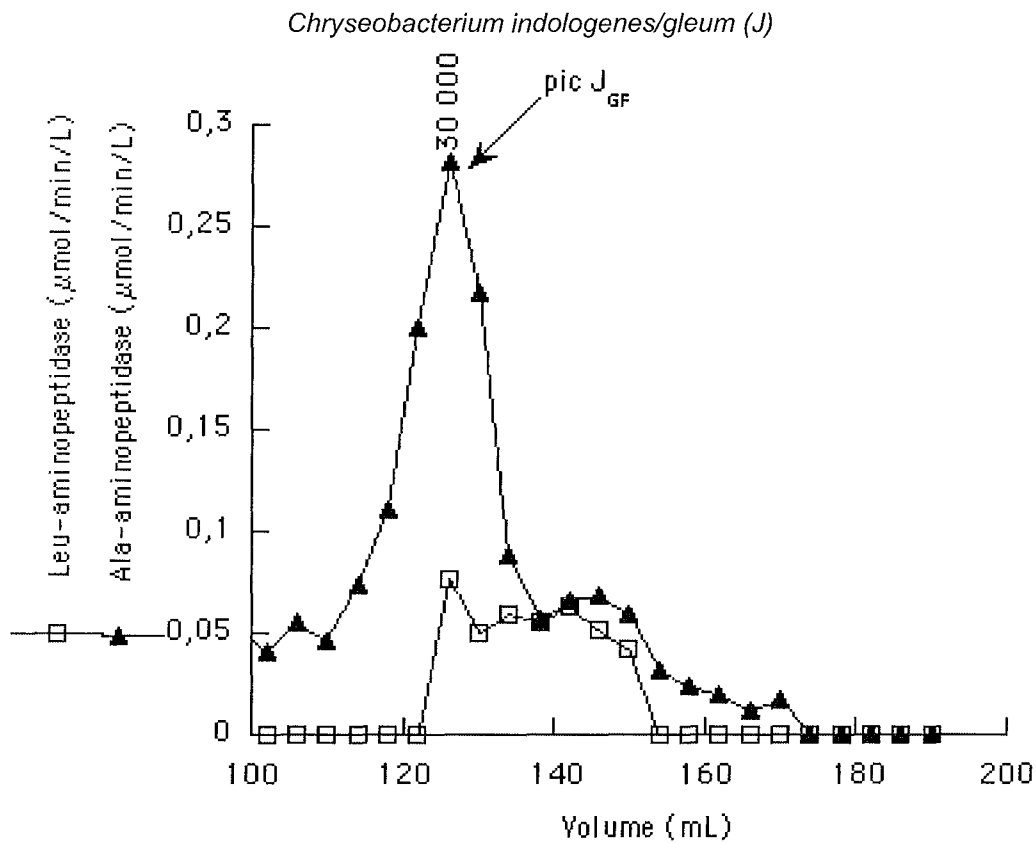


Figure 5. 9 : Comparaison des profils d'élution après filtration sur gel des pools des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase des souches *C. indologenes/gleum* (pool J), *A. hydrophila/media* (pool N), *A. hydrophila/media* (pool G), *A. media* (pool C) et *S. marcescens* (pool L) (n = 1). Les masses molaires correspondantes sont indiquées au-dessus des pics.

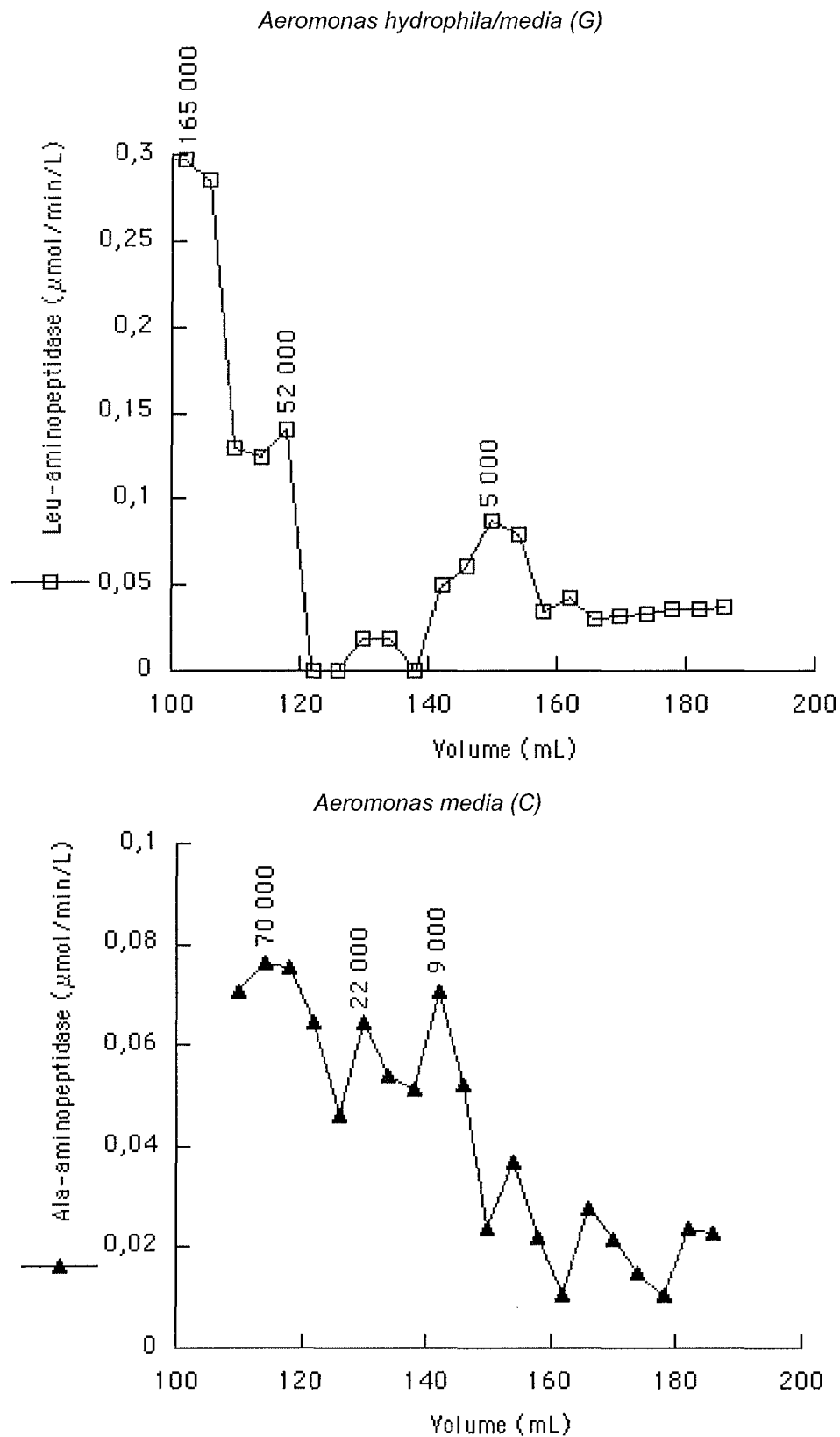


Figure 5. 9 (suite) : Comparaison des profils d'élution après filtration sur gel des pools des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase des souches *C. indologenes/gleum* (pool J), *A. hydrophila/media* (pool N), *A. hydrophila/media* (pool G), *A. media* (pool C) et *S. marcescens* (pool L) (n = 1). Les masses molaires correspondantes sont indiquées au-dessus des pics.

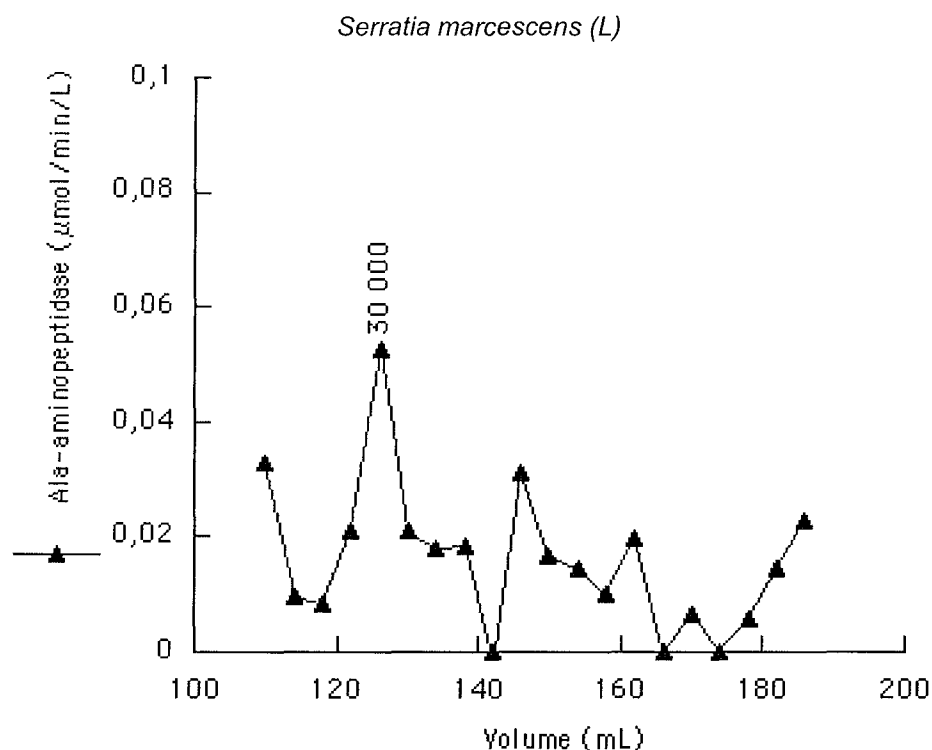


Figure 5. 9 (suite) : Comparaison des profils d'éluion après filtration sur gel des pools des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase des souches *C. indologenes/gleum* (pool J), *A. hydrophila/media* (pool N), *A. hydrophila/media* (pool G), *A. media* (pool C) et *S. marcescens* (pool L) (n = 1). Les masses molaires correspondantes sont indiquées au-dessus des pics.

Environ la moitié des aminopeptidase décrites à ce jour sont des monomères (47 %) ou sont associées sous forme de structures multimériques de 2, 4 ou 6 monomères (53 %). Seules deux aminopeptidases parmi 102 décrites ont montré des structure hétéro-multimériques (Gonzales et Robert-Baudouy, 1996). Parmi 80 aminopeptidases extracellulaires, issues de 56 souches bactériennes différentes, 41 ont une masse moléculaire comprise entre 20000 et 40000, 19 ont une masse moléculaire comprise entre 40000 et 60000 et seulement 1 a une masse moléculaire supérieure à 100000 (<http://srs6.ebi.ac.uk>). A titre de comparaison, une protéase extracellulaire ayant une masse moléculaire d'environ 24000 a été mise en évidence chez *Chryseobacterium indologenes* Ix9a (Venter et al., 1999). *Serratia marcescens* produits plusieurs protéases dont les masses moléculaires ont été estimées à 50900 (Salamone et Wodzinski, 1997) et 53500 et 66500 (Romero et al., 2001). *Aeromonas hydrophila* sécrète de nombreuses enzymes protéolytiques, dont les masses moléculaires varient de 30000 à 96000 (Cascón et al., 2000a; Cascón et al., 2000b; Santos et al., 1996). Ainsi, *Aeromonas hydrophila* QV12 produit 7 enzymes de masses moléculaires différentes en fonction des conditions de culture (30000, 42000, 45000, 55000, 64000, 75000 et 85000) et *Aeromonas hydrophila* L45 en produit 6 (30000, 40000, 48000, 55000, 64000 et 96000) (Santos et al., 1996). Trois de ces enzymes sont communes aux deux souches et seulement celle de masse moléculaire 30000 est produite quelles que soient les conditions de culture.

5.4.2. Masses molaires des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase associées aux EPS.

Les profils d'élution des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase après filtration sur gel des pool 1 et 3 de la chromatographie d'échange d'ions des EPS des boues (Figure 5. 10 et Figure 5. 11) sont très complexes. Ils montrent de nombreux pics, parfois relativement mal séparés, suggérant la présence d'un mélange complexe d'enzymes différentes. De plus, la présence d'activité enzymatique dans des fractions correspondant à des composés de masses moléculaires élevées suggère l'association des enzymes entre elles ou à d'autres composés, comme les composés humiques. Il est impossible de déterminer à ce stade de la séparation si les fractions possédant les deux activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase contiennent une ou plusieurs enzymes capables d'hydrolyser les deux substrats à la fois ou deux ou plusieurs enzymes hydrolysant spécifiquement l'un ou l'autre des substrats.

Les masses moléculaires correspondant à chacun des pics ont cependant été systématiquement déterminées pour les filtrations sur gel des pools 1 et 3 (Figure 5. 10 et Figure 5. 11). Les valeurs des masses moléculaires obtenues sont à considérer avec précaution car les expérimentations n'ont pas été répétées.

Ainsi, les résultats de la filtration sur gel du pool 1 des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase ont montré (Figure 5. 10) :

- 2 pics d'activité Ala-aminopeptidase contenant aussi des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase correspondant à des masses moléculaires de 9000 et 7000,
- 6 pics d'activité Leu-aminopeptidase contenant aussi des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase correspondant à des masses moléculaires de 198000, 98000, 40000, 28000, 24000, 14000 et 8000.

Les résultats de la filtration sur gel du pool 3 des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase ont montré (Figure 5. 11) :

- 1 pic d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase correspondant à une masse moléculaire de 10000,
- 3 pics d'activité Leu-aminopeptidase contenant aussi des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase correspondant à des masses moléculaires de 113000, 87000 et 16000,
- 3 pics d'activité Ala-aminopeptidase contenant aussi des protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase correspondant à des masses moléculaires de 460000, 150000 et 18000,
- 2 pics d'activité Ala-aminopeptidase correspondant à des masses moléculaires de 65000 et 37000.

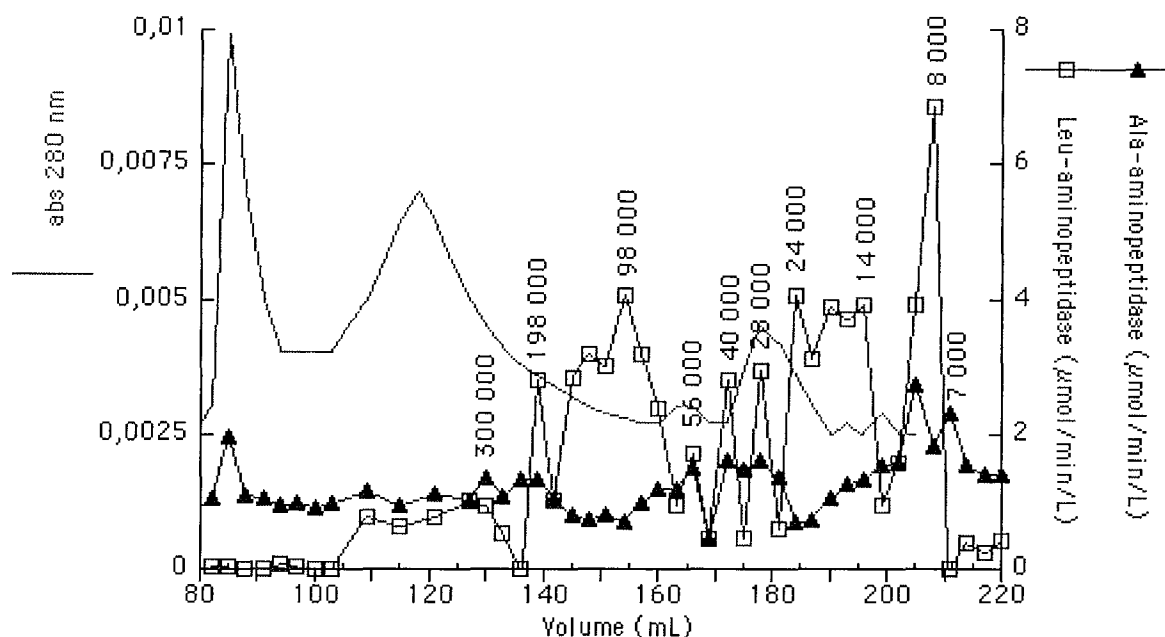


Figure 5. 10 : Profils d'élution des protéines dotées de l'activité Ala-aminopetidase et de l'activité Leu-aminopeptidase après filtration sur gel du pool 1 de la chromatographie d'échange d'ions. Les masses molaires correspondantes sont indiquées au-dessus de chaque pic.

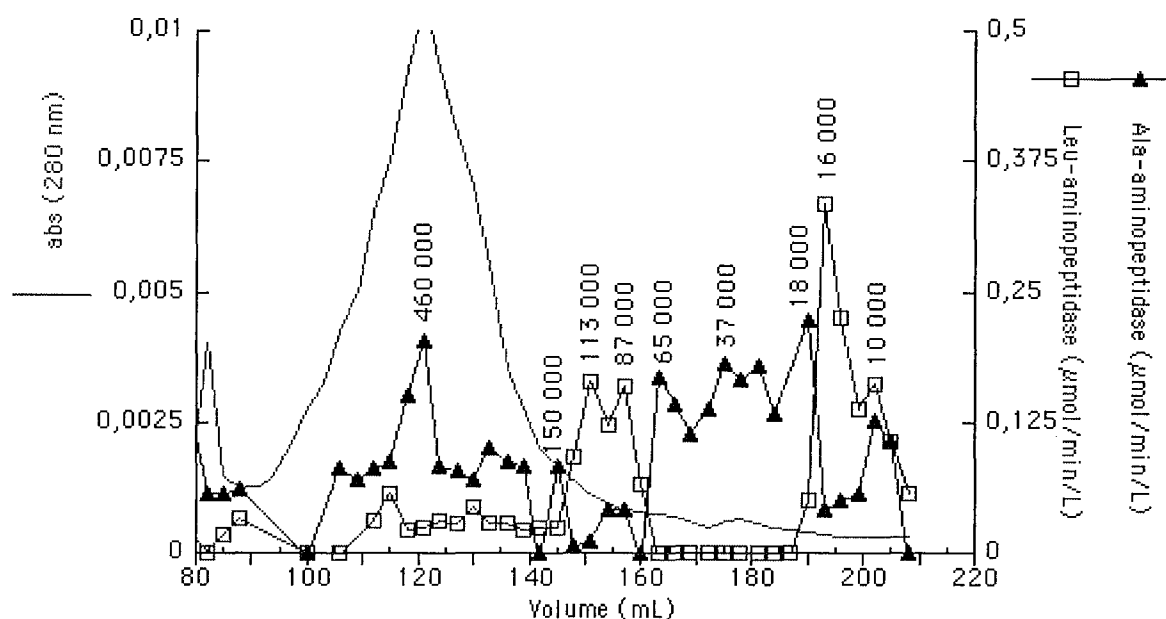


Figure 5. 11 : Profils d'élution des protéines dotées de l'activité Ala-aminopetidase et de l'activité Leu-aminopeptidase après filtration sur gel du pool 3 de la chromatographie d'échange d'ions. Les masses molaires correspondantes sont indiquées au-dessus de chaque pic.

**5.5. IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES DE QUELQUES PROTEINES.**

La composition en acides aminés de trois protéines a été déterminée par HPLC-MS-MS (Tableau 5. 7). Les protéines concentrées par ultracentrifugation (cf. 3.9.4) ont été séparées par électrophorèse (cf. 3.9.6). Le gel d'électrophorèse SDS-PAGE des protéines concentrées par ultracentrifugation du pic 1 de la chromatographie d'échange d'ions des EPS est présenté à titre d'exemple (Figure 5.12). Nous nous sommes intéressés en particulier à la bande à 50000 car une bande de masse moléculaire voisine a été observée sur les gels des souches *C. indologenes/gleum* (J) et *A. hydrophila/media* (N). Les bandes d'intérêt sont découpées dans les gels et les séquences peptidiques sont analysées par HPLC-MS-MS après digestion tryptique (cf. 3.9.7). Les séquences peptidiques obtenues ont été comparées entre elles et par rapport à des bases de données.

Tableau 5. 7 : Fragments peptidiques des protéines obtenus à partir de l'analyse par HPLC-MS-MS des protéines de *C. indologenes/gleum* (J), *A. hydrophila/media* (N) et des EPS de boues.

Origine des protéines	<i>C. indologenes/gleum</i> (J)	<i>A. hydrophila/media</i> (N)	EPS
Etape de la séparation	Gel filtration	Gel filtration	Echange d'ions
Fractions concentrées	Pic J <sub>GF</sub>	Pic N <sub>GF</sub>	Pic 1
Electrophorèse	Bande à 50000	Bande à 50000	Bande à 50000
Peptides	MSSSSGYGNSDK	LASYLDK	LTATED
	MSSSSGYESER	SQWVVSAAH	LTATEDAAAR
	LALDDFR	TLLDLNTR	MSSSSGYEMPK
	AEAESLYQSK	LNDLEDALQQAQ	TVAYQEAR
	VTMQGHMDR	EQFLNAAR	NLDLQG
	LASYLDK	TTNDNEQFLNEQFLNAAR	EDLTPR
	LENELNDYR	MLCVG	MDLTPR
	LENELQTYR	VTMQNLNDR	LNLMAGPSSR
	EAVCLSPR		EAVEY_ _K
	EAVNLNSK		LVYG
	SQWVV		NLVAQLGDK
	LSGW		ELS
	LSGLDDDR		MPQAATLAPCGR
	NVELDG		QSCLQLLYDGNNEER
	FHDADLHMR		LMQENGELVDL
	QGVADLNLGLR		AGMNGAGGMVLEGGADQMLN
			NMFQYHELV
			TGANATNLPAGGGAK
			EHELMSAGQR

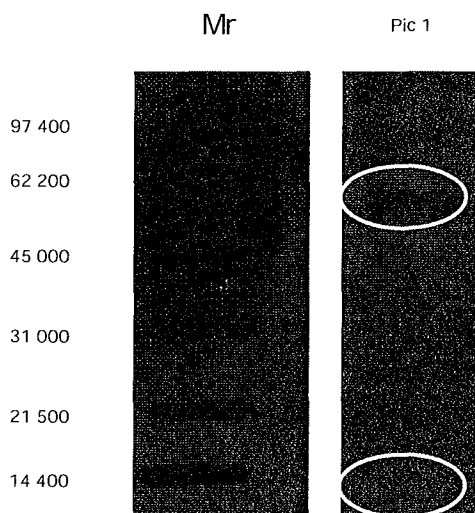


Figure 5. 12 : Photographie du gel d'électrophorèse SDS-PAGE des protéines concentrées par ultracentrifugation du pic 1 de la chromatographie d'échange d'ions des EPS.

La comparaison des séquences obtenues n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque analogie des protéines entre elles ou avec d'autres protéines déjà répertoriées. Néanmoins, ces résultats restent prometteurs pour la caractérisation de quelques enzymes d'intérêt au sein des EPS des boues activées et l'identification des micro-organismes qui les produisent. Aussi, ces analyses méritent d'être répétées. En particulier, l'amélioration des rendements de purification permettrait l'utilisation de la zymographie, c'est-à-dire de pouvoir détecter dans le gel d'électrophorèse les bandes correspondant aux protéines dotées de l'activité enzymatique d'intérêt.

En conclusion, cette étude a porté sur quelques membres seulement de la communauté microbienne des boues activées, mais elle laisse apercevoir la diversité des enzymes protéolytiques extracellulaires. De plus, parmi la palette d'activités présentes, nous avons concentrés nos travaux principalement sur les activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase, comme exemples d'activités protéolytiques.

L'extraction et la séparation de ces enzymes directement à partir des EPS de boues activées s'avère essentielle dans la mesure où :

- 1) la plupart des micro-organismes issus des boues ne poussent pas sur milieu gélosé,
- 2) la production des enzymes extracellulaires est clairement différente en fonction des conditions de culture ou des conditions environnementales,
- 3) la production des enzymes extracellulaires est aussi probablement influencée par l'agrégation.

Ces trois points limitent en effet considérablement la possibilité d'étudier à partir de souches pures les enzymes d'intérêt pour le procédé.

La séparation de quelques activités enzymatiques protéolytiques associées aux EPS des boues s'est révélée cependant complexe et reflète :

- 1) l'importante diversité des activités présentes,
- 2) l'association forte des enzymes aux autres protéines ou à d'autres molécules comme les substances humiques.

Il serait intéressant de compléter ces analyses par l'étude d'autres activités enzymatiques, afin d'améliorer notre compréhension de l'écosystème boues activées. En effet, d'autres observations ont suggéré la présence d'un faible nombre de lipases différentes (Gessesse et al., 2000) mais un nombre important d'estérases ayant la même spécificité (Boczar et al., 2001).



## 5.6. DISCUSSION.

La présence d'activités protéolytiques extracellulaires a pu être observée chez la plupart des bactéries isolées des boues activées. Les souches retenues, à savoir *C. indologenes/gleum*, *A. hydrophila/media*, *A. media* et *S. marcescens*, sont des bactéries traditionnellement présentes dans les produits laitiers et les milieux aquatiques. Il est possible que le milieu R2A-Agar utilisé pour l'isolement des bactéries ait favorisé la sélection de telles souches car il contient un hydrolysate de caséine qui pourrait être sélectif de ce type de bactéries. Toutefois, la plupart des souches cultivables issues des milieux aquatiques (20-97 % selon les milieux) ont montré une activité protéolytique extracellulaire (Chróst et al., 1986).

Les bactéries cultivables ne représentant qu'une très faible proportion (1 à 10 %) des bactéries des boues activées (Amann et al., 1998), les souches isolées ne représentent qu'une infime partie de la communauté bactérienne protéolytique des boues activées. Cependant, des profils chromatographiques des protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase très différents ont été mis en évidence en relation avec les différents genres bactériens étudiés, suggérant une importante diversité des enzymes extracellulaires sécrétées par les micro-organismes des boues activées.

En effet, les profils des protéines des EPS dotées d'activité Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase après chromatographie d'échange d'ions et filtration sur gel sont très complexes, suggérant la présence de nombreuses activités enzymatiques différentes et l'association des enzymes entre elles ou à d'autres composés des EPS. D'une part, la masse moléculaire des protéines des EPS déterminée par filtration sur gel a été rapportée comme très élevée, comprise entre 67000 à 200000 (Görner et al., 2003). D'autre part, les enzymes extracellulaires formeraient des complexes avec les substances humiques, comme cela a été montré dans les sols (Burns, 1989) et les milieux aquatiques (Wetzel, 1991). Contrairement aux résultats obtenus pour les souches pures, la présence de protéines dotées d'activité Ala-aminopeptidase et/ou Leu-aminopeptidase dans toutes les fractions de la chromatographie d'échange d'ions n'a pas permis la capture des enzymes d'intérêt de manière séparative. Les rendements de récupération des enzymes après chromatographie d'échange d'ions des EPS sont extrêmement faibles pour les deux activités Ala-aminopeptidase et Leu-aminopeptidase. La formation d'agrégats protéiques ou l'association avec d'autres composés pourrait expliquer l'importante perte d'activité au cours des étapes de séparation.

Il serait maintenant intéressant d'améliorer les rendements de purification, de manière à ne pas être limité par le seuil de détection des activités enzymatiques, en particulier lors de la filtration sur gel. De plus, cela permettrait l'utilisation en parallèle d'une technique de séparation électrophorétique, comme la zymographie, dont les résultats ne se sont pas révélés positifs pour l'instant. L'utilisation de substrats fluorescents pourrait aussi avantageusement augmenter la sensibilité de toutes ces analyses. L'ajout d'un détergent lors de la chromatographie d'échange d'ions, comme le Triton X-100, s'étant révélé inefficace pour améliorer la séparation des protéines dotées de l'activité enzymatique d'intérêt, une autre technique de capture des enzymes, par

exemple la chromatographie d'interactions hydrophobes, se révélerait peut-être plus efficace. A plus long terme, la séparation d'une enzyme d'intérêt au sein des EPS de boues activées permettrait, grâce à la combinaison de techniques immunologiques et d'imagerie microscopique, sa localisation in situ et la localisation des micro-organismes producteurs.

La mise en commun au sein des EPS des boues d'enzymes extracellulaires de spécificités différentes contribue à l'hydrolyse de substrats très complexes. De plus, la redondance fonctionnelle des activités enzymatiques permettrait aux cultures mixtes de maintenir une fonction hydrolytique stable, quelles que soient les conditions environnementales, comme l'a suggéré la présence dans les boues activées de nombreuses estérases de structures différentes (Boczar et al., 2001).

---

6. ACCESSIBILITE DES SUBSTRATS AUX  
ENZYMES EXTRACELLULAIRES ASSOCIEES  
AUX EPS.

---

### 6.1. INTRODUCTION.

Il a été clairement démontré que la vitesse d'hydrolyse de la matière organique des systèmes agrégés mixtes, comme les boues activées, est nettement supérieure à celle observée dans des cultures pures (Confer et Logan, 1997a, b), en particulier du fait de la mise en commun de diverses exo-enzymes au sein des EPS. Cependant, la vitesse d'hydrolyse des polymères et des particules organiques apparaît nettement plus lente que celle des composés de plus petite taille (Eliosov et Argaman, 1995; Orhon et Çokgör, 1997; Ubukata, 1998, 1999). La diffusion des macromolécules au sein des agrégats est certainement limitée par la matrice d'EPS, limitant par conséquent l'accessibilité des substrats aux enzymes extracellulaires et aux bactéries. En effet, les coefficients de diffusion dans les biofilms mixtes dépendent de la taille des composés (Lawrence *et al.*, 1994) et Tanaka *et al.*, (1984) ont montré que les composés de masse molaire élevée ( $M_r \geq 20000$ ) ne pénètrent pas dans un gel d'alginate utilisé comme modèle d'EPS. Ce type d'information est extrêmement rare pour les boues activées et mérite d'être déterminé car la vitesse de diffusion au sein des floccs de boues activées est susceptible d'être un facteur déterminant la vitesse d'hydrolyse des composés organiques véhiculés par les eaux usées. Cependant, d'une part la proportion et la répartition des enzymes hydrolytiques extracellulaires associées aux EPS et d'autre part la taille limite de diffusion au sein des EPS ne sont pas connues.

L'hypothèse est que la dispersion des agrégats augmenterait la vitesse d'hydrolyse des substrats macromoléculaires, contrairement aux substrats de faible masse molaire, considérés comme capables de diffuser au sein des agrégats.

Aussi, les objectifs de cette partie expérimentale sont :

- 1) de déterminer la proportion d'enzymes hydrolytiques associées aux EPS,
- 2) de déterminer dans quelle mesure l'agrégation limite la vitesse d'hydrolyse des substrats macromoléculaires en réduisant l'accessibilité aux enzymes hydrolytiques extracellulaires.

Les résultats ont fait l'objet d'un article paru en 2002 dans la revue *Enzyme and microbial Technology* (Cadoret A., Conrad A. et Block J.-C. Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges. *Enzyme and microbial Technology* 2002, 31(2), 179-186) présenté à la fin de cette partie.

### Protocole.

#### 1) Proportion d'enzymes hydrolytiques associées aux EPS.

La proportion d'activité enzymatique extracellulaire associée aux EPS extraits a été estimée en comparant l'activité enzymatique des EPS (cf. 3.7.4) à l'activité enzymatique totale des boues (cf. 3.7.3). L'activité totale a été déterminée sur les boues dispersées par ultrasons et résine échangeuse de cations (boues US + résine), c'est-à-dire avant l'étape de centrifugation qui permet de récupérer les EPS (surnageant de centrifugation) (cf. 3.5.2 et Figure 6. 1). Quatre activités enzymatiques différentes ont été testées, à savoir les activités Leu-aminopeptidase, protéase,  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase.

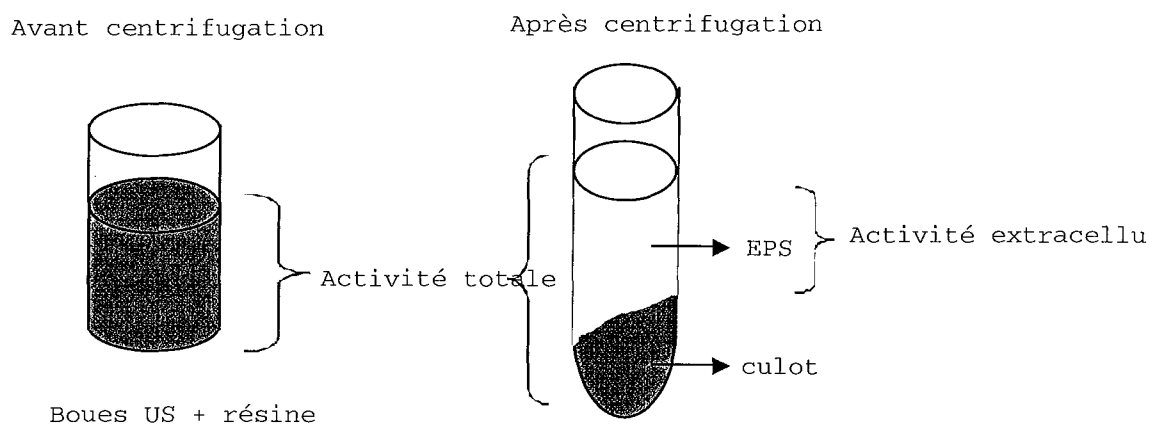


Figure 6. 1 : Protocole de détermination de la proportion d'activité enzymatique extracellulaire associée aux EPS par comparaison avec l'activité enzymatique totale des boues dispersées par ultrasons et résine échangeuse de cations (boues US + résine).

#### 2) Accessibilité aux enzymes extracellulaires.

L'accessibilité des substrats aux enzymes extracellulaires a été déterminée en comparant l'activité enzymatique des boues non dispersées (boues brutes) à celle des boues dispersées par ultrasons (boues + US) et des boues dispersées par ultrasons et résine échangeuse de cations (boues + US + résine). Les boues brutes et les boues dispersées ont été caractérisées par la distribution de taille des agrégats (cf. 3.3.4). Ainsi, quatre substrats de masse moléculaire et de nature différentes ont été testés : des substrats déterminant des activités protéolytiques, comme l'activité Leu-aminopeptidase (Leu-*p*-nitroanilide,  $M_r = 251$ ) et protéase (azocaséine,  $M_r = 25000$ ), et des substrats déterminant des activités glycolytiques, comme l'activité  $\alpha$ -glucosidase (*p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside,  $M_r = 301$ ) et l'activité  $\alpha$ -amylase (amylose azure,  $32000 \leq M_r \leq 86000$ ) (cf. 3.7.3).

## 6.2. PROPORTION D'ACTIVITE ENZYMATIQUE EXTRACELLULAIRE ASSOCIEE AUX EPS EXTRAITS DES BOUES.

La proportion d'activités enzymatiques associée aux EPS extraits des boues a été déterminée pour quatre activités hydrolytiques, en rapportant les activités enzymatiques des EPS à celles des boues + US + résine. La valeur d'activité enzymatique déterminée pour les boues + US + résine détermine la valeur de 100 %.

Nous avons par ailleurs vérifié que la somme des activités des EPS (surnageant de centrifugation) ( $1,59 \pm 0,24 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}_{\text{boues}}$ ) et des boues (culot de centrifugation) ( $4,60 \pm 0,65 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}_{\text{boues}}$ ) correspond à l'activité totale des boues US + résine ( $5,99 \pm 0,49 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}_{\text{boues}}$ ) ( $n = 3$  boues : n° 23, 24 et 25). Les caractéristiques physico-chimiques des boues sont présentées en Annexe 1 et la composition chimique des EPS est présentée en Annexe 2.

Une partie des activités Leu-aminopeptidase ( $17 \pm 8 \%$ ), protéase ( $23 \pm 8 \%$ ),  $\alpha$ -glucosidase ( $5 \pm 1 \%$ ) et  $\alpha$ -amylase ( $44 \pm 23 \%$ ) des boues US + résine est associée aux EPS extraits (Figure 6. 2). Les valeurs brutes de ces activités enzymatiques sont présentées en Annexe 3 et dans le Tableau 5 de l'article ci-joint publié dans *Enzyme and microbial Technology*, 2002, 31(2), 179-186. La plupart des enzymes restent associées aux EPS fortement liés aux floccs, c'est-à-dire non extractibles par la méthode utilisée, ou sont associées aux surfaces bactériennes.

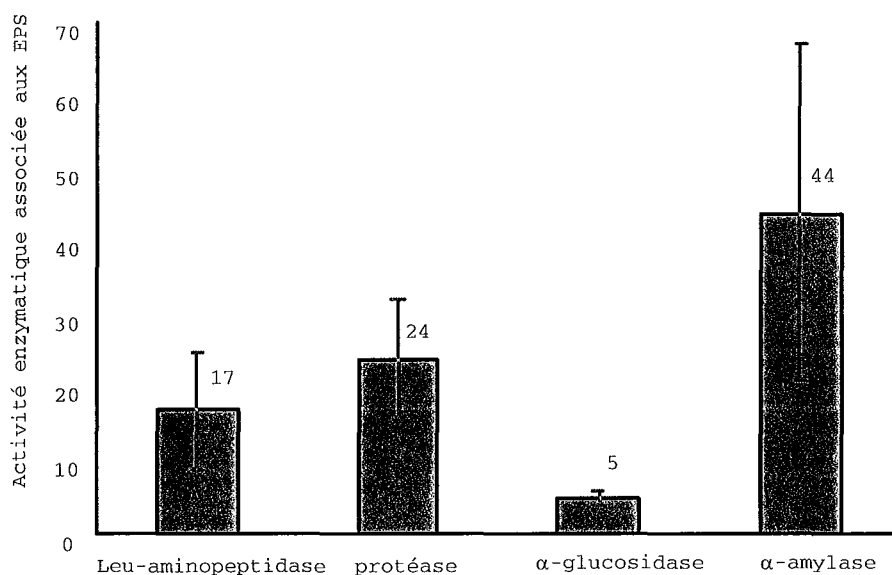


Figure 6. 2 : Comparaison de la proportion d'activités enzymatiques Leu-aminopeptidase et protéase associées aux EPS extraits des boues ( $n = 3$  boues : n° 15, 18 et 19) et proportions d'activités  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase associées aux EPS extraits des boues ( $n = 3$  boues : n° 27, 29 et 30). Les caractéristiques physico-chimiques des boues activées sont présentées en Annexe 1 et la composition chimique des EPS en Annexe 2.

### 6.3. ACCESSIBILITE DES SUBSTRATS MACROMOLECULAIRES AUX ENZYMES EXTRACELLULAIRES ASSOCIEES AUX EPS.

#### 6.3.1. Caractérisation des boues brutes et des boues dispersées.

La distribution granulométrique des boues montre une distribution légèrement asymétrique, typique de ce système dynamique, dans lequel les particules s'agrègent et se désagrègent constamment (Figure 6. 3). Le diamètre moyen apparent des agrégats bactériens des boues brutes est compris entre 6 et 600  $\mu\text{m}$  et 50 % du volume est occupé par des agrégats ayant un diamètre moyen apparent inférieur à 91  $\mu\text{m}$  (diamètre médian  $d_{50} = 91 \mu\text{m}$ ). L'application d'ultrasons, combinée ou non à l'utilisation de la résine échangeuse de cations, a un effet mesurable sur la distribution de taille des agrégats. La courbe de distribution de taille est déplacée vers les petites tailles, avec un diamètre moyen médian de 37  $\mu\text{m}$  pour les boues + US et de 28  $\mu\text{m}$  pour les boues + US + résine.

Bien que les agrégats de petite taille puissent être ignorés en terme de volume, ils sont dominants en nombre, avec 50 % des agrégats des boues brutes ayant un diamètre moyen apparent inférieur à 4  $\mu\text{m}$ . Les deux traitements dispersifs augmentent la fréquence des agrégats de petite taille, avec 99 % des agrégats des boues + US et des boues + US + résine ayant un diamètre moyen apparent inférieur à 4  $\mu\text{m}$ . Ainsi, la dispersion des agrégats bactériens augmente la surface de contact disponible.

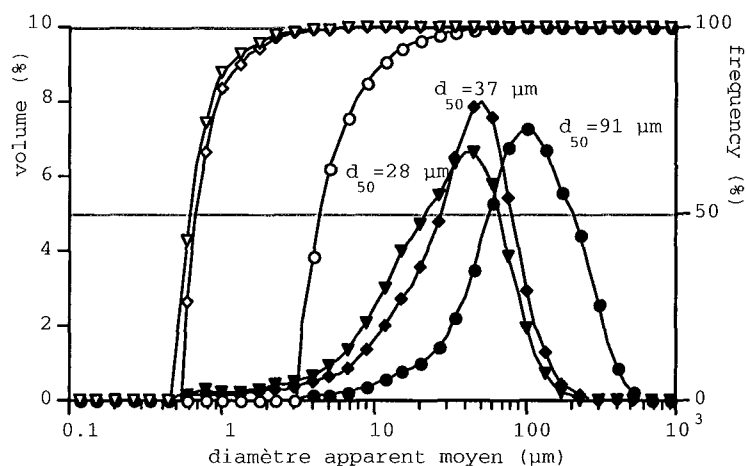


Figure 6. 3 : Distribution de taille des agrégats bactériens exprimée en volume pour les boues brutes (●), les boues dispersées par l'application d'ultrasons (boues + US) (◆) et les boues dispersées par l'application d'ultrasons et d'une résine échangeuse de cations (boues + US + résine) (▼) et distribution de taille des agrégats bactériens exprimée en nombre pour les boues brutes (○), les boues + US (◇) et les boues + US + résine (▽).  $d_{50}$  : diamètre médian.

### 6.3.2. Activités enzymatiques des boues brutes et des boues dispersées.

L'effet de la dispersion des agrégats sur l'hydrolyse enzymatique de substrats de masse molaires différentes a été évalué en comparant les activités enzymatiques Leu-aminopeptidase, protéase,  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase des boues dispersées (boues + US et boues + US + résine) aux activités enzymatiques des boues non dispersées (boues brutes). Les valeurs brutes de ces activités enzymatiques sont présentées en Annexe 3 et dans le Tableau 5 de l'article ci-joint publié dans *Enzyme and microbial Technology*, 2002, 31(2), 179-186.

Dans les boues + US, la vitesse d'hydrolyse du substrat L-Leu-aminopeptidase-*p*-nitroanilide ( $M_r = 251$ ), déterminant l'activité Leu-aminopeptidase, est plus importante que dans les boues totales. La vitesse d'hydrolyse du substrat *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside ( $M_r = 301$ ), déterminant l'activité  $\alpha$ -glucosidase, diminue d'environ 20 % dans les boues + US par rapport aux boues totales ( $p < 0,01$ ). Une faible diminution est aussi observée pour la vitesse d'hydrolyse de l'azocaséine ( $M_r = 25000$ ), déterminant l'activité protéase, alors que la vitesse d'hydrolyse de l'amylose azure ( $32000 < M_r < 86000$ ) montre une tendance à l'augmentation.

La dispersion des agrégats bactériens par les ultrasons suivie de la résine échangeuse de cations a un effet mesurable sur les vitesses d'hydrolyse par rapport aux vitesses d'hydrolyses déterminées sur les boues non dispersées. L'activité Leu-aminopeptidase augmente légèrement pour deux des trois boues testées ( $p < 0,01$ ). Trois situations différentes sont observées pour l'activité protéase, l'activité étant soit plus importante ( $p < 0,05$ ), soit identique, soit plus faible ( $p < 0,05$ ). L'activité  $\alpha$ -glucosidase diminue systématiquement d'environ 20 % dans les trois boues testées ( $p < 0,05$ ). Par contre, la dispersion des agrégats par ultrasons et résine augmente de manière significative ( $p < 0,01$ ) l'activité  $\alpha$ -amylase, d'environ 6 fois.

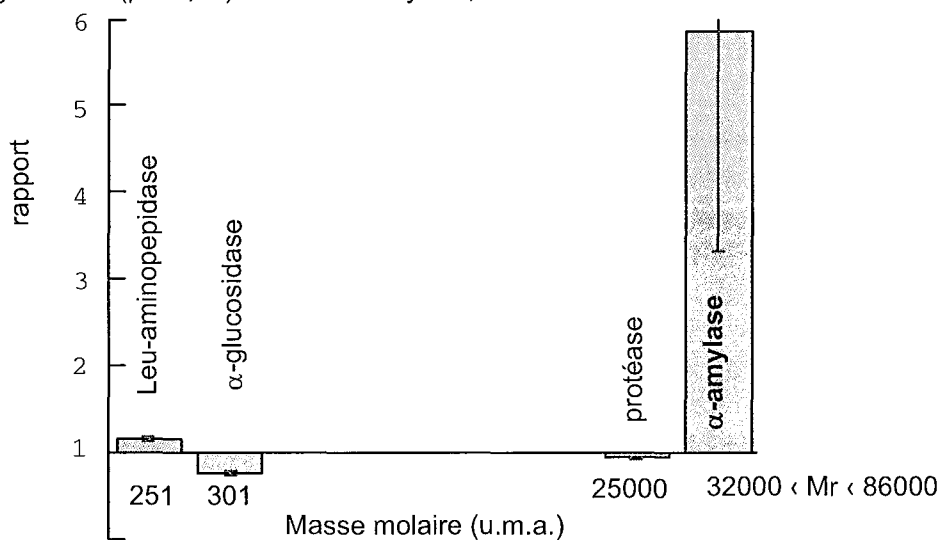


Figure 6. 4 : Rapport des activités enzymatiques Leu-aminopeptidase et protéase des boues US + résine sur les activités enzymatiques des boues brutes (ratio) ( $n = 3$  boues : n° 15, 18 et 19) et rapport des activités enzymatiques  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase des boues US + résine sur les activités enzymatiques des boues brutes (ratio) ( $n = 3$  boues : n° 27, 29 et 30). Les caractéristiques physico-chimiques des boues activées sont présentées en Annexe 1 et la composition chimique des EPS est présentée en Annexe 2.



#### 6.4. Discussion.

La proportion d'activité enzymatique associée aux EPS dépend de l'activité enzymatique étudiée. 56 à 95 % de l'activité reste associée aux agrégats après l'extraction des EPS. Les enzymes sont ainsi associées soit à des polymères très fortement liés aux cellules, soit aux surfaces bactériennes, comme c'est le cas des phosphatases extracellulaires, qui sont localisées préférentiellement à proximité des cellules plutôt que dispersées dans la matrice de polymères (Van Ommen Kloeke et Geesey, 1999). Une proportion d'activité enzymatique variant de 5 à 44 % selon les enzymes a été mise en évidence au sein des EPS, suggérant que la stratégie bactérienne pour récupérer de l'énergie et du carbone à partir des substrats macromoléculaires est dépendante du type de substrat. Néanmoins, nos résultats ne permettent pas de conclure que cette proportion est constante quelles que soient les conditions environnementales, car les essais ont été réalisés sur trois boues différentes prélevées sur une période d'un mois.

La dispersion des agrégats par les ultrasons augmente le nombre de particules de petite taille, en accord avec les travaux de Jorand *et al.* (1995) et de Bruus *et al.* (1992), sans toutefois disperser complètement les agrégats en entités unicellulaires. Bien que nous n'ayons pas pu vérifier si la dispersion des agrégats avait un effet sur le micro-environnement des enzymes extracellulaires, la diffusion au sein des EPS ne semble pas limiter la disponibilité des substrats de masse moléculaire élevée (jusqu'à 25000). Ainsi, la dispersion des agrégats n'a eu aucun effet mesurable sur la vitesse d'hydrolyse de l'azocaséine ( $M_r = 25000$ ). Ces résultats sont en contradiction avec des études précédentes ayant montré que seules des molécules de masse inférieure à 20000 ( $\alpha$ -lactoalbumine) étaient capables de diffuser dans un gel d'alginate utilisé comme modèle d'EPS (Tanaka *et al.*, 1984) et que la diffusion de molécules de dextrane, de masses molaires de 4000 à 2000000, était réduite de 55 à 98 % respectivement, par rapport à la diffusion de la fluorescéine ( $M_r = 289$ ) dans un biofilm mixte (Lawrence *et al.*, 1994). Par contre, la dispersion des agrégats bactériens a augmenté considérablement la vitesse d'hydrolyse de l'amylose azure ( $32000 < M_r < 86000$ ).

Si une masse molaire importante est d'une manière générale un facteur limitant la diffusion des composés au sein des agrégats, l'effet du traitement de dispersion sur l'accessibilité aux enzymes extracellulaires semble dépendre de la conformation spatiale des molécules. Ainsi, la différence de structure des deux composés macromoléculaires testés pourrait expliquer l'effet observé de la dispersion des agrégats sur leur vitesse d'hydrolyse. En effet, l'azocaséine est une protéine soluble, alors que l'amylose-azure est un polymère de glucose liés en  $\alpha(1-4)$  en chaînes plus ou moins longues formant des granules dont la taille peut atteindre 20  $\mu\text{m}$  (Dold *et al.*, 1995). Il s'avère alors que l'accessibilité des substrats aux enzymes extracellulaires dépend moins de la masse molaire que de la surface des composés (Sanders *et al.*, 2000) ou de leur charge (Carlson et Silverstein, 1998).

Ces résultats méritent d'être confirmés en testant par exemple d'autres macromolécules et d'autres méthodes de dispersion des agrégats.

En conclusion, l'accessibilité de l'azocaséine dont la masse moléculaire est inférieure à 25000 aux enzymes extracellulaires des EPS des boues activées est identique quel que soit l'état d'agrégation ou de dispersion des agrégats bactériens. Ces résultats suggèrent que la diffusion des macromolécules au sein des floccs de boues activées ne limite pas leur vitesse d'hydrolyse. Contrairement aux biofilms fixés sur des surfaces, les floccs de boues activées sont des structures dynamiques dont l'agrégation et la désagrégation perpétuelles augmentent considérablement les échanges de matière et par conséquent la disponibilité des substrats. L'hydrolyse des macromolécules constitue alors l'étape limitant le processus de biodégradation de la matière organique et la vitesse de biodégradation dépend plutôt des paramètres environnementaux susceptibles d'influencer l'expression des enzymes hydrolytiques.



ELSEVIER

Enzyme and Microbial Technology 31 (2002) 179–186

ENZYME and  
MICROBIAL  
TECHNOLOGY

www.elsevier.com/locate/enzmictec

# Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges

Aurore Cadoret\*, Arnaud Conrad, Jean-Claude Block

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie Pour, l'Environnement-L.C.P.M.E., UMR 7564 Université Nancy 1-CNRS,  
15 Avenue du Charmois, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Received 24 July 2001; received in revised form 1 March 2002; accepted 11 March 2002

## Abstract

Our primary objective was to investigate the extent to which the diffusion of high molecular weight compounds through the matrix of exopolymers in activated sludge aggregates reduces their availability to the extracellular enzymes. We found that 17% of L-Leu-aminopeptidase, 5% of  $\alpha$ -glucosidase, 23% of protease and 44% of  $\alpha$ -amylase activities were associated to the easily extractable extracellular polymeric substances (EPS) from the flocs. Surprisingly, when activated sludge flocs were dispersed by the use of both ultrasounds and a cation exchange resin, the rate of protein (azocasein, MW = 25,000) hydrolysis did not increase whereas the rate of polysaccharide (amylose azure, 32,000 < MW < 86,000) hydrolysis increased five-fold. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Activated sludge; Extracellular enzymatic activity; Bio-availability; Exopolymers; Hydrolysis

## 1. Introduction

Organic matter carried by urban wastewater is a complex mixture of single carbohydrates, amino acids, alcohols and volatile fatty acids mixed with polymers and heteropolymers including proteins (1/3 of chemical oxygen demand, COD), polysaccharides (1/5 of COD) and lipids (1/3 of COD) [1]. A large fraction of this wastewater organic matter (30–85%) consists of particles larger than 0.1  $\mu\text{m}$  [2] preventing them from being directly assimilated by microorganisms. Hisano et al. [3] recently showed that alginate is directly taken up (MW = 26,000) by *Sphingomonas* sp. A1 through a mouth-like pit on its cell surface. However, in most of the cases only monomers and oligomers (MW < 1000) are able to cross the bacterial membrane [4–6] via specific active transports [7]. For example, in seawater only small peptides (MW < 600–700) are imported directly into the cell [8,9]. It is well known that before bacteria can assimilate high molecular weight compounds, the compounds are usually hydrolysed by extracellular enzymes. These extracellular enzymes are either bound to the cell surface (ecto-enzymes) [10] or released (exo-enzymes) into the medium in the free form [11] before forming complexes with humic substances or other polymers [12]. The activity of ecto-enzymes may

be tightly coupled to substrate incorporation at low concentrations [13].

These extracellular enzymes are involved in the biodegradation of high molecular weight compounds by sewage biofilms [14–17] and activated sludge flocs [18–22]. Complex wastewater organic matter is biodegraded by various enzymes expressed by the mixed-species microbial aggregates [23]. In activated sludge flocs, the localisation of extracellular enzymes has not been clearly established. A few studies have proved that exo-enzymes are associated to the extracellular polymeric substances (EPS) [24–27]. However, the distribution of extracellular enzymes between the cell surface and the EPS is still unknown.

The hydrolysis of wastewater polymers to monomers appears to be the rate-limiting step of the biodegradation process as shown by the fact that high molecular weight compounds are hydrolysed slowly [28–31]. Moreover, the microbial EPS matrix may hinder the diffusion of substrates in the activated sludge flocs and their availability to extracellular enzymes. The diffusion coefficients in mixed-species biofilms are size-dependent [32,33] showed that high molecular weight compounds (MW > 20,000) are totally excluded from the alginate gel used as an EPS model. It is not known how this slow diffusion of organic compounds through the EPS matrix limits their availability to the extracellular enzymes of bacterial aggregates although the efficiency of the activated sludge process depends on the hydrolytic capacity.

\* Corresponding author. Tel.: +33-3-68-22-31; fax: +33-3-68-22-33.

E-mail address: aurore.cadoret@pharma.uhp-nancy.fr (A. Cadoret).

We aimed to compare the hydrolytic activities of whole and dispersed activated sludges to determine to what extent the aggregation state and the diffusion through the EPS matrix limit substrate availability to the extracellular enzymes. Activated sludge flocs were dispersed either by ultrasounds (i.e., sludge + US) or by both ultrasounds and a cation exchange resin (i.e., sludge + US + resin) that removes the bivalent cations such as  $\text{Ca}^{2+}$  involved in bridging between EPS and causes the flocs to break-up [34–37]. The whole and the dispersed (US and US + resin) sludges were characterised by their granulometric distribution. The effect of substrate availability was investigated by comparing the hydrolysis rate of low and high molecular weight compounds either with peptide bonds (L-Leu-*p*-nitroanilide, MW = 251, and azocasein, MW = 25,000) or with  $\alpha(1\text{--}4)$  glucan bonds (*p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, MW = 301, and amylose azure, 32,000 < MW < 86,000). The contribution of exo-enzymes associated with EPS in the global extracellular enzymatic activity was measured by comparing the hydrolytic activity of the extracted EPS and the sludge dispersed by ultrasounds and resin.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling and characterisation of activated sludge

Activated sludges were sampled from the aeration tank of Nancy–Maxéville wastewater treatment plant. To remove weakly sorbed organic matter, activated sludge was first washed as follows: 2 litres sludge was allowed to settle for 30 min at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  and 1 litre of supernatant was replaced by deionised water. After manual homogenisation, the sludge was allowed to settle again and 1 litre of the supernatant was replaced by deionised water. Washed activated sludge was characterised by determining the amounts of total (TS) and volatile solids (VS) as specified in the *Standard Methods* [38]. The variations on the measure were 1.4 and 2.3% for TS and VS, respectively. The sludge capacity to settle was determined by calculating the sludge volume index (SVI):  $\text{SVI} = \text{settled sludge volume (ml/l)} \times 1000/\text{TS (mg/l)}$ . The sludge was allowed to settle for 30 min at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  in a 1 litre glass test tube. The  $\text{pH}_{20^\circ\text{C}}$  (pH-meter HANNA instruments HI 9321) and conductivity ( $k_{20^\circ\text{C}}$ , conductimeter Bioblock WTW LF320, probe WTW A325) of the sludge supernatant that had been allowed to settle for 30 min were determined.

### 2.2. Dispersion of activated sludge and extraction of EPS

The whole sludge samples consisted of washed activated sludge flocs. The whole sludge was dispersed by a combination of a physical and a chemical technique: ultrasounds and ion exchange [36]. Activated sludge flocs were dispersed by ultrasounds as follows: fractions of 50 ml of washed

sludge were treated for 20 s with a 19 mm ultrasound probe (Labsonic 2000U, 37 W) immersed 15 mm into the liquid. Sludge was kept on ice for 15 min before and throughout the ultrasound treatment. Samples (i.e., sludge + US) were put aside for further enzymatic assays. Cations were subsequently removed by mixing a cation exchange resin (Dowex- $\text{Na}^+$  50  $\times$  8, Merck 44,445) (70 g/g VS) with the remaining ultrasound-treated sludges. This mix was stirred with a plate paddle at 400 rpm at  $4^\circ\text{C}$  for 45 min in a baffle beaker. After the resin had settled, samples of dispersed sludge (i.e., sludge + US + resin) were put aside for further enzymatic assays and the rest was centrifuged at  $35,000 \times g$  for 60 min at  $4^\circ\text{C}$  to separate the extracellular substances from the biomass. Extracted EPS were carefully removed by pipetting the supernatant and kept on ice until required.

### 2.3. Size distribution of particles in whole and dispersed sludges

The granulometric distribution of whole and dispersed activated sludge flocs was measured with a laser beam diffraction granulometer (Horiba LA 920) over a 0.02–2000  $\mu\text{m}$  size range. The size distribution was calculated from the scattered light as volume distribution (ratio of occupied/total volume) for each size category. The volume distribution was then used to calculate the distribution in terms of number of particles.

### 2.4. Enzyme assays

Enzymatic tests were carried out on substrates and sludges or EPS samples that had been warmed to  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  in a water bath. The glassware was baked at  $550^\circ\text{C}$  before use. The assays were optimised for substrate concentration related to initial hydrolysis rate measurements. Enzymatic activity was determined in triplicate for each sample tested (sludges 1–6 and related EPS). Control samples were assessed by boiling the sludge and EPS for 20 min.

The enzymatic activities tested in whole and dispersed sludges and EPS were L-Leu-aminopeptidase [39], protease [40],  $\alpha$ -glucosidase [41], and  $\alpha$ -amylase [18]. The related enzymatic assays were based on the release of a chromogen following the hydrolysis of the following synthetic substrates: L-Leu-*p*-nitroanilide (Sigma L9125, MW = 251), azocasein (Sigma A2765, MW = 25,000), *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (Sigma N1377, MW = 301) and amylose azure (Sigma A3508, 32,000 < MW < 86,000), respectively.

#### 2.4.1. Determination of L-Leu-aminopeptidase activity in the whole and dispersed sludges and in the EPS

Sludge samples (20 ml) were mixed with 8 ml 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) in 100 ml Pyrex glass flasks (Pro-labo 09833.053) and stirred at 150 rpm. The reaction was initiated by adding 12 ml of a 0.05% (w/v) substrate solution prepared by dissolving L-Leu-*p*-nitroanilide (Sigma L9125)

in 0.02 M Tris–HCl buffer (pH 7.6). Aliquots (2.5 ml) were sampled at regular time intervals in glass tubes. The reaction was stopped by immersing the tubes in boiling water for 5 min. Samples were centrifuged at  $2500 \times g$  for 5 min and the absorbance of the supernatants was measured at 410 nm.

EPS (2 ml) were mixed with 1 ml substrate solution in a spectrophotometer cuvette. The absorbance at 410 nm was automatically recorded at regular time intervals.

The L-Leu-aminopeptidase activities are expressed in  $\mu\text{mol}$  of nitroaniline produced/min/g VS.

#### 2.4.2. Determination of protease activity in the whole and dispersed sludges and in the EPS

Sludge samples (25 ml) were placed in 100 ml Pyrex glass flasks (Prolabo 09833.053) and stirred at 150 rpm. The reaction was initiated by adding 25 ml of a 0.2% (w/v) substrate solution prepared by dissolving azocasein (Sigma A2765) in a phosphate buffer at pH 7.6 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.74 g/l;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 12.4 g/l). Aliquots (0.5 ml) were sampled at regular time in polystyrene tubes. The reaction was stopped by adding 0.5 ml cold trichloroacetic acid 10% (w/v). Samples were incubated on ice for 10 min. After centrifugation at  $2500 \times g$  for 5 min, the absorbances of the supernatants were read at 340 nm.

Extracted EPS samples (9 ml) were mixed with 1 ml substrate solution in a 10 ml flask and stirred at 150 rpm. Aliquots (0.5 ml) were sampled at regular intervals in polystyrene tubes. The reaction was stopped by adding 0.5 ml cold trichloroacetic acid 10% (w/v). Samples were incubated on ice for 10 min. Absorbances were read at 340 nm.

The protease activities are expressed in  $\Delta\text{Abs}/\text{min}/\text{g}$  VS.

#### 2.4.3. Determination of $\alpha$ -glucosidase activity in the whole and dispersed sludges and in the EPS

Sludge samples (20 ml) were mixed with 12 ml 0.02 M Tris–HCl buffer (pH 7.2) in 100 ml Pyrex glass flasks (Prolabo 09833.053) and stirred at 150 rpm. The reaction was initiated by adding 8 ml of a 0.5% (w/v) substrate solution prepared by dissolving *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (Sigma N1377) in a 0.02 M Tris–HCl buffer at pH 7.2. Aliquots (2.5 ml) were sampled at regular time in glass tubes. The reaction was stopped by immersing the tubes in boiling water for 5 min. After centrifugation at  $2500 \times g$  for 5 min, the absorbances of the supernatants were read at 410 nm.

Extracted EPS samples (20 ml) were mixed with 5 ml substrate solution in a 100 ml flask and stirred at 150 rpm on a magnetic stirrer. Aliquots (2.5 ml) were sampled at regular intervals and absorbances were read at 410 nm.

The  $\alpha$ -glucosidase activities are expressed in  $\mu\text{mol}$  of *p*-nitrophenol produced/min/g VS.

#### 2.4.4. Determination of $\alpha$ -amylase activity in the whole and dispersed sludges and in the EPS

A total amount of 5 ml of a 0.15% (w/v) substrate solution prepared by dissolving amylose azure (Sigma A3508) in a phosphate buffer at pH 7.2 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.02 g/l;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,

10 g/l) was placed in 100 ml Pyrex glass flasks (Prolabo 09833.053) and stirred at 150 rpm for 15 h to allow swelling. The reaction was initiated by adding 20 ml of sludge. Then, 2 ml aliquots were sampled at regular intervals in polystyrene tubes. The reaction was stopped by adding 2 ml cold trichloroacetic acid 10% (w/v). Samples were incubated on ice for 10 min. After centrifugation at  $2500 \times g$  for 5 min, the absorbances of the supernatants were read at 620 nm.

Extracted EPS samples (20 ml) were mixed with 5 ml substrate solution in a 100 ml flask and stirred at 150 rpm on a magnetic stirrer. Aliquots (2 ml) were sampled at regular intervals in polystyrene tubes. The reaction was stopped by adding 2 ml cold trichloroacetic acid 10% (w/v). Samples were incubated on ice for 10 min. After centrifugation at  $2500 \times g$  for 5 min, the absorbances of the supernatants were read at 620 nm.

The  $\alpha$ -amylase activities are expressed in  $\mu\text{mol}$  of remazol brilliant blue/min/g VS.

### 2.5. Analysis of EPS composition

Protein concentrations were determined according to the method of Lowry et al. [42] and the results were expressed in mg equivalent bovine serum albumin/g VS. As proposed by Frølund et al. [25], the results were corrected for non-specific color development, which was shown to be caused by humic-like substances: absorbance was measured with and without  $\text{CuSO}_4$ .  $\text{Abs}_{\text{protein}} = 1.25(\text{Abs}_{\text{with CuSO}_4} - \text{Abs}_{\text{without CuSO}_4})$  and  $\text{Abs}_{\text{humic}} = \text{Abs}_{\text{without CuSO}_4} - 0.2 \times \text{Abs}_{\text{protein}}$ . The results were expressed in mg equivalent humic acid, sodium salt/g VS. Carbohydrate concentrations were determined according to the method of Dubois et al. [43] and the results were expressed in mg equivalent glucose/g VS.

All assays were replicated three times and the variations on the measure were on average 2.3% for protein concentrations, 7.7% for humic substances concentrations, and 5.4% for the carbohydrate concentrations.

## 3. Results

### 3.1. Characterisation of whole and dispersed sludges

The activated sludge flocs tested in this study were sampled from the average load wastewater treatment plant of Nancy–Maxéville (300,000 inhabitant equivalents). Their characteristics were representative of a system with a good settling capacity (Table 1).

The granulometric study of whole sludge showed that the distribution was slightly asymmetrical, which is typically for a dynamic system in which the particles are constantly aggregating and disaggregating (Fig. 1). The mean apparent diameter of the flocs was between 6 and 600  $\mu\text{m}$  and 50% of the volume consisted of flocs with a mean apparent diameter of less than 91  $\mu\text{m}$  (median diameter  $d_{50} = 91 \mu\text{m}$ ).

Table 1  
Average characteristics of activated sludges ( $n = 6$  sludges)

Sludge	Date	$T$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	pH	$k$ ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )	TS (g/l)	VS (g/l)	SVI (ml/g)
1	8 June	nd <sup>a</sup>	7.0	906	1.59	1.12	126
2	26 June	18	7.0	861	1.45	1.00	138
3	3 July	20	7.3	795	1.61	1.18	118
4	30 October	15	7.4	829	1.98	1.43	126
5	23 November	12	7.5	975	2.57	1.67	129
6	28 November	12	7.3	nd <sup>a</sup>	2.61	1.65	115
Mean	–	15.3	7.3	873	1.97	1.34	125
S.D.	–	4	0.2	70	0.5	0.3	8

<sup>a</sup> Not determined.

Ultrasounds either alone or combined with cation extraction had a measurable effect on the granulometric distribution. The floc size distribution curve was shifted to the small size classes, with a median diameter of  $37 \mu\text{m}$  for the sludges dispersed by ultrasounds and  $28 \mu\text{m}$  for the sludges dispersed by US and resin.

Although the small flocs in the whole sludges can be ignored in terms of volume, they were dominant in number as 50% of the particles had a mean apparent diameter of below  $4 \mu\text{m}$ . The dispersion treatments increased the frequency of the small flocs; 99% of the particles had a mean apparent diameter of less than  $4 \mu\text{m}$  in the sludges dispersed by ultrasounds alone or in combination with the resin. As a result, the surface available for hydrolysis was increased.

### 3.2. Kinetic parameters of L-Leu-aminopeptidase and $\alpha$ -glucosidase associated to EPS

EPS were recovered after the dispersion of bacterial aggregates and the kinetic parameters of the extracellular enzymes were assayed. The extraction of the extracellular matrix eliminated the diffusion limits caused by the aggregation, which rendered the tested substrates available to the extracellular enzymes. The kinetic analysis only studied the enzymatic hydrolysis of substrates with a single bond, i.e.,

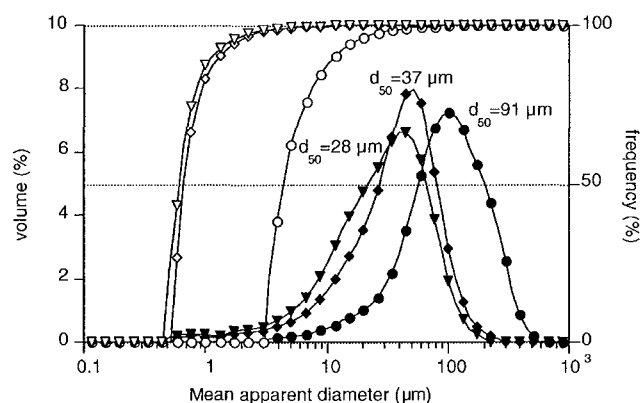


Fig. 1. Floc size distribution by volume of whole sludge (●), sludge + US (◆), and sludge + US + resin (▼), and floc size distribution by number of whole sludge (○), sludge + US (◇), and sludge + US + resin (▽).

L-Leu-*p*-nitroanilide and *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, and thus excluded the polymeric substrates, i.e., azocasein and amylose azure, because their hydrolysis produces a complex mixture of products some of which may serve as substrates.

The Michaelis–Menten method of constructing enzyme saturation curves was used to determine the apparent Michaelis constant ( $K_m$ ) and the maximal hydrolytic rate ( $V_m$ ) of L-Leu-aminopeptidase and  $\alpha$ -glucosidase. The hydrolytic rates were the apparent values resulting from the measure of total enzymatic activities. They fitted the Michaelis–Menten equation giving a rectangular hyperbola when the velocity of reaction ( $V$ ) was plotted against increasing concentrations of substrate ( $[S]$ ). The kinetic parameters were determined by use of the linear regression analysis suggested by Lineweaver and Burk:  $1/V = 1/V_m + (K_m/V_m)(1/[S])$  (Fig. 2). L-Leu-aminopeptidase generally had a higher affinity for the substrate than  $\alpha$ -glucosidase (apparent  $K_m$  values were  $107 \pm 36$  and  $245 \pm 73 \mu\text{mol/l}$ , respectively) (Table 2). The proteolytic enzymes displayed higher global activity ( $9.5 \pm 3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}_{\text{EPS}}$ ) than glycolytic enzymes ( $0.9 \pm 0.2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}_{\text{EPS}}$ ).

### 3.3. Hydrolytic activity of whole and dispersed sludges

Whole and dispersed sludges hydrolysed both the high and low molecular weight substrates (Table 3). The proteolytic enzymes of the whole sludges sampled over several weeks displayed more stable activity than the glycolytic enzymes. L-Leu-aminopeptidase and protease activities fluctuated by an average of 25% whereas  $\alpha$ -glucosidase activity varied by about 45%. The activity of the  $\alpha$ -amylase was especially variable, reaching 105%. The peptide bond was hydrolysed

Table 2  
Kinetic parameters of L-Leu-aminopeptidase and  $\alpha$ -glucosidase activities in the EPS ( $n = 3$  sludges)

	L-Leu-aminopeptidase	$\alpha$ -Glucosidase
$K_m$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	$107 \pm 36$	$245 \pm 73$
$V_m$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}_{\text{EPS}}$ )	$9.5 \pm 3$	$0.9 \pm 0.2$

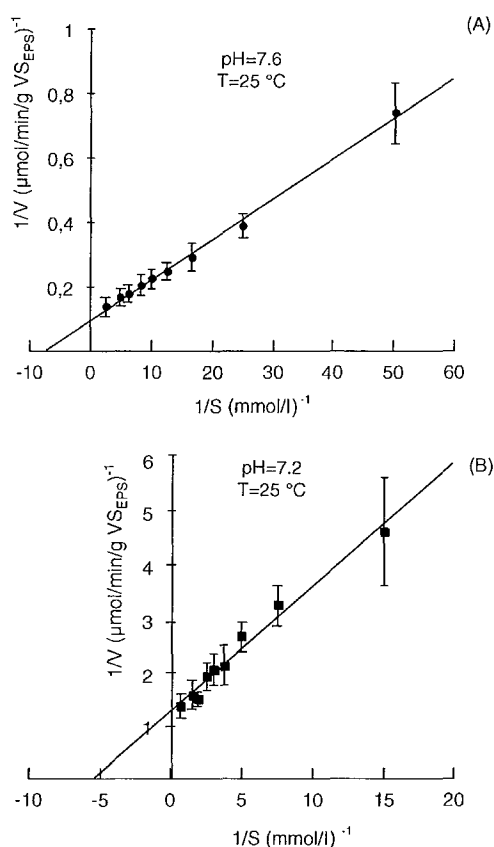


Fig. 2. Lineweaver and Burk plot of L-Leu-aminopeptidase activity (A) and glucosidase activity (B) in the EPS ( $n = 3$  different sludges).

more rapidly than the  $\alpha(1-4)$  glucan bond as shown by the fact that the L-Leu-aminopeptidase has a higher average hydrolytic rate ( $7.3 \pm 1.8 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}$ ) than  $\alpha$ -glucosidase ( $1.9 \pm 0.7 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}$ ).

In sonicated sludges, the rate of L-Leu-*p*-nitroanilide hydrolysis was higher than in whole sludges. The rate of *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside hydrolysis decreased by about 20% ( $P < 0.01$ ) in sonicated sludges.

Table 3

Average enzymatic activities of six samples of whole and dispersed activated sludges ( $n = 3$  sludges)

Enzymes	Substrates	Sludges	Whole sludge	Sludge + US	Sludge + US + resin
L-Leu-aminopeptidase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}$ )	L-Leu- <i>p</i> -nitroanilide (MW = 251)	1	$9.04 \pm 0.18$	Not determined	$8.49 \pm 0.29$
		2	$7.90 \pm 0.15$	$8.05 \pm 0.26$	$8.79 \pm 0.10$
		3	$5.06 \pm 0.08$	$6.64 \pm 0.50$	$7.24 \pm 0.24$
Protease ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}/\text{g VS}$ )	Azocasein (MW = 25,000)	1	$8.00 \pm 0.83$	Not determined	$5.73 \pm 0.20$
		2	$5.54 \pm 0.24$	$5.21 \pm 0.13$	$5.58 \pm 0.08$
		3	$5.44 \pm 0.15$	$5.33 \pm 0.10$	$5.89 \pm 0.01$
$\alpha$ -Glucosidase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}$ )	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (MW = 301)	4	$0.95 \pm 0.02$	$0.74 \pm 0.02$	$0.76 \pm 0.03$
		5	$2.52 \pm 0.19$	$1.85 \pm 0.11$	$2.09 \pm 0.04$
		6	$2.33 \pm 0.09$	$2.00 \pm 0.07$	$1.60 \pm 0.17$
$\alpha$ -Amylase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}$ )	Amylose azure (32,000 < MW < 86,000)	4	$0.08 \pm 0.02$	$0.08 \pm 0.04$	$0.20 \pm 0.05$
		5	$0.18 \pm 0.08$	$0.23 \pm 0.04$	$1.74 \pm 0.10$
		6	$0.64 \pm 0.09$	$0.72 \pm 0.13$	$2.67 \pm 0.33$

Table 4

Composition of EPS extracted from activated sludges (expressed in mg/g of VS of sludges)

EPS	Proteins (mg/g VS)	Humic substances-like (mg/g VS)	Polysaccharides (mg/g VS)
1	131.8	7.2	38.4
2	72.6	6.3	28.2
3	27.3	6.2	12.2
4	65.3	25.2	16.3
5	53.6	16.5	16.1
6	43.3	12.5	16.0
Mean	65.6	12.3	21.2
S.D.	36.2	7.5	10.0

A decrease was also observed in the protease activity, whereas the rate of amylose azure hydrolysis displayed an upward tendency.

The dispersion of bacterial aggregates by both US and resin had measurable effects on the hydrolysis rates compared to the hydrolytic activities in corresponding whole sludges. The rate of L-Leu-*p*-nitroanilide hydrolysis was slightly increased ( $P < 0.01$ ) for two of the three sludges (sludges 2 and 3). Three different situations were observed in the sludges tested for protease activity: the rate of azocasein hydrolysis was either significantly ( $P < 0.05$ ) decreased (sludge 1), identical (sludge 2) or significantly ( $P < 0.05$ ) increased (sludge 3). Concerning  $\alpha$ -glucosidase activity, the rate of *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside hydrolysis was reduced by about 20% ( $P < 0.05$ ) for the three sludges (sludges 4, 5 and 6). The dispersion increased  $\alpha$ -amylase activity by an average of five-fold ( $P < 0.01$ ) as shown by the rate of amylose azure hydrolysis.

### 3.4. Composition and hydrolytic activity associated to EPS

The average protein, humic-like substances, and carbohydrate composition of EPS (Table 4) varied markedly

Table 5  
Average enzymatic activities of six samples of EPS ( $n = 3$  sludges)

Enzymes	Substrates	Sludges	EPS	Fraction (%) <sup>a</sup>
L-Leu-aminopeptidase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}$ )	L-Leu- <i>p</i> -nitroanilide (MW = 251)	1	$2.03 \pm 0.10$	24
		2	$1.66 \pm 0.04$	19
		3	$0.64 \pm 0.03$	9
Protease ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}/\text{g VS}$ )	Azocasein (MW = 25,000)	1	$1.59 \pm 0.05$	28
		2	$1.57 \pm 0.02$	28
		3	$0.86 \pm 0.08$	15
$\alpha$ -Glucosidase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}$ )	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (MW = 301)	4	$0.05 \pm 0.003$	6
		5	$0.09 \pm 0.004$	4
		6	$0.08 \pm 0.008$	5
$\alpha$ -Amylase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}$ )	Amylose azure (32,000 < MW < 86,000)	4	$0.14 \pm 0.06$	67
		5	$0.75 \pm 0.27$	43
		6	$0.55 \pm 0.10$	21

<sup>a</sup> Values are related to the enzymatic activity of sludges + US + resin.

according to the date of sampling, but the analysis showed that proteins were systematically prevalent over carbohydrates.

Only relatively small fractions of the L-Leu-aminopeptidase ( $17 \pm 8\%$ ), protease ( $23 \pm 8\%$ ),  $\alpha$ -glucosidase ( $5 \pm 1\%$ ) and  $\alpha$ -amylase ( $44 \pm 23\%$ ) activities of the sludges dispersed by US and resin were recovered in EPS (Table 5). Most of the enzymes remained associated either to tightly bound EPS or directly bound to bacterial surfaces. Indeed after the EPS ( $160 \pm 20 \text{ mg}_{\text{VS}}$ ) was removed, the average rate of L-Leu-*p*-nitroanilide hydrolysis of the remaining material ( $750 \pm 10 \text{ mg}_{\text{VS}}$  for 1 g VS of sludge,  $n = 6$ ) was  $83 \pm 18\%$  of the hydrolysis rate of sludges dispersed by US and resin.

#### 4. Discussion

The hydrolytic capacity of whole activated sludges was characterised by measuring L-Leu-aminopeptidase and protease activities (protein hydrolysis) and by measuring the  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase activities (polysaccharide hydrolysis). Each hydrolysis rate measured was the result of the activity of a mixture of several enzymes originating from various microorganisms. The hydrolysis rates of L-Leu-*p*-nitroanilide (on average  $7.3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}$ ) and *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (on average  $1.9 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}$ ) are comparable to those reported in the literature: the L-Leu-aminopeptidase activity ranging from 13 to  $28 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}$  [39], and the  $\alpha$ -glucosidase activity ranging from 0.59 to  $3.10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g VS}$  [18,39,44]. The temporal variations of the hydrolysis rates are very high as shown by Conrad et al. [24] and might be explained by changes in the dominant bacterial populations [45] or by bacterial regulations of the hydrolytic activities in response to environmental conditions such as substrate, electron acceptor, pH or temperature [23,44].

Up to date, no hydrolytic activity was detected in the bulk water of sewage biofilms [46,47] or in the surrounding water of the activated sludge flocs [18,23]. We found that a significant fraction of the hydrolytic activity was associated with the easily extractable EPS of the activated sludge flocs [25–27] as with polyphenols in other aqueous ecosystems [12] or with colloids in soils [48,49]. The high hydrolytic capacity of the EPS is consistent with their composition insofar as proteins were systematically prevalent over carbohydrates, as shown by Jahn and Nielsen [35] and Jorand et al. [36]. Moreover, the higher the molecular weight of the tested substrate, the more the hydrolytic activity was associated to the EPS.

The participation of these hydrolytic exo-enzymes to the global activity of the activated sludge flocs reveals different ratios according to the tested activity. This suggests a partition of the extracellular enzymes between ecto- and exo-enzymes. A 56–95% of the extracellular enzymes were still bound to the cells after the EPS extraction as typical of the extracellular phosphatases localised near the cells rather than dispersed throughout the matrix [50]. A 5–44% of the extracellular enzymes were found to be trapped in the easily extractable EPS suggesting that the bacterial strategy for taking energy and carbon from high molecular weight compounds involves freely released extracellular enzymes. Whereas the hydrolysis of organic matter by ecto-enzymes tightly coupled to substrate incorporation [13] is the predominant strategy for the micro-organisms in seawater [10,51,52], the extracellular matrix of the activated sludge flocs contributes to the retention, the accumulation and the stabilisation of the associated enzymes [53].

Nevertheless the bacterial aggregation may reduce considerably the availability of high molecular weight compounds to the extracellular enzymes. The increase of the dispersion of activated sludge flocs was thought to raise the rate of large compounds hydrolysis in comparison with whole sludge. In this study low shear strengths for the sonication procedure were used to prevent cell lysis and the very cohesive



aggregates could not be dispersed into single bacteria. As shown by the granulometric study, the dispersion of flocs by both ultrasounds and a cation exchange resin had a major effect on the floc size distribution with an increase of the number of small particles [36,54]. Surprisingly the effect of this dispersion was not marked on the rate of protein hydrolysis (azocasein, MW = 25,000). Although we cannot rule out that the break-up of flocs may change the microenvironment of the extracellular enzymes, the diffusion through the EPS matrix does not reduce the availability of high molecular weight compounds (MW = 25,000) to extracellular enzymes. This is in contradiction with previous studies showing that only substrates with a molecular weight of less than 20,000 ( $\alpha$ -lactalbumin) can diffuse through the alginate gel used as an EPS model [33] and that the diffusion through mixed-species biofilms of dextrans with molecular weights between 4000 and 2,000,000 was reduced by 55–98%, respectively, in comparison with the diffusion of fluorescein (MW = 289) [32].

However, in our study, the dispersion of flocs markedly enhanced the availability of amylose azure (32,000 < MW < 86,000) to extracellular enzymes. Whatever the effect of the molecular weight in limiting the diffusion of the large compounds, the effect of the dispersion treatment on their availability to extracellular enzymes appears to depend on their spatial conformation. As examples, the molecule charge affects the sorption onto the biofilm and consequently less removal is observed for anionic compounds than for uncharged molecules of similar size [55] and the rate of particulate substrate hydrolysis is directly related to the substrate surface [22]. It must be emphasised that the constant aggregation and disaggregation of the flocs in the activate sludge aeration tank enhances the exchanges of matter and the availability of the substrates, in comparison with models of diffusion for fixed spatial organisation. Then the aggregation appears as an optimal strategy of growth for the bacteria that helps the trapping of organic compounds and the retention of the various extracellular enzymes involved in their hydrolysis.

## 5. Conclusion

The diffusion of high molecular weight compounds was reported to be limited through bacterial aggregates, particularly by the presence of the extracellular matrix. Thus, the availability of polymers to extracellular enzymes was assumed to be reduced considerably by aggregation. When activated sludge flocs were dispersed by the use of both ultrasounds and a cation exchange resin, the rate of azocasein (MW = 25,000) hydrolysis did not increase whereas the rate of amylose azure (32,000 < MW < 86,000) hydrolysis increased five-fold. The higher the molecular weight of the substrate, the more the hydrolytic activity was trapped in the easily extractable EPS. This suggests that the bacterial strategy for taking energy and carbon from high molecular

weight compounds involves freely released extracellular enzymes.

## References

- [1] Raunkjær K, Hvitved-Jacobsen T, Nielsen PH. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Water Res* 1994;28(2):251–62.
- [2] Levine AD, Tchobanoglous G, Asano T. Characterization of the size distribution of contaminants in wastewater: treatment and reuse implications. *J Water Pollut Control Fed* 1985;57:805–16.
- [3] Hisano T, Yonemoto Y, Yamashita T, Fukuda Y, Kimura A, Murata K. Direct uptake of alginate molecules through a pit on the bacterial cell surface: a novel mechanism for the uptake of macromolecules. *J Ferment Bioeng* 1995;79:538–44.
- [4] Egli T. The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates. In: Gwynfryn J, editor. *Advances in microbial ecology*, vol. 14. New York: Plenum Press, 1995. p. 305–86.
- [5] Gottschalk G. Metabolic diversity of aerobic heterotrophs. In: Gottschalk G, editor. *Bacterial metabolism*. 2nd ed. New York: Springer, 1986. p. 104–40.
- [6] Law BA. Transport and utilization of proteins by bacteria. In: Payne JW, editor. *Microorganisms and nitrogen sources*. New York: Wiley, 1980. p. 381–409.
- [7] Nikaido H. Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol Microbiol* 1992;6:435–42.
- [8] Hollibaugh JT, Azam F. Microbial degradation of dissolved proteins in seawater. *Limnol Oceanogr* 1983;28:1104–16.
- [9] Pantoja S, Lee C. Peptide decomposition by extracellular hydrolysis in coastal seawater and salt marsh sediment. *Mar Chem* 1999;63:273–91.
- [10] Chróst RJ. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ecto-enzymes. In: Chróst RJ, editor. *Microbial enzymes in aquatic environments*. New York: Springer, 1991. p. 29–59.
- [11] Vetter YA, Deming JW. Growth rates of marine bacterial isolates on particulate organic substrates solubilized by freely released extracellular enzymes. *Microb Ecol* 1999;37:86–94.
- [12] Wetzel RG. Extracellular enzymatic interactions: storage, redistribution and interspecific communication. In: Chróst RJ, editor. *Microbial enzymes in aquatic environments*. New York: Springer, 1991. p. 6–28.
- [13] Hoppe H-G, Kim S-J, Gocke K. Microbial decomposition in aquatic environments: combined process of extracellular enzyme activity and substrate uptake. *Appl Environ Microbiol* 1988;54(3):784–90.
- [14] Confer DR, Logan BE. Molecular weight distribution of hydrolysis products during biodegradation of model macromolecules in suspended and biofilm cultures. I. Bovine serum albumin. *Water Res* 1997;31(9):2127–36.
- [15] Confer DR, Logan BE. Molecular weight distribution of hydrolysis products during biodegradation of model macromolecules in suspended and biofilm cultures. II. Dextran and dextrin. *Water Res* 1997;31(9):2137–45.
- [16] Janning KF, Mesterton K, Harremoës P. Hydrolysis and degradation of filtrated organic particulates in a biofilm reactor under anoxic and aerobic conditions. *Water Sci Technol* 1997;36(1):279–86.
- [17] Larsen TA, Harremoës P. Degradation mechanisms of colloidal organic matter in biofilm reactors. *Water Res* 1994;28(6):1443–52.
- [18] Dold PL, Fleit E, Han J, Copp JB. Assay for determination of alpha-amylase activity in activated sludge mixed bacterial communities. *Environ Technol* 1995;16:181–8.
- [19] Garcia J, Fernandez S, Mirada FJ, Lopez F. Determination of the protease activity in activated sludges by gelatin hydrolysis. *J Environ Sci Health* 1997;A32:2537–51.

- [20] Henze M, Mladenovski C. Hydrolysis of particulate substrate by activated sludge under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Res* 1991;25(1):61–4.
- [21] McLoughlin AJ, Crombie-Quilty MB. The kinetics of protein removal by activated sludge. *Water Res* 1983;17:161–6.
- [22] Sanders WTM, Geering M, Zeeman G, Lettinga G. Anaerobic hydrolysis kinetics of particulates substrates. *Water Sci Technol* 2000;41(3):17–24.
- [23] Boczar BA, Begley WM, Larson RJ. Characterization of enzyme activity in activated sludge using rapid analysis for specific hydrolases. *Water Environ Res* 1992;64(6):792–7.
- [24] Conrad A, Cadoret A, Block J-C. Extracellular enzymatic activities in activated sludge flocs. In: Proceedings of the International Specialist Conference: Extracellular Polymeric Substances: The Construction Material of Biofilms, Mülheim (D), 2000.
- [25] Frølund B, Griebert T, Nielsen PH. Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995;43:755–61.
- [26] Gessesse A, Petersen SB, Dueholm TE, Nielsen, PH. Lipase production in activated sludge may be dominated by few organisms. In: Proceedings of the International Specialist Conference: Extracellular Polymeric Substances: The Construction Material of Biofilms, Mülheim (D), 2000.
- [27] Guellil A, Boualam M, Quiquampoix H, Ginestet P, Audic JM, Block J-C. Hydrolysis of wastewater colloidal organic matter by extracellular enzymes extracted from activated sludge flocs. *Water Sci Technol* 2001;43(6):33–40.
- [28] Elisosov B, Argaman Y. Hydrolysis of particulate organics in activated sludge systems. *Water Res* 1995;29:155–63.
- [29] Ohron D, Çokgör EU. COD fractionation in wastewater characterization—the state of the art. *J Chem Technol Biotechnol* 1997;68:283–93.
- [30] Ubukata Y. Kinetics and fundamental mechanisms of protein removal by activated sludge: hydrolysis of peptone to amino acids is the rate-determining step. *Water Sci Technol* 1998;38(8/9):121–8.
- [31] Ubukata Y. Kinetics and fundamental mechanisms of starch removal by activated sludge: hydrolysis of starch to maltose and maltotriose is the rate-determining step. *Water Sci Technol* 1999;40(1):61–8.
- [32] Lawrence JR, Wolfaardt GM, Korber DR. Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser microscopy. *Appl Environ Microbiol* 1994;60(4):1166–73.
- [33] Tanaka H, Matsumura M, Veliky IA. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginates gel beads. *Biotechnol Bioeng* 1984;26:53–8.
- [34] Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen PH. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res* 1996;30:1749–58.
- [35] Jahn A, Nielsen PH. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Water Sci Technol* 1995;32(8):157–64.
- [36] Jorand F, Zartarian F, Thomas F, Block J-C, Bottero J-Y, Villemin G, et al. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Res* 1995;29(7):1639–47.
- [37] Keiding K, Nielsen PH. Desorption of organic macromolecules from activated sludge: effect of ionic composition. *Water Res* 1997;31(7):1665–72.
- [38] Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington, DC, USA: APHA/AWA/WEF, 1998.
- [39] Teuber M, Brodisch KEU. Enzymatic activities of activated sludge. *Eur J Appl Microbiol* 1977;4:185–94.
- [40] Iversen SL, Jørgensen MH. Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth. *Biotechnol Tech* 1995;9(8):573–6.
- [41] Dold PL, Fleit E, Han J. Hydrolysis of  $\alpha$  (1–4) glucan bonds in activated sludge mixed bacterial communities. *Environ Technol* 1991;12:871–9.
- [42] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [43] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956;28:350–6.
- [44] Nybroe O, Jørgensen PE, Henze M. Enzyme activities in waste water and activated sludge. *Water Res* 1992;26(5):579–84.
- [45] Le Bihan Y, Lessard P. Use of enzyme tests to monitor the biomass activity of a trickling biofilter treating domestic wastewaters. *J Chem Technol Biot* 2000;75(11):1031–9.
- [46] Confer DR, Logan BE. Location of protein and polysaccharide hydrolytic activity in suspended and biofilm wastewater cultures. *Water Res* 1998;32(1):31–8.
- [47] Confer DR, Logan BE. A conceptual model describing macromolecule degradation by suspended cultures and biofilms. *Water Sci Technol* 1998;37(4/5):231–4.
- [48] Burns RG. Microbial and enzymatic activities in soil biofilms. In: Characklis WG, Wilderer PA, editors. Structure and function of biofilms. Chichester: Wiley, 1989. p. 333–49.
- [49] Morra MJ. Assessment of extracellular enzymatic activity in soil. In: Hurst CJ, editor. Manual of environmental microbiology. Washington, DC: ASM Press, 1997. p. 459–63.
- [50] Van Ommen Kloeke F, Geesey GG. Localization and identification of populations of phosphatase-active bacterial cells associated with activated sludge flocs. *Microb Ecol* 1999;38:201–14.
- [51] Lamy F, Bianchi M, Van Wambeke F, Sempere R, Talbot V. Use of data assimilation techniques to analyze the significance of ectoproteolytic activity measurements performed with the model substrate MCA-Leu. *Mar Ecol-Progr Ser* 1999;177:27–35.
- [52] Unanue M, Ayo B, Agis M, Slezak D, Herndl GJ, Iriberrri J. Ecto-enzymatic activity and uptake of monomers in marine bacterioplankton described by a biphasic kinetic model. *Microb Ecol* 1999;37:36–48.
- [53] Wingender J, Jaeger K-E, Flemming H-C. Interaction between extracellular polysaccharides and enzymes. In: Wingender J, Neu TR, Flemming H-C, editors. Microbial extracellular substances: characterization, structure and function. New York: Springer, 1999. p. 231–51.
- [54] Bruus JH, Nielsen PH, Keiding K. On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering. *Water Res* 1992;26(12):1597–604.
- [55] Carlson G, Silverstein J. Effect of molecular size and charge on biofilm sorption of organic matter. *Water Res* 1998;32(5):1580–95.

---

7. EFFET DES CONDITIONS  
ENVIRONNEMENTALES SUR LES ACTIVITES  
ENZYMATIQUES HYDROLYTIQUES.

---

### 7.1. INTRODUCTION.

Les activités enzymatiques hydrolytiques des bactéries issues des milieux aquatiques varient de manière importante en fonction des saisons (Martinez *et al.*, 1996), probablement en relation avec les variations de l'abondance bactérienne (Debroas, 1998; Romani et Sabater, 2000). Cependant, des variations journalières de grande amplitude (Karner et Rassoulzadegan, 1995) suggèrent une influence directe des conditions environnementales sur les activités enzymatiques. En particulier, la vitesse d'hydrolyse est influencée par des modifications des paramètres physico-chimiques du milieu, par exemple la salinité (Cunha *et al.*, 2001) ou la présence d'inhibiteurs comme les substances humiques (Wetzel, 1991) ou les argiles (Geiger *et al.*, 1999). De plus, l'augmentation de l'activité hydrolytique a été corrélée à l'apport de matière organique (Burns et Ryder, 2001; Chróst, 1991). En effet, la production d'hydrolases extracellulaires est d'une manière générale contrôlée par la nature des substrats, avec l'induction de la production d'enzymes en présence de macromolécules et la répression de la synthèse d'enzymes en présence d'une source de carbone directement assimilable (Priest, 1992).

La capacité hydrolytique des boues dépend aussi sans doute des conditions environnementales, comme le suggère la variabilité temporelle très marquée des activités enzymatiques associées aux EPS des boues activées (*cf.* 4.4). Différents paramètres sont ainsi susceptibles d'influencer l'activité hydrolytique des boues, comme la température (*cf.* 4.6.1), la présence de métaux lourds (Teuber et Brodisch, 1977) et les conditions d'accepteurs d'électrons (Dold *et al.*, 1991; Dold *et al.*, 1995). Cependant, ce type d'information reste assez rare et la régulation de l'expression des exo-enzymes des boues activées n'est pas connue.

Les bactéries des boues, qui sont soumises constamment aux variations des conditions environnementales et des conditions de mise en œuvre du procédé, exploitent probablement ces différents « stress » comme des signaux induisant des adaptations de leur physiologie.

L'hypothèse est que l'expression des enzymes extracellulaires est une réponse des bactéries aux conditions environnementales. Parmi les nombreux facteurs susceptibles d'influencer la production des enzymes, notre étude a été concentrée sur des paramètres d'intérêt pour la réduction de production de boues au cours du procédé d'épuration, à savoir le stress oxydant (Abbassi *et al.*, 2000) et la famine (Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003) ainsi que sur la présence de substrat macromoléculaire. L'effet sur les activités hydrolytiques des traitements oxydants récemment développés pour réduire la production de boues n'est pas connu. La perte des capacités de biodégradation de boues placées en conditions de famine a suggéré un effet de la déplétion en substrat sur la production d'enzymes hydrolytiques (Urbain *et al.*, 1993b), mais la stabilité des activités enzymatiques au cours d'une période de famine ne semble avoir fait l'objet que d'une seule étude (Teuber et Brodisch, 1977). La relation entre le profil enzymatique et la composition des eaux usées a suggéré que certains substrats induiraient les activités enzymatiques responsables de leur l'hydrolyse (Nybroe *et al.*, 1992), mais cet effet n'a jamais été vérifié.

Aussi, les objectifs de cette partie expérimentale sont d'étudier les variations de quelques activités enzymatiques :

- 1) lors de l'exposition des boues à un stress oxydant (à 100 % de la saturation en oxygène, de manière continue et discontinue),
- 2) lors d'une période de famine (3 jours, en aérobiose à  $21 \pm 1$  °C),
- 3) lors de l'apport de substrat macromoléculaire de nature protéique (azocaséine  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $M_r = 25000$ ).

### **7.2. EFFET DU STRESS OXYDANT SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES EXTRACELLULAIRES DES BOUES ACTIVEES.**

L'aération ou l'apport d'oxygène sont essentiels au processus de biodégradation aérobie de la matière organique par les micro-organismes des boues activées. Aussi, la concentration en oxygène est généralement maintenue entre  $0,5$  et  $3,5 \text{ mg L}^{-1}$  (soit 6 à 41 % de la concentration de saturation), dans les bassins d'aération des stations d'épuration. Des variations de la concentration en oxygène autour de ces valeurs de références engendrent des effets sur les caractéristiques des boues et sur le fonctionnement du procédé d'épuration. D'une part, lorsque la concentration en oxygène est faible ( $0,5$  à  $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), une perte de la capacité à décanter des boues est observée, en relation avec le développement des bactéries filamenteuses (Wilén et Balmer, 1999). C'est principalement la répétition de ces périodes de déficiences en oxygène qui serait à l'origine de la croissance des bactéries filamenteuses (Gaval et Pernelle, 2003). D'autre part, l'effet de l'augmentation de la concentration en oxygène est avéré sur la production d'alginate extracellulaire chez *Azotobacter vinelandii* (Peña *et al.*, 2000) et sur le caractère hydrophobe des surfaces cellulaires de bactéries isolées des boues (Palmgren *et al.*, 1998), suggérant l'existence d'une réponse bactérienne aux conditions d'oxygénation.

Le maintien d'une concentration élevée en oxygène dans les bassins d'aération a été suggéré pour réduire la production de boues. L'effet inhibiteur de l'oxygène sur les procédés biochimiques est lié à son aptitude à former des dérivés toxiques pour les cellules, comme l'anion superoxyde  $\text{O}_2^-$  et le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La réaction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  avec les métaux de transition conduit à la production de radicaux  $\text{OH}^\cdot$  très réactifs et destructeurs d'acides nucléiques et de protéines. Ainsi, l'augmentation de la concentration en oxygène de  $2$  à  $6 \text{ mg L}^{-1}$  permettrait de réduire la production de boues de 25 % (Abbassi *et al.*, 2000). Cependant, l'effet du maintien d'une concentration élevée en oxygène sur l'activité hydrolytique des boues, et par conséquent sur le procédé de biodégradation de la matière organique, n'a pas été déterminé.

Aussi, l'effet de l'oxygène sur les activités hydrolytiques extracellulaires des boues activées a été évalué en comparaison avec les activités enzymatiques des boues exposées à des conditions d'oxygénation identiques à celles qui sont observées dans les bassins d'aération de la station d'épuration.

#### Protocole.

Les activités enzymatiques Leu-aminopeptidase,  $\alpha$ -glucosidase et protéase des EPS des boues soumises à une augmentation brutale de la concentration en oxygène (boues test) ont été comparées aux activités des EPS des boues placées dans les conditions d'oxygénation de la station d'épuration (environ  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  soit 30 % de la saturation) (boues témoin). Les travaux de Roques *et al.* (1984) ayant suggéré que l'effet toxique de l'oxygène ne se manifesterait qu'à forte concentration, les boues test ont été exposées à une teneur en oxygène de l'ordre de 100 % de la saturation. La vitesse de réponse au stress oxydant n'étant pas connue, nous avons choisi de tester divers temps d'exposition à l'oxygène à 100 % de la concentration à saturation. En particulier, la répétition de cycles courts limiterait l'adaptation des bactéries au stress oxydant. Ainsi, trois protocoles différents de stress oxydant ont été réalisés pour les boues test (Figure 7.1):

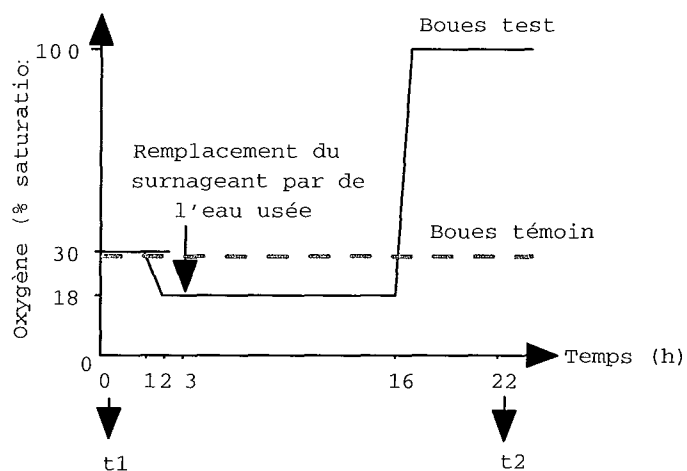
- 1) Protocole 1. Une fois que la concentration en oxygène des boues est équilibrée à 30 % de la saturation, la concentration en oxygène des boues test est dans un premier temps diminuée à environ 18 % de la saturation pendant 13 h puis, dans un deuxième temps, augmentée à environ 90 % de la saturation pendant 4 h.
- 2) Protocole 2. Après équilibration à 30 % de la saturation, la concentration en oxygène des boues test est augmentée à 100 % de la saturation pendant 18 h.
- 3) Protocole 3. Après équilibration à 30 % de la saturation, la concentration en oxygène des boues test est augmentée rapidement à 100 % de la saturation pendant 1h puis diminuée à 30 % de la saturation. Les cycles sont répétés 7 à 8 fois.

Les essais sont réalisés en réacteurs en verre de 5 L en conditions de type batch à  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  (cf. 3.4). Les conditions d'oxygénation sont contrôlées. Le pH est mesuré. Les valeurs expérimentales de la concentration en oxygène et du pH pour chacune des expériences sont présentées en Annexe 7. Les EPS ont été extraits (cf. 3.5.2) des boues au début ( $t_1$ ) et à la fin ( $t_2$ ) de l'expérience afin de déterminer les activités Leu-aminopeptidase (3.7.4.2),  $\alpha$ -glucosidase (cf. 3.7.4.3) et protéase (cf. 3.7.4.4).

7. Effet de quelques paramètres environnementaux.

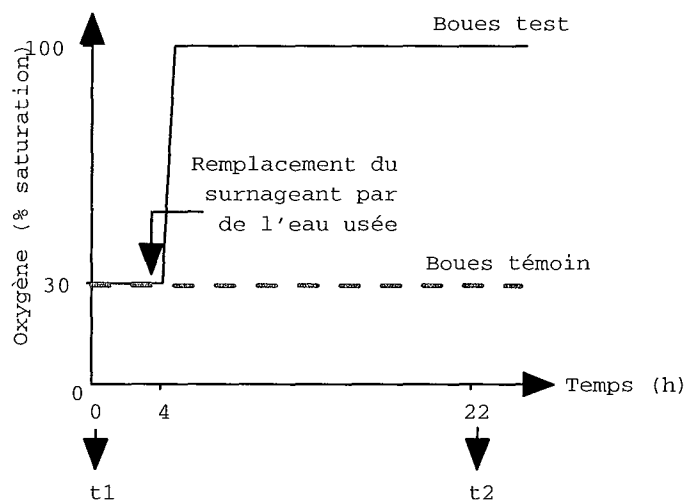
**Protocole 1**

Boues n° 32  
Boues n° 33



**Protocole 2**

Boues n° 34



**Protocole 3**

Boues n° 46  
Boues n° 47  
Boues n° 48

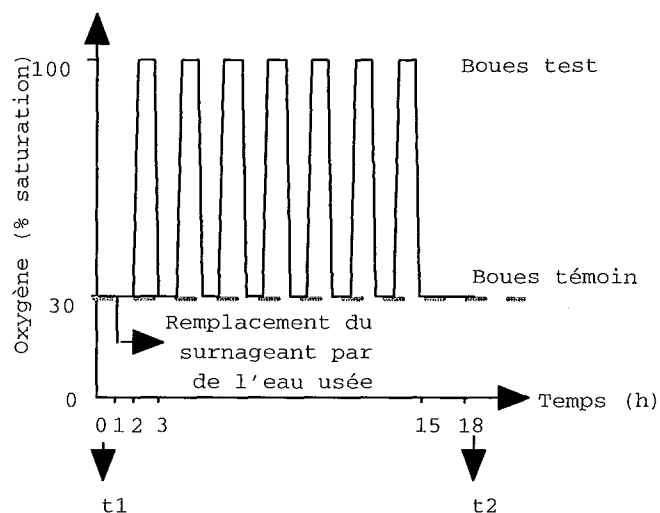


Figure 7. 1 : Conditions expérimentales des essais en batch concernant l'effet de l'oxygène sur l'expression des enzymes extracellulaires des boues activées. Les caractéristiques physico-chimiques des boues sont présentées en Annexe 1 et la composition des EPS est présentée en Annexe 2.

### Résultats.

La valeur du pH dans le réacteur témoin varie peu autour de la valeur de départ (7,5). Une augmentation du pH jusqu'à une valeur de 8 est observée en parallèle de l'ajout d'oxygène à la concentration de 100 % de la saturation. Cette augmentation résulte vraisemblablement de la purge en CO<sub>2</sub> par le flux de gaz, qui a pour conséquence une diminution de la concentration en bicarbonates.

La concentration de matières sèches des boues n'a pas montré de variations significatives en 24 h. La capacité des boues à décanter a peu varié ou varié de la même manière dans les deux réacteurs, avec une valeur de SVI qui diminue selon les essais de 2 à 39 % (n = 6) dans le réacteur témoin et de 4 à 36 % dans le réacteur test. Ces résultats suggèrent une résistance des agrégats à l'augmentation brutale de la concentration en oxygène.

Les activités enzymatiques, Leu-aminopeptidase, protéase et  $\alpha$ -glucosidase, mesurées dans les deux réacteurs au début et à la fin de l'expérience n'ont pas montré de variations significativement différente entre le réacteur témoin et le réacteur test (Tableau 7. 1). Les variations de l'activité enzymatique ont lieu quasi systématiquement dans le même sens et sont du même ordre de grandeur. Ainsi, l'augmentation brutale de la concentration en oxygène à une concentration reconnue comme toxique pour les cellules bactériennes n'a pas eu d'effet significatif dans la période de temps testée sur l'expression des activités enzymatiques extracellulaires.

Cependant, les activités enzymatiques ont montré des variations qui atteignent parfois plus de 70 %. Il semblerait alors que les variations observées soient dépendantes d'autres paramètres. La comparaison des caractéristiques des boues n'a pas montré de différences particulières susceptibles d'expliquer ces variations. En particulier, l'effet du stress oxydant n'a pas eu d'effet marqué sur la caractéristique hydrophobe des agrégats (Conrad *et al.*, 2002). La famine est peut-être un paramètre déterminant.



Tableau 7. 1 : Comparaison des activités enzymatiques Leu-aminopeptidase,  $\alpha$ -glucosidase et protéase des flocs de boues activées test et témoin. L'évolution de la valeur de l'activité entre le début de l'expérience (t1) et la fin (t2) est exprimée en pourcentage ( $\Delta$  %).

Protocole 1		L-Leu-aminopeptidase ( $10^3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot.}$ )			glucosidase ( $10^3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot.}$ )			protéase ( $10^3 \text{Abs}/\text{min}/\text{mg prot.}$ )		
		t1	t2	$\Delta$ (%)	t1	t2	$\Delta$ (%)	t1	t2	$\Delta$ (%)
Boues n°32	Témoin	155,7 $\pm$ 3,2	150,6 $\pm$ 9,7	-3 $\pm$ 3,8	6,2 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,3	+7 $\pm$ 3,0	37,7 $\pm$ 0,3	32,5 $\pm$ 0,0	-14 $\pm$ 0,5
	Test	141,8 $\pm$ 4,8	155,2 $\pm$ 6,2	+9 $\pm$ 3,2	6,9 $\pm$ 0,3	7,4 0,7	+7 $\pm$ 6,4	51,5 $\pm$ 3,6	47,0 7,8	-9 $\pm$ 9,7
Boues n°33	Témoin	75,9 $\pm$ 1,0	60,4 $\pm$ 0,8	-20 $\pm$ 1,0	8,0 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 2,4	-32 $\pm$ 17,7	24,9 $\pm$ 3,9	28,6 $\pm$ 8,1	+15 $\pm$ 20,8
	Test	68,1 $\pm$ 1,3	58,6 $\pm$ 1,5	-14 $\pm$ 1,7	4,1 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,7	+17 $\pm$ 10,3	23,6 $\pm$ 3,0	40,9 $\pm$ 4,2	+73 $\pm$ 12,7
Protocole 2										
Boues n°34	Témoin	38,9 $\pm$ 0,6	50,5 $\pm$ 0,6	+30 $\pm$ 1,3	2,3 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,2	-2 $\pm$ 6,0	16,0 $\pm$ 1,4	20,2 $\pm$ 5,8	+26 $\pm$ 21,6
	Test	38,2 $\pm$ 0,6	50,0 $\pm$ 2,0	+31 $\pm$ 3,1	2,3 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,2	+7 $\pm$ 4,7	20,1 $\pm$ 2,0	24,6 $\pm$ 9,5	+22 $\pm$ 27,9
Protocole 3										
Boues n°46	Témoin	13,76	16,51	+20	1,45	0,77	-47	14,5	16	+10
	Test	13,17	15,45	+17	1,38	0,72	-48	10,4	9,1	-13
Boues n°47	Témoin	27,6	48,8	+77	2,9	2,0	-31	11,6	21,1	+82
	Test	30,9	51,4	+66	3,3	1,9	-43	18,1	31,4	+73
Boues n°48	Témoin	13,6	13,0	-4	2,2	0,6	-71	18,9	10,9	-42
	Test	14,7	14,6	-0,3	1,8	0,9	-50	12,9	10,2	-21

### 7.3. EFFET DE LA FAMINE.

D'une manière générale, la matière organique présente dans les milieux environnementaux est quantitativement faible et qualitativement peu disponible. Les micro-organismes présents dans l'environnement sont ainsi exposés constamment à la variation de la concentration en nutriments, alternant entre suffisance et famine, cette dernière étant la situation la plus fréquente. En effet l'apport de composés organiques est conditionnés par des événements ponctuels comme les mouvements d'eaux dans les sols (Burns et Ryder, 2001), la mise en suspension des sédiments (Chróst et Riemann, 1994) ou les blooms algaux (Riemann *et al.*, 2000).

Les bactéries des boues activées sont elles aussi exposées à des apports fluctuants de matière organique, qui varient selon des périodes jour/nuit et semaine/fin de semaine (Escalas *et al.*, 2003). De plus, la concentration en carbone généralement observée dans les eaux usées est considérée comme limitante, avec un rapport C/N inférieur à 20.

A l'instar d'autres « stress », la famine serait à l'origine de modifications physiologiques des bactéries qui concourent à la formation d'agrégats ou en d'autres termes à la création d'un micro-environnement plus favorable à leur développement (Bossier et Verstraete, 1996). Ainsi, la déplétion phosphorée et azotée stimule la synthèse d'alginate extracellulaire et la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (Rehm et Valla, 1997). Au contraire, la lyse par certains micro-organismes de leurs propres EPS a été observée en période de famine, comme chez *P. fluorescens* (Allison *et al.*, 1998) et *P. aeruginosa* (Boyd et Chakrabarty, 1994).

Par ailleurs, des conditions de déplétion en carbone, azote ou phosphore stimulent l'acquisition de nutriments, en induisant par exemple la production d'enzymes extracellulaires chez *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Chatterjee *et al.*, 1995) ou une augmentation de l'affinité des enzymes extracellulaires pour leur substrat (Unanue *et al.*, 1999).

L'hypothèse est que la cohésion des agrégats bactériens serait maintenue par la synthèse continue de nouveaux polymères, qui compenserait la perte constante d'EPS, par effet mécanique en particulier. Aussi, la diminution de la concentration en protéines et en polysaccharides des boues, observée au cours d'une période de famine (Urbain *et al.*, 1993b), s'expliquerait par l'inhibition de la synthèse et principalement par la consommation des EPS par les bactéries survivantes. Cependant, l'effet de la famine sur la composition des EPS des boues n'a jamais été déterminée. De plus, la question de savoir si la famine ne serait pas à l'origine de la synthèse d'enzymes extracellulaires de manière à compenser la déplétion en nutriments n'a pas été clairement démontrée.

Aussi, les objectifs de cette partie expérimentale sont :

- 1) de caractériser les variations de la composition des EPS au cours d'une période de famine,
- 2) de déterminer l'effet de la famine sur les activités enzymatiques extracellulaires des floccs de boues activées.

Protocole.

L'effet de la famine sur la composition des EPS extraits (cf. 3.5.2.) des boues en protéines (cf. 3.6.3.1.1), substances humiques (cf. 3.6.3.1.1), polysaccharides (cf. 3.6.3.2) et ADN (cf. 3.6.3.3) ainsi que les activités enzymatiques extracellulaires Leu-aminopeptidase (cf. 3.7.4.1),  $\alpha$ -glucosidase (cf. 3.7.4.2) et protéase (cf. 3.7.4.4.) ont été déterminée au cours d'une période de 3 jours.

L'expérience a été limitée à trois jour, des essais préliminaires ayant montré qu'au-delà de cette période, la dérive du système était trop importante en conditions de type batch.

Les conditions de famine ont été appliquées en maintenant les boues sans apport de substrat, dans des conditions constantes de température ( $21 \pm 1$  °C), d'agitation ( $250 \text{ tr min}^{-1}$ ) et d'aération (bullage d'air comprimé) permettant de maintenir une concentration en oxygène d'environ  $3 \text{ mg L}^{-1}$ . Les essais ont été réalisés en triplicat sur la même boue placée dans trois batchs en parallèle.

**7.3.1. Effet de la famine sur la composition des EPS des boues.**

Les conditions de famine ont un effet marqué sur les teneurs en matières sèches et en matières volatiles des boues. Les valeurs de matières sèches et matières volatiles diminuent de manière constante avec le temps, jusqu'à atteindre au bout de trois jours une valeur correspondant à 80 % de la valeur de départ (Figure 7. 2). Ces résultats montrent que les floccs subissent un « vieillissement » du fait de leur séjour en réacteur batch, se traduisant en particulier par une désagrégation importante. La diminution observée est en accord avec les résultats précédents de Urbain *et al.* (1993b), montrant une diminution de 16 % de la valeur des matières sèches en suspension au bout de trois jours de famine.

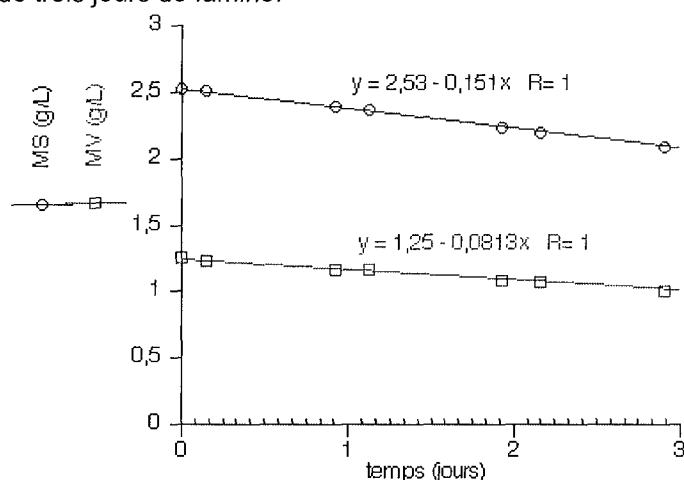


Figure 7. 2 : Diminution de la concentration en matières sèches (MS) et matières volatiles (MV) des boues activées (n° 43) au cours d'une période de famine de trois jours en condition e type batch.

L'analyse de la composition des EPS montre classiquement une concentration en protéines ( $35,6 \text{ mg g}^{-1} \text{ MV}$ ) supérieure à la concentration en polysaccharides ( $26,9 \text{ mg g}^{-1} \text{ MV}$ ). La concentration en protéines fluctue autour d'une valeur de l'ordre de  $40 \text{ mg g}^{-1} \text{ MV}$ , sans montrer de tendance marquée. Par contre, la concentration en ADN augmente de manière importante, d'environ 38 % en deux jours, suggérant une lyse cellulaire importante, en accord avec les observations de Urbain *et al.* (1993b).

La concentration en polysaccharides et la concentration en substances humiques augmentent de manière significative dès le premier jour de famine, de 27 et 21 % respectivement. La déflocculation des agrégats typiquement observée au cours d'une période de famine suggère que l'augmentation de la concentration en polysaccharides et en substances humiques s'expliquerait plutôt par un transfert de ces polymères vers la phase eau que par une production accrue. Cependant, les mécanismes qui seraient à l'origine de ce relargage de matière ne sont pas connus. Aussi, l'équilibre relatif de la concentration en protéines est sans doute dû à la consommation par les bactéries survivantes.

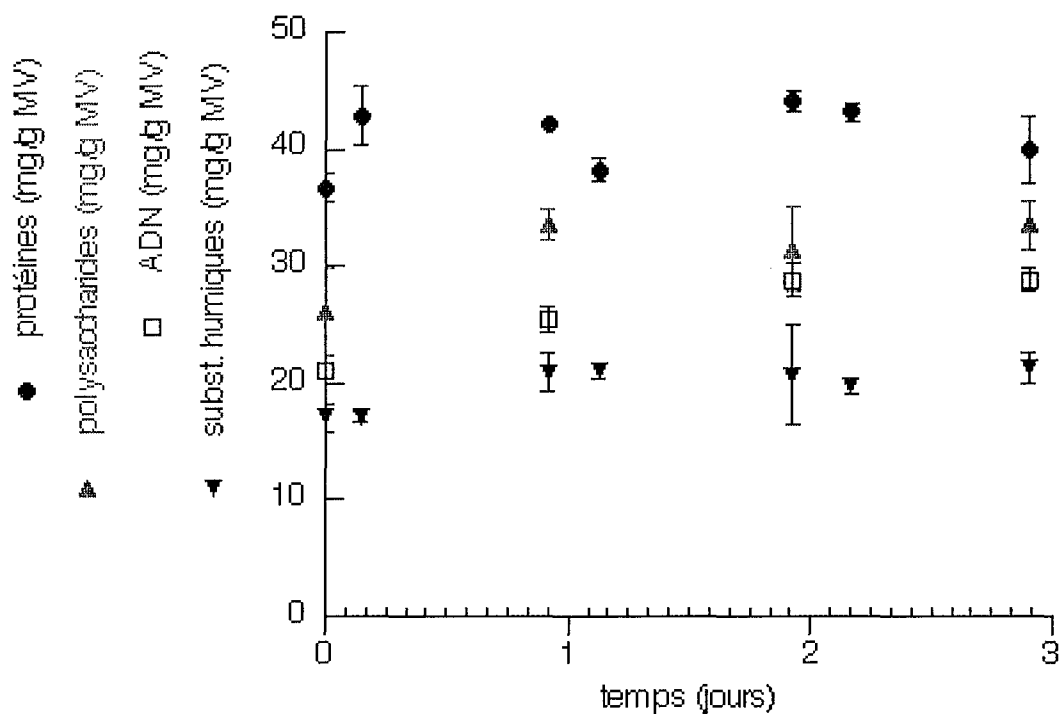


Figure 7. 3 : Variation de la composition des EPS en protéines, substances humiques, polysaccharides et acides nucléiques, au cours d'une période de famine de 3 jours (n = 3 extraits différents de la même boue, n° 43). Les caractéristiques physico-chimiques de boues sont présentées en Annexe 1.

### 7.3.2. Effet de la famine sur les activités enzymatiques associées aux EPS.

L'effet de la famine sur les activités enzymatiques extracellulaires associées aux EPS varie en fonction de l'activité enzymatique étudiée (Figure 7. 4). L'activité  $\alpha$ -glucosidase diminue de manière quasi linéaire avec le temps, jusqu'à une activité résiduelle de 20 % au bout de 3 jours. L'activité protéase augmente très peu au cours des deux premiers jours de famine mais atteint une valeur double au bout de 3 jours. L'activité Leu-aminopeptidase ne montre pas de profil marqué, variant de plus ou moins 10 % de la valeur de départ.

A titre de comparaison, l'exposition des boues à une période de famine a montré une diminution systématique de 40 à 83 % de toutes les activités enzymatiques des boues testées après 4 jours de famine (Teuber et Brodisch, 1977) et une absence totale d'activité de biodégradation après 10 jours de famine (Urbain *et al.*, 1993b).

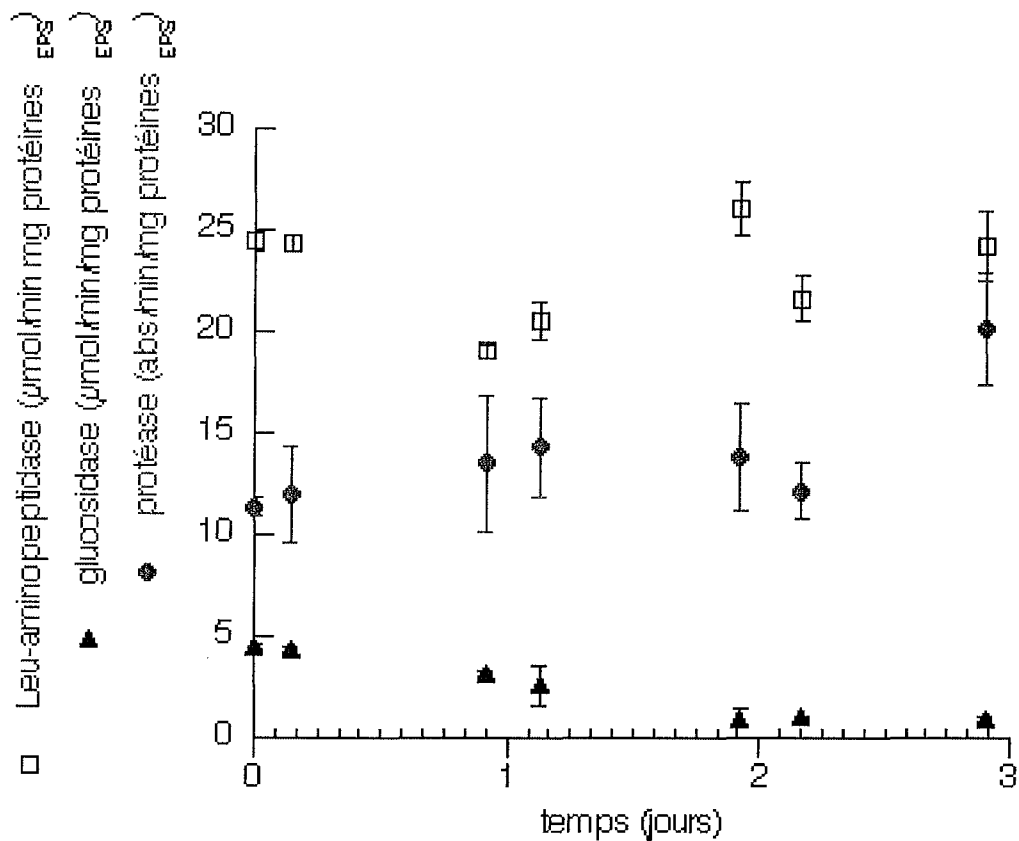


Figure 7. 4: Variation des activités enzymatiques extracellulaires associées aux EPS (Leu-aminopeptidase,  $\alpha$ -glucosidase et protéase) au cours d'une période de famine de 3 jours (n = 3 extraits différents de la même boues, n° 43).

En conclusion, le maintien des activités enzymatiques hydrolytiques associées aux EPS varie en fonction de l'activité étudiée. Ces essais méritent cependant d'être répétés, afin de confirmer ces tendances et déceler un éventuel effet des caractéristiques des boues sur leur réponse à la famine. De plus, il serait intéressant de déterminer l'effet de la famine sur la proportion d'activités hydrolytiques associées aux EPS, afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle la stratégie bactérienne ecto-enzymatique *versus* exo-enzymatique dépendrait des conditions environnementales.

#### 7.4. EFFET DE L'AJOUT D'AZOCASEINE.

D'une manière générale, l'expression des activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires des bactéries est régulée par les substrats disponibles. La présence de substrat macromoléculaire ou de produits d'hydrolyse induit la synthèse d'enzymes, afin de favoriser leur acquisition rapide (Priest, 1992). Inversement, la présence d'une source de carbone directement assimilable comme le glucose inhibe chez certains micro-organismes la production de ces enzymes par un phénomène dit de répression catabolique.

Dans les milieux naturels, l'apport de matière organique se traduit la plupart du temps par une augmentation de l'activité hydrolytique, qui n'est pas forcément corrélée à l'augmentation de l'abondance bactérienne (Pantoja et Lee, 1999), suggérant un effet des composés organiques sur l'expression des activités enzymatiques.

L'augmentation des activités enzymatiques semble directement reliée à la nature des substrats disponibles. Ainsi, les activités Leu-aminopeptidase et protéase des eaux d'un lac augmentent après un apport de caséine (Worm et Nybroe, 2001) et la synthèse des activités  $\alpha$ - et  $\beta$ -glucosidase est stimulée par la présence d'amidon et de cellobiose respectivement (Somville, 1984).

Les profils d'activités enzymatiques des boues sont différents en fonction des stations d'épuration étudiées (Boczar *et al.*, 2001; Gessesse *et al.*, 2000; Nybroe *et al.*, 1992), suggérant l'influence de la composition des eaux usées sur la nature des activités hydrolytiques présentes. Ainsi, l'ajout de lactose à des boues placées en conditions de famine depuis 6 jours a provoqué une augmentation transitoire des activités  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase et  $\alpha$ -glucosidase (Teuber et Brodisch, 1977). Cependant, l'effet de l'ajout de substrat de nature protéique sur l'activité hydrolytique des boues est inconnu.

L'hypothèse est que l'apport de substrat macromoléculaire de nature protéique induit l'expression d'enzymes protéolytiques des boues activées.

Aussi l'objectif de cette partie expérimentale est de déterminer les variations de l'activité Leu-aminopeptidase après l'ajout d'une protéine, l'azocaséine ( $M_r = 25\ 000$ ). Différentes questions ont fait l'objet de cette étude :

- 1) l'élimination de l'azocaséine au cours du temps,
- 2) le temps de réponse de l'activité Leu-aminopeptidase,
- 3) la spécificité de l'induction,
- 4) la concentration limite en azocaséine pour induire l'expression de Leu-aminopeptidase.

##### Protocole.

500 mL de boues activées sont placées sous agitation à  $350\ \text{tr}\ \text{min}^{-1}$  à  $25\ ^\circ\text{C}$ . La concentration en matières sèches des boues a été systématiquement ajustée à  $1,2\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$  afin de pouvoir comparer les essais entre eux. L'activité Leu-aminopeptidase des boues (*cf.* 3.7.3.1.) a été déterminée sur des prélèvements de 10 mL. Les résultats obtenus ont été comparés à l'activité Leu-aminopeptidase de boues témoin, n'ayant pas été supplémentées en azocaséine, et à l'activité Leu-aminopeptidase de boues ayant été supplémentées en acides aminés. Des essais ont été réalisés à  $4\ ^\circ\text{C}$  de manière à inhiber l'activité bactérienne et l'activité enzymatique.

L'élimination de l'azocaséine ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) a été déterminée en mesurant sa concentration dans le surnageant de boues (*cf.* 3.11) et l'hydrolyse de l'azocaséine a été déterminée en mesurant la production de peptides solubles dans l'acide trichloracétique ( $M_r < 5\,000$ ) (*cf.* 3.7.3.3). Le temps de réponse de l'activité Leu-aminopeptidase a été estimé à partir du suivi de l'activité Leu-aminopeptidase sur une période de 72 h. Afin de déterminer la spécificité de l'induction, l'activité  $\alpha$ -glucosidase des boues (*cf.* 3.7.3.2.) a aussi été mesurée après l'ajout d'azocaséine à la concentration de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . L'activité Leu-aminopeptidase des boues a été déterminée après l'ajout de concentrations croissantes en azocaséine, de 10 à  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , de manière à estimer la concentration limite permettant d'observer un effet.

#### 7.4.1. Élimination de l'azocaséine par les floccs de boues activées.

La concentration en azocaséine dans le surnageant des boues activées diminue rapidement, immédiatement après mélange de l'azocaséine et des boues activées (Figure 7. 5). Environ 40 % de l'azocaséine est éliminé en 1 h et la cinétique d'élimination montre un pseudo-plateau à partir de 2 h de contact. Cette élimination rapide s'explique typiquement par un phénomène d'adsorption par les floccs (Guellil *et al.*, 2001). La vitesse initiale d'élimination de l'azocaséine est plus importante à  $25^\circ\text{C}$  qu'à  $4^\circ\text{C}$ , ce qui a déjà été observé par Pujol et Canler (1992).

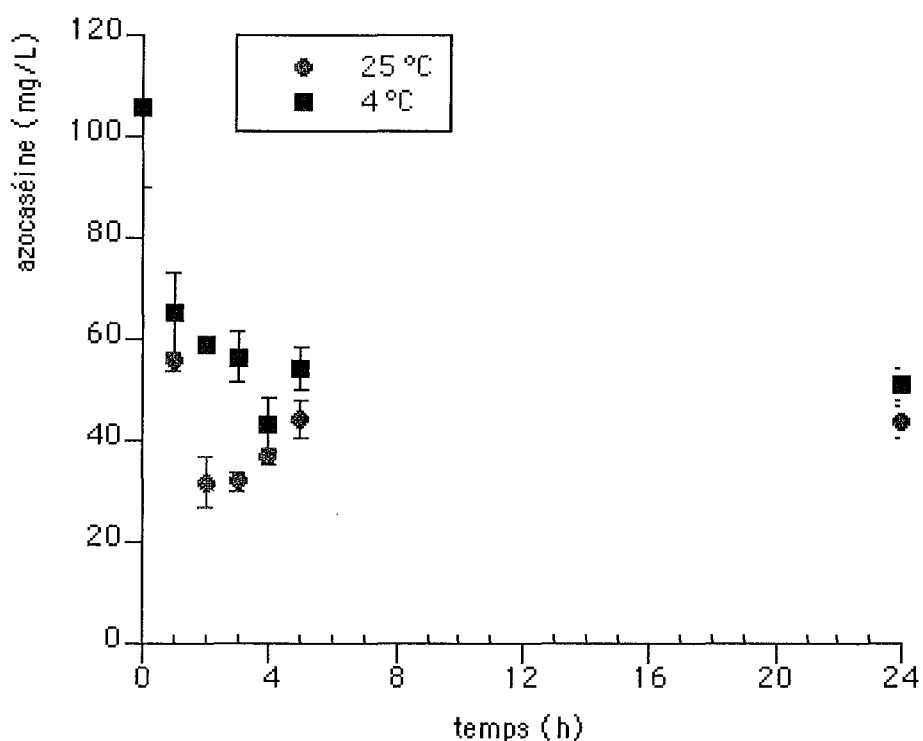


Figure 7. 5 : Élimination de l'azocaséine ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) par les floccs de boues activées (Boues n° 52) sur une période de 24 h à la température de  $25^\circ\text{C}$  et de  $4^\circ\text{C}$ . Les caractéristiques physico-chimiques des boues activées sont présentées en annexe 1.

La capacité d'élimination de l'azocaséine par les boues a été déterminée par le paramètre  $b$  pour 4 échantillons de boues (Tableau 7. 2) :

$$b = \frac{([A]_0 - [A]_2)}{MS \times 2} \text{ (mg g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}\text{),}$$

avec  $[A]_0$ , la concentration en azocaséine au temps  $t = 0$  h

et  $[A]_2$ , la concentration en azocaséine au temps  $t = 2$  h

Tableau 7. 2 : Capacité d'élimination ( $b$ ) de l'azocaséine par les boues à 25 °C et à 4°C ( $n = 4$ ) (Boues n° 51 à 54). Les caractéristiques physico-chimiques des boues activées sont présentées en annexe 1.

N° boues	$b$ (mg g <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )	
	25 °C	4 °C
51	20,6	12,0
52	30,8	19,4
53	18,5	10,3
54	18,2	18,5
moyenne	22,0	15,1
	± 5,9	± 4,6

Les capacités d'élimination de l'azocaséine à 25 °C et à 4 °C sont différentes et la capacité d'élimination de l'azocaséine à 25 °C est supérieure (environ 1,5 fois en moyenne) à la capacité d'élimination à 4 °C pour trois essais sur quatre. Cette différence s'explique vraisemblablement par l'inhibition de l'activité bactérienne et de l'activité enzymatique hydrolytique à 4°C. Cependant, il n'est pas exclu que le phénomène d'adsorption soit plus important à 25 °C qu'à 4 °C (Pujol et Canler, 1992).

Le suivi de la concentration en azocaséine sur une période de temps plus longue (72 h) montre une diminution linéaire en fonction du temps de la concentration en azocaséine à 25 °C, alors que la concentration en azocaséine reste quasi constante à 4 °C (environ 60 mg L<sup>-1</sup>) (Figure 7.6).

Ainsi, ces résultats confirment le fait que l'élimination de l'azocaséine est due à deux phénomènes, d'une part l'adsorption et d'autre part la biodégradation. Ainsi, l'élimination de l'azocaséine par biodégradation en 72 h est estimée à 0,52 mg g<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup>. La vitesse d'hydrolyse apparaît plus importante pendant le premier jour (1,32 mg g<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup>) que les deux jours suivants (0,31 mg g<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup>).

L'élimination de l'azocaséine s'accompagne de la libération dans le surnageant de peptides solubles dans l'acide trichloracétique ( $M_r < 5\,000$ ) (Figure 7. 7). L'augmentation de l'absorbance est plus importante à 25 °C qu'à 4 °C, mais l'activité enzymatique n'est pas complètement inhibée à basse température. Ainsi, l'activité protéolytique estimée à partir de l'augmentation de l'absorbance en 1 h est de l'ordre de 0,37 Abs<sub>340 nm</sub> min<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> à 25 °C et de l'ordre de 0,15 Abs<sub>340 nm</sub> min<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> à 4 °C, soit environ 2,5 fois plus importante à 25 °C qu'à 4°C.



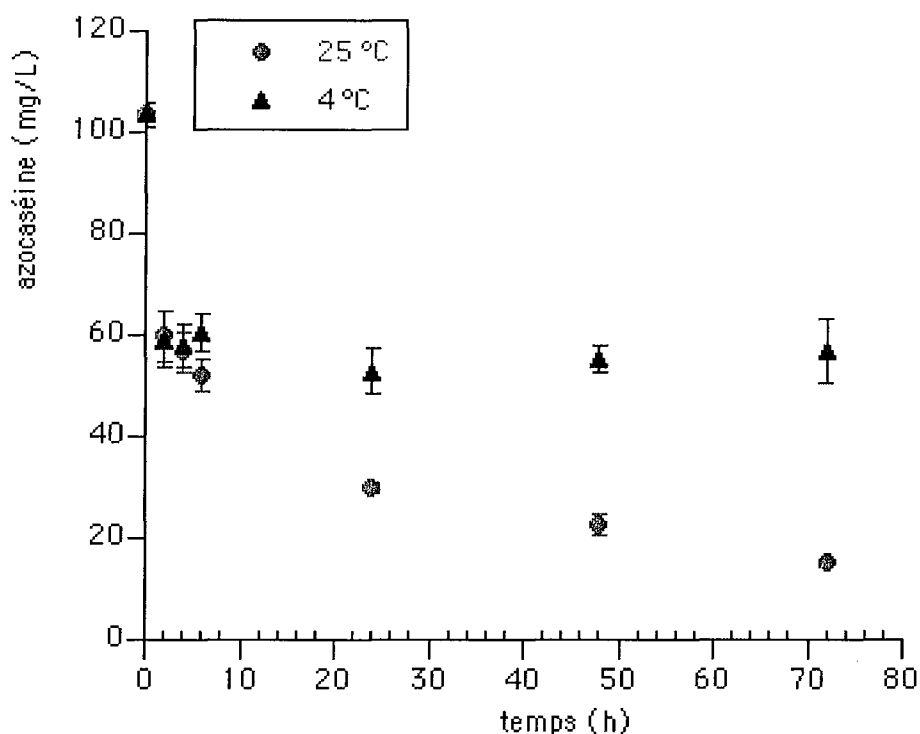


Figure 7. 6 : Elimination de l'azocaséine par les flocs de boues activées (Boues n° 54) sur une période de 72 h à la température de 25 °C et de 4 °C. Les caractéristiques physico-chimiques des boues activées sont présentées en annexe 1.

Les formes des courbes sont nettement différentes en fonction de la température. À 4 °C, la concentration en substrat semble suffisante pour saturer les enzymes encore actives à basse température, ce qui se traduirait par une augmentation linéaire de l'absorbance en fonction du temps. À 25 °C, l'augmentation de l'absorbance présente un plateau, qui s'expliquerait par une concentration en substrat vraisemblablement insuffisante pour saturer le système enzymatique. En effet, la concentration en protéine nécessaire pour saturer le système enzymatique des boues est considérablement élevée, à savoir  $6 \text{ g L}^{-1}$  pour  $1 \text{ g L}^{-1}$  de boues (Garcia *et al.*, 1997).

#### 7.4.2. Induction de l'activité Leu-aminopeptidase en présence d'azocaséine.

L'activité Leu-aminopeptidase des boues activées supplémentées en azocaséine augmente au cours du temps (Figure 7. 8). L'augmentation de l'activité Leu-aminopeptidase est plus importante à 25 °C qu'à 4 °C. La valeur maximale a été observée à 24 h dans le cas des boues placées à 25 °C et à 72 h dans le cas des boues placées à 4 °C. Dans le témoin, l'activité Leu-aminopeptidase augmente également, d'une amplitude comparable à celle observée à 4 °C. Avec une augmentation significative de l'activité Leu-aminopeptidase des boues au bout de 2 h d'exposition à l'azocaséine, le temps de réponse des boues est certainement court. L'existence d'une phase de latence pourrait éventuellement être détectée en réduisant l'échelle d'observation à une période de temps plus courte.

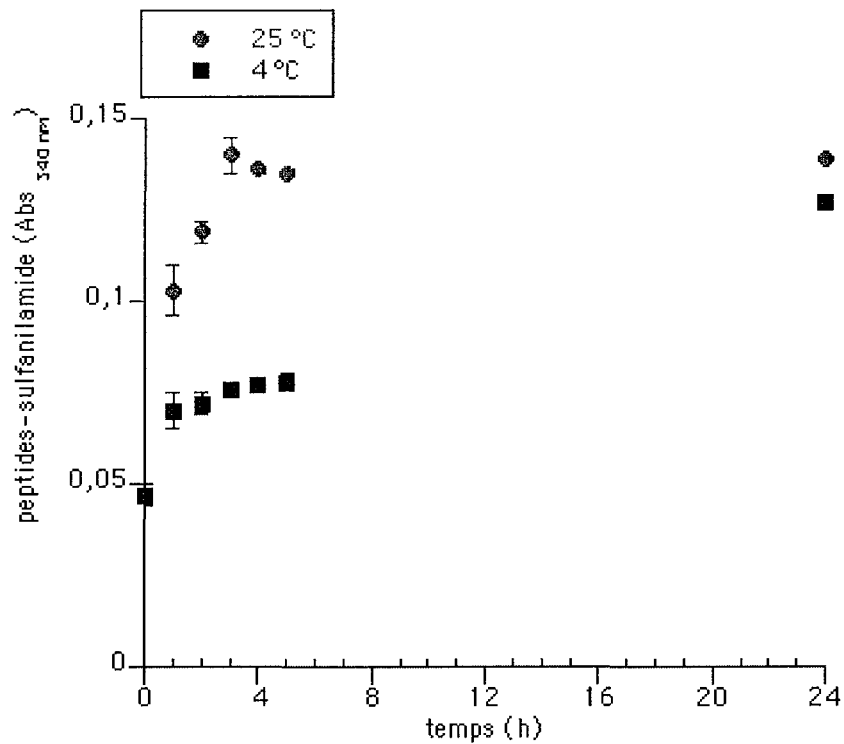


Figure 7. 7 : Mise en évidence de la biodégradation à 25 °C et à 4 °C de l'azocaséine par les boues par la libération dans le surnageant de peptides-sulfanilamide soluble dans l'acide trichloracétique (Boues n°52). Les caractéristiques physico-chimiques des boues activées sont présentées en annexe 1.

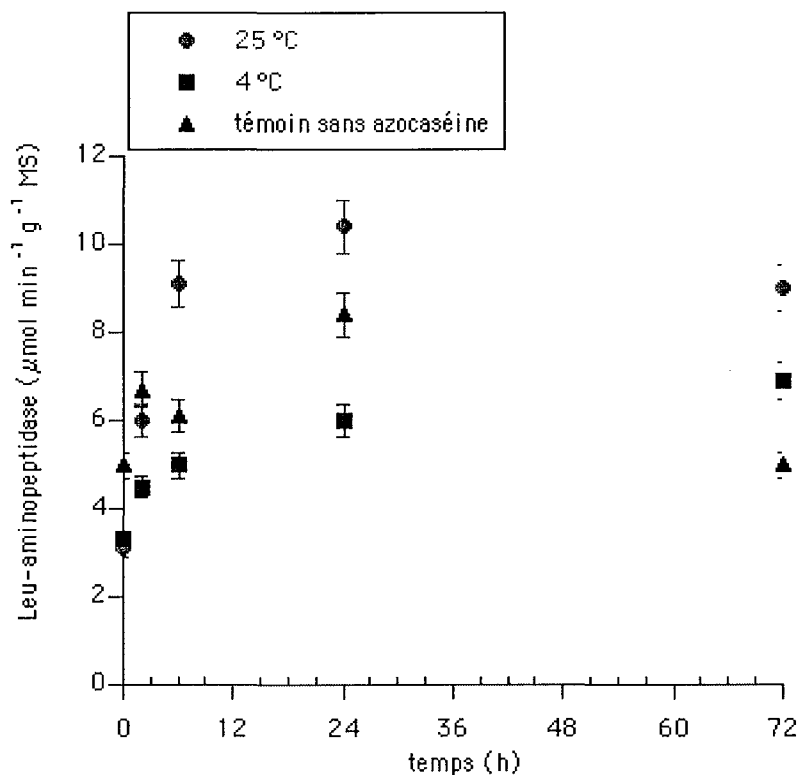


Figure 7. 8 : Activité Leu-aminopeptidase des boues activées en fonction du temps avec et sans ajout d'azocaséine à 25 °C et avec ajout d'azocaséine 4 °C (Boues n°54). Les caractéristiques physico-chimiques des boues activées sont présentées en annexe 1.

Sur la base de ces résultats, l'activité Leu-aminopeptidase a été mesurée au bout de 24 h dans les boues placées à 25 °C et supplémentées en azocaséine à la concentration de 100 mg L<sup>-1</sup>, en comparaison avec les variations de l'activité Leu-aminopeptidase observées dans les boues témoin (sans azocaséine) à 25 °C.

L'activité Leu-aminopeptidase des boues supplémentées en azocaséine a augmenté systématiquement au temps 24 h dans les 10 essais, entre 1,2 et 3,3 fois selon les essais (Tableau 7.3). L'activité Leu-aminopeptidase des boues supplémentées en azocaséine au temps 24 h est significativement différente ( $p < 0,0001$ ) de celle au temps 0 h et significativement différente de l'activité Leu-aminopeptidase du contrôle ( $p < 0,05$ ).

Ainsi, ces résultats ont clairement montré que l'activité Leu-aminopeptidase des boues pouvait être induite par l'apport d'un substrat macromoléculaire de type protéine. Cependant, le mécanisme d'induction est inconnu.

Tableau 7. 3 : Activité Leu-aminopeptidase des boues activées avec et sans ajout d'azocaséine (100 mg L<sup>-1</sup>) au temps 0h et au temps 24 h à 25 °C (n = 10). Les caractéristiques physico-chimiques des boues activées sont présentées en annexe 1.

Boues N°	Leu-aminopeptidase ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{MS}$ )			
	témoin sans azocaséine (25 °C)		azocaséine 100 mg/L (25 °C)	
	0 h	24 h	0 h	24 h
53	5,7	8,3	6,8	13,3
54	5,0	8,4	3,1	10,4
55	7,6	5,2	5,8	6,4
56	8,2	8,7	8,6	12
57	15,4	11,9	14,1	17
58	12,7	14,2	11,7	17,3
60	15,0	14,4	14,3	20,7
61	14,7	14,6	14,0	20,7
62	15,2	15,2	14,2	18,3
63	15,6	13,1	13,4	18,1
moyenne	<b>11,5</b>	<b>11,4</b>	<b>10,6</b>	<b>15,4</b>
écart-type	4,4	3,5	4,2	4,7

L'ajout d'acides aminés à la concentration de 100 mg L<sup>-1</sup> et exactement dans les mêmes proportions que celles apportées par l'azocaséine n'a pas montré d'effet sur l'activité Leu-aminopeptidase des boues (Figure 7. 9). Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'induction repose sur la présence de liaisons peptidiques. Cette hypothèse mérite d'être confirmée par l'étude de l'effet de l'ajout de différents peptides. Par ailleurs, l'ajout d'acides aminés n'a pas montré de diminution de l'activité Leu-aminopeptidase, suggérant l'absence d'un effet répresseur par l'apport de substrats directement assimilables à la concentration étudiée.

L'ajout d'azocaséine n'a pas eu d'effet sur l'activité  $\alpha$ -glucosidase des boues activées, c'est-à-dire sur une activité enzymatique qui n'est pas impliquée dans l'hydrolyse des protéines (Figure 7.10). Aussi, l'activité protéolytique ne semble pas être induite de manière spécifique par des substrats dont elle ne dépend pas. Ces résultats pourraient expliquer en partie la relation qui a été observée entre la composition des eaux usées et le profil enzymatique des boues (Nybroe *et al.*,

1992). Cette hypothèse pourrait être facilement confirmée en testant l'effet d'autres substrats et en déterminant d'autres activités enzymatiques.

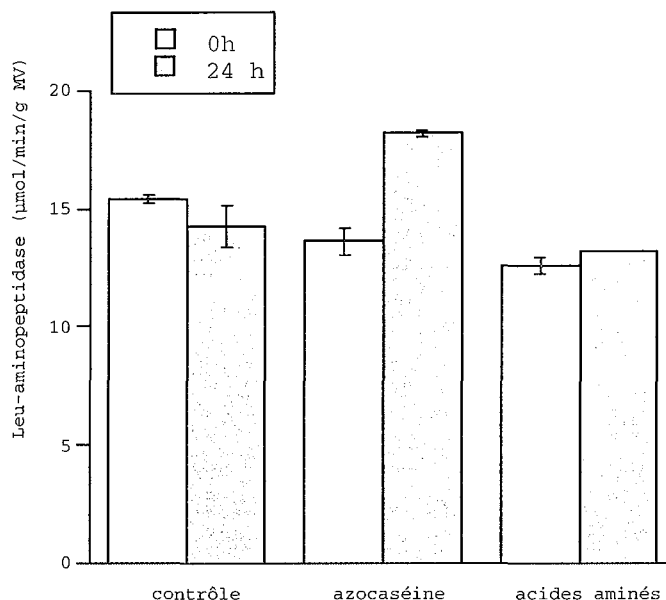


Figure 7. 9 : Activité Leu-aminopeptidase des boues activées avec et sans ajout d'azocaséine ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) et avec ajout d'acides aminés ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) au temps 0 h et 24 h à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $n = 2$ ) (Boues n° 62 et 63). Les barres représentent les écarts à la moyenne. Les caractéristiques physico-chimiques des boues activées sont présentées en annexe 1.

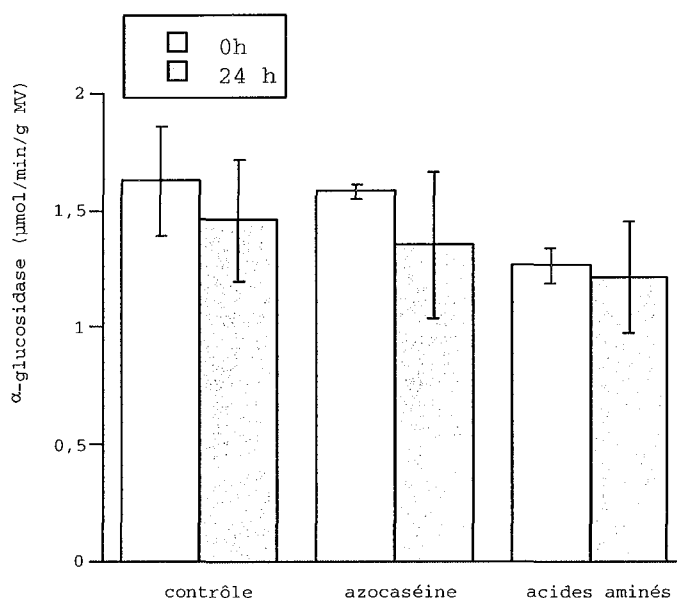


Figure 7. 10 : Activité α-glucosidase des boues activées avec ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) et sans ajout d'azocaséine et avec ajout d'acides aminés ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) au temps 0h et au temps 24 h à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $n = 2$ ) (Boues n° 62 et 63). Les barres représentent les écarts à la moyenne. Les caractéristiques physico-chimiques des boues activées sont présentées en annexe 1.

#### 7.4.2. Effet de la concentration en azocaséine sur l'activité Leu-aminopeptidase des boues.

L'ajout d'azocaséine en concentrations croissantes de 10 à 500 mg L<sup>-1</sup> a montré une relation dose-effet entre la concentration ajoutée et l'activité Leu-aminopeptidase des boues (Figure 7. 11). L'augmentation de l'activité Leu-aminopeptidase des boues est significative ( $p < 0,05$ ) à partir d'une concentration en azocaséine de 50 mg L<sup>-1</sup>. A cette concentration, le ratio de l'activité Leu-aminopeptidase des boues supplémentées en azocaséine sur l'activité Leu-aminopeptidase des boues témoin est de 1,32, alors qu'il est de 1,07 pour 10 mg L<sup>-1</sup> et de 1,02 pour les boues témoin.

Cette relation semble quasi linéaire jusqu'à la concentration de 400 mg L<sup>-1</sup> où elle atteint 2,4 fois sa valeur de départ. La valeur de l'activité Leu-aminopeptidase des boues exposées à l'azocaséine à la concentration de 500 mg L<sup>-1</sup> est néanmoins systématiquement plus faible, avec un ratio moyen de 1,8. Cette diminution pourrait éventuellement traduire l'existence d'un plateau aux fortes concentrations en substrat, comme si le système avait atteint sa capacité maximale de réponse. Cependant, cette hypothèse mérite d'être confirmée en testant l'effet de l'azocaséine sur une gamme de concentrations plus étendue.

Les résultats ont montré une reproductibilité importante, sans doute du fait que les trois boues utilisées ont été prélevées à moins de 15 jours d'intervalles. Il serait intéressant de comparer la réponse à l'ajout d'azocaséine de boues prélevées à des périodes différentes de l'année ou de boues issues de stations différentes, afin de déterminer un éventuel effet des conditions environnementales ou des caractéristiques des boues sur l'induction de l'activité enzymatique.

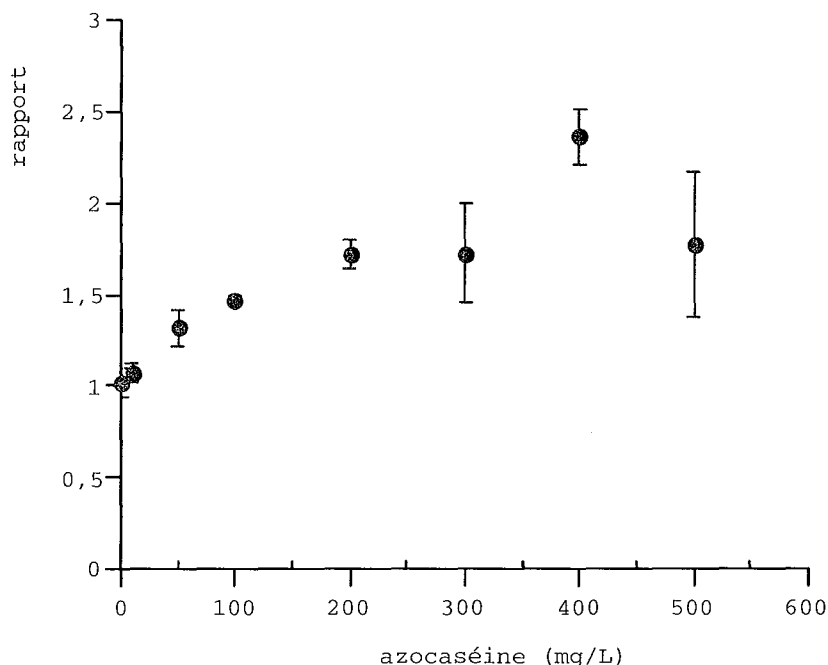


Figure 7. 11 : Rapport de l'activité Leu-aminopeptidase des boues après 24 h d'exposition à l'azocaséine (de 10 à 500 mg L<sup>-1</sup>) sur l'activité Leu-aminopeptidase des boues témoin (non exposées à l'azocaséine) (ratio) ( $n = 3$ ) (Boues n° 58, 60 et 61). Les caractéristiques physico-chimiques des boues activées sont présentées en annexe 1.

En conclusion :

- 1) l'élimination de l'azocaséine par les floccs de boues activées est plus importante à 25 °C qu'à 4 °C, mais le rôle de l'adsorption et de la biodégradation n'ont pas été clairement différencié dans cette étude, ainsi la biodégradation de l'azocaséine a lieu immédiatement après le mélange des boues et du substrat, mais l'élimination importante observée dès le début de l'expérience est vraisemblablement due à un phénomène d'adsorption,
- 2) l'activité Leu-aminopeptidase des boues supplémentées en azocaséine augmente rapidement (moins de deux heures), et l'activité Leu-aminopeptidase augmente significativement dans les boues supplémentées en azocaséine par rapport au boues témoin, en moyenne de 1,6 fois au bout de 24 h (n = 10) mais cette augmentation est sensible au bout de 6 h,
- 3) l'ajout d'acides aminés correspondant exactement à la composition de l'azocaséine n'a pas montré d'effet sur l'activité Leu-aminopeptidase des boues, suggérant un mécanisme d'induction des enzymes protéolytiques lié à la présence de protéines ou de leurs produits d'hydrolyse (peptides),
- 4) l'ajout d'azocaséine n'a pas eu d'effet marqué sur l'activité  $\alpha$ -glucosidase, suggérant que l'induction est spécifique de la nature du substrat ajouté,
- 5) l'augmentation de l'activité Leu-aminopeptidase des boues en présence d'azocaséine dépend clairement de la concentration ajoutée, une augmentation significative a été observée à partir de 50 mg L<sup>-1</sup> et un plateau semble être atteint à partir d'environ 400 mg L<sup>-1</sup>.

### 7.5. DISCUSSION.

Cette partie expérimentale avait pour objectif la mise en évidence d'un effet de quelques paramètres environnementaux sur l'expression des activités hydrolytiques extracellulaires des boues activées. Nous avons ainsi cherché à vérifier l'hypothèse selon laquelle les variations temporelles de l'activité enzymatique des boues traduisent la réponse des micro-organismes aux variations des conditions environnementales.

Les différentes expérimentations ont été volontairement effectuées sur un temps court, en général moins de 3 jours, afin de limiter le « vieillissement » du système. Cette dérive est classiquement observée en conditions de type batch. Elle se traduit en particulier par une défloculation. Cependant, les mécanismes expliquant ce relargage de matière ne sont pas connus. La famine est sans doute en partie à l'origine de ce phénomène. De plus, l'observation des effets sur un temps court permet d'éviter un shift des populations microbiennes, qui rendrait difficile l'interprétation des résultats. En effet, le shift des populations apparaît négligeable en moins de deux jours, alors qu'il est vraisemblablement assez important au bout d'une semaine (Klatt et Lapara, 2003; Worm et Nybroe, 2001).

Aussi, l'étude des effets de quelques paramètres environnementaux sur une période relativement courte, ne pouvait pas conduire *a priori* à des modifications drastiques de l'organisation des floccs et de l'expression des enzymes extracellulaires en particulier. D'une part, il est probable que les floccs exposés à des situations stressantes « réagissent » rapidement afin de maintenir leur intégrité. D'autre part, si des modifications importantes et facilement observables pouvaient avoir lieu, elles auraient sans doute été déjà rapportées.

L'exposition des boues à un stress oxydant n'a pas permis de mettre en évidence un effet de l'oxygène sur l'expression des enzymes hydrolytiques extracellulaires. Néanmoins, le suivi d'un marqueur spécifique du stress oxydant, comme le glutathion, permettrait de confirmer l'état de stress des cellules (Dziurla *et al.*, in press) et d'envisager éventuellement l'utilisation d'oxydants plus puissants comme le peroxyde d'hydrogène ou l'ozone.

Le maintien des activités enzymatiques des boues exposées à une période de famine de 3 jours est variable en fonction de l'activité testée, avec une diminution de près de 80 % de l'activité  $\alpha$ -glucosidase, une multiplication par deux de l'activité protéase et une activité Leu-aminopeptidase quasi stable.

L'ajout d'azocaséine a modifié significativement l'expression de l'activité Leu-aminopeptidase des boues. Ces résultats ont clairement démontré que la présence de substrat macromoléculaire est un paramètre qui induit l'expression de certaines activités enzymatiques hydrolytiques, comme l'activité Leu-aminopeptidase. L'exposition des boues à l'azocaséine a un effet quasi immédiat sur l'activité Leu-aminopeptidase. L'effet dépend de la concentration en substrat. Il est aussi vraisemblablement spécifique de la nature et de la structure macromoléculaire du substrat et de l'activité enzymatique correspondante.

En conclusion, les floes de boues activées ont une organisation dynamique, qui les rend capables de réagir rapidement à divers *stimuli* environnementaux. En particulier, l'expression des enzymes extracellulaires dépend de la nature et de la concentration en substrat. Cette capacité d'adaptation constitue justement une des caractéristiques fondamentale de ce micro-écosystème, qui lui permet de maintenir des fonctions stables quelles que soient les variations des conditions environnementales.



---

## 8. CONCLUSION GENERALE.

---

La matière organique véhiculée par les eaux usées se répartit dans trois fractions : particulaire (29 %), colloïdale (31 %) et soluble (40 %) (Guellil *et al.*, 2001b). La fraction biodégradable se répartit pour moitié dans la fraction soluble et dans la fraction particulaire (Servais *et al.*, 1995). La fraction soluble se compose principalement de polymères et de macromolécules et seulement 10 % environ du carbone organique dissous sont directement assimilables par les bactéries (Orhon et Çokgör, 1997). Aussi, l'élimination de la matière organique des eaux usées repose en grande partie sur l'activité enzymatique hydrolytique confinée au sein des floccs de boues activées.

Des mesures de différentes activités dans ce type de système ont déjà été répertoriées (Boczar *et al.*, 1992 ; Teuber et Brodisch, 1977). Des profils d'activités enzymatiques différents ont été observés selon les stations d'épuration (Nybroe *et al.*, 1992), suggérant une adaptation des bactéries aux conditions environnementales et en particulier une modulation de l'expression des enzymes hydrolytiques en fonction de la composition des eaux usées.

Aussi, l'objectif majeur de ce travail était de déterminer quelques paramètres environnementaux qui pourraient influencer l'expression des enzymes hydrolytiques extracellulaires des floccs de boues activées et par conséquent l'efficacité du procédé d'épuration.

Les points forts de cette étude sont au nombre de six :

1) Qualification et quantification de quelques activités hydrolytiques associées aux EPS des boues activées.

Dix-neuf activités enzymatiques différentes ont été systématiquement mises en évidence au sein des EPS, participant aussi bien à l'hydrolyse des protéines que des polysaccharides et des lipides. La diversité des espèces bactériennes associées au sein de ces agrégats se traduit nécessairement par une variété d'activités enzymatiques, dont la nature et le nombre exact demeurent cependant inconnus. La capacité hydrolytique des boues activées par rapport aux bactéries d'autres milieux aquatiques repose en partie sur cette diversité et probablement aussi sur la redondance d'enzymes présentes. La complexité du système a néanmoins permis d'estimer la température optimale de fonctionnement de quelques enzymes et les paramètres cinétiques apparents. Ainsi, pour l'activité Leu-aminopeptidase, la constante de Michaelis est  $K_m \text{ app} = 110 \mu\text{mol L}^{-1}$  et la vitesse maximale d'hydrolyse est  $V_m = 9,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MV}_{\text{EPS}}$  et pour l'activité  $\alpha$ -glucosidase,  $K_m \text{ app} = 234 \mu\text{mol L}^{-1}$  et  $V_m = 0,9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MV}_{\text{EPS}}$ .

2) Variations temporelles de quelques activités enzymatiques.

La variation temporelle des activités enzymatiques étudiées s'est avérée très importante, en particulier pour les activités protéolytiques. Ces résultats ont suggéré une dynamique du système en réponse à certains paramètres environnementaux. Ces variations s'expliquent soit par des modifications intrinsèques des agrégats, comme un changement des populations microbiennes dominantes, soit par un changement de l'expression des enzymes en fonction des conditions environnementales.

3) La séparation de quelques enzymes au sein du mélange complexe d'activités enzymatiques associées aux EPS des boues.

La séparation des protéines dotées d'activités Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase est considérée comme l'étape critique de ce travail. Ce type d'analyse pouvant amener à terme à des informations détaillées sur les propriétés physico-chimiques, la structure, les facteurs déterminant l'expression et la localisation *in situ* des enzymes.

L'isolement de quelques souches protéolytiques a permis d'établir une sorte de référence, sans toutefois considérer les micro-organismes isolés comme parfaitement représentatifs de la communauté bactérienne.

L'isolement d'enzymes à partir du milieu hétérogène que sont les EPS ne pouvait *a priori* conduire qu'à un stade de purification intermédiaire. Aussi, les protéines dotées d'activité Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase semblent fortement associées à d'autres protéines et à d'autres composés comme les substances humiques. Il serait alors intéressant d'analyser plus finement ces interactions de manière à orienter le choix des techniques de séparation.

4) Proportion d'activité enzymatique associée aux EPS.

La part d'activité enzymatique associée aux EPS est variable en fonction de l'activité enzymatique étudiée, de 5 % pour l'activité  $\alpha$ -glucosidase, de 17 % pour l'activité Leu-aminopeptidase, 23 % pour l'activité caséinase et 44 % pour l'activité  $\alpha$ -amylase. Ces résultats suggèrent une localisation différente des enzymes en fonction du substrat qu'elles hydrolysent. L'hypothèse est que le fonctionnement des enzymes qui libèrent à partir des polymères des produits d'hydrolyse directement assimilables serait couplé à l'assimilation. De telles enzymes seraient associées aux surfaces bactériennes (ecto-enzymes), par opposition aux enzymes libérées dans le milieu extracellulaire (exo-enzymes). Quoiqu'il en soit ces résultats méritent un approfondissement. En particulier l'influence des conditions environnementales sur la répartition des enzymes n'est pas connue.

5) Accessibilité des substrats macromoléculaires aux enzymes extracellulaires.

Contrairement aux résultats obtenus jusqu'alors, la diffusion des substrats macromoléculaires ( $M_r < 25\ 000$ ) au sein des agrégats bactériens ne semble pas être un facteur limitant leur vitesse d'hydrolyse. Ces résultats suggèrent que la dynamique d'agrégation et de désagrégation des floccs de boues activées augmente considérablement l'accessibilité des substrats aux enzymes hydrolytiques et aux bactéries. L'effet de la dispersion des agrégats sur la vitesse d'hydrolyse semble néanmoins dépendre de la structure et des propriétés physico-chimiques des substrats. Ainsi, l'efficacité de la biodégradation dépend directement de la vitesse d'hydrolyse et par conséquent, des paramètres environnementaux qui influencent l'activité enzymatique, comme la température, ou qui modifient l'expression des enzymes extracellulaires.

6) Induction de l'activité enzymatique par les substrats macromoléculaires.

L'ajout d'azocaséine ( $M_r = 25000$ ) a modifié significativement l'expression de l'activité Leu-aminopeptidase des boues. L'exposition des boues à l'azocaséine a eu un effet quasi immédiat sur l'activité Leu-aminopeptidase des boues, qui a augmenté de manière significative après 24 h d'exposition. L'intensité de l'effet dépend de la concentration en substrat. De plus, les résultats suggèrent que la nature et la structure des substrats disponibles seraient les principaux déterminants de l'expression des enzymes hydrolytiques. Les macromolécules comme l'azocaséine n'ayant pas accès aux gènes de régulation situés à l'intérieur du cytoplasme, l'hypothèse formulée est ses produits d'hydrolyse (peptides) sont impliqués dans la régulation de l'expression de l'activité Leu-aminopeptidase et induiraient sa production à un niveau supérieur au niveau basal.

En conclusion, la structure agrégée apparaît comme une organisation optimale pour les micro-organismes en réponse aux conditions environnementales, qui peuvent varier parfois de manière brutale, occasionnant des stress importants pour les bactéries. En effet, la présence d'une matrice de polymères extracellulaires (EPS) crée un micro-environnement favorable au développement bactérien. Les EPS permettent à la fois l'adsorption de composés organiques et la rétention des enzymes hydrolytiques extracellulaires à proximité des cellules. Contrairement à d'autres structures agrégées, comme les biofilms, le réseau d'EPS des floccs de boues activées ne semble pas limiter la vitesse d'hydrolyse des substrats macromoléculaires. La mise en commun de ces activités enzymatiques confère aux agrégats bactériens une capacité hydrolytique accrue par rapport à un micro-organisme isolé. La redondance d'activités enzymatiques permet le maintien de la fonction de biodégradation, quelles que soient les conditions environnementales. Il est alors probable que sous la pression environnementale la dominance des micro-organismes au sein des boues activées dépende plus de leur capacités fonctionnelles et à former des interactions trophiques, que de leur appartenance à un genre donné.

Les informations sur les activités enzymatiques des boues activées sont encore relativement limitées. De fait, diverses voies restent encore à explorer comme i) la distribution des enzymes *in situ* au sein des agrégats biologiques, ii) la répartition des enzymes entre la surface bactérienne et les EPS, et iii) l'abondance, la localisation, l'identification et la caractérisation de l'état physiologique des micro-organismes qui sécrètent ces enzymes.

Ces informations permettraient i) d'affecter des fonctions hydrolytiques à un groupe phylogénétique, ii) d'évaluer l'hétérogénéité fonctionnelle intra-population, iii) de déterminer des activités enzymatiques *in situ* dans un système complexe comme les agrégats bactériens et leurs variations en fonction des conditions environnementales.

Les perspectives de ce travail expérimental impliqueraient la combinaison de techniques d'imagerie microscopique avec l'utilisation de substrats fluorescents et de sondes oligonucléotidiques (FISH) et l'utilisation de techniques de biologie moléculaire (RT-PCR quantitative) et d'immunologie (anticorps).

---

## 9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

---

## 9. Références bibliographiques.

---

1. **Abbassi B., Dullstein S. and Rübiger N.** (2000). Minimization of excess sludge production by increase of oxygen concentration in activated sludge flocs, experimental and theoretical approach, *Water Res.*, 34, 139-146.
2. **Ainsworth A.M. and Goulder R.** (2000). The effects of sewage-works effluent on riverine extracellular aminopeptidase activity and microbial leucine assimilation, *Water Res.*, 34, 2551-2557.
3. **Allison D.G., Mcbain A.J. and P. G.** (2000). Biofilms: problems of control, In: *Community structure and co-operation in biofilms*, Allison D. G., Gilbert P., Lappin-Scott H. M., and Wilson M. (Eds.), 59th symposium of the Society for general microbiology, Exeter, pp. 309-327.
4. **Allison D.G., Ruiz B., Sanjose C., Jaspe A. and Gilbert P.** (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms, *FEMS Microbiol. Lett.*, 167, 179-184.
5. **Amann R., Lemmer H. and Wagner M.** (1998). Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 25, 205-215.
6. **Arnosti C. and Repeta D.J.** (1994). Extracellular enzyme activity in anaerobic bacterial cultures : evidence of pullulanase activity among mesophilic marine bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 840-846.
7. **Azeredo J., Oliveira R. and Lazarova V.** (1998). A new method for extraction of exopolymers from activated sludges, *Water Sci. Technol.*, 37, 659-662.
8. **Azeredo J., Lazarova V. and Oliveira R.** (1999a). Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms : a comparative study, *Water Sci. Technol.*, 39, 243-250.
9. **Azeredo J., Visser J. and Oliveira R.** (1999b). Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO theories, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14, 141-148.
10. **Bauda P., Bouzendorffer C., Block J.C., Faup G. and Colin F.** (1990). Characterization of bacterial biomass potential activity by proteolytic activity measurements, *Environ. Technol.*, 11, 785-792.
11. **Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L. and Hoondal G.S.** (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 326-338.
12. **Bellais S., Léotard S., Poirel L., Naas T. and Nordmann P.** (1999). Molecular characterization of a carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*, *FEMS Microbiol. Lett.*,
13. **Beveridge T.J.** (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles, *J. Bacteriol.*, 181, 4725-4733.
14. **Billen G.** (1991). Protein degradation in aquatic environments, In: *Microbial enzymes in aquatic environments*, Chróst R. J. (Ed.), Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 123-143.
15. **Blair B.G. and Anderson K.L.** (1999). Regulation of cellulose-inducible structures of *Clostridium cellulovorans*, *Can. J. Microbiol.*, 45, 242-249.
16. **Bleich U. and Nehr Korn A.** (1989). Elektronenmikroskopische Darstellung extrazellulärer polymere Substanzen in Belebtschlammflocken, *Zbl. Hyg.*, 188, 66-83.
17. **Block J.-C.** (1999). Adhésion-agrégation des bactéries : comportement individuel ou social ?, *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 14, 13-18.
18. **Boczar B.A., Begley W.M. and Larson R.J.** (1992). Characterization of enzyme activity in activated sludge using rapid analysis for specific hydrolases, *Water Environ. Res.*, 64, 792-797.
19. **Boczar B.A., Forney L.J., Begley W.M., Larson R.J. and Federle T.W.** (2001). Characterisation and distribution of esterase activity in activated sludge, *Water Res.*, 35, 4208-4216.
20. **Boon N., De Windt W., Verstraete W. and Top E.M.** (2002). Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 39, 101-112.
21. **Bossier P. and Verstraete W.** (1996). Triggers for microbial aggregation in activated sludge ?, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 1-6.
22. **Boyd A. and Chakrabarty A.M.** (1994). Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2355-2359.
23. **Bradford M.M.** (1976). A rapid method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
24. **Brown M.J. and Lester J.N.** (1980). Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods, *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 179-185.
25. **Bruus J.H., Nielsen P.H. and Keiding K.** (1992). On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering, *Water Res.*, 26, 1597-1604.
26. **Bura R., Cheung M., Liao B., Finlayson J., Lee B.C., Droppo I.G., Leppard G.G. and Liss S.N.** (1998). Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix, *Water Sci. Technol.*, 37, 325-333.
27. **Burns R.G.** (1989). Microbial and enzymatic activities in soil biofilms, In: *Structure and function of biofilms*, Characklis W. G. and Wilderer P. A. pp. 333-349.
28. **Burns A. and Ryder D.S.** (2001). Response of bacterial extracellular enzymes to inundation of floodplain sediments, *Freshwater Biology*, 46, 1299-1307.
29. **Buswell C.M., Herlihy Y.M., Marsh P.D., Keevil C.W. and Leach S.A.** (1997). Coaggregation amongst aquatic biofilm bacteria, *J. Appl. Microbiol.*, 83, 477-484.
30. **Canziani R., Vismara R., Basilico D. and Zinni L.** (1999). Nitrogen removal in fixed-bed submerged biofilters without backwashing, *Water Sci. Technol.*, 40, 145-152.

## 9. Références bibliographiques.

---

31. **Carlson G. and Silverstein J.** (1998). Effect of molecular size and charge on biofilm sorption of organic matter, *Water Res.*, 32, 1580-1592.
32. **Cascón A., Fregeneda J., Aller M., Yugueros J., Temprano A., Hernanz C., Sánchez M., Rodríguez-Aparicio L. and Naharro G.** (2000a). Cloning, characterization, and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila*, *Journal of Fish Diseases*, 23, 49-59.
33. **Cascón A., Yugueros J., Temprano A., Sánchez M., Hernanz C., Luengo J.M. and Naharro G.** (2000b). A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*, *Infection Immunity*, 68, 3233-3241.
34. **Chappell K.R. and Goulder R.** (1995). A between-river comparison of extracellular-enzyme activity, *Microb. Ecol.*, 29, 1-17.
35. **Chatterjee A., Cui Y., Liu Y., Korsi Dumenyo C. and Chatterjee A.K.** (1995). Inactivation of rsmA leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1959-1967.
36. **Chen G.-H., Yip W.-K., Mo H.-K. and Liu Y.** (2001). Effect of sludge fasting/feasting on growth of activated sludge cultures, *Water Res.*, 35, 1029-1037.
37. **Chen G.-H., An K.-J., Saby S., Brois E. and Djafer M.** (2003). Possible cause of excess sludge reduction in an oxic-settling-anaerobic activated sludge process (OSA process), *Water Research*, 37, 16, 3855-3866.
38. **Chen X. and Steward P.S.** (2002). Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 718-720.
39. **Chróst R.J., Wcislo R. and Halemejko G.Z.** (1986). Enzymatic decomposition of organic matter by bacteria in an eutrophic lake, *Arch. Hydrobiol.*, 107, 145-165.
40. **Chróst R.J.** (1991). Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes, In: *Microbial enzymes in aquatic environments* Chróst R. J. (Ed.), Springer-Verlag, New York, pp. 29-59.
41. **Chróst R.J. and Rai H.** (1993). Ecto-enzyme activity and bacterial secondary production in nutrient-impoverished and nutrient-enriched freshwater mesocosms, *Microb. Ecol.*, 25, 131-150.
42. **Chróst R.J. and Riemann B.** (1994). Storm-stimulated enzymatic decomposition of organic matter in benthic/pelagic coastal mesocosms, *Marine Ecology Progress Series*, 108, 185-192.
43. **Clesceri L.S., Greenberg A.E. and Eaton A.D.** (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American public Health Association, Washington. (1998).
44. **Confer D.R. and Logan B.E.** (1997a). Molecular weight distribution of hydrolysis products during biodegradation of model macromolecules in suspended and biofilm cultures. I. Bovine serum albumin, *Water Res.*, 31, 2127-2136.
45. **Confer D.R. and Logan B.E.** (1997b). Molecular weight distribution of hydrolysis products during biodegradation of model macromolecules in suspended and biofilm cultures. II. Dextran and dextrin, *Water Res.*, 31, 2137-2145.
46. **Conrad A., Cadoret A. and Block J.C.** (2000). Extracellular enzymatic activities in activated sludge flocs., International Specialist Conference: Extracellular polymeric substances: The construction material of biofilms., Mülheim (D)
47. **Conrad A., Cadoret A., Dziurla M.-A., Ginestet Ph. et Block J.-C.** (2002). Response of activated sludge flocs to sudden oxygen variations. In *The world of Microbes*, 10<sup>th</sup> IUMS international congress of bacteriology and applied microbiology, Paris (F).
48. **Conrad A., Corteel P., Leroy P. et Block J.-C.** (2003a). Sorption et désorption des sulfonates d'alkylbenzène et de protéines par des boues activées, 5th Congrès International: Micropolluants et microorganismes dans l'environnement, Paris.
49. **Conrad A., Kontro Suutari M., Keinänen M.M., Cadoret A., Faure P., Mansuy-Huault L. and Block J.-C.** (2003b). Fatty acids profiles of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs., *Lipids*, 38, 1093-1105.
50. **Coolen M.J.L. et Overmann J.** (2000). Fonctionnal exoenzymes as indicators of metabolically active bacteria in 124;000-year-old sapropel layers of the Eastern Mediterranean Sea, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2589-2598.
51. **Crombie-Quilty M.B. et Mcloughlin A.J.** (1983). The adsorption of bovine serum albumin by activated sludge, *Water Res.*, 17, 39-45.
52. **Cunha M.A., Almeida M.A. et Alcântara F.** (2001). Short-term responses of the natural planktonic bacterial community to the changing water properties in an estuarine environment: ectoenzymatic activity, glucose incorporation, and biomass production, *Microb. Ecol.*, 42, 69-79.
53. **Dabert P., Delgenès J.-P., Moletta R. et Godon J.-J.** (2002). Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1, 39-49.
54. **Danese P.N., Pratt L.A. et Kolter R.** (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture, *J. Bacteriol.*, 182, 3593-3596.
55. **De Beer D., Stoodley P. et Lewandowski Z.** (1996). Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms, *Water Res.*, 30, 2761-2765.
56. **Debroas D.** (1998). Decomposition of protein compounds in an eutrophic lake : spatial and temporal distribution of exopeptidase and endopeptidase activities in various size fraction, *Hydrobiologica*, 382, 161-173.
57. **Demanèche S., Jocteur-Monrozier L., Quiquampoix H. et Simonet P.** (2001). Evaluation of biological and physical protection against nuclease degradation of clay-bound plasmid DNA., *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 293-299.

## 9. Références bibliographiques.

---

58. **Deng S.B., Bai R.B., Hu X.M. et Luo Q.** (2003). Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 588-593.
59. **Deriaz R.E., Stacey M., Teece E.G. et Wiggins L.F.** (1949). Deoxy-sugars. Part I. The Dische reaction for 2-deoxypentoses, *J. Chem. Soc.*, 14, 1222-1232.
60. **Dignac M.-F., Ginestet P., Rybacki D., Bruchet A., Urbain V. et Scribe P.** (2000). Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: nature of residual organic matter, *Water Res.*, 34, 4185-4194.
61. **Dold P.L., Fleit E. et Han J.** (1991). Hydrolysis of alpha (1-4) glucan bonds in activated sludge mixed bacterial communities, *Environ. Technol.*, 12, 871-879.
62. **Dold P.L., Fleit E., J. H. et B. C.J.** (1995). Assay for determination of alpha-amylase activity in activated sludge mixed bacterial communities, *Environ. Technol.*, 16, 181-188.
63. **Droppo I.G., Flannigan D.T., Leppard G.G., Jaskot C. et Liss S.** (1996). Floc stabilization for multiple microscopic techniques, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3508-3515.
64. **Droppo I.G., Leppard G.G., Flannigan D.T. et Liss S.N.** (1997). The freshwater floc: a functional relationship of water and organic and inorganic floc constituents affecting suspended sediment properties, *Water, Air and Soil Pollution*, 99, 43-54.
65. **Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. et Smith F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
66. **Dueholm T.E., Andreassen K.H. et Nielsen P.H.** (2001). Transformation of lipids in activated sludge, *Water Sci. Technol.*, 43, 165-172.
67. **Durmaz B. et Sanin F.D.** (2001). Effect of carbon to nitrogen on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge, *Water Sci. Technol.*, 44, 221-229.
68. **Dziurla M.A., Leroy P., Strükmann G.W., Salhi M., Lee D.U., Camacho P., Heinz V., Müller J.A., Paul E., Ginestet P. et Block J.C.** (2003, in press). Measurement of glutathione in activated sludges., *Wat. Res.*
69. **Egelseer E.M., Schocher I., Sleytr U.B. et Sara M.** (1996). Evidence that an N-terminal S-layer protein fragment triggers the release of a cell-associated high-molecular-weight amylase in *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980, *J. Bacteriol.*, 178, 5602-5609.
70. **Egli T.** (1995). The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates., In: *Advances in microbial ecology*, Vol. 14, Jones G. (Ed.), Plenum Press, New York, pp. 305-386.
71. **Eliosov B. et Argaman Y.** (1995). Hydrolysis of particulate organics in activated sludge systems, *Water Res.*, 29, 155-163.
72. **Englard S. et Seifter S.** (1990). Precipitation techniques., In: *Guide to protein purification.*, Vol. 182, Deutscher M. P. (Ed.), Academic Press, Inc, San Diego, pp.
73. **Eriksson L., Steen I. et Tendaj M.** (1992). Evaluation of sludge properties at an activated sludge plant, *Water Sci. Technol.*, 25, 251-265.
74. **Eschenhagen M., Schuppler M. et Roske I.** (2003). Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents, *Water Research*, 37, 13, 3224-3232.
75. **Esparza-Soto M. et Westerhoff P.K.** (2001). Fluorescence spectroscopy and molecular weight distribution of extracellular polymers from full-scale activated sludge biomass, *Water Sci. Technol.*, 43, 87-95.
76. **Fabiano M. et Danovaro R.** (1998). Enzymatic activity; bacterial distribution; and organic matter composition in sediments of the Ross Sea (Antarctica), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3838-3845.
77. **Flemming H.C., Wingender J., Mayer C., Korstgens V. et Borchard W.** (2000). Cohesiveness in biofilm matrix polymers, In: *Community structure and co-operation in biofilms (59th symposium of the Society for general microbiology, Exeter)* Allison D. G., Gilbert P., Lappin-Scott H. M., and Wilson M. (Eds.), Society for general microbiology, University Press, Cambridge, pp. 88-105.
78. **Frankenberger W.T. et Johanson J.B.** (1986). Use of plasmolytic agents and antiseptics in soil enzyme assays, *Soil Biol. Biochem.*, 18, 209-213.
79. **Frølund B., Griebel T. et Nielsen P.H.** (1995). Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 755-761.
80. **Frølund B., Palmgren R., Keiding K. et Nielsen P.H.** (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin, *Water Research*, 30, 8, 1749-1758.
81. **Ganaye V., Keiding K., Vogel T.M., Viriot M.L. et Block J.C.** (1997). Evaluation of soil organic matter polarity by pyrene fluorescence spectrum variations, *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2701-2706.
82. **Garcia J., Fernandez S., Mirada F.J. et Lopez F.** (1997). Determination of the protease activity in activated sludges by gelatin hydrolysis, *J. Environ. Sci. Health*, A32, 2537-2551.
83. **Garcia-Gonzalez J., Mirada F. et Lopez F.** (2001). Evaluation of a protease assay based on a natural protein for heavy metal inhibition of activated sludge, *J. Environ. Sci. Health*, 36, 1349-1360.
84. **Garcia-Lopez L. et Veiga M.C.** (2000). Studies of mass transfer coefficients in denitrifying biofilms., 1st Water congress of the international water association, Paris (F)
85. **Gaval G. et Pernelle J.-J.** (2003). Impact of the repetition of oxygen deficiencies on the filamentous bacteria proliferation in activated sludge, *Water Res.*, 37, 9, 1991-2000.



## 9. Références bibliographiques.

---

86. **Geiger G., Furrer G., Brandl H. et Schulin R.** (1999). Activity of  $\beta$ -glucosidase in the presence of copper or zinc or montmorillonite or Al-montmorillonite, In: *Effect of mineral-organic-microorganism interactions on soil and freshwater environments* Berthelin (Ed.), Kluwer Academic / Plenum, New York, pp. 287-294.
87. **Gessesse A. et Mamo G.** (1999). High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 68-72.
88. **Gessesse A., Petersen S.B., Dueholm T.E. et Nielsen P.H.** (2000). Lipase production in activated sludge may be dominated by few organisms., International Specialist Conference: Extracellular polymeric substances: The construction material of biofilms., Mülheim (D)
89. **Gessesse A., Dueholm T., Petersen S.B. et Nielsen P.H.** (2003). Lipase and protease extraction from activated sludge, *Water Research*, 37, 15, 3652-3657.
90. **Ghuysen J.M., Tipper D.J., Birge C.H. et Strominger J.L.** (1965). Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus* strain Copenhagen. VI The soluble glycopeptide and its sequential degradation by peptidases., *Biochem.*, 4, 2245-2254.
91. **Givskov M., Eberl L. et Molin S.** (1997). Control of exoenzyme production; motility and cell differentiation in *Serratia liquefaciens*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 148, 115-122.
92. **Goel R., Mino T., Satoh H. et Matsuo T.** (1998a). Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor, *Water Res.*, 32, 2081-2088.
93. **Goel R., Mino T., Satoh H. et Matsuo T.** (1998b). Comparison of hydrolytic enzyme systems in pure culture and activated sludge under different electron acceptor conditions, *Water Sci. Technol.*, 37, 335-343.
94. **Gonzales T. et Robert-Baudouy J.** (1996). Bacterial aminopeptidases: properties and functions, *FEMS Microbiol. Rev.*, 18, 319-344.
95. **Görner T., De Donato P., Ameil M.-H., Montarges-Pelletier E. et Lartiges B.** (2003). Activated sludge exopolymers: separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy, *Water Res.*, 2388-2393.
96. **Gregor J.E., Fenton E., Brokenshire G., Van Den Brink P. et O'sullivan B.** (1996). Interactions of calcium and aluminium ions with alginate, *Water Res.*, 30, 1319-1324.
97. **Grotenhuis J.T.C., Smit M., Van Lammeren A.A.M., Stams A.J.M. et Zehnder A.J.B.** (1991). Localization and quantification of extracellular polymers in methanogenic granular sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 115-119.
98. **Gruner E., Von Graevenitz A. et Altwegg M.** (1992). The API ZYM system: a tabulated review from 1977 to date, *Journal of Microbiological methods*, 16, 101-118.
99. **Gschlöbl T., Michel I., Heiter M., Nerger C. et Rehbein V.** (1997). Microscopic and enzymatic investigations on biofilms of wastewater treatment systems, *Water Sci. Technol.*, 36, 21-30.
100. **Guellil A., Boualam M., Quiquampoix H., Block J.-C. et Ginestet P.** (2001a). Hydrolysis of wastewater colloidal matter by the extracellular enzymes extracted from activated sludge flocs, *Water Sci. Technol.*, 43, 33-40.
101. **Guellil A., Thomas F., Block J.-C., Bersillon J.-L. et Ginestet P.** (2001b). Transfer of organic matter between wastewater and activated sludge flocs, *Water Res.*, 35, 143-150.
102. **Gupta R., Beg Q.K. et Lorenz P.** (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,
103. **Häner A., Mason C.A. et Hamer G.** (1994). Death and lysis during aerobic thermophilic sludge treatment : characterization of recalcitrant products, *Water Res.*, 28, 863-869.
104. **Hanlon G.W., Hodges N.A. et Russell A.D.** (1982). The influence of glucose; ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*, *J. Gen. Microbiol.*, 128, 845-851.
105. **Hart T.D., Chamberlain A.H.L., Lynch J.M., Newling B. et McDonald P.J.** (1999). Astray field magnetic resonance study of water diffusion in bacterial exopolysaccharides, *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 339-347.
106. **Hashimoto W., Momma K., Miki H., Mishima Y., Kabayashi E., Miyake O., Kawai S., Nankai H., Mikami B. et Murata K.** (1999). Enzymatic and genetic bases on assimilation; depolymerization; and transport of heteropolysaccharides in bacteria, *J. Biosc. Bioeng.*, 87, 123-136.
107. **Hebert E.M., Raya R.R. et De Giori G.S.** (2000). Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5316-5321.
108. **Hendel B., Marxsen J., Fiebig D. et Preuss G.** (2001). Extracellular enzyme activities during slow sand filtration in a water recharge plant, *Water Res.*, 35, 2484-2488.
109. **Henze M., Grady C.P.L., Gujer W., Marais G.V.R. et Matsuo T.** (1986). Activated sludge model n°1 by IAWPRC task group on mathematical modelling for design and operation of biological wastewater treatment,
110. **Henze M. et Mladenovski C.** (1991). Hydrolysis of particulate substrate by activated sludge under aerobic; anoxic and anaerobic conditions, *Water Res.*, 25, 61-64.
111. **Henze M.** (1992). Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes, *Water Sci. Technol.*, 25, 1-15.
112. **Henze M., Gujer W., Mino T., Matsuo T., Wentzel M.C. et Marais G.V.R.** (1995). Activated sludge model n°2 by IAWPRC task group on mathematical modelling for design and operation of biological wastewater treatment processes,
113. **Higgins M.J. et Novak J.T.** (1997). Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation, *J. Environ. Eng.*, 123, 479-485.
114. **Hollibaugh J.T. et Azam F.** (1983). Microbial degradation of dissolved proteins in seawater, *Limnol. Oceanogr.*, 28, 1104-1116.

## 9. Références bibliographiques.

---

115. Hoondal G.S., Tiwari R.P., Tewari R., Dahiya N. et Beg Q.K. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 409-418.
116. Hoppe H.-G., Kim S.-J. et Gocke K. (1988). Microbial decomposition in aquatic environments : combined process of extracellular enzyme activity and substrate uptake., *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 784-790.
117. Hoppe H.-G., Giesenhausen H.C. et Gocke K. (1998). Changing patterns of bacterial substrate decomposition in a eutrophication gradient, *Aquat. Microb. Ecol.*, 15, 1-13.
118. Hugo C.J. et Jooste P.J. (1997). Preliminary differentiation of food strains of *Chryseobacterium* and *Empedobacter* using multilocus enzyme electrophoresis, *Food Microbiology*, 14, 133-142.
119. Huston A.L., Krieger-Brockett B.B. et Deming J.W. (2000). Remarkably low temperature optima for extracellular enzyme activity from Arctic bacteria and sea ice, *Environ. Microbiol.*, 2, 383-388.
120. Huston A.L. et Deming J.W. (2002). Relationships between microbial extracellular enzymatic activity and suspended and sinking particulate organic matter: seasonal transformations in the North Water, *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 49, 22-23, 5211-5225.
121. Iversen S.L. et Jørgensen M.H. (1995). Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth, *Biotechnology Techniques*, 9-8, 573-576.
122. Iwabuchi N., Sunairi M., Urai M., Itoh C., Anzai H., Nakajima M. et Harayama S. (2002). Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus* rhodochrous S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2337-2343.
123. Jahn A. et Nielsen P.H. (1995). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin, *Water Sci. Technol.*, 32, 157-164.
124. Jahn A. et Nielsen P.H. (1998). Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms, *Water Sci Technol.*, 37, 1, 17-24.
125. Janning K.F., Mesterton K. et Harremoës P. (1997). Hydrolysis and degradation of filtrated organic particulates in a biofilm reactor under anoxic and aerobic conditions, *Water Sci. Technol.*, 36, 279-286.
126. Janvier M. et Grimont P.A.D. (1995). The genus *Methylophaga*, a new line of descent within phylogenetic branch  $\gamma$  of *Proteobacteria*, *Res. Microbiol.*, 146, 543-550.
127. Jeon C.O., Lee D.S. et Park J.M. (2003). Microbial communities in activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor, *Water Res.*, 37, 9, 2195-2205.
128. Johnsen A.R., Hausner M., Schnell A. et Wuertz S. (2000). Evaluation of fluorescently labeled lectins for noninvasive localization of extracellular polymeric substances in *Sphingomonas* biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3487-3491.
129. Johnsen A.R. et Karlson U. (2003, in press). Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
130. Jorand F., Zartarian F., Thomas F., Block J.-C., Bottero J.-Y., Villemin G., Urbain V. et Manem J. (1995). Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs, *Water Res.*, 29, 1639-1647.
131. Jorand F., Boué-Bigne F., Block J.C. et Urbain V. (1998). Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances, *Water Sci. Technol.*, 37, 307-315.
132. Jung J., Xing X.-H. et Matsumoto K. (2001). Kinetic analysis of disruption of excess activated sludge by Dyno Mill and characteristics of protein release for recovery of useful materials, *Biochemical Engineering Journal*, 8, 1-7.
133. Juretschko S., Timmermann G., Schmid M., Schleifer K.-H., Pommerening-Röser A., Koops H.-P. et Wagner M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3042-3051.
134. Kadurugamuwa J. et Beveridge T. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion, *J. Bacteriol.*, 177, 14, 3998-4008.
135. Kadurugamuwa J. et Beveridge T. (1996). Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics, *J. Bacteriol.*, 178, 10, 2767-2774.
136. Kämpfer P., Erhart R., Beimfohr C., Böhringer J., Wagner M. et Amann R. (1996). Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus *in situ* identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotides probes, *Microb. Ecol.*, 32, 101-121.
137. Karner M. et Rassoulzadegan F. (1995). Extracellular enzyme activity: indications for high short-term variability in a coastal marine ecosystem, *Microb. Ecol.*, 30, 143-156.
138. Keiding K. et Nielsen P.H. (1997). Desorption of organic macromolecules from activated sludge: effect of ionic composition, *Water Res.*, 31, 1665-1672.
139. Klatt C.G. et Lapara T.M. (2003). Aerobic biological treatment of synthetic municipal wastewater in membrane-coupled bioreactors, *Biotech. Bioeng.*, 82, 313-320.
140. Kosugi A., Murashima K. et Doi R.H. (2001). Characterization of xylanolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans*: expression of xylanase activity dependent on growth substrates, *J. Bacteriol.*, 183, 7037-7043.
141. Krishna C. et Van Loosdrecht M.C.M. (1999). Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge, *Water Res.*, 33, 2374-2382.
142. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.

## 9. Références bibliographiques.

---

143. **Larsen T.A. et Harremoës P.** (1994). Degradation mechanisms of colloidal organic matter in biofilm reactors, *Water Res.*, 28, 1443-1452.
144. **Law B.A.** (1980). Transport and utilization of proteins by bacteria, In: *Microorganisms and nitrogen sources* Payne J. W. and Wiley J. (Eds.), Sons Ltd, 381-409.
145. **Lawrence J.R., Wolfaardt G.M. et Korber D.R.** (1994). Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1166-1173.
146. **Lawrence J.R., Neu T.R. et Swerhone G.D.W.** (1998). Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms, *J. of Microbiol. Methods*, 32, 3, 253-261.
147. **Le Bihan Y. et Lessard P.** (1998). Influence of operational variables on enzymatic tests applied to monitor the microbial biomass activity of a biofilter, *Water Sci. Technol.*, 37, 199-202.
148. **Le Bihan Y. et Lessard P.** (2000). Use of enzyme tests to monitor the biomass activity of a trickling biofilter treating domestic wastewaters., *J. Chem. Technol. and Biotechnol.*, 75, 1031-1039.
149. **Lemma H., Roth D. et Schade M.** (1994). Population density and enzyme activities of heterotrophic bacteria in sewer biofilms and activated sludge, *Water Res.*, 28, 1341-1346.
150. **Lessie T.G. et Wyk V.** (1972). Multiple forms of *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases : differences in size, pyridine nucleotide specificity, and susceptibility to inhibition by adenosine 5'-triphosphate., *J. Bacteriol.*, 110, 1107-1117.
151. **Levine A.D., Tchobanoglous G. et Asano T.** (1985). Characterization of the size distribution of contaminants in wastewater : treatment and reuse implications, *J. Water Poll. Control Fed.*, 57, 805816.
152. **Levine A.D., Tchobanoglous G. et Asano T.** (1991a). Particulate contaminants in wastewater: a comparison of measurement techniques and reported particle size distributions, *Fluid Particle Separation Journal*, 4, 89-106.
153. **Levine A.D., Tchobanoglous G. et Asano T.** (1991b). Size distributions of particulate contaminants in wastewater and their impact on treatability, *Water Res.*, 25, 911-922.
154. **Li D. et Ganczarczyk J.** (1991). Size distribution of activated sludge flocs, *Res. J. Water Pollut. Control Fed.*, 63, 806-814.
155. **Li Z., Clarke A.J. et Beveridge T.J.** (1998). Gram-Negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria, *J. Bacteriol.*, 180, 20, 5478-5483.
156. **Li X.-Y., Yuan Y. et Wang H.-W.** (2003). Hydrodynamics of biological aggregates of different sludge ages: an insight into the mass transport mechanisms of bioaggregates, *Environ. Sci. Technol.*, 37, 292-299.
157. **Liao B.Q., Allen D.G., Leppard G.G., Droppo I.G. et Liss S.N.** (2002). Interparticle interactions affecting the stability of sludge flocs, *Journal of Colloid and Interface Science*, 249, 372-380.
158. **Lichko L.P., Kulakovskaya T.V. et Kulaev I.S.** (2002). Two exopolyphosphatases of *Microlunatus phosphovorius*; a polyphosphate-accumulating eubacterium from activated sludge, *Process biochemistry*, 37, 799-803.
159. **Lijnen H.R., B. V.H., F. U., D. C. et I. R.** (2000). Specific proteolysis of human plasminogen by a 24 kDa endopeptidase from a novel *Chryseobacterium* Sp., *Biochem.*, 39, 479-488.
160. **Lishman L.A. et Murphy K.L.** (1994). The significance of hydrolysis in microbial death and decay, *Water Res.*, 28, 2417-2419.
161. **Liss S.N., Droppo I.G. et Flannigan D.T.** (1996). Floc architecture in wastewater and natural riverine systems, *Environ. Sci. Technol.*, 30, 680-686.
162. **Little J.E., Sjogren R.E. et Carson G.R.** (1979). Measurement of proteolysis in natural waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 900-908.
163. **Liu H. et Fang H.H.P.** (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges, *J. Biotechnol.*, 95, 249-256.
164. **Liu Y., Yang S.-F. et Tay J.-H.** (2003). Elemental compositions and characteristics of aerobic granules cultivated at different substrate N/C ratios, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,
165. **Longo A.M., Novella I.S., Garcia L.A. et Diaz M.** (1992). Diffusion of proteases in calcium alginate beads, *Enzyme and Microbial Technol.*, 14, 586-590.
166. **Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A. et Randall R.J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
167. **Mallet C. et Debroas D.** (1999). Relations between organic matter and bacterial proteolytic activity in sediment surface layers of a eutrophic lake (Lake Aydat, Puy de Dôme, France), *Arch. Hydrobiol.*, 145, 39-56.
168. **Martinez J., Smith D.C., Steward G.F. et Azam F.** (1996). Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea, *Aquat. Microb. Ecol.*, 10, 223-230.
169. **Martinez M.B., Flicklinger M.C. et Nelsestuen G.L.** (1999). Steady-state enzyme kinetics in the *Escherichia coli* periplasm : a model of a whole cell biocatalyst, *J. Biotechnol.*, 71, 59-66.
170. **Maunoir S., Sabil N., Rambaud A., Philip H. et Coletti-Previero M.A.** (1991). Role of insoluble enzymes in anaerobic wastewater treatment and enzyme-bioactivator interactions, *Environ. Technol.*, 12, 313-323.
171. **Mayer F.** (1993). Principles of functional and structural organization in the bacterial cell : 'Compartments' and their enzymes, *FEMS Microbiol. Rev.*, 104, 327-346.
172. **Mcelhaney R.** (1982). Effect of membrane lipids on transport and enzymatic activities, In: *Current topics in membrane and transport. Membrane lipids of prokaryotes.*, Vol. 17, Bronner F. and Kleinzeller A. (Eds.), Academic Press, London, pp. 317-380.

## 9. Références bibliographiques.

---

173. **McLoughlin A.J. et Crombie-Quilty M.B.** (1983). The kinetics of protein removal by activated sludge, *Water Res.*, 17, 161-166.
174. **Mines R.O. et Sherrard J.H.** (1999). Temperature interactions in the activated sludge process, *J. Environ. Sci. Health*, A34(2), 329-340.
175. **Miron Y., Zeeman G., Van Lier J.B. et Lettinga G.** (2000). The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids; carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems, *Water Res.*, 5, 1705-1713.
176. **Mobarry B.K., Wagner M., Urbain V., Rittmann B.E. et Stahl D.A.** (1996). Phylogenetic probes for analysing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria., *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2156-2162.
177. **Morgan-Sagastume F. et Allen D.G.** (2003). Effects of temperature transient conditions on aerobic biological treatment of wastewater, *Water Res.*, 37, 15, 3590-3601.
178. **Morra M.J.** (1997). Assessment of extracellular enzymatic activity in soil, In: *Manual of environmental microbiology* Hurst C. J. (Ed.), ASM Press Washington D. C., 459-463.
179. **Murashima K., Kosugi A. et Doi R.H.** (2002). Determination of subunit composition of Clostridium cellulovorans cellulosomes that degrade plant cell walls, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1610-1615.
180. **Murray R.G.E., Brenner D.J., Bryant M.P., Holt J.G., Krieg N.R., Moulder J.M., Pfennig N., Sneath P.H.A., Staley J.T., Lapage S.P., Lautrop H., Liston J. et Niven C.F.** (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, London (1984).
181. **Mustafa N. et Sörensson F.** (2001). Assay for determination of  $\alpha$ -glucosidase and peptidase activity and location in a nitrifying trickling filter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 799-802.
182. **Mustafa N., Thörn M. et Sörensson F.** (2002). Inhibition of bacterial  $\alpha$ -glucosidases by castanospermine in pure cultures and activated sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 68-71.
183. **Neu T.R. et Lawrence J.R.** (1999). In situ characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in biofilm systems, In: *Microbial extracellular substances : characterization; structure and function* Wingender J., Neu T. R. and Flemming H.-C. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 22-47.
184. **Nielsen P.H., Raunkjær K., Norsker N.H., Jensen N.A. et Hvitved-Jacobsen T.** (1992). Transformation of wastewater in sewer systems-a review, *Water Sci. Technol.*, 25, 17-31.
185. **Nielsen P.H. et Jahn A.** (1999). Extraction of EPS, In: *Microbial extracellular substances : characterization, structure and function* Wingender J., Neu T. R. and Flemming H.-C. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 50-72.
186. **Nielsen P.H., Andreasen K., Lee N. et Wagner M.** (1999). Use of microautoradiography and fluorescent in situ hybridization for characterization of microbial activity in activated sludge, *Water Sci. Technol.*, 39, 1, 1-9.
187. **Nikaido H.** (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes, *Mol. Microbiol.*, 6,
188. **North P.F.** (1976). Towards an absolute measurement of soil structural stability using ultrasound, *Journal of Soil Science*, 27, 451-419.
189. **Novak J.T., Muller C.D. et Murthy S.N.** (2001). Floc structure and the role of cations, *Water Sci. Technol.*, 44, 209-213.
190. **Nybroe O., Jørgensen P.E. et Henze M.** (1992). Enzyme activities in waste water and activated sludge, *Water Res.*, 26, 579-584.
191. **Ohron D. et Çokgör E.U.** (1997). COD fractionation in wastewater characterization-The state of the art, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 68, 283-293.
192. **Olofsson A.-C., A. Z. et Hermansson M.** (1998). Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge, *Microbiology*, 144, 519-528.
193. **Ohron D. et Çokgör E.U.** (1997). COD fractionation in wastewater characterization-The state of the art, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 68, 283-293.
194. **Palmgren R., Jorand F., Nielsen P.H. et Block J.-C.** (1998). Influence of oxygen limitation of the cell surface properties of bacteria from activated sludge, *Water Sci. Technol.*, 37, 349-352.
195. **Pantoja S. et Lee C.** (1999). Peptide decomposition by extracellular hydrolysis in coastal seawater and salt marsh sediment, *Mar. Chem.*, 63, 273-291.
196. **Pelmont J.** (1993). Etat stationnaire et vitesse initiale, In: *Enzymes*, Pelmont J. (Ed.), Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble, pp. 179-197.
197. **Peña C., Trujillo-Roldan M.A. et Galindo E.** (2000). Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 390-398.
198. **Peterson G.L.** (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Analytical Biochemistry*, 100, 201-220.
199. **Priest F.G.** (1992). Enzymes, extracellular, In: *Encyclopedia of microbiology*, Vol. 2, Priest F. G. (Ed.), Academic Press Inc, 81-93.
200. **Pujol R. et Canler J.P.** (1992). Biosorption and dynamics of bacterial populations in activated sludge, *Water Res.*, 26, 209-212.
201. **Rad J.C., Navarro-Gonzalez M. et Gonzales-Carcedo S.** (1999). Use of pyrophosphate to extract extra- and intracellular enzymes from a compost of municipal solid wastes, In: *Effect of Mineral-organic-microorganism interactions on soil and freshwater environments*, Berthelin (Ed.), Kluwer academic / Plenum, New York, pp.

## 9. Références bibliographiques.

---

202. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. et Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol. Mol. Biol. Reviews*, 62, 597-635.
203. Raunkjær K., Hvitved-Jacobsen T. et Nielsen P.H. (1994). Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater, *Water Res.*, 28, 251-262.
204. Rehm B.H.A. et Valla S. (1997). Bacterial alginates: biosynthesis and applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 281-288.
205. Richards S.R., Hastwell C. et Davies M. (1984). The comparative examination of 14 activated-sludge plants using enzymatic techniques, *Wat. Pollut. Control*, 300-313.
206. Rickard A.H., Leach S.A., Buswell C.M., High N.J. et Handley P.S. (2000). Coaggregation between aquatic bacteria is mediated by specific-growth-phase-dependent lectin-saccharide interactions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 431-434.
207. Riemann L., Steward G.F. et Azam F. (2000). Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 578-587.
208. Roberson E.B. et Firestone M.K. (1992). Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1284-1291.
209. Romani A.M. (2000). Characterization of extracellular enzyme kinetics in two Mediterranean streams, *Arch. Hydrobiol.*, 148, 99-117.
210. Romaní A.M. et Sabater S. (2000). Influence of algal biomass on extracellular enzyme activity in river biofilms, *Microbial Ecology*, 16-24, 41.
211. Romero F.J., García L.A., Salas J.A., Díaz M. et Quirós L.M. (2001). Production; purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey, *Process Biochemistry*, 36, 507-515.
212. Roques H., Capeville B., Séropian J.C. et Grigoropoulou H. (1984). Oxygenation by hydrogen peroxide of the fixed biomass used in biological water treatment, *Water Res.*, 18, 103-110.
213. Russel N.J. (1998). Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications, *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 61, 2-20.
214. Salamone P.R. et Wodzinski R.J. (1997). Production; purification and characterization of a 50-kDa extracellular metalloprotease from *Serratia marcescens*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 317-324.
215. Sanders W.T.M., Geering M., Zeeman G. et Lettinga G. (2000). Anaerobic hydrolysis kinetics of particulates substrates, *Water Sci. Technol.*, 41, 17-24.
216. Sanin D. et Vesilind P.A. (2000). Bioflocculation of activated sludge: the role of calcium ions and extracellular polymers, *Environ. Technol.*, 21, 1405-1412.
217. Santos J.A., González C.J., López-Díaz T.M., García-López M.L. et Otero A. (1996). Extracellular protease production by dairy strains of *Aeromonas hydrophila* as affected by growth media and incubation temperature, *Food microbiology*, 13, 47-51.
218. Sarath G., De La Motte R.S. et Wagner F.W. (1989). Protease assay methods, In: *Proteolytic enzymes: a practical approach*, Beynon R. J. and Bond J. S. (Eds.), Oxford University Press, Oxford, pp. 25-55.
219. Sauter J.J., Elle D. et Witt W. (1998). A starch granule bound endoamylase and its possible role during cold acclimatation of parenchyma cells in poplar wood (*Populus x canadensis* Moench "robusta"), *J. Plant physiol.*, 153, 739-744.
220. Schmid M., Thill A., Purkhold U., Walcher M., Bottero J.Y., Ginestet P., Nielsen P.H., Wuertz S. et Wagner M. (2003). Characterization of activated sludge flocs by confocal laser scanning microscopy and image analysis, *Water Research*, 37, 9, 2043-2052.
221. Schramm A., Larsen L.H., Revsbech N.P., Ramsing N.B., Amann R. et Schleifer K.-H. (1996). Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes., *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4641-4647.
222. Schramm A., De Beer D., Wagner M. et Amann R. (1998). Identification and activities in situ of *Nitrosospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3480-3485.
223. Secades P. et Guijarro J.A. (1999). Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture on production, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3969-3975.
224. Servais P., Barillier A. et Garnier J. (1995). Determination of the biodegradable fraction of dissolved and particulate organic carbon in waters, *Annals Limnol.*, 31, 75-80.
225. Seviour R.J. et Blackall L.L. (1999). *The microbiology of activated sludge*, Kluwer Academic, Dordrecht, Boston, London (1999).
226. Singh L., Sai Ram M., Agarwal M.K. et Alam S.I. (2000). Characterization of *Aeromonas hydrophila* strains and their evaluation for biodegradation of night soil, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 625-630.
227. Somville M. (1984). Measurement and study of substrate specificity of exoglucosidase activity in eutrophic water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 1181-1185.
228. Sponza D.T. (2002). Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady- and unsteady-state activated sludge systems, *Process Biochem.*, 37, 983-998.
229. Sponza D.T. (2003). Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions., *Enzyme and Microb. Technol.*, 32, 375-385.
230. Sridhar M.K.C. et Pillai S.C. (1973). Protease activity in sewage sludges and effluents, *Water and waste treatment*, 35-42.

## 9. Références bibliographiques.

---

231. **Stepanauskas R., Edling H. et Tranvik L.J.** (1999). Differential dissolved organic nitrogen availability and bacterial aminopeptidase activity in limnic and marine waters, *Microb. Ecol.*, 38, 264-272.
232. **Stringfellow W.T. et Alvarez-Cohen L.** (1999). Evaluating the relationship between the sorption of PAHs to bacterial biomass and biodegradation, *Water Res.*, 33, 11, 2535-2544.
233. **Struijs J., Stoltenkamp J. et Van De Meent D.** (1991). A spreadsheet-based box model to predict the fate of xenobiotics in a municipal wastewater treatment plant, *Water Res.*, 25, 7, 891-900.
234. **Struijs J., Stoltenkamp J. et Van De Meent D.** (1991). A spreadsheet-based box model to predict the fate of xenobiotics in a municipal wastewater treatment plant, *Water Research*, 25, 7, 891-900.
235. **Sutherland I.W.** (1999). Polysaccharases for microbial exopolysaccharides, *Carbohydrates Polymers*, 38, 319-328.
236. **Svitil A.L., Ni Chadhain S.M., Moore J.A. et Kirchman D.L.** (1997). Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 408-413.
237. **Swift S., Lynch M.J., Fish L., Kirke D.F., Tomás J.M., Stewart G.S.A.B. et Williams P.** (1999). Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*, *Infection and Immunity*, 67, 5192-5199.
238. **Tanaka H., Matsumura M. et Veliky I.A.** (1984). Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginates gel beads, *Biotech. Bioeng.*, 26, 53-58.
239. **Tavares F. et Sellstedt A.** (2000). A simple; rapid and non-destructive procedure to extract cell wall-associated from *Frankia*, *J. Microbiol. Methods*, 39, 171-178.
240. **Tay J.-H., Liu Q.-S. et Liu Y.** (2001). The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules, *Letters in Appl. Microbiol.*, 33, 222-226.
241. **Teuber M. et Brodisch K.E.U.** (1977). Enzymatic activities of activated sludge, *European J. Appl. Microbiol.*, 4, 185-194.
242. **Thiel P.G. et Hattingh W.H.J.** (1967). Determination of hydrolytic enzyme activities in anaerobic digesting sludge, *Water Res.*, 1, 191-196.
243. **Tholosan O., Lamy F., Garcin J., Polychronaki T. et Bianchi A.** (1999). Biphasic extracellular proteolytic enzyme activity in benthic water and sediment in the Northwestern Mediterranean Sea, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1619-1626.
244. **Toh S.K., Tay J.H., Moy B.Y.P., Ivanov V. et Tay S.T.L.** (2003). Size-effect on the physical characteristics of the aerobic granule in a SBR, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 687-695.
245. **Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A. et Hirata A.** (2003). Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface, *FEMS Microbiology Letters*, 223, 2, 287-292.
246. **Ubukata Y.** (1997). Kinetics of polymeric substrate (dextrin or peptone) removal by activated sludge : hydrolysis of polymers to monomers is the rate-determining step, *Water Sci. Technol.*, 36, 159-167.
247. **Ubukata Y.** (1998). Kinetics and fundamental mechanisms of protein removal by activated sludge: hydrolysis of peptone to amino acids is the rate-determining step, *Wat. Sci Technol.*, 38, 121-128.
248. **Ubukata Y.** (1999). Kinetics and fundamental mechanisms of starch removal by activated sludge : hydrolysis of starch to maltose and maltotriose is the rate-determining step, *Water Sci. Technol.*, 40, 61-68.
249. **Unanue M., Ayo B., Agis M., Slezak D., Herndl G.J. et Iriberrí J.** (1999). Ecto enzymatic activity and uptake of monomers in marine bacterioplankton described by a biphasic kinetic model, *Microb. Ecol.*, 37, 36-48.
250. **Urbain V., Block J.-C. et Manem J.** (1993a). Biofloculation in activated sludge : an analytic approach, *Water Res.*, 27, 829-838.
251. **Urbain V., Pys E., Block J.-C. et Manem J.** (1993b). Composition and activity of activated sludge under starvation conditions, *Environ. Technol.*, 14, 731-740.
252. **Van Ommen Kloeke F. et Geesey G.G.** (1999). Localization and identification of populations of phosphatase-active bacterial cells associated with activated sludge flocs, *Microb. Ecol.*, 38, 201-214.
253. **Venter H., Osthoff G. et Litthauer D.** (1999). Purification and characterization of a metalloprotease from *Chryseobacterium indologenes* Ix9a and determination of the amino acid specificity with electrospray mass spectrometry, *Protein Expression and Purification*, 15, 282-295.
254. **Verheul A., Rombouts F.M. et Abee T.** (1998). Utilization of oligopeptides by *Listeria monocytogenes* Scott A, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1059-1065.
255. **Vetter Y.A. et Deming J.W.** (1999). Growth rates of marines bacterial isolates on particulate organic substrates solubilized by freely released extracellular enzymes, *Microb. Ecol.*, 37, 86-94.
256. **Vetter Y.A., Deming J.W., Jumars P.A. et Krieger-Brockett B.B.** (1998). A predictive model of bacterial foraging by means of freely released extracellular enzymes, *Microb. Ecol.*, 36, 75-92.
257. **Vidal O., Longin R., Prigent-Combaret C., Dorel C., Hooreman M. et Lejeune P.** (1998). Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: Involvement of a new ompR allele that increases curli expression, *J. Bacteriol.*, 180, 9, 2442-2449.
258. **Vives Rego J., Billen G., Fontigny A. et Somville M.** (1985). Free and attached proteolytic activity in water environments, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 21, 245-249.
259. **Vogt M., Flemming H.-C. et Veeman W.S.** (2000). Diffusion in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a pulsed field gradient NMR study, *Journal of Biotechnology*, 77, 1, 137-146.
260. **Vrba J., Simek K., Nedoma J. et Hartman P.** (1993). 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -N-acetylglucosaminide hydrolysis by a high-affinity enzyme; a putative marker of protozoan bacterivory, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3091-3101.

## 9. Références bibliographiques.

---

261. **Wagner M., Rath G., Koops H.-P., Flood J. et Amann R.** (1996). *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants, *Water Sci. and Technol.*, 34, 1-2, 237-244.
262. **Wang J., Huang C.P., Allen H.E., Cha D.K. et Kim D.-W.** (1998). Adsorption characteristics of dye onto sludge particulates, *Journal of Colloid and Interface Science*, 208, 518-528.
263. **Warren R.A.J.** (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides, *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 183-212.
264. **Wetzel R.G.** (1991). Extracellular enzymatic interactions: storage, redistribution and interspecific communication, In: *Microbial enzymes in aquatic environments*, Chróst (Ed.), Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 6-28.
265. **Whiteley C.G., Heron P., Pietschke B., Rose P.D., Tshivhunge S., Van Jaarsveld F.P. et Whittington-Jones K.** (2002). The enzymology of sludge solubilisation utilising sulphate reducing systems: Properties of proteases and phosphatases, *Enzyme and Microb. Technol.*, 31, 4, 419-424.
266. **Whiteley C.G., Burgess J.E., Melamane X., Pietschke B. et Rose P.D.** (2003). The enzymology of sludge solubilisation utilising sulphate-reducing systems: the properties of lipases, *Water Res.*, 37, 289-296.
267. **Wick L.Y., Wattiau P. et Harms H.** (2002). Influence of the growth substrate on the mycolic acid profiles on mycobacteria, *Environ. Microbiol.*, 4, 10, 612-616.
268. **Wicker-Böckelmann U., Wingender J. et Winkler U.K.** (1987). Alginate lyase releases cell-bound lipase from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Zbl. Bakt. Hyg. A*, 266, 379-389.
269. **Wilén B.M. et Balmer P.** (1999). The effect of dissolved oxygen concentration on the structure; size and size distribution of activated sludge flocs, *Water Res.*, 33, 391-400.
270. **Wilén B.M., Nielsen J.L., Keiding K. et Nielsen P.H.** (2000). Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18, 145-156.
271. **Wilén B.-M., Jin B. et Lant P.** (2003). The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties, *Water Res.*, 37, 9, 2127-2139.
272. **Wingender J. et Winkler U.K.** (1984). A novel biological function of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* and its mucoid mutants : stimulation of exolipase, *FEMS Microbiol. Lett.*, 21, 63-69.
273. **Wingender J., Volz S. et Winkler U.K.** (1987). Interaction of extracellular *Pseudomonas* lipase with alginate and its potential use in biotechnology, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 139-145.
274. **Wingender J.** (1990). Interactions of alginate with exoenzymes, In: *Pseudomonas infection and alginates : Biochemistry, genetics and pathology*, Gacesa P. and Russel N.J. 160-180, pp. 160-180.
275. **Wingender J., Jaeger K.-E. et Flemming H.-C.** (1999). Interaction between extracellular polysaccharides and enzymes, In: *Microbial extracellular substances : characterization, structure and function* Wingender J., Neu T. R. and Flemming H.-C. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 231-251.
276. **Wolfaardt G.M., Lawrence J.R., Headley J.V., Robarts R.D. et Caldwell D.E.** (1994). Microbial exopolymers provide a mechanism for bioaccumulation of contaminants, *Microb. Ecol.*, 27, 279-291.
277. **Wolfaardt G.M., Lawrence J.R., Robarts R.D. et Caldwell D.E.** (1995). Bioaccumulation of the herbicide diclofop in extracellular polymers and its utilization by a biofilm community during starvation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 152-158.
278. **Wolfaardt G.M., Lawrence J.R., Robarts R.D. et Caldwell D.E.** (1998). *In situ* characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorination organics, *Microb. Ecol.*, 35, 213-223.
279. **Worm J. et Nybroe O.** (2001). Input of protein to lake water microcosms affects expression of proteolytic enzymes and the dynamics of *Pseudomonas* spp., *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 4955-4962.
280. **Worm J., Jensen L.E., Hansen T.S., Søndergaard M. et Nybroe O.** (2000). Interactions between proteolytic and non proteolytic *Pseudomonas fluorescens* affect protein degradation in a model community, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 32, 103-109.
281. **Wuertz S., Spaeth R., Hinderberger A., Griebe T., Flemming H. et Wilderer P.A.** (2001). A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals, *Water Sci. Technol.*, 43, 25-31.
282. **Yamaguchi S. et Yokoe M.** (2000). A novel protein-deaminating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3337-3343.
283. **Yamaguchi S., Jeenes D.J. et Archer D.B.** (2001). Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*; an enzyme that deaminates glutamyl residues in proteins, *Eur. J. Biochem.*, 268, 1410-1421.
284. **Yuan Z. et Blackall L.L.** (2002). Sludge population optimisation: a new dimension for the control of biological wastewater treatment systems, *Water Res.*, 36, 482-490.
285. **Zhang T. et Fang H.H.P.** (2001). Quantification of extracellular polymeric substances in biofilms by confocal laser scanning microscopy, *Biotech. Letters*, 23, 405-409.
286. **Zita A. et Hermansson M.** (1997a). Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater in situ, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 152, 299-306.
287. **Zita A. et Hermansson M.** (1997b). Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1168-1170.





# ANNEXE 1.

Caractéristiques physico-chimiques des boues activées prélevées à la station d'épuration de Nancy-Maxéville de 1999 à 2001 (t : température ; pH ; k : conductivité ; MS : matières sèches ; MV : matières volatiles ; SVI : sludge volume index ; \* échantillons concentrés).

Boues activées (Nancy-Maxéville)										
n°	date	t	pH	k	MS	MV	MV/MS	SVI		
	<b>1999</b>	(°C)	(20 °C)	(µS/cm)	(g/L)	(g/L)	(%)	(mL/g)		
A9	19-nov	12,0	7,3	1510	<b>2,29</b>	± 0,02	<b>1,68</b>	± 0,01	73	127
A10	26-nov	12,0	7,4	870	<b>2,47</b>	± 0,02	<b>1,9</b>	± 0,02	77	148
A11	1-déc	13,0	7,3	1133	<b>3,07</b>	± 0,00	<b>2,37</b>	± 0,01	77	197
A12	8-déc	11,0	7,2	693	<b>2,36</b>	± 0,03	<b>1,96</b>	± 0,06	83	117

Boues activées (Nancy-Maxéville)										
n°	date	t	pH	k	MS	MV	MV/MS	SVI		
	<b>2000</b>	(°C)	(20 °C)	(µS/cm)	(g/L)	(g/L)	(%)	(mL/g)		
1	10-jan	12,8	6,7	541	<b>2,70</b>	± 0,05	<b>1,81</b>	± 0,02	67	135
2	25-jan	9,0	7,5	752	<b>2,53</b>	± 0,13	<b>1,92</b>	± 0,01	76	188
3	31-jan	nd	7,1	822	<b>2,55</b>	± 0,02	<b>1,92</b>	± 0,02	75	212
4	7-fév	10,0	7,4	732	<b>2,40</b>	± 0,01	<b>1,82</b>	± 0,01	76	167
5	28-fév	11,0	7,4	745	<b>2,52</b>	± 0,02	<b>1,70</b>	± 0,01	68	127
6	7-mars	10,5	7,5	741	<b>2,48</b>	± 0,02	<b>1,57</b>	± 0,00	63	103
7	8-mars	11,0	7,4	714	<b>2,47</b>	± 0,02	<b>1,54</b>	± 0,01	62	109
8	9-mars	11,0	7,4	761	<b>2,25</b>	± 0,10	<b>1,37</b>	± 0,06	61	118
A13	13-mars	12,0	7,2	693	<b>2,77</b>	± 0,07	<b>1,86</b>	± 0,02	67	80
9	14-mars	nd	7,4	798	<b>2,43</b>	± 0,02	<b>1,80</b>	± 0,01	74	103
10	15-mars	11,5	7,5	735	<b>2,44</b>	± 0,04	<b>1,60</b>	± 0,03	66	98
A14	20-mars	12,0	7,3	795	<b>2,15</b>	± 0,07	<b>1,57</b>	± 0,05	73	93
A15	22-mars	12,0	7,5	820	<b>2,28</b>	± 0,01	<b>1,68</b>	± 0,01	74	90
11	28-mars	11,5	7,3	783	<b>2,41</b>	± 0,04	<b>1,78</b>	± 0,03	74	100
A16	5-avr	11,0	7,0	457	<b>1,92</b>	± 0,05	<b>1,52</b>	± 0,10	79	110
12	10-avr	12,0	7,5	877	<b>1,76</b>	± 0,03	<b>1,28</b>	± 0,03	73	125
13	2-mai	15,0	7,6	782	<b>1,18</b>	± 0,03	<b>0,89</b>	± 0,02	75	102
14	4-mai	15,5	7,6	930	<b>1,42</b>	± 0,01	<b>1,07</b>	± 0,01	76	113
15	8-juin	nd	7,0	906	<b>1,59</b>	± 0,02	<b>1,12</b>	± 0,01	70	126
16	19-juin	21,0	7,8	968	<b>1,58</b>	± 0,01	<b>1,18</b>	± 0,01	75	177
17	22-juin	21,0	7,8	968	<b>1,90</b>	± 0,03	<b>1,31</b>	± 0,04	69	137
18	26-juin	18,0	7,0	861	<b>1,45</b>	± 0,02	<b>1,00</b>	± 0,04	69	138
19	3-juil	20,0	7,3	795	<b>1,61</b>	± 0,02	<b>1,18</b>	± 0,04	73	118
20	7-sep	17,5	7,0	543	<b>2,34</b>	± 0,04	<b>1,59</b>	± 0,01	67	109
21	12-sep	19,0	7,1	823	<b>2,23</b>	± 0,07	<b>1,61</b>	± 0,03	73	116
22	26-sep	18,0	7,3	854	<b>2,04</b>	± 0,03	<b>1,49</b>	± 0,01	73	113
23	28-sep	18,5	7,3	803	<b>2,24</b>	± 0,02	<b>1,65</b>	± 0,02	74	107
24	13-oct	16,0	7,4	845	<b>2,26</b>	± 0,02	<b>1,54</b>	± 0,02	68	110
25	16-oct	16,0	7,4	575	<b>2,78</b>	± 0,03	<b>1,94</b>	± 0,02	70	122
26	23-oct	16,0	7,5	944	<b>2,01</b>	± 0,02	<b>1,44</b>	± 0,03	73	117
27	30-oct	15,0	7,4	829	<b>1,98</b>	± 0,03	<b>1,43</b>	± 0,05	72	126
28	22-nov	12,0	7,3	675	<b>2,40</b>	± 0,00	<b>1,56</b>	± 0,01	65	142
29	23-nov	11,5	7,5	975	<b>2,57</b>	± 0,06	<b>1,67</b>	± 0,05	65	129
30	28-nov	12,0	7,4	nd	<b>2,61</b>	± 0,01	<b>1,65</b>	± 0,02	63	115

## ANNEXE 1 (suite).

Caractéristiques physico-chimiques des boues activées prélevées à la station d'épuration de Nancy-Maxéville en 2001 et à la station de Toul de 2002 à 2003 (t : température ; pH ; k : conductivité ; MS : matières sèches ; MV : matières volatiles ; SVI : sludge volume index ; \* échantillons concentrés).

Boues activées (Nancy-Maxéville)										
n°	date	t	pH	k	MS	MV	MV/MS	SVI		
	2001	(°C)	(20 °C)	(µS/cm)	(g/L)	(g/L)	(%)	(mL/g)		
31	27-fév	10,5	7,88	936	<b>1,53</b>	± 0,04	<b>1,05</b>	± 0,00	69	72
32	26-mars	11	nd	nd	<b>1,86</b>	nd	<b>1,04</b>	nd	56	nd
33	10-avr	12	nd	nd	<b>1,78</b>	nd	<b>1,41</b>	nd	79	91
34	10-mai	nd	nd	nd	<b>2,72</b>	± 0,08	<b>1,65</b>	± 0,01	61	71
35	3-juil	24	nd	nd	<b>2,50</b>	± 0,03	<b>1,60</b>	± 0,04	64	203
36	8-oct	nd	nd	nd	<b>2,91</b>	± 0,03	<b>1,85</b>	± 0,03	64	nd
37	13-nov	14	7,44	638	<b>4,74</b>	± 0,03	<b>3,29</b>	± 0,03	69	112
38*	3-déc	nd	nd	nd	<b>10,62</b>	± 0,06	<b>7,35</b>	± 0,04	69	nd

Boues activées (Toul)										
n°	date	t	pH	k	MS	MV	MV/MS	SVI		
	2002	(°C)	(20 °C)	(µS/cm)	(g/L)	(g/L)	(%)	(mL/g)		
39*	7-jan	nd	nd	nd	<b>6,23</b>	± 0,07	<b>3,97</b>	± 0,05	64	nd
40*	14-jan	nd	nd	nd	<b>13,18</b>	± 0,31	<b>9,08</b>	± 0,25	69	nd
41*	4-mars	10	nd	nd	<b>7,46</b>	± 0,02	<b>4,05</b>	± 0,02	54	nd
42	20-mars	nd	nd	nd	<b>2,41</b>	± 0,06	<b>1,31</b>	± 0,02	54	nd
43	26-mars	nd	nd	nd	<b>2,53</b>	± 0,02	<b>1,25</b>	± 0,03	49	nd
44*	10-avr	nd	nd	nd	<b>8,26</b>	± 0,06	<b>5,22</b>	± 0,05	63	nd
45	30-avr	14	nd	nd	<b>3,15</b>	± 0,10	<b>1,90</b>	± 0,08	60	nd
46	25-juin	nd	nd	nd	<b>3,33</b>	± 0,04	<b>1,75</b>	± 0,11	53	nd
47	3-juil	nd	7,4	729	<b>3,25</b>	± 0,05	<b>1,92</b>	± 0,04	59	nd
48	9-sep	21	7,42	609	<b>3,60</b>	± 0,09	<b>1,96</b>	± 0,04	54	222
49*	26-sep	nd	nd	nd	<b>7,44</b>	nd	<b>5,02</b>	nd	67	nd

Boues activées (Toul)										
n°	date	t	pH	k	MS	MV	MV/MS	SVI		
	2003	(°C)	(20 °C)	(µS/cm)	(g/L)	(g/L)	(%)	(mL/g)		
50	16-mai	nd	nd	nd	<b>1,17</b>	± 0,04	<b>0,41</b>	± 0,05	35	197
51	20-mai	nd	nd	nd	<b>1,86</b>	± 0,05	<b>0,59</b>	± 0,16	32	215
52	27-mai	nd	nd	nd	<b>1,85</b>	± 0,01	<b>0,60</b>	nd	33	nd
53	3-juin	nd	nd	nd	<b>1,93</b>	± 0,00	<b>0,74</b>	± 0,12	38	nd
54	17-juin	nd	nd	nd	<b>1,59</b>	± 0,14	<b>0,70</b>	± 0,16	44	113
55	19-juin	nd	nd	nd	<b>1,53</b>	± 0,04	<b>0,64</b>	± 0,13	42	124
56	10-juil	nd	nd	nd	<b>1,58</b>	nd	<b>0,71</b>	nd	45	nd
57	17-juil	nd	nd	nd	<b>1,36</b>	nd	<b>0,55</b>	nd	41	nd
58	2-aoû	nd	nd	nd	<b>1,45</b>	± 0,03	<b>0,43</b>	± 0,01	30	nd
59	5-aoû	nd	nd	nd	<b>2,10</b>	nd	<b>0,98</b>	nd	47	nd
60	8-aoû	nd	nd	nd	<b>1,13</b>	nd	<b>0,38</b>	nd	34	nd
61	13-aoû	nd	nd	nd	<b>1,26</b>	nd	<b>0,42</b>	nd	33	nd
62	19-aoû	nd	nd	nd	<b>1,19</b>	nd	<b>0,40</b>	nd	33	nd
63	22-aoû	nd	nd	nd	<b>1,25</b>	nd	<b>0,36</b>	nd	29	nd

## ANNEXE 2.

Composition chimique exprimés en mg L<sup>-1</sup> en protéines, substances humiques, polysaccharides et acides nucléiques des EPS extraits des boues activées prélevés à la station d'épuration de Nancy-Maxéville de 1999 à 2000 (MV : matières volatiles).

		EPS (Boues activées Nancy-Maxéville)					
n°	date	MV (g/L)	Protéines		Ac. Nucléiques (mg/L)		
			(mg/L)	(mg/L)			
<b>1999</b>							
A9	19-nov	nd	nd	114,3 ± 3,0	17,9 ± 2,3	34,6 ± 1,8	21,5 ± 0,7
A10	26-nov	nd	nd	142,8 ± 3,7	26,9 ± 6,2	69,2 ± 1,2	36,3 ± 0,5
A11	1-déc	nd	nd	191,3 ± 4,0	42,7 ± 0,9	70,3 ± 9,2	44,5 ± 0,9
A12	8-déc	nd	nd	128,1 ± 6,6	27,8 ± 1,7	45,5 ± 1,2	29,5 ± 0,5
<b>2000</b>							
EPS (Boues activées Nancy-Maxéville)							
n°	date	MV (g/L)	Protéines		Subst. humique Polysaccharide (mg/L)	Ac. Nucléiques (mg/L)	
			(mg/L)	(mg/L)			
1	10-jan	nd	188,1 ± 26,1	nd	nd	nd	nd
2	25-jan	nd	158,7 ± 8,3	nd	nd	nd	nd
3	31-jan	nd	147,4 ± 4,1	nd	nd	nd	nd
4	7-fév	nd	169,3 ± 6,9	nd	nd	nd	nd
5	28-fév	nd	161,1 ± 2,3	nd	nd	nd	nd
A13	13-mars	nd	nd	119,9 ± 1,7	9,4 ± 0,2	72,0 ± 0,6	26,6 ± 0,3
9	14-mars	nd	147,5 ± 0,5	nd	nd	nd	nd
10	15-mars	nd	134,2 ± 1,2	nd	nd	nd	nd
A14	20-mars	nd	nd	106,2 ± 0,4	13,1 ± 0,5	40,2 ± 2,2	23,2 ± 1,7
A15	22-mars	nd	nd	70,5 ± 1,4	5,3 ± 0,1	39,4 ± 0,9	27,4 ± 1,1
A16	5-avr	nd	nd	74,9 ± 2,7	10,5 ± 0,4	54,7 ± 0,6	18,2 ± 0,8
12	10-avr	nd	199,8 ± 19,6	87,7 ± 0,8	84,5 ± 0,8	29,7 ± 4,4	26,60 ± 0,3
13	2-mai	nd	83,1 ± 0,9	57,8 ± 1,2	19,0 ± 1,2	32,7 ± 0,8	nd
14	4-mai	nd	119,2 ± 2,9	91,7 ± 1,2	18,9 ± 1,2	40,4 ± 1,6	nd
15	8-juin	nd	162,2 ± 3,0	147,6 ± 1,2	8,1 ± 1,2	43,0 ± 4,3	nd
18	26-juin	nd	82,6 ± 1,0	72,6 ± 0,9	6,3 ± 0,1	28,2 ± 0,3	nd
19	3-juil	nd	42,1 ± 0,3	32,2 ± 0,3	7,3 ± 0,1	14,4 ± 0,3	nd
20	7-sep	0,20 ± 0,02	nd	89,6 ± 0,6	3,9 ± 0,0	22,5 ± 1,9	nd
21	12-sep	0,22 ± 0,01	nd	89,6 ± 0,7	6,4 ± 0,1	17,9 ± 1,5	nd
22	26-sep	0,25 ± 0,02	nd	102,35 ± 0,9	5,1 ± 0,1	22,2 ± 0,7	nd
23	28-sep	0,27 ± 0,03	nd	110,62 ± 0,4	7,3 ± 0,1	23,5 ± 2,9	nd
24	13-oct	0,21 ± 0,02	nd	75,94 ± 0,9	4,3 ± 0,2	24,5 ± 1,7	nd
25	16-oct	0,24 ± 0,02	nd	119,43 ± 1,3	17,6 ± 0,0	31,4 ± 0,5	nd
26	23-oct	0,23 ± 0,01	nd	104,15 ± 1,4	12,8 ± 0,5	26,2 ± 1,1	nd
27	30-oct	0,17 ± 0,01	nd	93,37 ± 0,2	11,4 ± 0,3	23,4 ± 2,1	nd
29	23-nov	0,16 ± 0,03	nd	89,59 ± 9,5	5,6 ± 0,8	26,9 ± 2,1	nd
30	28-nov	0,16 ± 0,06	nd	71,44 ± 0,3	2,8 ± 0,0	26,4 ± 0,6	nd

## ANNEXE 2 (suite).

Composition chimique exprimés en mg L<sup>-1</sup> en protéines, substances humiques, polysaccharides et acides nucléiques des EPS extraits des boues activées prélevés à la station d'épuration de Nancy-Maxéville en 2001 et la station de Toul en 2002 (MV : matières volatiles).

EPS (Boues activées Nancy-Maxéville)										
n°	date	MV (g/L)	Protéines (mg/L)	Protéines (mg/L)	Subst. humique (mg/L)	Polysaccharide (mg/L)	Ac. Nucléique (mg/L)			
			(Bradforêt al., 1971)	(Frølundet al., 1995)	(Frølundet al., 1995)	(Duboiset al., 1995)	(Deriazet al., 1949)			
<b>2001</b>										
32	26-mars	0,20	nd	nd	17,6 ± 2,1	85,0 ± 7,0	10,8 ± 0,8	10,8	± 0,8	10,8 ± 0,8
33	10-avr	0,29	nd	nd	32,8 ± 1,1	8,9 ± 0,5	18,1 ± 0,1	18,1	± 0,1	18,1 ± 0,1
34	10-mai	0,39 ± 0,01	nd	nd	81,8 ± 5,1	139,9 ± 5,4	25,1 ± 1,5	25,1	± 1,5	25,1 ± 1,5
35	3-juil	0,25 ± 0,0	nd	nd	79,5 ± 6,9	20,7 ± 2,1	24,0 ± 0,7	24,0	± 0,7	24,0 ± 0,7
36	8-oct	nd	nd	nd	92,1 ± 1,4	nd	20,5 ± 1,1	14,3	± 0,5	14,3 ± 0,5
37	13-nov	0,32 ± 0,02	nd	nd	101,0 ± 0,9	87,1 ± 0,8	nd	nd	nd	nd
38*	3-déc	0,88 ± 0,02	130,0 ± 5,7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	188,6 ± 1,9
<b>EPS (Boues activées Toul)</b>										
n°	date	MV (g/L)	Protéines (mg/L)	Protéines (mg/L)	Subst. humique (mg/L)	Polysaccharide (mg/L)	Ac. Nucléique (mg/L)			
			(Bradforêt al., 1971)	(Frølundet al., 1995)	(Frølundet al., 1995)	(Duboiset al., 1995)	(Deriazet al., 1949)			
<b>2002</b>										
39*	7-jan	0,36 ± 0,1	63,5 ± 4,7	nd	nd	nd	54,7 ± 5,8	123,5	± 12,7	123,5 ± 12,7
40*	14-jan	1,4 ± 0,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
41*	4-mars	nd	51,8 ± 0,7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
42	20-mars	nd	14,9 ± 2,3	60,6 ± 3,2	17,2 ± 1,1	17,1 ± 1,6	nd	nd	nd	nd
43	26-mars	0,13	nd	45,8 ± 1,6	21,2 ± 1,5	32,5 ± 4,7	32,55 ± 4,7	32,55	± 4,7	32,55 ± 4,7
44*	10-avr	nd	79,6 ± 2,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
45	30-avr	nd	nd	72,5 ± 1,1	34,7 ± 0,1	44,4 ± 0,1	31,7 ± 0,6	31,7	± 0,6	31,7 ± 0,6
46	25-juin	0,46	nd	103,2 ± 2,5	40,3 ± 0,7	21,3 ± 2,6	31,8 ± 0,5	31,8	± 0,5	31,8 ± 0,5
47	3-juil	0,34 ± 0,0	nd	75,6 ± 7,1	36,0 ± 1,7	36,4 ± 1,9	52,8 ± 0,4	52,8	± 0,4	52,8 ± 0,4
48	9-sep	0,55 ± 0,1	nd	138,7 ± 2,7	42,3 ± 1,0	32,1 ± 0,7	47,1 ± 1,6	47,1	± 1,6	47,1 ± 1,6
49*	26-sep	0,5	nd	175,9 ± 2,3	157,1 ± 0,8	67,0 ± 5,0	310,5 ± 25,0	310,5	± 25,0	310,5 ± 25,0

# ANNEXE 2 (suite).

Composition chimique exprimés en  $\text{mg g}^{-1}$  MV<sub>EPS</sub> en protéines, substances humiques, polysaccharides et acides nucléiques des EPS extraits des boues activées prélevés à la station d'épuration de Nancy-Maxéville de 1999 à 2000 (MV : matières volatiles).

n°	date	MV (g/L)	EPS (Boues activées Nancy-Maxéville)			
			Protéines (Lowry et al., 1951) (mg/g MVEps) <sup>1</sup>	Protéines (Frølund et al., 1995) (mg/g MVEps) <sup>2</sup>	Subst. humique (Frølund et al., 1995) (mg/g MVEps)	Polysaccharide: Ac. Nucléique (Dubois et al., 1956) (mg/g MVEps)
A9	19-nov	nd	nd	nd	nd	nd
A10	26-nov	nd	nd	nd	nd	nd
A11	1-déc	nd	nd	nd	nd	nd
A12	8-déc	nd	nd	nd	nd	nd

n°	date	MV (g/L)	EPS (Boues activées Nancy-Maxéville)			
			Protéines (Lowry et al., 1951) (mg/g MVEps) <sup>1</sup>	Protéines (Frølund et al., 1995) (mg/g MVEps) <sup>2</sup>	Subst. humique (Frølund et al., 1995) (mg/g MVEps)	Polysaccharide: Ac. Nucléique (Dubois et al., 1956) (mg/g MVEps)
<b>2000</b>						
1	10-jan	nd	nd	nd	nd	nd
2	25-jan	nd	nd	nd	nd	nd
3	31-jan	nd	nd	nd	nd	nd
4	7-fév	nd	nd	nd	nd	nd
5	28-fév	nd	nd	nd	nd	nd
A13	13-mars	nd	nd	nd	nd	nd
9	14-mars	nd	nd	nd	nd	nd
10	15-mars	nd	nd	nd	nd	nd
A14	20-mars	nd	nd	nd	nd	nd
A15	22-mars	nd	nd	nd	nd	nd
A16	5-avr	nd	nd	nd	nd	nd
12	10-avr	nd	nd	nd	nd	nd
13	2-mai	nd	nd	nd	nd	nd
14	4-mai	nd	nd	nd	nd	nd
15	8-juin	nd	nd	nd	nd	nd
18	26-juin	nd	nd	nd	nd	nd
19	3-juil	nd	nd	nd	nd	nd
20	7-sep	0,20 ± 0,02	nd	454,8 ± 3,0	19,8 ± 0,2	114,4 ± 9,7
21	12-sep	0,22 ± 0,01	nd	401,8 ± 3,1	28,5 ± 0,4	80,3 ± 6,8
22	26-sep	0,25 ± 0,02	nd	403,0 ± 3,7	20,0 ± 0,4	87,3 ± 2,8
23	28-sep	0,27 ± 0,03	nd	414,3 ± 1,5	27,4 ± 0,3	87,8 ± 10,9
24	13-oct	0,21 ± 0,02	nd	358,2 ± 4,2	20,5 ± 0,8	115,6 ± 7,9
25	16-oct	0,24 ± 0,02	nd	491,5 ± 5,2	72,6 ± 0,0	129,1 ± 2,2
26	23-oct	0,23 ± 0,01	nd	456,8 ± 5,9	56,1 ± 2,0	114,7 ± 5,0
27	30-oct	0,17 ± 0,01	nd	546,0 ± 1,1	66,4 ± 1,6	136,6 ± 12,6
29	23-nov	0,16 ± 0,03	nd	553,0 ± 58,6	34,8 ± 5,2	165,9 ± 12,8
30	28-nov	0,16 ± 0,06	nd	448,4 ± 2,1	17,5 ± 0,2	165,5 ± 3,6

## ANNEXE 2 (suite).

Composition chimique exprimés en mg g<sup>-1</sup> MV<sub>EPS</sub> en protéines, substances humiques, polysaccharides et acides nucléiques des EPS extraits des boues activées prélevés à la station d'épuration de Nancy-Maxéville en 2001 et la station de Toul en 2002 (MV : matières volatiles).

EPS (Boues activées Nancy-Maxéville)									
n°	date	MV (g/L)	Protéines (mg/g MVeps) <sup>3</sup>	Protéines (mg/g MVeps) <sup>2</sup>	Subst. humique (mg/g MVeps)	Polysaccharide (mg/g MVeps)	Ac. Nucléique (mg/g MVeps)		
(Bradford et al., 1976 (Frølund et al., 1995)(Frølund et al., 1991 (Dubois et al., 1956)(Deriaz et al., 1941									
<b>2001</b>									
32	26-mars	0,20	nd	88,0 ± 10,5	425,0 ± 35,0	54,0 ± 4,0	54,0 ± 4,0	54,0 ± 4,0	
33	10-avr	0,29	nd	112,0 ± 3,6	30,3 ± 1,7	61,8 ± 0,5	28,9 ± 1,9	28,9 ± 1,9	
34	10-mai	0,39 ± 0,01	nd	208,1 ± 13,0	356,0 ± 13,7	63,9 ± 3,8	42,9 ± 0,7	42,9 ± 0,7	
35	3-juil	0,25 ± 0,01	nd	318,1 ± 27,7	82,8 ± 8,4	95,8 ± 2,7	72,0 ± 2,0	72,0 ± 2,0	
36	8-oct	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
37	13-nov	0,32 ± 0,02	nd	315,5 ± 2,8	272,0 ± 2,4	nd	nd	nd	nd
38*	3-déc	0,88 ± 0,02	147,7 ± 6,5	nd	nd	nd	nd	214,3 ± 2,2	
EPS (Boues activées Toul)									
n°	date	MV (g/L)	Protéines (mg/g MVeps) <sup>3</sup>	Protéines (mg/g MVeps) <sup>2</sup>	Subst. humique (mg/g MVeps)	Polysaccharide (mg/g MVeps)	Ac. Nucléique (mg/g MVeps)		
(Bradford et al., 1976 (Frølund et al., 1995)(Frølund et al., 1991 (Dubois et al., 1956)(Deriaz et al., 1941									
<b>2002</b>									
39*	7-jan	0,4 ± 0,1	176,4 ± 13,1	nd	nd	151,9 ± 16,11	343,1 ± 35,3	nd	nd
40*	14-jan	1,4 ± 0,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
41*	4-mars	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
42	20-mars	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
43	26-mars	0,13	nd	344,4 ± 12,0	159,8 ± 11,0	244,7 ± 35,67	244,7 ± 35,7	244,7 ± 35,7	
44*	10-avr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
45	30-avr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
46	25-juin	0,46	nd	224,2 ± 5,4	87,6 ± 1,5	46,3 ± 5,7	69,1 ± 1,2	69,1 ± 1,2	
47	3-juil	0,34 ± 0,0	nd	222,3 ± 20,9	106,0 ± 5,1	107,0 ± 5,7	155,3 ± 1,3	155,3 ± 1,3	
48	9-sep	0,55 ± 0,1	nd	252,1 ± 4,8	76,9 ± 1,8	58,3 ± 1,3	85,6 ± 2,9	85,6 ± 2,9	
49*	26-sep	0,50	nd	351,8 ± 4,7	314,2 ± 1,6	134,0 ± 10,0	621,0 ± 50,0	621,0 ± 50,0	

## ANNEXE 2 (suite).

Composition chimique exprimés en  $\text{mg g}^{-1}$  MV<sub>boues</sub> en protéines, substances humiques, polysaccharides et acides nucléiques des EPS extraits des boues activées prélevés à la station d'épuration de Nancy-Maxéville de 1999 à 2000 (MV : matières volatiles).

n°	date	MV (g/L)	EPS (Boues activées Nancy-Maxéville)				
			Protéines (mg/g MV boues)	Protéines (mg/g MV boues)	Subst. humique: Polysaccharide (mg/g MV boues)	Ac. Nucléique (mg/g MV boues)	
<b>1999</b>							
A9	19-nov	nd	nd	68,0 ± 1,8	10,6 ± 1,4	20,6 ± 1,1	12,8 ± 0,4
A10	26-nov	nd	nd	75,1 ± 2,0	14,2 ± 3,3	36,4 ± 0,7	19,1 ± 0,3
A11	1-déc	nd	nd	80,7 ± 1,7	18,0 ± 0,4	29,7 ± 3,9	18,8 ± 0,4
A12	8-déc	nd	nd	65,4 ± 3,4	14,2 ± 0,8	23,2 ± 0,6	15,1 ± 0,2
<b>2000</b>							
<b>1995 (Frolund et al., 1995)</b>							
n°	date	MV (g/L)	Protéines (mg/g MV boues)	Protéines (mg/g MV boues)	Subst. humique: Polysaccharide (mg/g MV boues)	Ac. Nucléique (mg/g MV boues)	
1	10-jan	nd	103,9 ± 14,4	nd	nd	nd	
2	25-jan	nd	82,7 ± 4,3	nd	nd	nd	
3	31-jan	nd	76,8 ± 2,1	nd	nd	nd	
4	7-fév	nd	93,0 ± 3,8	nd	nd	nd	
5	28-fév	nd	94,8 ± 1,3	nd	nd	nd	
A13	13-mars	nd	nd	64,5 ± 0,9	5,1 ± 0,1	38,7 ± 0,3	
9	14-mars	nd	81,9 ± 0,3	nd	nd	nd	
10	15-mars	nd	83,9 ± 0,8	nd	nd	nd	
A14	20-mars	nd	nd	67,6 ± 0,3	8,3 ± 0,3	25,6 ± 1,37	
A15	22-mars	nd	nd	41,9 ± 0,8	3,2 ± 0,1	23,5 ± 0,54	
A16	5-avr	nd	nd	49,3 ± 1,8	6,9 ± 0,3	36,0 ± 0,38	
12	10-avr	nd	156,1 ± 15,3	68,5 ± 0,6	66,0 ± 0,6	23,2 ± 3,4	
13	2-mai	nd	93,4 ± 1,0	65,0 ± 1,3	21,3 ± 1,3	36,8 ± 0,9	
14	4-mai	nd	111,4 ± 2,7	85,7 ± 1,1	17,6 ± 1,1	37,8 ± 1,5	
15	8-juin	nd	144,8 ± 2,7	131,8 ± 1,1	7,2 ± 1,1	38,4 ± 3,8	
18	26-juin	nd	82,6 ± 1,0	72,6 ± 0,9	6,3 ± 0,1	28,2 ± 0,3	
19	3-juil	nd	35,7 ± 0,3	27,3 ± 0,2	6,2 ± 0,1	12,2 ± 0,2	
20	7-sep	0,20 ± 0,02	nd	56,4 ± 0,4	2,5 ± 0,0	14,2 ± 1,2	
21	12-sep	0,22 ± 0,01	nd	55,8 ± 0,4	4,0 ± 0,0	11,1 ± 0,9	
22	26-sep	0,25 ± 0,02	nd	68,8 ± 0,6	3,4 ± 0,1	14,9 ± 0,5	
23	28-sep	0,27 ± 0,03	nd	66,9 ± 0,2	4,4 ± 0,0	14,2 ± 1,8	
24	13-oct	0,21 ± 0,02	nd	49,3 ± 0,6	2,8 ± 0,1	15,9 ± 1,1	
25	16-oct	0,24 ± 0,02	nd	61,7 ± 0,7	9,1 ± 0,0	16,2 ± 0,3	
26	23-oct	0,23 ± 0,01	nd	72,4 ± 0,9	8,9 ± 0,3	18,2 ± 0,8	
27	30-oct	0,17 ± 0,01	nd	65,5 ± 0,1	8,0 ± 0,2	16,4 ± 1,5	
29	23-nov	0,16 ± 0,03	nd	53,7 ± 5,7	3,4 ± 0,5	16,1 ± 1,2	
30	28-nov	0,16 ± 0,06	nd	43,3 ± 0,2	1,7 ± 0,0	16,0 ± 0,4	

## ANNEXE 2 (suite).

Composition chimique exprimés en  $\text{mg g}^{-1}$  MV<sub>boues</sub> en protéines, substances humiques, polysaccharides et acides nucléiques des EPS extraits des boues activées prélevés à la station d'épuration de Nancy-Maxéville en 2001 et la station de Toul en 2002 (MV : matières volatiles).

EPS (Boues activées Nancy-Maxéville)									
n°	date	MV	Protéines (Bradforøt al., 1971 (mg/g MV boues)	Protéines (Frølundøt al., 1995 (mg/g MV boues)	Subst. humiques (Frølundøt al., 1995 (mg/g MV boues)	Polysaccharides (Duboisøt al., 1956 (mg/g MV boues)	Ac. Nucléique (Deriazøt al., 1945 (mg/g MV boues)		
<b>2001</b>									
32	26-mars	0,20	nd	16,9 ± 2,0	81,7 ± 6,7	10,4 ± 0,8	10,4 ± 0,8	10,4 ± 0,8	10,4 ± 0,8
33	10-avr	0,29	nd	23,4 ± 0,8	6,3 ± 0,4	12,9 ± 0,1	12,9 ± 0,1	12,9 ± 0,1	12,9 ± 0,1
34	10-mai	0,39 ± 0,01	nd	49,6 ± 3,1	84,8 ± 3,3	15,2 ± 0,9	15,2 ± 0,9	15,2 ± 0,9	15,2 ± 0,9
35	3-juil	0,25 ± 0,01	nd	49,7 ± 4,3	12,9 ± 1,3	15,0 ± 0,4	15,0 ± 0,4	15,0 ± 0,4	15,0 ± 0,4
36	8-oct	nd	nd	49,8 ± 0,7	nd	11,1 ± 0,6	11,1 ± 0,6	7,7 ± 0,3	7,7 ± 0,3
37	13-nov	0,32 ± 0,02	nd	30,7 ± 0,3	26,5 ± 0,2	nd	nd	nd	nd
38*	3-déc	0,88 ± 0,02	17,7 ± 0,8	nd	nd	nd	nd	nd	25,7 ± 0,3
EPS (Boues activées Toul)									
n°	date	MV	Protéines (Bradforøt al., 1971 (mg/g MV boues)	Protéines (Frølundøt al., 1995 (mg/g MV boues)	Subst. humiques (Frølundøt al., 1995 (mg/g MV boues)	Polysaccharides (Duboisøt al., 1956 (mg/g MV boues)	Ac. Nucléique (Deriazøt al., 1945 (mg/g MV boues)		
<b>2002</b>									
39*	7-jan	0,36 ± 0,1	16,0 ± 1,2	nd	nd	13,8 ± 1,5	31,1 ± 3,2	31,1 ± 3,2	31,1 ± 3,2
40*	14-jan	1,36 ± 0,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
41*	4-mars	nd	12,8 ± 0,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
42	20-mars	nd	11 ± 1,8	46,3 ± 2,4	13,1 ± 0,8	13,1 ± 1,2	13,1 ± 1,2	13,1 ± 1,2	13,1 ± 1,2
43	26-mars	0,13	nd	36,6 ± 1,3	17,0 ± 1,2	26,0 ± 3,8	26,0 ± 3,8	26,0 ± 3,8	26,0 ± 3,8
44*	10-avr	nd	15,2 ± 0,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
45	30-avr	nd	nd	38,1 ± 0,6	18,3 ± 0,0	23,4 ± 0,0	23,4 ± 0,0	16,7 ± 0,3	16,7 ± 0,3
46	25-juin	0,46	nd	58,9 ± 1,4	23,0 ± 0,4	12,2 ± 1,5	12,2 ± 1,5	18,2 ± 0,3	18,2 ± 0,3
47	3-juil	0,34 ± 0,0	nd	39,4 ± 3,7	18,8 ± 0,9	19,0 ± 1,0	19,0 ± 1,0	27,5 ± 0,2	27,5 ± 0,2
48	9-sep	0,55 ± 0,1	nd	70,8 ± 1,4	21,6 ± 0,5	16,4 ± 0,4	16,4 ± 0,4	24,0 ± 0,8	24,0 ± 0,8
49*	26-sep	0,50	nd	35,0 ± 0,5	31,3 ± 0,2	13,3 ± 1,0	13,3 ± 1,0	61,9 ± 5,0	61,9 ± 5,0



# ANNEXE 3.

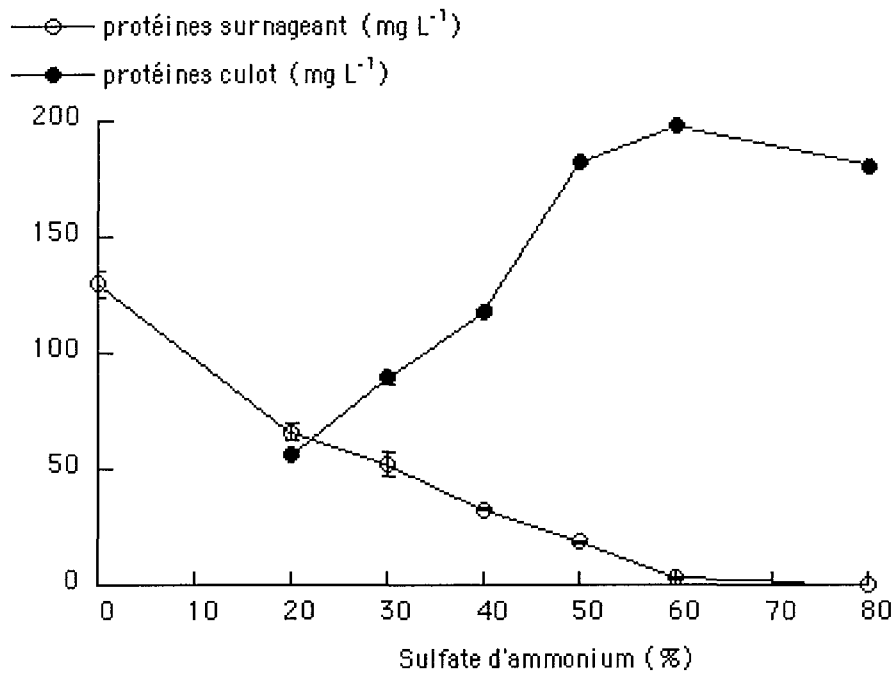
Activités enzymatiques hydrolytiques associées aux EPS des boues activées prélevées à la station d'épuration de Nancy-Maxéville de 1999 à 2001 et à la station de Toul en 2002.

Activités enzymatiques hydrolytiques associées aux EPS (Boues activées Nancy-Maxéville)									
n°	date	Protéase abs/min/mg protéines	Leu-aminopeptidase nmol/min/mg protéine	α-glucosidase nmol/min/mg protéines	C4-estérase nmol/min/mg protéines	β-glucosidase nmol/min/mg protéines	α-galactosidase nmol/min/mg protéines	α-amylase nmol/min/mg protéines	
1999									
A9	19-nov	0,187 ± nd	34,0 ± nd	nd	0,112 ± nd	0,720 ± nd	0,60 ± nd	nd	
A10	26-nov	0,023 ± nd	38,1 ± nd	nd	0,253 ± nd	1,040 ± nd	0,70 ± nd	nd	
A11	1-déc	0,384 ± nd	14,3 ± nd	nd	0,103 ± nd	0,651 ± nd	2,42 ± nd	nd	
A12	8-déc	0,029 ± nd	22,3 ± nd	nd	0,146 ± nd	0,483 ± nd	0,44 ± nd	nd	
2000									
A13	14-mars	0,191 ± 0,002	23,6 ± 0,25	nd	0,087 ± 0,002	0,182 ± 0,02	0,69 ± nd	nd	
A14	20-mars	0,088 ± 0,0005	23,0 ± nd	nd	0,185 ± 0,002	0,484 ± nd	0,56 ± nd	nd	
A15	22-mars	0,689 ± 0,033	51,5 ± 1,05	nd	0,443 ± 0,100	0,874 ± nd	0,78 ± nd	nd	
A16	5-avr	0,103 ± 0,003	20,4 ± nd	nd	0,770 ± nd	nd	nd	nd	
12	10-avr	0,020 ± 0,001	31,3 ± 1,17	1,75 ± 0,22	nd	nd	nd	2,10 ± 0,22	
13	2-mai	0,022 ± 0,002	37,3 ± 1,78	2,47 ± 0,08	nd	nd	nd	4,35 ± 0,16	
14	4-mai	nd	27,3 ± 0,86	2,36 ± 0,10	nd	nd	nd	3,28 ± 0,09	
15	8-juin	0,012 ± 0,0004	15,4 ± 0,78	nd	nd	nd	nd	nd	
18	26-juin	0,022 ± 0,0003	22,9 ± 0,56	nd	nd	nd	nd	nd	
19	3-juil	0,032 ± 0,003	23,4 ± 0,87	nd	nd	nd	nd	nd	
2001									
32	26-mars	0,038 ± 0,0003	155,7 ± 3,20	6,20 ± 0,20	nd	nd	nd	nd	
33	9-avr	0,025 ± 0,004	75,9 ± 1,00	8,00 ± 0,30	nd	nd	nd	nd	
34	10-mai	0,016 ± 0,001	38,9 ± 0,60	2,30 ± 0,10	nd	nd	nd	nd	
37	14-nov	0,018 ± 0,0005	39,2 ± 0,07	4,01 ± 0,09	nd	nd	nd	nd	
Activités enzymatiques hydrolytiques associées aux EPS (Boues activées Toul)									
n°	date	Protéase abs/min/mg protéines	Leu-aminopeptidase μmol/min/mg protéines	α-glucosidase μmol/min/mg protéines	C4-estérase μmol/min/mg protéines	β-glucosidase μmol/min/mg protéines	α-galactosidase μmol/min/mg protéines	α-amylase μmol/min/mg protéines	
2002									
42	20-mars	nd	77,0 ± 1,41	nd	nd	nd	nd	nd	
43	26-mars	0,011 ± 0,0004	24,5 ± 0,54	4,49 ± 0,16	nd	nd	nd	nd	
45	30-avr	0,010 ± 0,003	11,3 ± 0,92	2,72 ± 0,42	nd	nd	nd	nd	
46	25-juin	0,015 ± nd	13,8 ± nd	1,45 ± nd	nd	nd	nd	nd	
47	3-juil	0,012 ± nd	27,6 ± nd	2,90 ± nd	nd	nd	nd	nd	
48	9-sep	0,019 ± nd	13,6 ± nd	2,20 ± nd	nd	nd	nd	nd	

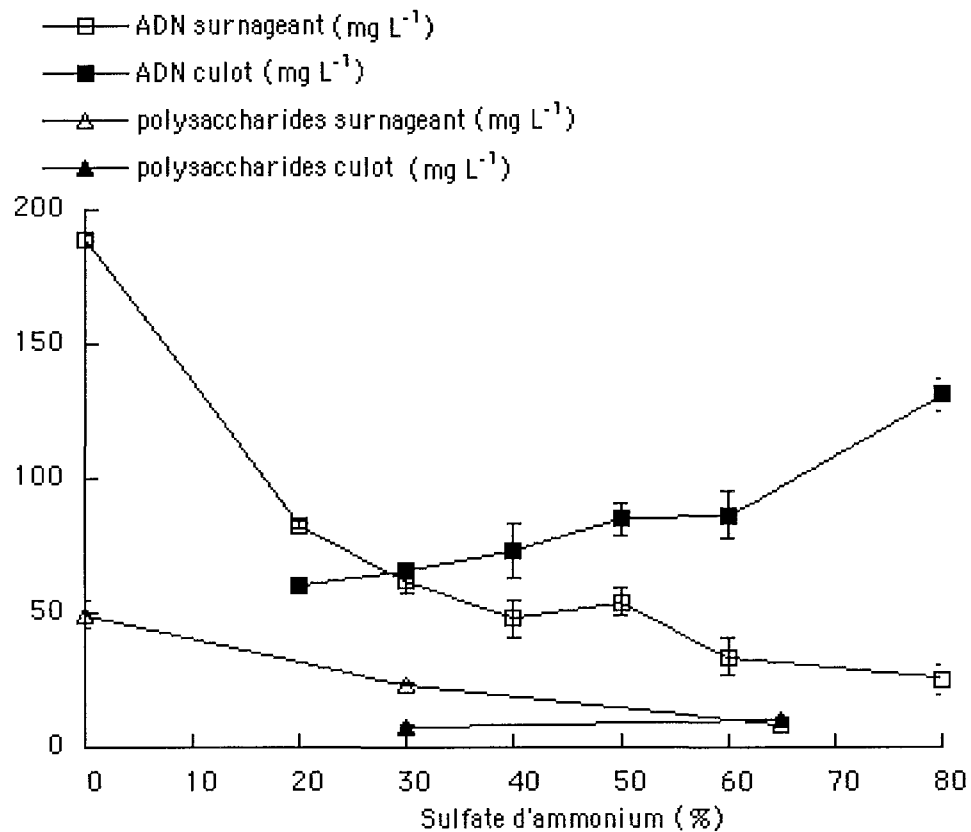
## ANNEXE 4.

Concentration de protéines (A), de polysaccharides et d'ADN (B) dans les culots et les surnageants après centrifugation à 5000 x g à 4 °C pendant 30 min des extraits d'EPS (100 mL) sous agitation à 200 tr.min<sup>-1</sup> à 4 °C soumis pendant 1h à des concentrations croissantes en sulfate d'ammonium.

A)



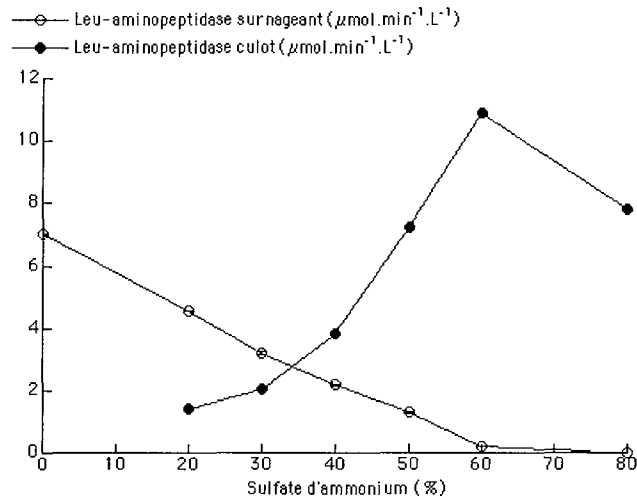
B)



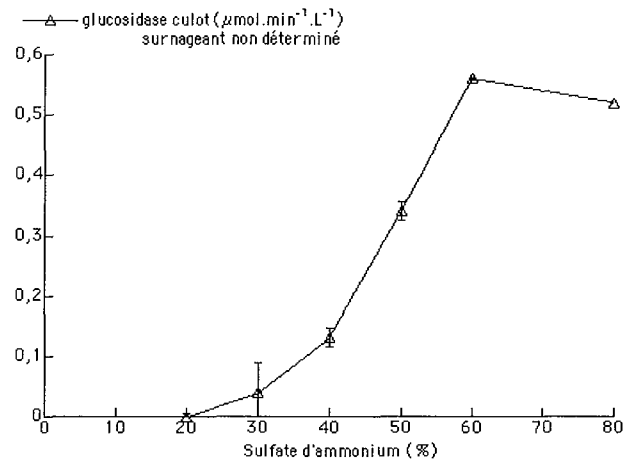
## ANNEXE 4 (suite).

Activités Leu-aminopeptidase (C),  $\alpha$ -glucosidase (D) et protéase (E) dans les culots et les surnageants après centrifugation à 5000 x g à 4 °C pendant 30 min des extraits d'EPS (100 mL) sous agitation à 200 tr.min<sup>-1</sup> à 4 °C soumis pendant 1h à des concentrations croissantes en sulfate d'ammonium.

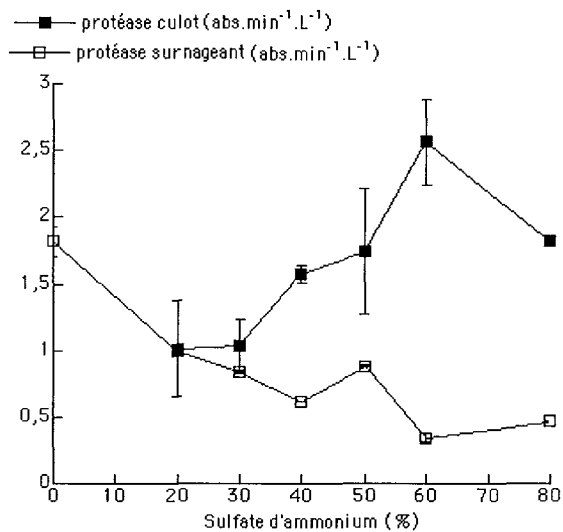
C)



D)



E)



## ANNEXE 5.

Bilan des étapes préliminaires de séparation des protéines extracellulaires des souches protéolytiques isolées des boues dotées d'activité Ala-aminopeptidase ou Leu-aminopeptidase.

souches	surnageant de culture			chromatographie d'échange d'ions				
	volume protéines (mL)	(mg/L)	Ala-amp (μmol/min/L)	Leu-amp (μmol/min/L)	volume protéines déposées (μg)	Ala-amp (nmol/min)	Leu-amp (nmol/min)	Leu-amp (nmol/min)
<i>C. indologenes/gIeuM(J)</i>	940	17,1	0,402	1,990	5	69	105	
<i>A. hydrophila/media(N)</i>	1190	3,7	0,043	0,133	5	3	17	
<i>A. hydrophila/media(G)</i>	1080	5,3	0,063	0,625	5	6	76	
<i>A. media (C)</i>	1040	5,2	0,041	0,109	5	1	1	
<i>S. marcescens(L)</i>	1115	4,6	0,016	0,013	5	1	0,3	

souches	filtration sur gel			chromatographie d'échange d'ions				
	volume protéines (μL)	(mg/L)	Ala-amp (μmol/min/L)	Leu-amp (μmol/min/L)	volume protéines déposées (μg)	Ala-amp (nmol/min)	Leu-amp (nmol/min)	Leu-amp (nmol/min)
<i>C. indologenes/gIeuM(J)</i>	634	89,2	115	56	100	11,5	5,6	
<i>A. hydrophila/media(N)</i>	260	28,1	2,8	23	100	0,3	2,3	
<i>A. hydrophila/media(G)</i>	175	450,6	11	58	100	1,1	5,8	
<i>A. media (C)</i>	346	12,3	2,8	2,7	100	0,3	0,3	
<i>S. marcescens(L)</i>	113	4,2	1,3	0	100	0,1	0	

## ANNEXE 6.

Bilan des étapes préliminaires de séparation des protéines extracellulaires des EPS des boues dotées d'activité Ala-aminopeptidase ou Leu-aminopeptidase.

EPS			
volume protéines (mL)	Ala-amp ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ )	Leu-amp ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ )	
950	60,0	10,4	4,9

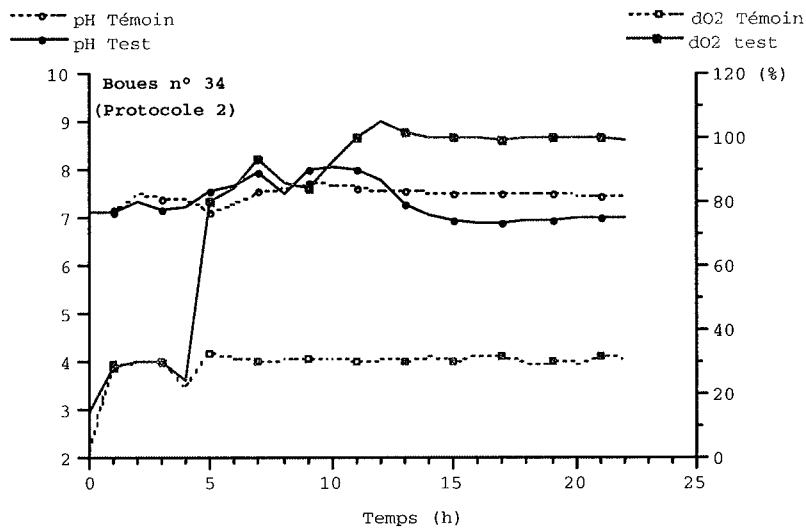
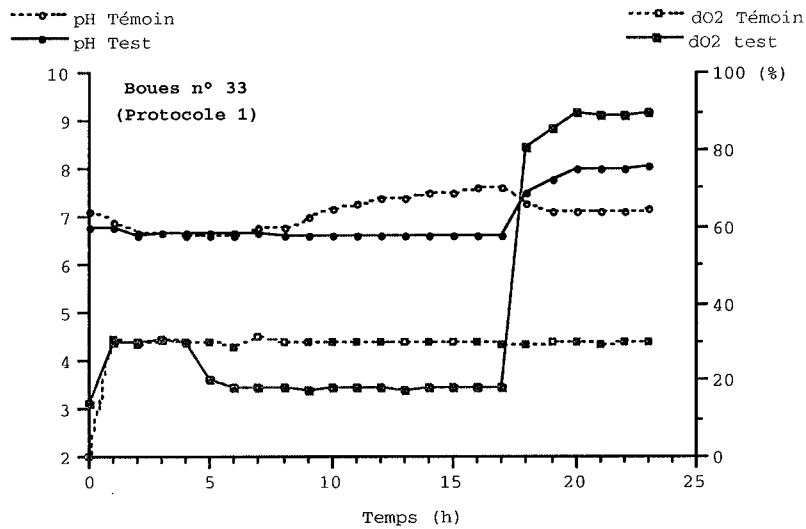
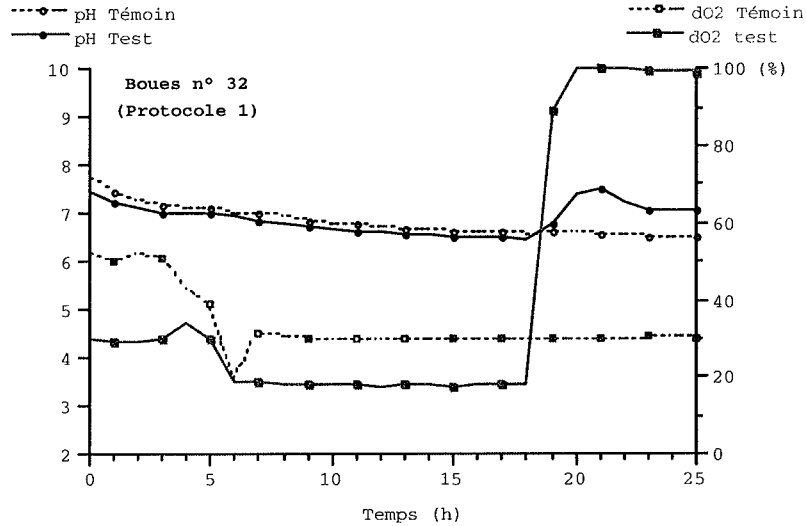
chromatographie d'échange d'ions					
volume protéines (mL)	Ala-amp ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ )	Leu-amp ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ )	volume déposé protéines (mL)	Ala-amp ( $\text{nmol}/\text{min}$ )	Leu-amp ( $\text{nmol}/\text{min}$ )
46	592,2	111,8	5	3,0	559
					197

filtration sur gel					
volume protéines ( $\mu\text{L}$ )	Ala-amp ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ )	Leu-amp ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ )	volume déposé protéines ( $\mu\text{g}$ )	Ala-amp ( $\text{nmol}/\text{min}$ )	Leu-amp ( $\text{nmol}/\text{min}$ )
pool 1	370	518,6	94,5	22,4	9
pool 3	348	330,3	16,1	2	1,7

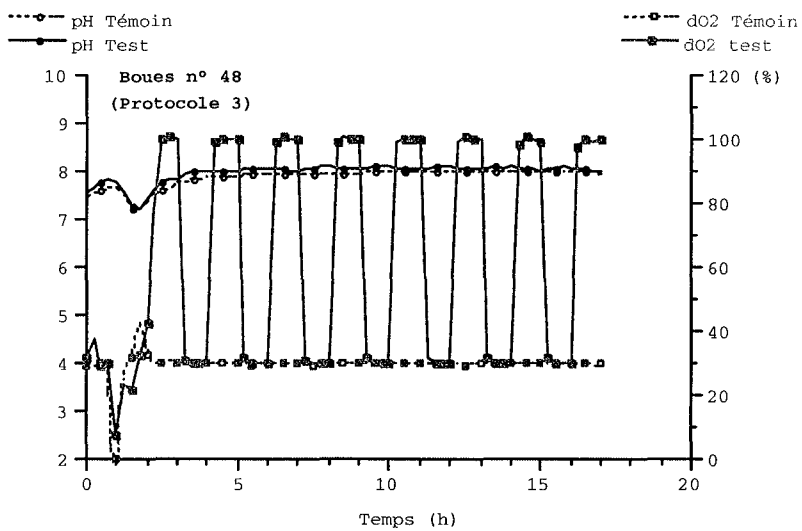
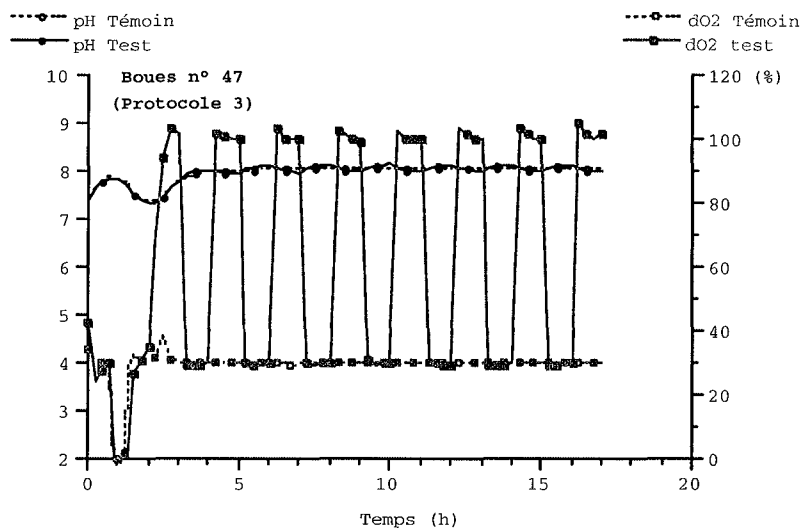
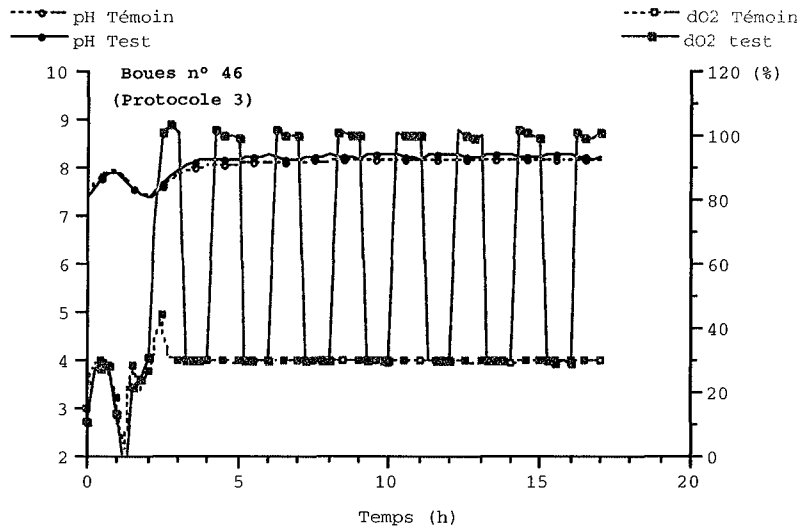
# ANNEXE 7.

Profils des valeurs de la concentration en oxygène et du pH mesurées en continu dans le réacteur Témoin, régulé à 30 % de la saturation en oxygène, et le réacteur Test subissant des variations de la concentration en oxygène jusqu'à 100 % de la saturation.



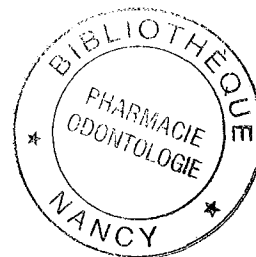
## ANNEXE 7 (suite).

Profils des valeurs de la concentration en oxygène et du pH mesurées en continu dans le réacteur Témoin, réglé à 30 % de la saturation en oxygène, et le réacteur Test subissant des variations de la concentration en oxygène jusqu'à 100 % de la saturation.



Prénom, Nom :

**Aurore CADORET**



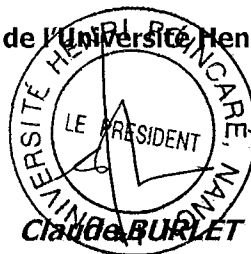
Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1  
en Biologie - Santé - Environnement**

**VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER** N° 866

Nancy, le 10 décembre 2003

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I







## RESUME

La plupart des micro-organismes des milieux environnementaux sont retrouvés sous forme d'agrégats. Ces structures complexes sont formées par l'association de micro-organismes au sein d'une matrice de polymères extracellulaires (EPS), qui assure leur cohésion. Ainsi, les agrégats microbiens des stations d'épuration (boues activées), regroupent plus d'une centaine d'espèces bactériennes différentes, entourées d'un réseau de macromolécules (protéines, polysaccharides, substances humiques, ADN et lipides). Les EPS seraient impliqués dans l'adsorption des substrats macromoléculaires et dans le confinement des enzymes hydrolytiques extracellulaires à proximité des cellules.

L'objectif général de notre travail était de qualifier et de quantifier les enzymes extracellulaires associées aux EPS extraits des agrégats bactériens des stations d'épuration, d'étudier leur variabilité et les paramètres environnementaux qui déterminent ces variations.

Ainsi, une vingtaine d'activités enzymatiques différentes ont été systématiquement mises en évidence au sein des EPS des boues. Malgré la complexité du mélange, les paramètres cinétiques apparents à 25 °C de l'activité Leu-aminopeptidase ( $K_m = 110 \mu\text{mol L}^{-1}$  et  $V_m = 9,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MV}_{\text{EPS}}$ ) et de l'activité  $\alpha$ -glucosidase ( $K_m = 234 \mu\text{mol L}^{-1}$  et  $V_m = 0,9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MV}_{\text{EPS}}$ ) ont été estimés. La vitesse d'hydrolyse augmente avec la température, avec une température optimale voisine de 30 °C pour l'activité Leu-aminopeptidase et d'au moins 50 °C pour les activités  $\alpha$ -glucosidase et protéase. La séparation des protéines dotées d'activités Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase a été réalisée afin de disposer d'une enzyme cible au sein de ce mélange. La séparation des protéines extracellulaires dotées d'activité Leu-aminopeptidase et Ala-aminopeptidase de cinq souches protéolytiques isolées des boues a permis d'établir une sorte de référence.

La proportion d'activité enzymatique extracellulaire associée aux EPS est voisine de 5 % pour l'activité  $\alpha$ -glucosidase, de 17 % pour l'activité Leu-aminopeptidase, 23 % pour l'activité caséinase et 44 % pour l'activité  $\alpha$ -amylase. La diffusion au sein des EPS ne semble pas limiter l'accessibilité des composés de masse molaire élevée (azocaséine,  $M_r = 25000$ ) aux enzymes extracellulaires. Par contre, la dispersion des agrégats bactériens a augmenté considérablement la vitesse d'hydrolyse de l'amylose azure ( $32000 < M_r < 86000$ ). L'accessibilité des substrats aux enzymes extracellulaires serait accrue par l'agrégation et la désagrégation en continu des agrégats, mais semble néanmoins dépendre de la structure et des propriétés physico-chimique des substrats.

Les variations temporelles importantes, des activités protéolytiques notamment, suggèrent une réponse de la biomasse aux conditions environnementales. Après 3 jours de famine, l'activité  $\alpha$ -glucosidase est divisée par 5, l'activité protéase multipliée par 2 et l'activité Leu-aminopeptidase voisine de sa valeur de départ. L'exposition des boues à l'azocaséine ( $M_r = 25000$ ) induit l'activité Leu-aminopeptidase, qui augmente de manière significative après 24 h et proportionnellement à la concentration en substrat. Seul le « stress » oxydant n'a pas montré d'effet significatif sur l'expression des enzymes extracellulaires.

Ces différents aspects renforcent à la compréhension du rôle du compartiment extracellulaire des agrégats dans l'adaptation des bactéries aux conditions environnementales et dans l'améliorer de l'accès aux macromolécules, en particulier.

---

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ-NANCY I

Ecole doctorale : Santé et Environnement

---

### MOTS-CLEFS

Agrégats bactériens, exo-enzymes, EPS, boues activées, hydrolyse, purification, Km.

---

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME)

UMR 7564 – CNRS – Université Henri Poincaré, Nancy I

Extension Pôle de l'Eau, 15 avenue du Charmois, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy (F)