



HAL
open science

Substances polymériques extracellulaires dans les procédés de traitement des eaux usées

Ana Catalina Avella Vasquez

► **To cite this version:**

Ana Catalina Avella Vasquez. Substances polymériques extracellulaires dans les procédés de traitement des eaux usées. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2010. Français. NNT : 2010INPL029N . tel-01748827

HAL Id: tel-01748827

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748827v1>

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

Présentée à

l'Institut National Polytechnique de Lorraine

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'INPL

Spécialité: Géosciences

par

Ana Catalina AVELLA VASQUEZ

Thèse dirigée par Tatiana GÖRNER
Thèse co-dirigée par Philippe de DONATO

SUBSTANCES POLYMERIQUES EXTRACELLULAIRES DANS LES PROCEDES DE TRAITEMENT DES EAUX USEES

Soutenance prévue le 25 Juin 2010, devant la commission d'examen

Mme Christelle WISNIEWSKI	Professeur, Université de Montpellier I	Rapporteur
M. Nicolas ROCHE	Professeur, Université Aix-Marseille III	Rapporteur
Mme Claire ALBASI	Chargée de Recherches CNRS, LGC, Toulouse	Examineur
Mme Hélène CARRERE	Directrice de Recherches INRA, LBE, Narbonne	Examineur
Mme Tatiana GÖRNER	Maître de Conférences, ENSIC, Université de Nancy	Directrice de Thèse
M. Philippe de DONATO	Directeur de Recherches CNRS, LEM, Nancy	Co-directeur de Thèse
Mme Marie-Noëlle PONS	Directeur de Recherche CNRS, LRGP, Nancy	Invité
M. Daniel VILLESSOT	Lyonnaise des eaux Directeur Scientifique, Paris	Invité

REMERCIEMENTS

J'ai eu le plaisir de réaliser ce travail de thèse au Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM) de l'INPL de Nancy. Je remercie Monsieur Jacques Yvon, ancien directeur du laboratoire et Monsieur Fabien Thomas, actuel directeur du laboratoire de m'avoir accueilli.

Je tiens à remercier sincèrement ma directrice de thèse Madame Tatiana Görner pour m'avoir encadré, soutenu et accompagné tout au long de ce travail. Egalement, je remercie mon co-directeur de thèse Monsieur Philippe de Donato qui a donné un point d'équilibre à ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à tous les collaborateurs scientifiques de ce travail, Madame Claire Albasi et Monsieur Luis Fernando Delgado du LGC Toulouse ; Madame Marie-Noëlle Pons et Monsieur Jean Noel Louvet du LRGP de Nancy ; Monsieur Christian Mustin du LIMOS de Nancy ; Monsieur Pascal Chappe et Madame Patricia Guinot-Thomas de l'IUT de Nancy ainsi que les collaborateurs des stations d'épuration des papeteries qui ont apporté et contribué au développement de cette étude.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Madame Hélène Carrère pour avoir présider le jury de ma thèse et également à Madame Christelle Wisniewski et Monsieur Nicolas Roche d'en avoir été les rapporteurs. Merci à Daniel Villesot d'avoir participé à ce jury.

Merci à tous les étudiants qui ont apporté par leur stage à cette thèse, Messieurs Lucas Charrois et Romain Pelletier, Mademoiselles Emilie Cabanettes et Céline Hognon.

Un grand merci du fond de mon cœur à toutes les personnes proches qui m'ont donné des bons conseils et qui m'ont soutenu pendant ces années, d'abord les membres de ma famille mes parents, Blanca et Jaime, à ma sœur Lorena et mes tantes et oncles Lilia, Pedro, Custodio, Luis et Oliva, également à celles que je garde dans ma mémoire Alicia et à ma grand mère Belarmina. Ensuite, je remercie pour leur disposition et soutien précieux, Raquel Gonçalves, Elise Ahimon, Diane Pichon, Pierre Yves et Valérie Abresol, Hector y Stella Avila.

A mes amis, vraiment merci, de m'avoir donné l'occasion de partager des bons moments, Noémie Taquet, Ellen Schneider, Henriette Adjia, Jean Aimé Mbey, Natalia Ferreira.

Au Roi des rois, Seigneur des seigneurs

A mis padres, Blanca y Jaime

TABLE DE MATIÈRES

INTRODUCTION	1
<u>CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	9
I.1. PROCÉDÉS DE TRAITEMENT DES EAUX USÉES PAR VOIE BIOLOGIQUE	12
I.2. LES AGRÉGATS BIOLOGIQUES	18
I.3. RÔLE DES MICROORGANISMES ET ACTIVITÉ MICROBIENNE	24
I.3.1. DÉGRADATION DE LA POLLUTION ORGANIQUE DES EAUX USEES	28
I.3.2. LES SUBSTANCES POLYMÉRIQUES EXTRACELLULAIRES (EPS)	31
I.3.2.1. Origine et description	31
I.3.2.2. Rôle des EPS dans le procédé de traitement des eaux usées	36
I.3.2.3. Analyse des EPS: extraction, caractérisation et quantification des EPS	39
I.4. PRÉSENCE DE MÉDICAMENTS DANS L'ENVIRONNEMENT	51
I.4.1. INFLUENCE DES COMPOSÉES PHARMACEUTIQUES SUR L'ACTIVITÉ BACTÉRIENNE	59
I.4.2. INFLUENCE SUR LES PERFORMANCES DE L'ÉPURATION	61
I.5. UTILISATION DES CULTURES FONGIQUES POUR LE TRAITEMENT DES EAUX USÉES	64
I.6. SUIVI DU FONCTIONNEMENT D'UNE STATION DE TRAITEMENT DES EAUX USÉES	67
I.6.1. ANALYSE STATISTIQUE DE DONNEES	69
I.7. CONCLUSIONS	72
<u>CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>	75
II.1. PROVENANCE DES ÉCHANTILLONS	77
II.1.1. EAUX USÉES URBAINES	77
II.1.2. STATIONS D'ÉPURATION DES EAUX INDUSTRIELLES DES PAPETERIES	82
II.1.3. INSTALLATIONS UTILISÉES	86
II.1.3.1. Bioréacteur à membranes	86
II.1.3.2. Réacteur batch	88
II.2. CARACTÉRISATION DES BOUES BIOLOGIQUES	89
II.2.1. CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE	89
II.2.2. CARACTÉRISATION MICROSCOPIQUE DES BOUES	90

II.3. PROTOCOLES ANALYTIQUES	92
II.3.1. EXTRACTION DES EPS LIÉS DANS LES FLOCS	92
II.3.2. ANALYSE DES EPS PAR LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE D'EXCLUSION PAR TAILLE	94
II.3.3. ANALYSE DES EPS PAR LA TECHNIQUE DE SPECTROSCOPIE INFRAROUGE	96
II.3.4. DOSAGE DE PROTÉINES ET DE POLYSACCHARIDES	98

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION 101

III.1. ÉVALUATION ET VALIDATION DES PROTOCOLES ANALYTIQUES (MÉTHODE D'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE, MÉTHODE D'EXTRACTION DES EPS ET MÉTHODE DE DOSAGE QUANTITATIVE DES EPS PAR UV-Vis)	104
III.1.1. VALIDATION DE LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE	104
III.1.1.1. Choix de la phase mobile	104
III.1.1.2. Choix de la longueur d'onde de détection UV-vis	105
III.1.1.3. Reproductibilité de l'analyse chromatographique des EPS	106
III.1.2. REPRODUCTIBILITÉ DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION DES EPS	107
III.1.3. ÉVALUATION DES METHODES DE DOSAGE QUANTITATIVE DES EPS PAR UV-Vis	108
III.1.3.1. Appréciation de l'erreur opératoire liée aux méthodes classiques de dosage des protéines et des Polysaccharides	108
III.1.3.2. Interférences des acides humiques sur la méthode de dosage des protéines	109
<i>The pitfalls of protein quantification in wastewater treatment studies.</i>	110
<i>Avella A.C., Görner T., de Donato Ph.</i>	
<i>Article accepté à Science of the Total Environment, 2010.</i>	
III.2. IMPACT DE PRODUITS PHARMACEUTIQUES SUR LES BOUES ACTIVÉES : FORMATION DES SUBSTANCES POLYMÉRIQUES EXTRACELLULAIRES	116
III.2.1. INTRODUCTION	116
III.2.2. EFFET DE LA PRÉSENCE D'UN AGENT CYTOSTATIQUE SUR LA FORMATION DE SUBSTANCES POLYMÉRIQUES EXTRACELLULAIRES DANS LES EAUX USÉES MUNICIPALES TRAITÉES DANS UN BIOREACTEUR A MEMBRANE	117
IV.2.2.1. Campagne expérimentale I	117
<i>Effect of cytostatic drug presence on extracellular polymeric substances formation in municipal wastewater treated by membrane bioreactor.</i>	119
<i>Avella A.C., Delgado L.F., Görner T., Albasi CGalmiche M., de Donato Ph.</i>	
<i>Bioresource Technology 101 (2010), pag 518 – 526.</i>	
III.2.2.2. Campagne expérimentale II	129
III.2.2.3. Discussion	132

III.2.3. COMPORTEMENT DES BOUES ACTIVÉES DANS UN REACTEUR BATCH EN PRÉSENCE D'ANTIBIOTIQUES : ETUDE DES SUBSTANCES POLYMÉRIQUES EXTRACELLULAIRES _____	139
III.2.3.1. Etude en présence de 5 antibiotiques _____	139
<i>Activated sludge behaviour in a batch reactor in the presence of antibiotics: Study of extracellular polymeric substances.</i> _____	140
<i>Avella A.C., Essendoubi M., Louvet J.N., Görner T., Sockalingum G.D., Pons M.N., Manfait M., de Donato Ph.</i>	
<i>Article accepté à Water Science and Technology, 2010.</i>	
III.2.3.2. Étude en présence d'Érythromycine _____	151
III.2.3.2.1. Caractérisation des boues brutes _____	151
III.2.3.2.2. Impact des différentes concentrations d'Érythromycine _____	153
III.2.3.2.3. Impact des différents types d'Érythromycine _____	157
III.2.3.2.4. Discussion _____	158
III.3. ÉTUDE DE BOUES ACTIVÉES DES STATIONS D'ÉPURATION DE PAPETERIES _____	161
III.3.1. INTRODUCTION _____	161
III.3.2. EFFET DU TRAITEMENT FONGIQUE SUR LA DECANTABILITE DES BOUES DES STATIONS D'EPURATION DE PAPETERIE _____	162
<i>Effect of fungal treatment on the settleability of the paper mill wastewater sludge.</i> _____	163
<i>Avella A.C., Görner T., Chappe P., Guinot–Thomas P., de Donato Ph.</i>	
<i>Article soumis à Biological Control, 2010.</i>	
III.3.3. APPLICATION DES MÉTHODES STATISTIQUES ET ANALYSE DES BOUES ACTIVÉES POUR UNE MEILLEUR COMPREHENSION ET DIAGNOSTIQUE DE TROIS STATIONS D'ÉPURATION DES EAUX USÉES _____	172
<i>Activated sludge analysis by statistical methods for a better understanding and diagnosis of three wastewater treatment plants.</i> _____	173
<i>Avella A.C., Görner T., Yvon J., Chappe P., Guinot–Thomas P., de Donato Ph.</i>	
<i>Article soumis à Water Research, 2010.</i>	
CONCLUSIONS GÉNÉRALES et PERSPECTIVES _____	191
LISTE DE RÉFÉRENCES _____	199

Notations

A	Amoxicilline
AB	Antibiotique
ACP	Analyse en composante principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BOD	Biochemical oxygen demand [mg/L]
BSA	Bovine Serum Albumin (protéine)
COD	Chemical Oxygen Demand [mg/L]
COT	Carbone Organique Total [mg/L]
Da	Daltons
DBO₅ ou DBO	Demande Bio-chimique en Oxygène [mg/L]
DCO	Demande chimique en oxygène [mg/L]
DLVO	Théorie de la double couche (Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek)
DO	Dissolved Oxygen Concentration [mg/L]
DSSV	Dissolved Settled Sludge Volume [mL/L]
DSVI	Diluted Sludge Volume Index [mL/g]
E	Erythromycine
EH	Equivalent habitant
EPS	Extracellular Polymeric Substances (Substances polymériques extracellulaires)
F-C	Folin-Ciocalteu's reagent
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
HA	Humic Acid
HPSEC	High Pressure Size Exclusion Chromatography
MES	Matières En Suspension
MLSS	Mixed Liquor Suspended Solids
MLVSS	Mixed Liquor Volatile Suspended Solids
MS	Matières Sèches
MVS	Matières Volatiles en Suspension
NTK	Azote total Kjeldahl (voir : TKN-N)
OD	Oxygène Dissous
PCA	Principal Components Analysis (Analyse en composante principales)
PC1	Premier axe d'explication en composantes principales
PC2	Second axe d'explication en composantes principales
PR	Protéines
PS	Polysaccharides
R	Roxithromycine
S	Sulfamethoxazole
SSV	Settled Sludge Volume [mL/L]
STEP	Station d'Épuration des Eaux Polluées
SVI	Sludge Volume Index (français : indice de décantation de Mohlman) [mL/g]
T	Tétracycline
TKN-N	Total Kjeldahl Nitrogen [mg/L]
VT	Vitesse Tangentielle
WWTP	WasteWater Treatment Plant

Symboles

ϵ	Coefficient d'extinction molaire [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$]
δ	Ecart type
A	Absorbance à une longueur d'onde donnée
C_i	Concentration massique de l'espèce i [mg/L]
c	Concentration molaire de l'espèce absorbante [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]
l	Longueur du trajet optique [cm]
R^2	Coefficient de régression
V_i	Volume de liqueur mixte [mL]
V_e	Volume d'élution de la phase mobile [mL]
V_f	Volume des EPS après extraction [mL]
X_i	Concentration nominale en protéines [mg/L]
\bar{Y}_{PR}	Concentration moyenne en protéines [mg/L]
\bar{Y}_{HA}	Concentration moyenne en polysaccharides [mg/L]

INTRODUCTION

Contexte sociétal :

L'augmentation de la population, l'intensification des activités industrielles et agricoles, le nombre grandissant d'agglomérations de plus en plus étendues et le mode de vie actuel exercent une pression très négative sur les ressources en eau. La directive européenne cadre sur l'eau du 23 octobre 2000 fixe des objectifs ambitieux pour atteindre un bon état général tant pour les eaux superficielles, que pour les eaux souterraines et les eaux côtières. Elle vise aussi à retrouver une meilleure adéquation entre besoins et ressources en eau disponibles dans une perspective de développement durable des activités économiques utilisatrices d'eau. La directive européenne du 21 mai 1991 a imposé aux Etats membres la collecte et le traitement des eaux usées avant leur rejet dans le milieu naturel avec des échéances selon la taille de l'agglomération. Mais l'enjeu n'est pas simplement de se conformer aux directives. Il s'agit de traiter un véritable problème de protection de la qualité de nos eaux. Bien sûr, le traitement des eaux usées à lui seul n'est pas gage du bon état écologique, mais il est un préalable indispensable.

Les procédés d'épuration des eaux usées urbaines, industrielles et agricoles sont nombreux. Le principe est basé sur la capacité des bactéries présentes naturellement dans les eaux usées à dégrader la pollution organique qu'elles utilisent pour leur développement. Les stations d'épuration s'appuient sur les technologies pour intensifier ce phénomène naturel. Le traitement biologique des eaux usées permet de diminuer la pollution organique azotée carbonée et phosphorée (décrite en termes globaux de DCO, DBO, MES, N, P). L'efficacité d'une station d'épuration dépend, d'une part, de l'adsorption et de la dégradation des polluants par une population bactérienne adaptée et, d'autre part, de la bonne séparation de la biomasse épuratrice et de l'eau épurée. L'étape de séparation de la biomasse et de l'eau est un point critique pour le bon fonctionnement d'une station d'épuration.

Contexte scientifique :

Les microorganismes vivent en communauté et produisent naturellement des biopolymères, appelés aussi des substances polymériques extracellulaires (EPS) nécessaires à leur survie. Des recherches récentes montrent que les EPS sont impliqués dans des mécanismes physico-chimiques aux interfaces/interphases et donc dans la formation, la stabilité et la décantation de la biomasse (appelée aussi boues biologiques). La communauté scientifique s'accorde sur le fait que les EPS ont un rôle prépondérant sur la cohésion du floc bactérien. Les EPS interviennent dans les mécanismes de survie des bactéries (apport de

nutriments, protection contre l'impact négatif extérieur, communication bactérienne...). Ils interviennent également dans le phénomène de rétention d'une quantité importante d'eau dans des boues produites. Ces boues de stations d'épuration sont un déchet volumineux et problématique. Tant la qualité de l'eau déversée dans le milieu naturel que la quantité des boues produites sont un enjeu sociétal important. Une meilleure connaissance et compréhension de la nature et des propriétés des boues biologiques permet d'optimiser les procédés de traitement.

Depuis une dizaine d'années, une partie des recherches du LEM sur l'eau est consacrée aux études des EPS dans des STEP. Dans un premier temps, les recherches visaient la mise au point de techniques avancées, nouvelles et originales. Ainsi, l'utilisation et l'optimisation de la chromatographie liquide de séparation par taille a permis une caractérisation des biopolymères en fonction de leur taille. De plus la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a permis l'identification et la quantification des espèces majoritaires présentes dans les EPS. Dans un deuxième temps, ces outils puissants ont servi à l'acquisition de nouvelles connaissances sur la nature chimique des EPS (Thèse : Ch. Garnier, INPL, soutenue en 2005) dans différentes situations : la caractérisation des EPS dans différentes stations d'épuration, le suivi des EPS en fonction des saisons, l'implication des EPS dans la décantation dans des situations normales et critiques, ou la cinétique de production des EPS par certaines souches bactériennes de façon indépendante ou compétitive.

Le présent travail de thèse vise à obtenir une meilleure compréhension du rôle des EPS dans différents procédés de traitement des eaux usées. Pour mener à terme ce travail dans différents contextes, une approche multidisciplinaire a été adoptée. Les recherches ont été effectuées en collaboration avec des physico-chimistes du LEM, des microbiologistes (IUT Brabois) et des ingénieurs des procédés du LGC Toulouse dans le cadre de l'ANR TOXEAUBAM et du LRGP Nancy dans le cadre du programme ANR ANTIBIEAU (N° ANR-07-BLAN-0195-02). Une partie des recherches ont participé dans le programme de recherche de la Zone Atelier Moselle (ZAM) labellisée par le CNRS depuis 2001.

L'objectif fixé pour ce travail est double : d'une part (*i*) étudier le comportement de la biomasse et notamment la production des EPS en présence des composés pharmaceutiques (un agent anticancéreux et cinq antibiotiques); et d'autre part, (*ii*) étudier les EPS dans le contexte de décantation des boues dans des stations d'épuration. La figure 1 montre schématiquement les recherches développées dans ce manuscrit.

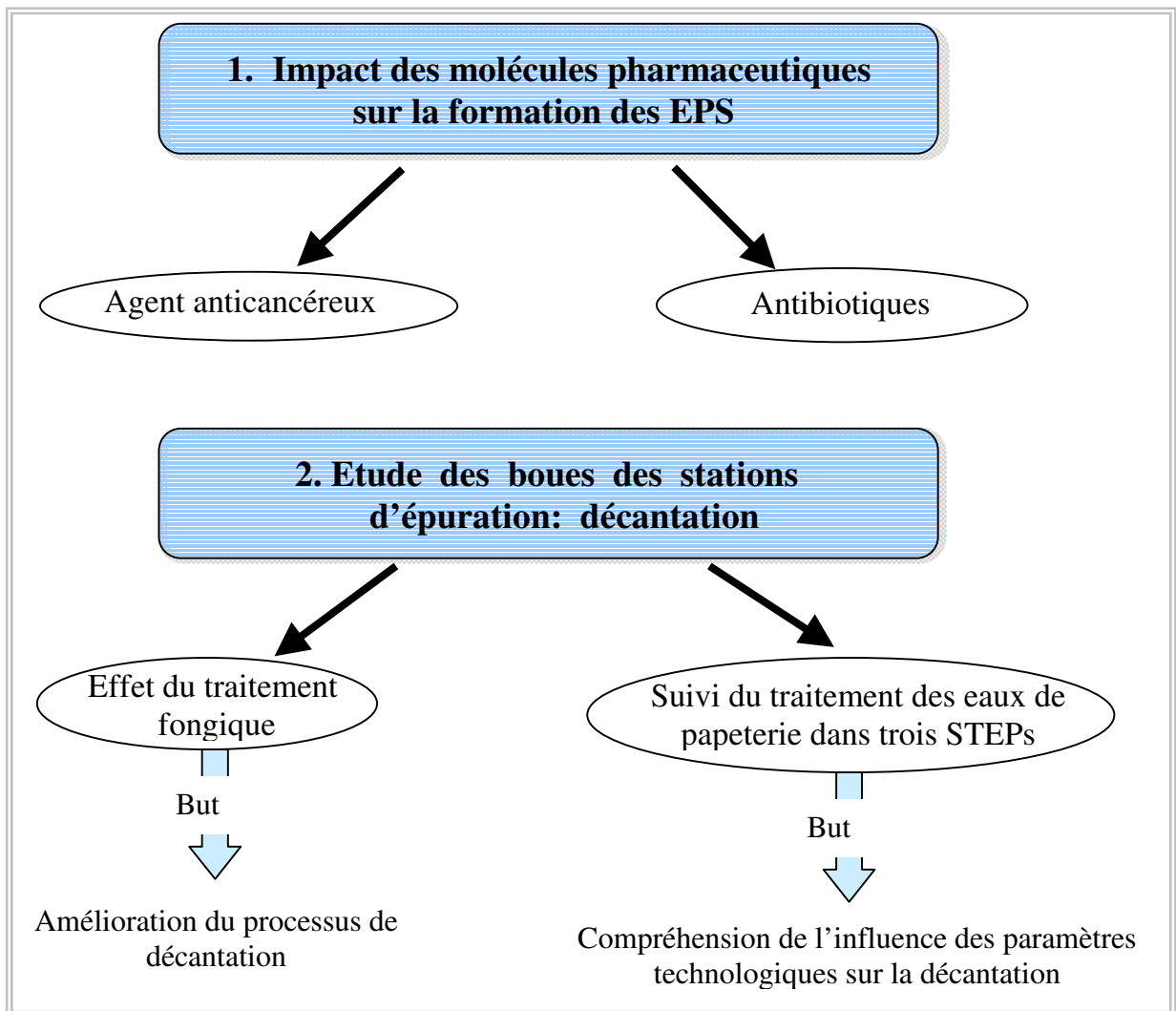


Figure 1. Schéma des études réalisées

ORIENTATION DE L'ETUDE

La production naturelle d'EPS par les bactéries (lors de leur métabolisme cellulaire) reflète directement le comportement bactérien. Les bactéries réalisent la consommation/transformation de la pollution organique contenue dans les eaux usées et cette activité est accompagnée par la production d'EPS. Différentes situations et conditions dans les procédés de traitement des eaux peuvent menacer l'intégrité des agrégats biologiques, menacer les bactéries et déterminent l'efficacité de l'épuration biologique. L'étude d'EPS est donc un outil pour une meilleure compréhension du comportement microbien des boues (figure 2). Nos études ont été réalisées tant à l'échelle moléculaire dans des situations créées

artificiellement au laboratoire qu'à l'échelle industrielle dans les situations réelles rencontrées directement dans trois stations d'épuration.

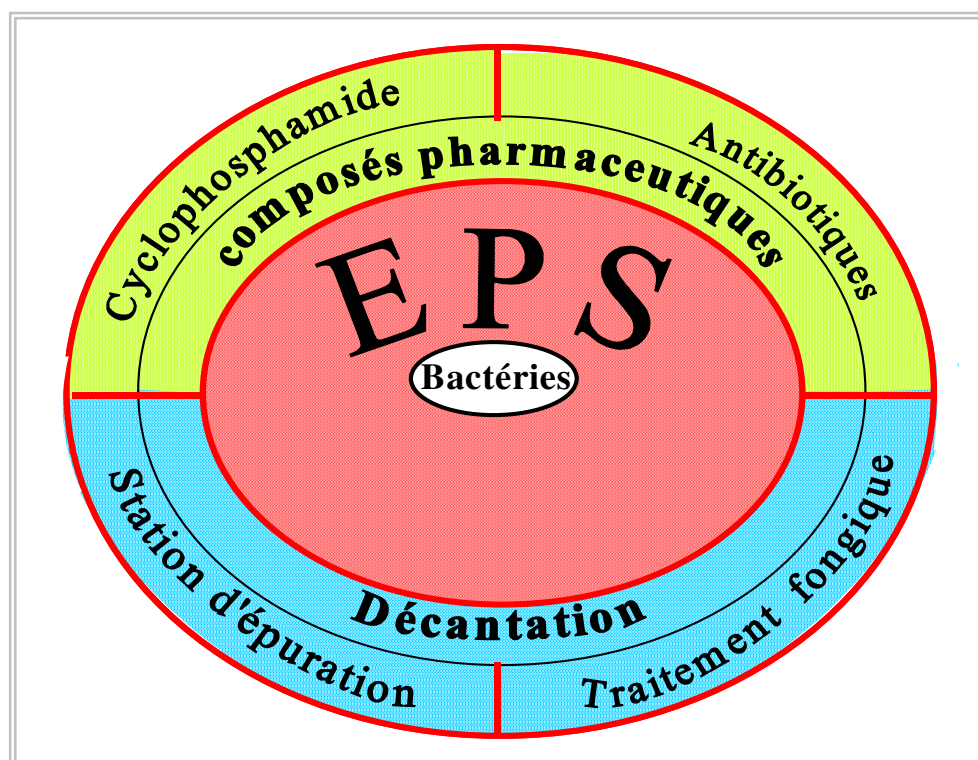


Figure 2. Représentation schématique des axes d'études

Impact de la présence des produits pharmaceutiques sur l'activité bactérienne:

Le but de ce travail était d'examiner le comportement bactérien via l'analyse d'EPS en présence des molécules médicales tout en estimant la capacité d'épuration bactérienne. Nous avons étudié deux types de médicaments : des molécules utilisées dans les traitements anticancéreux et des antibiotiques. Ces molécules et leurs sous-produits de dégradation se retrouvent dans les eaux usées domestiques. Ils peuvent avoir des effets sur la biomasse des STEP car elles sont, par définition, destinées à avoir un impact sur l'organisme vivant. L'étude de l'impact de l'agent anticancéreux, le cyclophosphamide, et de ses principaux métabolites sur la biomasse a été réalisée en collaboration avec le LGC Toulouse. L'étude de l'impact de cinq antibiotiques (roxithromycine, sulfaméthoxazole, amoxicilline, tétracycline et plus spécifiquement l'érythromycine) sur le comportement bactérien a été réalisée dans des réacteurs batch en collaboration avec le LRGP-Nancy.

Décantation des boues:

La décantation, l'étape cruciale dans les systèmes à boues activées est le résultat de l'action conjuguée de plusieurs facteurs qui varient dans le temps, tels que les conditions opérationnelles, les caractéristiques de la biomasse épuratrice et la qualité de l'affluent à traiter. Dans ce contexte complexe, les EPS jouent un rôle très important dans la formation et la cohésion du floc.

Nous nous sommes intéressés à l'action des produits fongiques sur l'amélioration de la décantation des boues. Cette partie a été réalisée en collaboration avec l'équipe de microbiologie de l'IUT de Nancy-Brabois.

Nous avons étudié également la décantation de boues dans les conditions réelles d'opération de trois STEP de papeterie. L'exploitation statistique des paramètres technologiques et la caractérisation physico-chimique des boues ont permis de déterminer l'influence prépondérante des certaines conditions opérationnelles sur la biomasse et de la production d'EPS sur la qualité de la décantation.

Ce travail de thèse a été organisé en quatre chapitres. Nous avons choisi de présenter les résultats obtenus sous la forme d'articles acceptés ou soumis dans le troisième chapitre intitulé : résultats et discussion.

Le premier chapitre de ce mémoire **appuyé sur la recherche bibliographique**, fait l'inventaire des connaissances actuelles sur les substances polymériques extracellulaires : depuis leur origine jusqu'à leur implication dans les différents procédés de traitement des eaux usées. La problématique de la présence de médicaments dans les stations d'épuration est également traitée avec un regard particulier sur l'activité bactérienne et la formation des EPS. L'utilisation des cultures fongiques dans le traitement des eaux usées est aussi considérée du point de vue de la production des EPS. Enfin, le suivi du procédé d'épuration est abordé et un panorama des travaux sur l'exploitation de données dans les stations d'épuration est présenté.

Le deuxième chapitre, « Matériels et Méthodes », est consacré à la description des stations d'épuration urbaines et industrielles d'où proviennent les boues étudiées. Le lecteur trouvera ensuite la description des installations de laboratoire (réacteur batch, réacteur à membrane et pilote au système de boues activées), les méthodes de caractérisation des boues et les méthodes d'analyse des EPS.

Le troisième chapitre, « Résultats et Discussion », présente la validation des méthodes d'analyse et les résultats d'investigations. L'évaluation de la méthode classique de Lowry pour le dosage des protéines dans les eaux usées a été acceptée à *Science of the Total*

Environment, 2010. Les résultats concernant l'influence d'un agent cytostatique sur les EPS ont été publiés dans *Bioresource Technology*, 2010. L'étude de l'effet des antibiotiques sur les EPS, a été acceptée à *Water Science and Technology*, 2010. L'étude de la décantation des boues avec l'ajout des agents fongiques a été soumise à *Desalination*, 2010. Enfin, la description du procédé d'épuration par une approche à la fois statistique, concernant l'analyse des données, et physico-chimique pour la caractérisation des boues et des EPS, a été soumise à *Water Research*, 2010.

Le quatrième chapitre, les conclusions générales, présente les contributions essentielles de ce travail. En particulier, l'étude des EPS nous a permis de mieux connaître le comportement bactérien face aux situations de stress (présence de composés pharmaceutiques) et au sein des stations d'épuration avec un regard sur la décantation. Le stress bactérien stimule la production d'EPS en tant que mécanisme de protection. Ainsi, les bactéries enveloppées dans la matrice des polymères biologiques minimisent les effets nuisibles des micropolluants à l'intérieur des agrégats. D'autre part, la présence de cultures fongiques dans les boues biologiques a amélioré la décantation des boues. Enfin, l'activité bactérienne dans la STEP est le résultat de multiples facteurs agissant simultanément. La meilleure décantation observée dans une des trois stations étudiées a été reliée à une activité bactérienne intense (formation importante d'EPS et richesse du consortium bactérien liée à la nitrification) et à la présence de phosphates dans le bassin biologique.

CHAPITRE I.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

La Directive Européenne de l'eau (du 23 octobre 2000, 2000/60/CE) a défini la pollution en général, comme une **modification défavorable** du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme un sous-produit de l'action humaine, au travers d'effets directs ou indirects altérant les critères de répartition d'énergie, des niveaux de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes.

Ainsi l'homme, responsable de la pollution, doit effectuer les actions nécessaires pour la récupération et la préservation du milieu qui l'entoure. En France en 2004, la quantité d'eaux usées générées a été estimée à environ 7 milliards de m³ (Ministère de l'écologie, 2008 « gestion de l'eau potable et des eaux usées »). Pour traiter ces effluents, la directive européenne (Directive 91/271/CEE) a imposé qu'à partir du 31 décembre 2000, toutes les agglomérations dont le nombre d'équivalent-habitant (EH) est supérieur à 15000, doivent être équipées d'un système de collecte et de traitement même si elles ne rejettent pas leurs effluents dans une zone sensible. A partir du 31 décembre 2005, cette même norme est appliquée aux agglomérations urbaines plus petites dont le nombre d'EH est supérieur à 2000. Les performances minimales des stations d'épuration ont été également définies. Ainsi, dans les stations d'épuration des grandes agglomérations recevant une pollution supérieure à 600 kg/j de DBO₅, comme celle du Grand Nancy, le rendement minimum à atteindre est de 80 % en DBO₅ (Arrêté du 22 juin 2007).

Ces contraintes réglementaires exigent une grande performance des procédés de traitement utilisés. Différents procédés de traitement existent: les procédés physiques, physico-chimiques et biologiques. Nous allons nous focaliser dans ce travail sur les procédés d'épuration par voie biologique. Le traitement biologique des eaux usées est avantageux par rapport aux autres techniques de traitement du fait qu'il est économique et qu'il permet de traiter un débit important d'eau (Characklis et Marshall, 1990). Cependant, le traitement biologique est d'une complexité importante qui rend difficile la compréhension intégrale du procédé. En effet, les microorganismes étant des êtres vivants, ils répondent de manière différente aux diverses conditions du milieu. De ce fait, le traitement biologique de l'eau est largement étudié pour élucider la réponse bactérienne face à différentes situations. Bien que la maîtrise des procédés biologiques d'épuration soit difficile, elle permettra de proposer des améliorations aux procédés existant et de créer de nouveaux procédés.

I.1. PROCÉDÉS DE TRAITEMENT DES EAUX USÉES PAR VOIE BIOLOGIQUE

Le traitement biologique des effluents à l'échelle industrielle a commencé à la fin du XIX^{ème} siècle. Il est fondé sur des travaux de Pasteur et des connaissances expérimentales acquises concernant l'activité de dégradation microbienne (Cemagref, 2002 « La petite histoire de l'épuration »).

A l'heure actuelle, l'objectif du traitement biologique des eaux usées est, à la fois, d'obtenir des temps minimaux de résidence de l'eau dans les installations, et d'atteindre les meilleurs taux d'élimination des polluants par l'action des microorganismes. Ainsi, l'intensification du procédé d'épuration obtenue grâce à l'augmentation de la quantité de biomasse permet une élimination élevée du substrat (Metcalf et Eddy, 2003).

Les principaux procédés biologiques utilisés pour le traitement des eaux usées peuvent être classés en deux types: les procédés à cultures fixées et les procédés à cultures libres. Dans les procédés à cultures fixées (tels que les lits bactériens ou les biofiltres), les microorganismes forment des biofilms qu'ils soient sous conditions aérobies ou anaérobies. Les biofilms sont des structures biologiques constituées de cellules immobilisées en présence de substrats et enveloppées dans une matrice polymérique d'origine microbienne (Characklis and Marshall, 1990). Les biofilms se développent lorsqu'ils sont attachés à un support inerte. Etant donnée la forte densité biologique des biofilms et leur propriété d'immobiliser divers éléments, les biofilms sont utilisés actuellement dans la bioremediation de certains polluants présents dans l'environnement tels que métaux lourds et les carburants, entre autres (Singh et al., 2006).

Le principe du procédé à cultures libres repose sur le travail d'Arden et Lockett réalisé en 1914. Dans ce travail, les boues issues de la biodégradation des effluents ont été soumises à une aération continue. En présence d'oxygène, l'activité bactérienne a été stimulée par la formation d'agrégats dans le bassin biologique. Un tel procédé intensif d'épuration a été appelé « boues activées ». Actuellement, les agrégats bactériens sont maintenus en suspension dans l'eau en cours de traitement grâce à un brassage continu de la liqueur (Metcalf et Eddy, 2003). En France, 60 % des stations d'épuration fonctionnent selon le principe des boues activées (Cemagref, 2008a). Dans ce travail de thèse, nous décrirons davantage le procédé à boues activées car les boues étudiées sont issues de ce procédé.

Le **procédé à boues activées** comporte essentiellement trois étapes (Metcalf et Eddy, 2003):

- 1) Une réaction aérobie dans laquelle les microorganismes en suspension se développent et consomment la pollution organique des effluents en la transformant en CO_2 et H_2O . La croissance bactérienne dans cette étape est dictée par le temps de résidence de la boue (l'âge de boues). Ainsi, les espèces présentes sont exclusivement celles dont le temps de reproduction est plus court que le temps de séjour de boues. Selon cette définition, les boues ayant des temps de séjours importants sont formées par un consortium bactérien riche constitué par des bactéries qui ont des temps de croissance prolongés. Par contre, les stations opérant avec des boues peu âgées ont une richesse bactérienne réduite (IWA, 2002).
- 2) Une étape de séparation solide/liquide, généralement achevée dans un clarificateur. Quand la liqueur mixte formée dans le bassin d'aération est laissée au repos, la biomasse a tendance à s'agglomérer davantage et à décanter par l'action de la pesanteur. Cette étape est cruciale dans les procédés à boue activées car elle régit la séparation des matières en suspension et en conséquence la qualité de l'effluent.
- 3) La recirculation de la boue décantée. Une partie de la boue décantée est recirculée vers le bassin aéré, augmentant ainsi la concentration de la biomasse du réacteur biologique et amplifiant le taux d'épuration des eaux. La croissance bactérienne dépend de la concentration des substances organiques (substrat) contenues dans les eaux, une quantité importante de nutriments favorise la croissance bactérienne (IWA, 2002).

Le **procédé à boues activées classique** avec décantation des boues (figure I.1) est le plus répandu en France et à l'étranger. Les floccs suffisamment agglomérés et ayant un poids approprié décantent et forment les boues. La décantation est suivie habituellement dans les stations d'épuration par l'indice de Mohlman ou Sludge Volume Index (SVI) (éq. I.1) qui est le paramètre opérationnel standardisé (APHA et al., 2005). Il donne une information sur la qualité de la décantation de la boue. Il est défini comme le volume de boue décanté au bout de 30 min. par rapport à la quantité de biomasse présente. La valeur de SVI n'a pas de base théorique (APHA et al., 2005), elle est obtenue expérimentalement et dépend de la concentration initiale de la boue.

$$SVI = \frac{Vol_{30 \text{ min}}}{m_{\text{biomasse}}} \quad (\text{Eq. I.1})$$

SVI = sludge volume index ou indice de Molhman [mL/g]

Vol_{30 min} = volume de boue décanté dans une éprouvette au bout de 30 min sur 1 L de liqueur [mL/L]

m_{biomasse} = quantité de cellules estimée par MES (matière en suspension) ou MVS (matière volatile en suspension) [g/L]

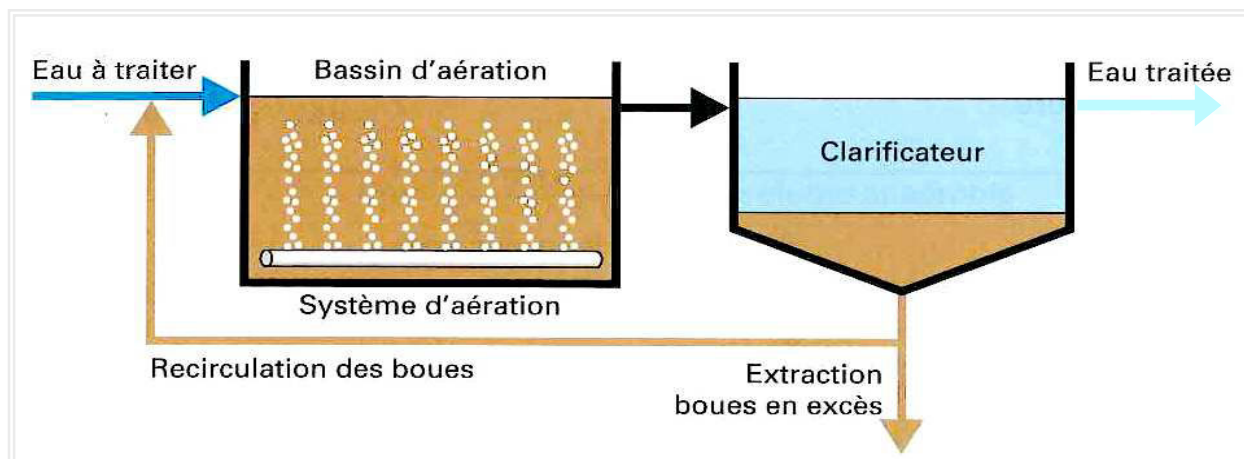


Figure I. 1. Schéma simplifié d'un système à boues activées [source : Dégremont, 2005]

Dans les stations d'épuration, une mauvaise décantation est reflétée par un indice de décantation (SVI) supérieur à 250 mL/g (Dégremont, 2005). En France, une enquête réalisée en 2003 dans les stations d'épuration, a révélé que 25 % des stations d'épuration (traitant des effluents urbains) présentent une mauvaise décantation (Cemagref, 2008b). Les problèmes de décantation sont donc fréquents dans les stations d'épuration. De ce fait, la décantation est un sujet continu d'étude. Durant les trois dernières années seulement (entre 2007 et 2009), on compte près de 900 articles scientifiques relatifs à la décantation de boues activées. Les scientifiques s'accordent sur le fait que différents facteurs influencent la décantation des boues : *i*) la prolifération des bactéries filamenteuses ou "bulking" (e.g. Jenkins et al., 2003), *ii*) les propriétés de surface des agrégats (e.g. Wilén et al., 2003), *iii*) l'influence de substances polymériques extracellulaires dans l'agglomération des agrégats (e.g. Liu et Fang, 2003), *iv*) la densité des agrégats (e.g. Schuler et Jang., 2007) et leur taille obtenue suite à la floculation.

Une technique qui évite l'étape de décantation de boues est le **bioréacteur à membrane** (figure I. 2). Cette technique est très prometteuse même si actuellement elle est utilisée en moindre mesure par rapport au procédé à boues activées classique. La séparation des boues

activées est réalisée par la filtration sur membranes localisées soit à l'extérieur soit à l'intérieur du bassin biologique. Comparé au procédé classique à boues activées, le bioréacteur à membrane offre quelques avantages remarquables (Judd, 2006) :

- Une séparation très importante entre l'eau traitée et les microorganismes ou particules contenus dans l'eau. Cette séparation est assurée même lorsque les caractéristiques de décantation des agrégats sont médiocres.
- Une qualité supérieure de l'effluent. En plus d'être clarifié, l'effluent est pratiquement désinfecté grâce au fait que la taille effective des pores de la membrane (souvent $< 0,1 \mu\text{m}$) est inférieure à la taille de bactéries pathogènes et de virus contenus dans les boues.
- L'indépendance opérationnelle entre le temps de rétention hydraulique de l'eau et le temps de séjour de boues (ou âge de boue). Dans le bioréacteur à membrane, la formation des agrégats n'exige pas de temps de rétention spécifique. Les agrégats formés nécessitent seulement d'être plus grands que la taille de pore de la membrane. Par contre, dans les systèmes classiques à boues activées, le temps de séjour doit être tel que la formation d'une grande taille de floes soit favorisée ($> 50 \mu\text{m}$) pour la décantation.

Le bioréacteur à membrane facilite également l'opération avec des âges de boues nettement plus élevés que le procédé classique à boues activées. Ceci permet l'implantation de microorganismes à croissance lente augmentant ainsi la diversité biologique des boues et améliorant la nitrification.

- Le fonctionnement du bioréacteur avec de grandes concentrations de matières en suspension (MES) permet la réduction des dimensions du bioréacteur.
- La réduction de la production de boues. La production d'une faible quantité de boues est le résultat d'un fonctionnement avec des âges de boues importants.

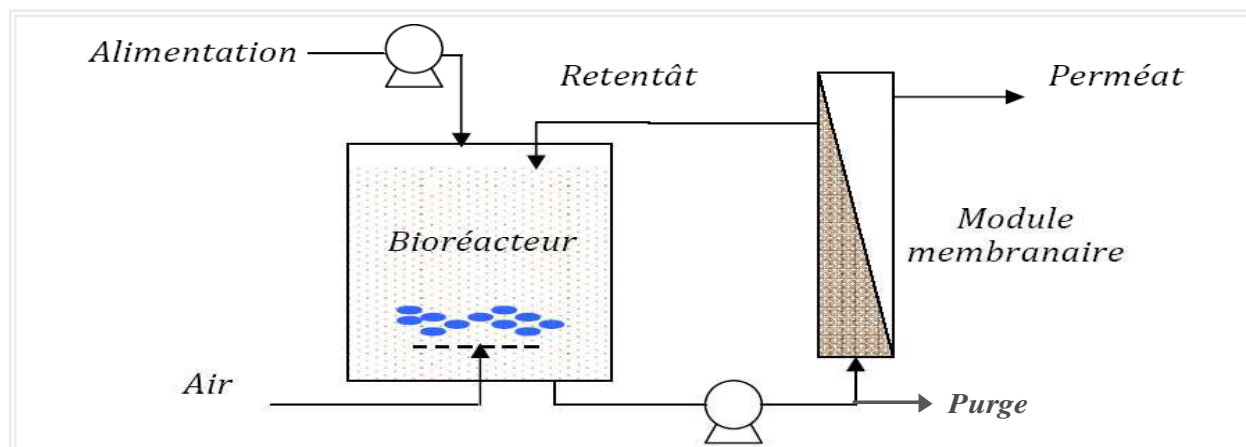


Figure I. 2. Schéma d'un bioréacteur à membrane externe

En général, les caractéristiques pratiques les plus remarquables du bioréacteur à membranes sont d'une part, l'intensification du procédé liée à la réduction des dimensions des installations et d'autre part, l'obtention d'une qualité supérieure de l'effluent. Cependant ce procédé requiert une forte consommation énergétique due à la pression pour réaliser la filtration, un investissement initial important et des coûts considérables d'opérations qui sont plus élevés que pour un système classique à boues activées (Judd, 2006). Etant donné que la biomasse adhère à la surface de la membrane de filtration et forme une deuxième couche filtrante, en réduisant la taille de pores de filtration et en augmentant la résistance à la filtration, le colmatage de membranes est un phénomène assez récurrent dans les bioréacteurs à membranes (Metcalf et Eddy, 2003). Ceci demande des coûts supplémentaires de maintenance/remplacement des membranes.

La production de boues est un point commun de tous les procédés biologiques de traitement d'effluents car la formation de boues biologiques est inhérente à la croissance bactérienne. En France, le traitement d' 1 m^3 d'eaux usées produit entre 350 et 450 grammes de boues (www.suez-environnement.fr). La production de boues issues du traitement des eaux usées domestiques s'est élevée à environ 1100 000 tonnes de matières sèches en 2006 (Ministère de l'écologie (2009), « Recueil de textes sur l'assainissement communal »).

En général, dans une station d'épuration classique, on peut distinguer selon l'origine du traitement, trois types de boues différents (Spinosa et Vesilind, 2001) : (i) les boues du traitement primaire: produites par simple décantation des matières en suspension, (ii) les boues des traitements physico-chimiques contenant les matières organiques particulières ou

colloïdales agglomérées par l'action d'un réactif coagulant, *iii*) les boues du traitement biologique sont retirées des installations afin d'assurer une dynamique de régénération de la masse bactérienne.

De manière générale, les boues en excès qui sont purgées du système contiennent entre 95 et 99 % d'eau des matières organiques et des matières minérales dissoutes ou insolubles. Étant donnée la quantité considérable d'eau, la manipulation de la boue est difficile et l'eau doit être retirée de la boue. Ce conditionnement des boues est coûteux et atteint près de 50 % des coûts totaux d'opération d'une station d'épuration (Spellman, 2009).

Le conditionnement des boues cherche à réduire : 1) le volume de boues, et 2) le pouvoir fermentescible de la boue,

- 1) La réduction du volume implique: (a) l'épaississement de boues, (b) la déshydratation des boues qui peut être soit physique (par traitement thermique entre 150 et 200 °C pendant 30 à 60 min ou par évaporation (lits de séchage)), soit mécanique éliminant l'eau libre et seulement une partie de l'eau liée (par filtration ou par centrifugation) ou soit chimique (ajout des sels de fer ou d'aluminium, de chaux ou de polymères).
- 2) La réduction du pouvoir fermentescible de la boue est obtenue par la stabilisation de la matière organique effectuée, soit par digestion aérobie ou anaérobie (jusqu'à auto-oxydation de la biomasse), soit par stabilisation chimique (avec l'ajout d'oxyde de calcium). Ce procédé peut être placé en amont ou en aval de la déshydratation.

Une fois conditionnées, les boues des stations d'épuration peuvent être dirigées vers plusieurs filières de traitement et de valorisation :

- La valorisation agricole par épandage direct. Les éléments fertilisants (amendement organique, l'azote et le phosphore principalement) sont valorisables sur les champs destinés à l'agriculture. D'après le Ministère de l'écologie, (2009) (« Recueil de textes sur l'assainissement communal »), en France, plus de 60 % de boues produites en 2006 ont été valorisées en agriculture. Les conditions pour l'épandage des boues en agriculture sont dictées par le code de l'environnement afin d'éviter les risques sanitaires qui y sont associés.
- Le compostage où les boues sont mélangées avec des déchets verts, des sciures et des fumiers.
- La méthanisation ou digestion anaérobie. Elle permet une réduction entre 45 et 50 % de la quantité de matière organique de boues (Appels et al., 2008) avec le bénéfice

annexe de production de gaz combustible (biogaz) convertible en électricité. La boue ainsi obtenue est plus facile à valoriser par épandage ou compostage.

- L'incinération qui n'est envisageable qu'à l'échelle des grandes collectivités, constitue la seconde voie d'élimination de boues en France (Ministère de l'écologie, 2009 « Recueil de textes sur l'assainissement communal »).

I.2. LES AGRÉGATS BIOLOGIQUES

Dans les procédés biologiques de traitement des eaux, les microorganismes se développent dans des agrégats biologiques tels que les biofilms et les floccs. Les agrégats biologiques sont des structures microbiennes assez denses. Ils résultent de l'accumulation des microorganismes (procaryotes et eucaryotes), de substances polymériques extracellulaires (EPS), de cations multivalents, de fibres organiques, de particules inorganiques, de colloïdes et de constituants solubles (Wingender et al., 1999). Les bactéries représentent de 5 à 20 % de la partie organique de la boue, tandis que les EPS sont la fraction la plus importante ayant une contribution entre 25 et 70 % de la boue (Nielsen et Jahn, 1999; Frolund et al., 1996).

Différents auteurs ont étudié les floccs de boues des stations d'épuration. Ils ont proposé des représentations qui illustrent globalement la structure et l'organisation des floccs avec ses divers composants (figure I.3). A titre indicatif, trois modèles différents et complémentaires entre eux sont présentés ici :

Le modèle de Jorand et al. (1995) a vérifié les observations réalisées par Li et Ganczarczyk (1989) concernant la présence de diverses fractions constitutives de différentes tailles dans les floccs. Le modèle de Jorand et al. (1995) propose une structure d'organisation du flocc à trois niveaux (figure I.3a) : une fraction organique de petite taille (2,5 μm) « structure primaire ou cellules isolées », une fraction de moyenne taille (13 μm) « colonies microbiennes » et une fraction de grande taille (125 μm) « structure tertiaire ». De plus, ils suggèrent que deux types majoritaires d'EPS existent, le premier qui lie les cellules isolées avec les colonies bactériennes et le deuxième qui rassemble les microorganismes à l'intérieur de colonies

Le modèle de Keiding et Nielsen (1997) considère des bactéries filamenteuses et des fibres organiques comme des éléments servant de squelette rigide aux agrégats (figure I.3b). Les EPS s'agglutinent et entourent les cellules en donnant une stabilité colloïdale aux floes. Une perturbation sur la stabilité colloïdale des boues provoque un relargage d'EPS extérieures tandis que les colonies bactériennes et les structures fibreuses placées à l'intérieur du floe restent intactes.

Le modèle expérimental d'Eriksson et al. (1992) (figure I.3c) repose sur les caractéristiques opérationnelles de la boue dans les stations d'épuration. Ainsi, la structure des floes est fonction de l'âge de boues. A des âges de boues importants, la croissance bactérienne est faible, mais les cellules sont environnées par une matrice d'EPS abondante formant des agrégats bactériens très compacts. Au contraire, à des âges de boue moins importants, la croissance bactérienne est atténuée, mais les cellules sont reliées par peu d'EPS formant des structures fines et allongées. D'après les auteurs, les parties extérieures des floes correspondent aux structures jeunes avec une croissance bactérienne importante tandis que les parties internes des floes sont denses et bien formées. De ce fait, à des âges de boues peu importants, les EPS sont facilement extractibles. Des années plus tard, Wilén et al. (2008a) ont corroboré ces observations. Wilén et al. ont observé par microscopie que les bactéries qui se trouvent à la surface des agrégats sont faiblement reliées à la matrice du floe. Cette liaison peut être dégradée facilement et les cellules peuvent se détacher par l'action de forces de cisaillement. A l'inverse, les parties internes du floe sont reliées plus fortement. De ce fait, elles restent intactes même après avoir été exposées aux contraintes mécaniques.

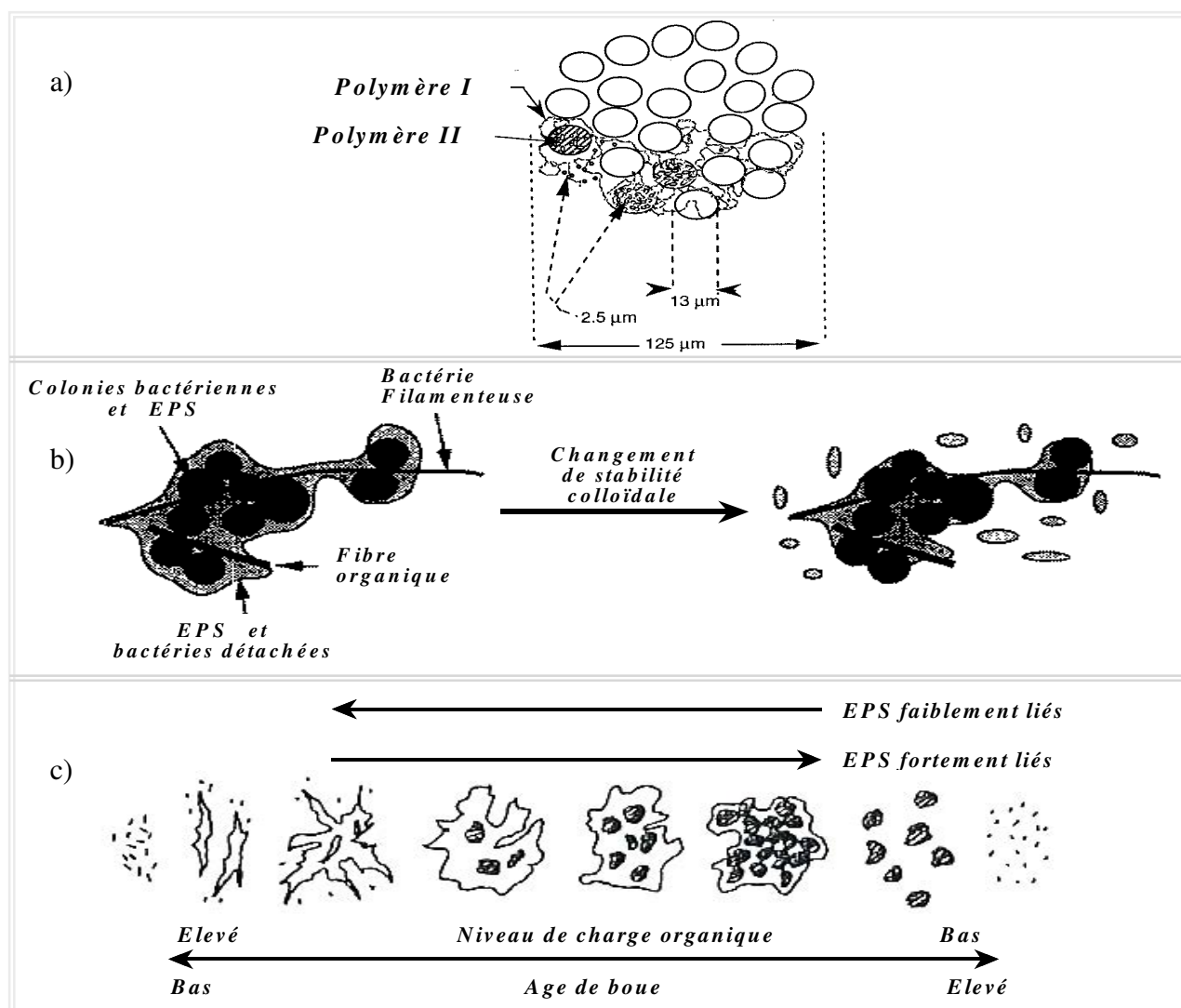


Figure I. 3. Représentation schématique des différents modèles décrivant l'organisation du floc de boues activées. a) Modèle de Jorand et al. (1995), b) Modèle de Keiding et Nielsen (1997), c) Modèle d'Eriksson et al. (1992).

Dans les stations d'épuration, les conditions opérationnelles, la qualité de l'affluent ainsi que les différents procédés physiques, chimiques et biologiques interviennent de manière simultanée pour définir les caractéristiques des flocons. Les caractéristiques de flocons comprennent les propriétés biologiques, les propriétés morphologiques, les propriétés physiques et la composition chimique. La floculation, l'agglomération et la décantation des boues ainsi que la facilité de déshydratation des boues sont le résultat de ces multiples facteurs. Jin et al. (2003) présentent un schéma récapitulatif de ces facteurs (figure I.4).

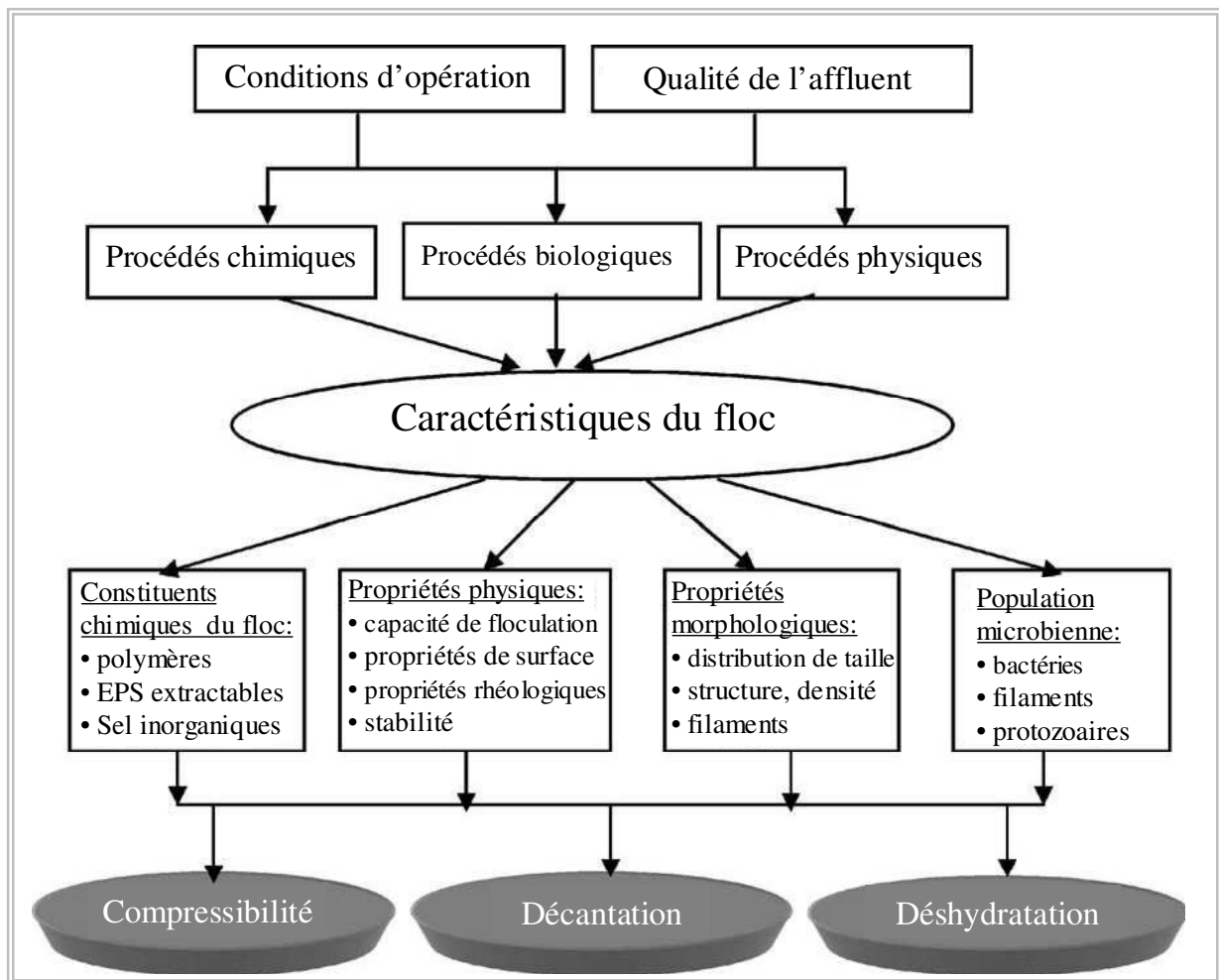


Figure I.4. Schéma des facteurs influençant les caractéristiques des floes [source : Jin et al., 2003].

L'étude de Wilén et al. (2003), réalisée sur sept stations d'épuration, a vérifié que la macrostructure et la morphologie des floes (taille des floes, présence de filaments, densité et forme globale de l'agrégat) sont déterminées par les conditions opérationnelles dans la station d'épuration. Ils ont observé que la structure des floes dans une même station d'épuration reste semblable tandis que les floes provenant de diverses stations présentent des caractéristiques différentes.

Ces observations ont été également confirmées lors de notre étude sur les boues des stations d'épuration. La structure des floes diffère selon les conditions du milieu. La figure I.5 montre des boues de deux stations d'épuration différentes soumises à des conditions opératoires différentes. La figure I.5 (a) montre des floes bien structurés avec de sub-unités fines et denses entrelacées et connectées entre elles. Il s'agit d'une structure aérée qui exhibe des canaux interstitiels. Les floes d'une deuxième station d'épuration (figure b) montrent une présence importante de fibres. Cependant, les unités de biomasse ne se structurent pas dans

l'allongement des fibres. Il s'agit d'unités rondes indépendantes les unes des autres et séparées par de grands espaces occupés par l'eau.

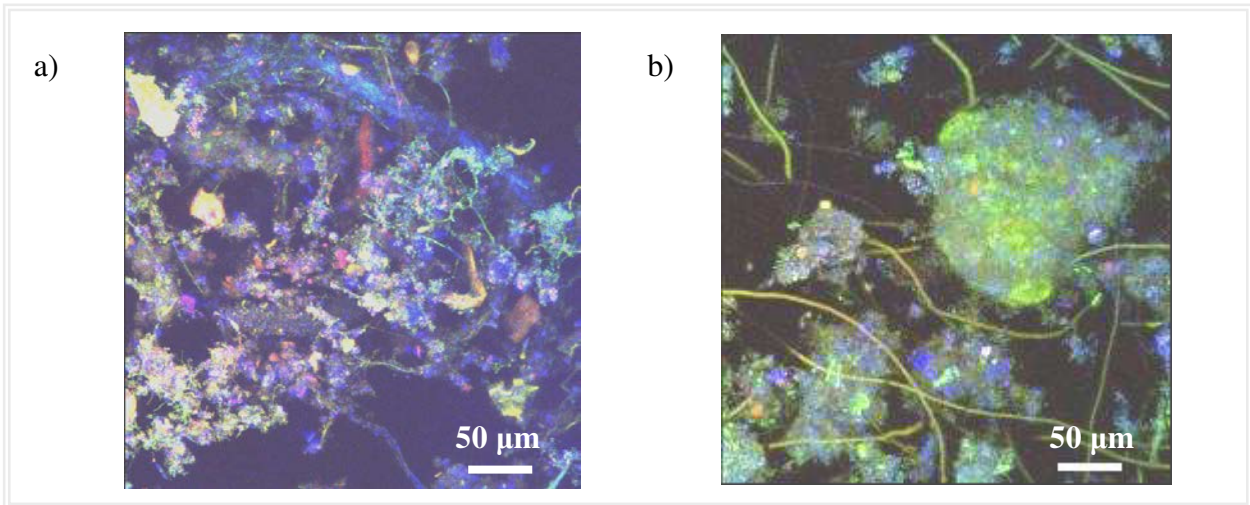


Figure I. 5. Photographie (345 µm x 345 µm) des boues des deux stations d'épuration de papeteries.

Il est connu dans la littérature que l'assemblage de tous les constituants du floc résulte en des structures tridimensionnelles amorphes et poreuses. En effet, l'étude de Li et Ganczarzyk (1990) a montré, par l'analyse de différentes coupes de floccs, que les floccs de boues activées ne présentent aucune uniformité dans leur structuration et ils ont différents niveaux de structuration. La distribution des cellules et des EPS dans la matrice est aléatoire laissant un grand nombre de canaux libres pour l'eau. Ces espaces vides représentent entre 25 à 65 % de la surface totale de la section du floc. Puisqu'il est difficile de décrire, par des géométries simples, la non-homogénéité de ces structures biologiques, les propriétés fractales sont évoquées. Un fractal se définit comme étant un objet de forme irrégulière qui répond à la loi d'autosimilarité quelle que soit l'échelle d'observation. La dimension fractale est la grandeur qui permet de quantifier la tortuosité des objets. La dimension fractale prend en compte la forme et surface des agrégats, la masse et le rayon de giration par rapport au centre de masse des agrégats (Ganczarzyk, 1994). Logan et Wilkinson (1991) ont montré que pour des agrégats de microorganismes cultivés en souche pure, la dimension fractale était fonction du type de microorganisme ou des conditions d'agitation des cultures. Des floccs soumis à des conditions d'agitation élevées ont montré une densité plus forte que ceux obtenus en conditions d'agitation plus douce.

La stabilité des agrégats est déterminée par leur structure et par l'équilibre entre les diverses forces liant les différents constituants du floc ensemble, qui résulte en un arrangement spatial de ces constituants (Nielsen et al., 2004). De manière globale, les agrégats

bactériens ont une charge nette négative à cause des fonctions chimiques de leurs constituants. Les EPS, principal composant des agrégats comportent de polysaccharides exhibant des groupes carboxyliques (tels que les acides uroniques (Frolund et al., 1996)) qui sont des groupes chimiques en général déprotonés au pH des eaux usées (6,5 à 7,5). Les EPS sont également constitués de protéines contenant des groupes carboxyliques contribuant ainsi à la charge globale négative des agrégats (Dignac et al., 1998). De même, les bactéries participent à la charge négative des floccs car leur paroi est essentiellement chargée négativement (Borrok and Fein, 2005). Ces caractéristiques chimiques particulières permettent aux agrégats d'établir des liaisons avec des cations. Les cations divalents, notamment Ca^{2+} , jouent un rôle important dans l'agrégation des floccs. Afin d'expliquer les mécanismes d'interaction par lesquels les cations influencent l'agrégation des floccs, trois théories ont été proposées :

i) La théorie de la double couche (DLVO) (Derjaguin et Landau, 1941 ; Verwey et Overbeek, 1948). Initialement, elle a été proposée pour décrire les particules colloïdales mais elle a été aussi adoptée dans différentes études pour expliquer des interactions entre les agrégats biologiques (Tatulian et al., 1991 ; Zita et Hermansson, 1994). La théorie DLVO décrit les particules comme des objets ayant une double couche de contre-ions. La première couche (couche de Stern) est fortement chargée de contre-ions tandis que la deuxième couche est plus diffuse. En effet, la concentration d'ions de la deuxième couche diminue en fonction de la distance jusqu'à atteindre la concentration de la solution (Adamson, 1990). Cette double couche ionique en mouvement génère un potentiel électrostatique ou potentiel Zeta qui est à l'origine de la répulsion entre particules de même charge. L'interaction nette entre deux surfaces dépend de la distance entre elles et est la résultante entre les forces d'attraction de Van der Waals et les forces de répulsion électrostatiques. Trois situations peuvent se présenter en fonction de la concentration ionique du milieu :

(1) A forte charge ionique, l'attraction entre les particules est favorisée, sans tenir compte de leur distance, grâce à la compression de la double couche. (2) A des concentrations ioniques intermédiaires, l'attraction entre particules peut être réversible et dépend de la distance entre elles, (3) A faible charge ionique, indépendamment de la distance de séparation, deux particules se repoussent.

ii) La théorie de l'alginate (proposée par Bruus et al., 1992). L'alginate est un polysaccharide (acides mannuronique et guluronique) produit par différentes souches bactériennes pour former un gel. L'agrégation de cette matrice gélose dépend de la

présence des ions Ca^{2+} . Sanin et Vesilind (1996) ont confirmé l'agrégation, en présence de Ca^{2+} , de boues synthétiques constituées d'alginate.

iii) La théorie du pontage par des cations divalents (McKinney, 1952 ; Tezuka, 1969). Les cations divalents établissent des pontages avec les charges négatives des agrégats biologiques notamment des EPS. Cette théorie est appuyée par différents travaux démontrant le déplacement des cations divalents par l'action de monovalents (Na^+ , K^+) provoquant ainsi la désagrégation des floccs. Higgins et Novak (1997) ont observé la détérioration des floccs quand la quantité de cations monovalents dépasse de deux fois la quantité de divalents.

Zita et Hermansson (1994) ont conclu que, sur des boues provenant des stations d'épuration, la théorie DLVO est seulement valable à des forces ioniques inférieures à 0,05 M (ce qui n'est pratiquement jamais le cas) tandis qu'à des forces ioniques plus élevées, la théorie est insuffisante car les auteurs ont constaté la déstabilisation des floccs avec la libération de cellules. Ils ont également observé l'augmentation de la turbidité des effluents avec l'augmentation des cations (K^+), cependant sans relargage apparent des ions Ca^{2+} . Sobeck et Higgins (2002) ont analysé l'applicabilité des trois théories sur des boues issues d'un réacteur pilote avec une alimentation synthétique. Ils ont conclu que la théorie de pontage par des cations divalents décrit mieux le rôle des cations sur les agrégats biologiques. En effet, la théorie DLVO n'établit pas des différences entre les cations monovalents et divalents. L'ajout de cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) contribue à la stabilité des floccs tandis que l'augmentation de cations monovalents (Na^+) se fait au détriment de la structure des floccs.

I.3. RÔLE DES MICROORGANISMES ET ACTIVITÉ MICROBIENNE

Les microorganismes jouent des rôles vitaux dans les écosystèmes en tant que producteurs primaires, décomposeurs et consommateurs primaires (Figure I.6). Les producteurs primaires fixent le carbone en utilisant la lumière ou l'énergie chimique. Comme résultat, les composés minéraux sont transformés par les producteurs primaires en des substances utilisables pour les consommateurs primaires.

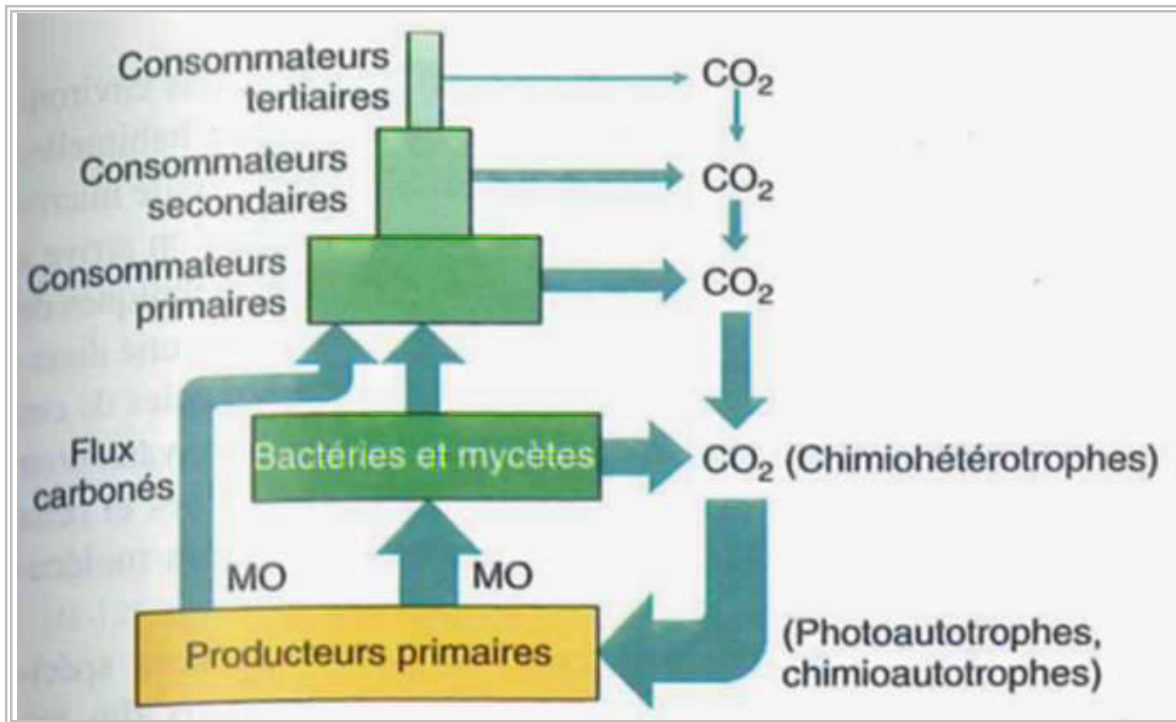


Figure I.6. Rôle de microorganismes dans les écosystèmes [source : Prescott et al., 2003]

Les microorganismes assurant la transformation de la matière en différents composés utilisables, sont de deux types (figure I.7) : les eucaryotes qui possèdent une structure cellulaire évoluée (protozoaires, métazoaires et champignons) (Jenkins et al., 1993) et les procaryotes (les bactéries) qui sont des microorganismes physiologiquement plus simples mais qui sont, en même temps, les plus nombreux dans les boues activées (Wagner et al., 1993).

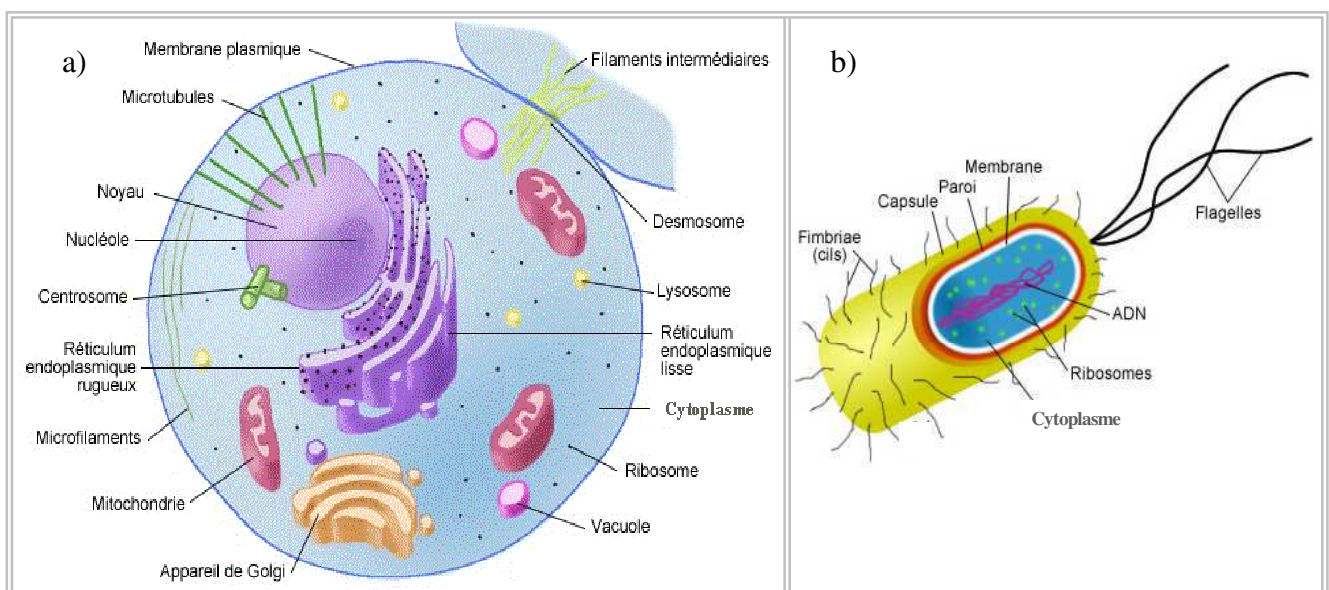


Figure I.7. Représentation d'une cellule a) eucaryote, et b) procaryote [source : Prescott et al., 2003]

Les **eucaryotes** sont des microorganismes de structure cellulaire complexe (figure I.7a). Ils possèdent une membrane nucléaire bien définie. Les cellules eucaryotes contiennent des organites qui présentent des fonctions spécifiques et différentes. Ces organites sont, pour la plus part, entourés d'une membrane qui rend possible le déroulement de fonctions biologiques et physiologiques dans des compartiments séparés et qui facilite une coordination indépendante des fonctions. Le matériel génétique est enfermé et protégé dans le noyau. Les cellules eucaryotes contiennent un système interne élaboré, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ils permettent, respectivement, le transport des substances vers l'extérieur et la maturation de protéines et lipides synthétisées à l'intérieur de la cellule (Prescott et al., 2003).

Dans le cas de boues activées, les microorganismes les plus typiques sont les protozoaires (unicellulaires) et les métazoaires (pluricellulaires). Les champignons se trouvent rarement dans les boues activées traditionnelles (Jenkins et al., 1993).

Les **procaryotes** (bactéries) possèdent une structure simple sans vrai noyau (figure I.7b). Les bactéries sont dépourvues des organites délimités par une membrane. Ces cellules sont petites avec des tailles qui vont de 1 à 5 μm . Par contre, leur reproduction est très rapide et leur division cellulaire est précédée par un simple repiquage de la molécule d'ADN. La synthèse des protéines a lieu au niveau des ribosomes. Les ribosomes internes synthétisent les protéines intracellulaires et les ribosomes liés à la membrane plasmique fabriquent les protéines qui sont exportées. La membrane plasmique entoure le matériel intracellulaire, elle sert de barrière perméable sélective laissant passer des ions et des molécules vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule et empêchant d'autres d'entrer ou de sortir. La membrane contient des molécules réceptrices spéciales qui permettent à la bactérie de détecter et de répondre à des substances chimiques présentes dans l'environnement. La paroi cellulaire est placée à l'extérieur de la membrane plasmique et donne la forme à la cellule. Elle protège la cellule contre l'éclatement et contre les substances toxiques externes. Les différences retrouvées au niveau de la paroi cellulaire, entre diverses bactéries, sont un critère de classification. Des bactéries ayant une membrane épaisse sont connues comme gram positives (gram +). La paroi des bactéries gram+ est formée d'une seule couche homogène (couche de peptidoglycane) avec une épaisseur entre 20 et 80 nm. Cette paroi épaisse rend les bactéries gram+ plus résistantes contre les agressions externes. Au contraire les bactéries ayant une paroi cellulaire plus fine appelées gram négatives (gram -) sont plus sensibles aux agressions. Leur paroi

cellulaire comporte deux couches, une première couche de peptidoglycane d'une épaisseur de 2 à 7 nm et une membrane externe de 7 à 8 nm d'épaisseur (Prescott et al., 2003).

Les transformations biochimiques et énergétiques assurées par les cellules (eucaryotes et procaryotes) constituent le métabolisme bactérien. On distingue deux catégories de métabolismes (Prescott et al., 2003) :

- Le métabolisme de synthèse (anabolisme) : il permet à l'organisme d'élaborer les substances de structure, de réserve et de catalyse enzymatique y compris les substances polymériques extracellulaires.
- Le métabolisme énergétique (catabolisme) : l'organisme produit l'énergie nécessaire à l'anabolisme grâce à des réactions exo énergétiques de dégradations des nutriments ou des substances de réserve riches en énergie chimique potentielle.

Afin d'effectuer ces fonctions cellulaires fondamentales et d'assurer la synthèse du nouveau matériel cellulaire, les microorganismes (eucaryotes ou procaryotes) ont besoin des sources d'énergie, telles que le carbone, des nutriments organiques et inorganiques. Le carbone peut provenir d'une source organique ou du dioxyde de carbone. En fonction de leur source de carbone, les cellules sont classées en : autotrophes ou hétérotrophes.

- 1) Les organismes **autotrophes** sont capables d'effectuer la synthèse des composés essentiels en assimilant le carbone inorganique (CO_2 , HCO_3^-) en présence de certains sels minéraux, l'azote ammoniacal ou nitrique (pour la synthèse des acides aminés et des protéines) et les phosphates (constituant de l'ADN, de l'ARN). La conversion du dioxyde de carbone en carbone cellulaire nécessite des processus de réduction avec une demande d'énergie importante. Les autotrophes dépendent donc d'une quantité élevée d'énergie pour cette transformation en réduisant l'énergie nécessaire à leur croissance. De ce fait, le taux de croissance des autotrophes est plus faible que celui des hétérotrophes (Metcalf et Eddy, 2003). Les nitrifiantes du genre *Nitrosomonas* oxydent l'ammonium en nitrites, et du genre *Nitrobacter* transforment les nitrites en nitrates. Ces bactéries sont généralement aérobies.
- 2) Les espèces **hétérotrophes** ne peuvent s'alimenter qu'avec de la matière organique déjà élaborée par des autotrophes ou d'autres hétérotrophes. Au cours du catabolisme, ce substrat est scindé en molécules plus simples qui sont ensuite oxydées pour fournir l'énergie nécessaire à l'anabolisme. Ce sont des réactions d'oxydo-réduction qui se font en milieu aérobie ou en milieu anaérobie.

Dans le cas des agrégats microbiens des boues activées dans les stations d'épuration, Losick et Kaiser (1997) proposent de considérer les bactéries, non comme des cellules individuelles, mais plutôt de considérer la population bactérienne comme un organisme avec une organisation propre et une coopération entre les cellules (autotrophes et hétérotrophes) pour le développement de la communauté. En effet, certaines activités accomplies par le consortium bactérien ne peuvent pas être effectuées par des populations de souches pures. D'après Lappin-Scott et Costerton (2003), un exemple typique de ce fait est l'utilisation des molécules récalcitrantes comme source d'énergie par le consortium bactérien. Cependant, ces mêmes molécules sont très résistantes à la dégradation par des espèces pures. Les microorganismes maximisent leurs capacités métaboliques à travers la coopération mutuelle entre les différentes populations d'un même habitat. Ainsi chaque individu contribue à la maintenance intégrale du système ainsi qu'à sa propre survie.

I.3.1. DÉGRADATION DE LA POLLUTION ORGANIQUE DES EAUX USEES

La pollution organique présente dans les eaux usées est transformée/dégradée en composés inorganiques (CO_2 , NO_3^- , NO_2^- , CH_4^+ , H_2) par des processus biologiques. Deux types de pollution organique se distinguent :

- La pollution primaire: pollution carbonée, azotée et phosphorée,
- La pollution secondaire ou micro-pollution: substances contenues dans les eaux usées à des concentrations relativement faibles de l'ordre de ng et $\mu\text{g/L}$.

L'utilisation de la pollution primaire comme source d'énergie au métabolisme microbien est présentée dans cette section. La dégradation biologique des micro-polluants (pollution secondaire), notamment les composés pharmaceutiques, sera abordée dans la section I.4.

La pollution primaire peut être classée en éléments majeurs (le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote), en éléments mineurs (le phosphore, le potassium, le sulfure et le magnésium), en vitamines et hormones, et en éléments traces ou oligoéléments (Co, Fe, Ni...) (Metcalf et Eddy, 2003).

a) Pollution carbonée

Le carbone organique (huile, graisses, tensioactifs...) est généralement la pollution principale à éliminer ; le carbone est également le principal constituant de la biomasse. Afin de suivre l'élimination du carbone lors de l'épuration des eaux usées, les paramètres listés ci-dessous sont utilisés comme indicateurs (APHA et al., 2005) :

- i)* Le carbone organique total (COT). Cette mesure inclut tout le carbone qu'il soit ou non utilisable par les microorganismes. Le dosage du COT est réalisé en oxydant la matière organique d'un échantillon, à haute température, en présence d'oxygène. Le résultat correspond à la mesure du CO₂ formé.
- ii)* Le carbone chimiquement oxydable ou demande chimique en oxygène (DCO). La mesure correspond à la quantité de l'agent oxydant (bichromate de potassium) nécessaire pour oxyder la matière organique (biodegradable ou non biodegradable). Le résultat est exprimé en quantité d'équivalent d'oxygène. La réaction est effectuée à des conditions d'haute température et en milieu acide.
- iii)* La demande biochimique en oxygène (DBO). Cette mesure indique la quantité d'oxygène utilisée par les microorganismes pour l'oxydation du carbone biodégradable contenu dans l'échantillon. Il s'agit d'une digestion de boues pendant plusieurs jours (5 jours habituellement) à des conditions contrôlées (absence de luminosité, à 20°C et en présence de solutions salines : sulfate de magnésium, chlorure de calcium, sulfite de sodium, solution de glucose et acide glutamique et un inhibiteur de la nitrification).

b) Pollution azotée

Selon la littérature, chaque personne produit 13,3 g d'azote par jour qui sont rejetés dans les égouts (Hellström, 2003). La majeure partie de cet azote provient de l'urine (80 %), des matières fécales (13 %) et des eaux issue des usages domestiques (7 %). Cet azote est hydrolysé, au cours du séjour dans le réseau d'égouts, en ammoniacque et en azote organique. Pratiquement toutes les sources d'azote (organique et inorganique) sont métabolisées par les bactéries épuratrices pour la synthèse essentielle des protéines, des acides nucléiques et des polymères constituant la paroi cellulaire.

Le traitement de l'azote comporte deux processus: la nitrification et la dénitrification.

- La nitrification correspond à l'oxydation de l'ammonium (NH_4^+) en nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-) en milieu aérobie. La population bactérienne impliquée est autotrophe et utilise uniquement des sources de carbone d'origine minérale pour sa croissance (Wanner, 1994).
- La dénitrification indique la transformation des nitrates (NO_3^-) en azote gazeux (N_2) à des conditions d'absence d'oxygène libre. La population hétérotrophe est impliquée en se développant à partir d'une source de carbone organique (Boëglin, 1998).

D'après Burdman et al. (2000), la relation carbone/azote joue un rôle important dans les propriétés d'agrégation des microorganismes. Un rapport élevé carbone/azote améliore l'agrégation tandis qu'un rapport faible induit la dispersion cellulaire dans les floccs des boues des stations d'épuration.

c) Pollution phosphorée

Le phosphore est présent dans les eaux usées sous forme de phosphates (PO_4^{3-}), polyphosphate ou de phosphore organique (Henze et al., 2002). Le phosphore contenu dans les eaux usées provient principalement du métabolisme humain ; les lessives et différentes charges minérales peuvent également apporter mais dans une moindre mesure. Dans les stations d'épuration, ce phosphore est utilisé par la biomasse pour être incorporé essentiellement dans les acides nucléiques, les phospholipides et les polymères des parois bactériennes. Dans certains cas, le phosphore peut aussi être stocké dans les cellules.

L'élimination du phosphore par voie biologique repose sur deux phases : la phase anaérobie et la phase aérobie.

- La phase anaérobie : dans cette phase les microorganismes aérobies faisant la respiration anaérobie, libèrent du phosphore dans le milieu et accumulent des réserves d'énergie (polyhydroxybutyrate).
- La phase aérobie : les microorganismes sous des conditions aérobies réabsorbent le phosphore libéré, et en plus, absorbent une quantité de phosphore présent dans le milieu. Cette absorption est réalisée en parallèle à l'hydrolyse de la réserve de polyhydroxybutyrate.

Globalement, les cellules absorbent plus de phosphore qu'elles n'en libèrent vers le milieu. La succession de phases anaérobie-aérobie permet d'obtenir une accumulation

progressive du phosphore dans les boues des stations d'épuration. Les valeurs d'accumulation peuvent atteindre jusqu'à 10 % de poids sec de la biomasse (Henze et al., 2002). Puisque l'élimination biologique du phosphore est limitée, il est souvent nécessaire d'envisager des solutions complémentaires de type physico-chimique pour éliminer le phosphore restant. En général, ces procédés physico-chimiques recourent à la précipitation du phosphore par des sels de Fer/Al.

I.3.2. LES SUBSTANCES POLYMÉRIQUES EXTRACELLULAIRES (EPS)

I.3.2.1. Origine et description

La présence d'EPS dans les boues des stations d'épuration est le résultat de différents processus: sécrétion, libération du matériel cellulaire, lyse cellulaire et adsorption des substances du milieu (Flemming et Leis, 2001).

La production des EPS est une propriété générale de microorganismes procaryotes (bactéries) et aussi des eucaryotes (espèces fongiques) qui habitent en communauté. Les bactéries isolées et les cultures de souches pures perdent la capacité à produire des EPS comparée aux cellules d'un consortium bactérien. Selon Costerton et al. (1987), la production des EPS par des souches pures ne confère aucun avantage sélectif à l'espèce impliquée tandis que dans des situations de compétitivité multi-espèces, la production des EPS devient essentielle afin d'assurer la survie d'une population. Les bactéries produisent des EPS pour leur survie et en réponse au stress environnemental. Les EPS, constituant des agrégats microbiens, forment une matrice tridimensionnelle assez hydratée et chargée dans laquelle les microorganismes sont enveloppés. Cette matrice est aussi constituée des fibres organiques et des particules organiques et inorganiques (Laspidou and Rittmann, 2002). Différentes études ont montré l'importance des EPS sur les propriétés de surface, sur la taille des floccs et sur la charge ionique des agrégats (Mikkelsen et Keiding, 2002 ; Sponza, 2003).

Les EPS sont composées de 75 à 90 % de polysaccharides et protéines avec des petites quantités de lipides, ADN et ARN. Ces composés peuvent être présents à l'état pur ou en liaison avec différents groupes fonctionnels. Souvent les protéines sont associées avec des oligosaccharides pour former les glycoprotéines ou avec des acides gras pour former des lipoprotéines (Wingender et al., 1999). Les tailles molaires des EPS vont de quelques centaines à des centaines de milles de Daltons (Garnier et al., 2005).

En général, les polymères qui se trouvent à l'extérieur de la paroi cellulaire et qui ne sont pas directement ancrés dans la membrane extérieure sont considérés comme des substances polymériques extracellulaires EPS.

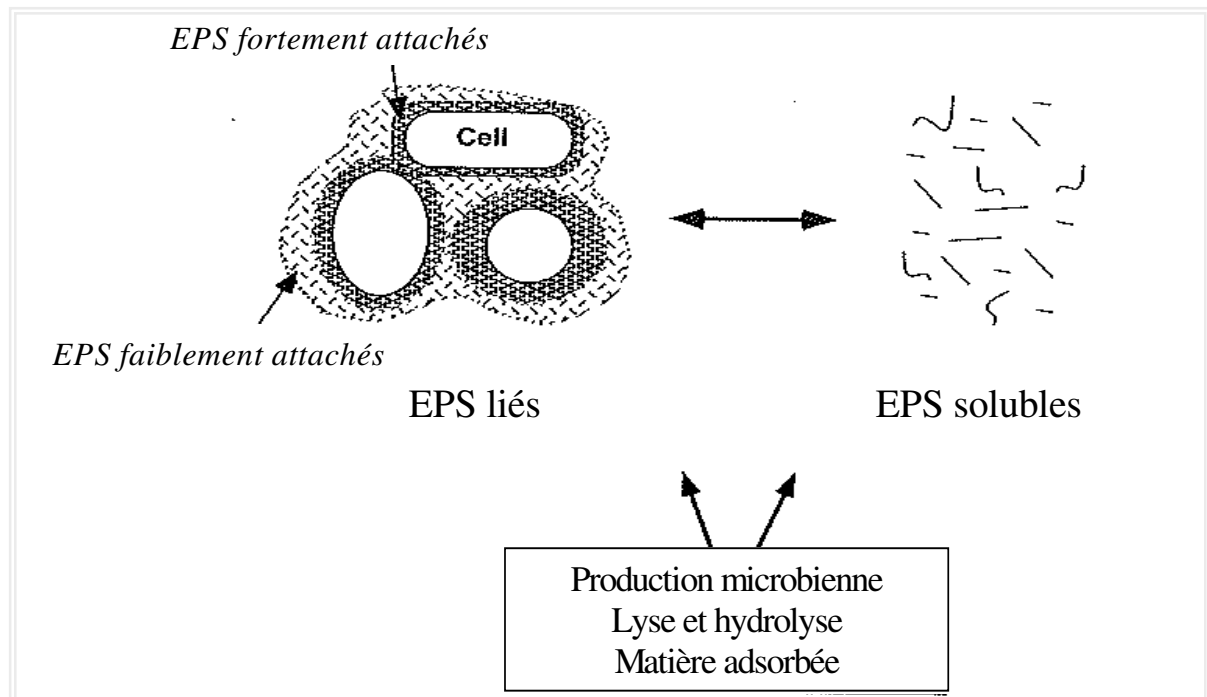


Figure I. 8. Représentation des EPS liés et des EPS solubles [source: Nielsen et Jahn, 1999].

Dans la figure I. 8., on peut distinguer deux classes d'EPS (Laspidou et Rittmann, 2002; Barker et Stuckey, 1999):

- i) Les EPS liés: polymères capsulaires (substances fortement liées aux cellules) ainsi que les substances visqueuses plus faiblement liées qui entourent les cellules (slime EPS) (c.f. review de Liu et Fang (2003) qui regroupe près de 200 travaux). Parmi les EPS liés, ceux qui sont associés à la surface cellulaire de microorganismes sont connus sous le terme de « Glycocalix ». Celui-ci comprend également la capsule qui est une structure extérieure entourant les cellules et qui est de constitution principalement polysaccharidique. Puisque le Glycocalix est très fortement hydraté (jusqu'à 99 % de sa masse correspond à l'eau), il s'écroule sous des conditions de déshydratation (Costerton et al., 1992).
- ii) Les substances solubles: macromolécules solubles et colloïdales présentes dans la liqueur. Ces molécules contribuent à la DCO et la DBO soluble (Rittmann et McCarty, 2001). D'après Hsieh et al. (1994), les substances solubles sont relarguées soit par dissolution soit par hydrolyse, à partir de la fraction d'EPS liés dans les boues vers la

phase liquide. Ces substances solubles sont aussi utilisées comme nutriments par les cellules (c.f. review de Barker et Stuckey (1999) qui regroupe 120 travaux).

L'étude séparée de ces deux classes d'EPS a été, pendant plusieurs années, la tendance générale de tous les travaux, car l'investigation de chaque classe d'EPS a une orientation particulière.

La matrice des floccs (ou des biofilms) constitue le point d'appui de l'étude sur les EPS liés. Ceci se justifie par la proximité des cellules et les EPS liés. En effet, la croissance bactérienne et la production des EPS liés sont étroitement corrélées. Les études sur les EPS liés se sont concentrées sur les caractéristiques des floccs/biofilm afin d'examiner l'incidence que les EPS liés exercent sur l'agglomération de la matière, sur les propriétés de surface des agrégats, sur la distribution de charges, et sur le pontage entre les cations et les charges négatives des EPS. Au contraire, les études concernant les substances solubles reposent sur l'estimation de la qualité de l'effluent et sur la contribution de ces substances à la DCO et à la DBO. Laspidou et Rittmann (2002) ont proposé l'unification de ces deux branches d'études. Selon les auteurs un équilibre dans la phase liquide entre la concentration des substrats et les substances solubles d'origine microbienne est établi. Les modifications de cet équilibre sont principalement dues à la libération des substances liées. Les EPS solubles sont produits par l'hydrolyse de macromolécules contenues dans les boues et de la lyse cellulaire. L'interconnexion de ces deux types d'EPS permet donc d'expliquer le métabolisme cellulaire et l'activité microbienne d'épuration.

Dans notre cas, la présente étude aborde l'analyse des EPS avec une vue d'ensemble intégrale qui regroupe à la fois, l'analyse des substances solubles et des EPS liés. Ceci nous a permis d'avoir une vision locale (floccs) et globale (liqueur mixte) des substances extracellulaires.

Les EPS liés dans les floccs sont principalement responsables de la structure et de l'intégralité des agrégats biologiques. Ils remplissent les espaces intracellulaires à l'intérieur des micro-colonies contribuant à la formation des agglomérats. De ce fait, ils constituent « la maison des microorganismes » (Flemming et Wingender, 2001).

Puisque les EPS constituent la fraction la plus dominante de la boue, ils déterminent les propriétés physico-chimiques et biologiques des floccs (Nielsen et Jahn, 1999; Urbain et al, 1993). Selon Dignac et al. (1998), les protéines, en particulier, ont un rôle très important dans

la structuration de floccs car elles sont fortement impliquées dans les liaisons électrostatiques avec les cations multivalents, ainsi que dans les liaisons hydrophobes des agrégats. Les protéines ont la particularité de piéger dans leur structure des molécules organiques et inorganiques. Certaines protéines extracellulaires constituent les enzymes capables d'hydrolyser la matière organique adsorbée dans les floccs. Selon Nielsen et al. (1997) la présence de protéines est fonction du temps de rétention de la boue dans les systèmes de traitement. D'après Sutherland (1999), les polysaccharides interviennent également dans l'intégralité du flocc du fait qu'une grande partie d'entre eux adoptent une double configuration hélicoïdale qui définit la structure du flocc. De plus, les polysaccharides ont une grande capacité à constituer des matrices adhésives autour des cellules et de participer à l'adhésion entre les cellules. La sécrétion de polysaccharides a été constatée dans les systèmes fonctionnant sous stress (Davey et O'Toole, 2000).

La composition des EPS semble dépendre de leur fonction dans l'agrégat. Les EPS constituant la surface des agrégats et exposés à des contraintes environnementales importantes montrent une composition différente de ceux contenus à l'intérieur des agrégats (Wolfaardt et al., 1999). De plus, la production de certains types d'EPS à différentes phases de la croissance bactérienne laisse penser qu'ils exercent différentes fonctionnalités. Les EPS capsulaires par exemple, sont préférentiellement produits pendant la phase logarithmique de croissance bactérienne tandis que les EPS extérieurs à la capsule sont produits pendant la phase stationnaire de croissance (Decho et Lopez, 1993). Les fonctions principales attribuées aux EPS ont été énumérées par Wingender et al. (1999). Ces fonctions sont:

- Barrière de protection des bactéries contre les agressions extérieures. Résistance à des hôtes, à des biocides (incluant désinfectants et antibiotiques), protection contre les effets nuisibles de l'oxygène. Sutherland (1999) décrit le rôle des polysaccharides capsulaires comme étant une barrière de protection aux cellules. En effet, dans les biofilms contenant des microorganismes pathogènes, la capsule des cellules les protège contre leurs agresseurs et augmente la résistance des anti-corps.
- Rétention de l'eau. Afin de garantir les conditions appropriées pour la survie de microorganismes, les polymères extracellulaires préviennent la dessiccation de cellules (Ophir et Gutnick, 1994).
- Organisation spatiale influençant la décantation des boues. La distribution spatiale dépend de la fonction spécifique de chaque composé.

- Agrégation des cellules, formation des floccs et des biofilms. Liaison entre cellules et particules inorganiques piégées du milieu. Site de développement et immobilisation de grandes densités bactériennes.
- Endroit de communication et de reconnaissance entre cellules. D'après Wolfaardt et al. (1999), les EPS contribuent à la communication et à la reconnaissance intracellulaire car ils servent de matériel adhésif entre les cellules et ils participent à l'implantation des micro-environnements appropriés à la vie microbienne dans un consortium bactérien.
- Adhésion aux surfaces et colonisation des surfaces. D'après Sand et Gehrke (1999), les besoins d'adhérence et la quantité de substrat disponible régulent la production d'EPS par les cellules. Ainsi, sur des surfaces solides sulfuriques, de grandes quantités d'EPS ont été produites tandis qu'en présence des composés sulfuriques dissous, une plus faible quantité d'EPS a été formée. Dans le cas de surfaces minérales, l'étude de Sand et Gehrke a montré que les interactions électrostatiques entre certains EPS et les surfaces du minéraux sont à l'origine de l'adhérence des EPS aux surfaces de pyrite.
- Réserve de nutriments. On peut distinguer deux mécanismes différents pour expliquer la participation des EPS dans la réserve de nutriments : (i) la production d'EPS est une réserve de nutriments. Il a été observé que certaines espèces bactériennes ont l'habilité de réutiliser ses propres EPS (Wingender et al., 1999), (ii) les EPS sont utilisés pour l'accumulation des nutriments. En effet, la propriété adhésive des EPS favorise la rétention des particules (Wingender et al., 1999).

Pour toutes ces fonctions, les polymères biologiques reflètent d'un côté, le « bien-être » bactérien et d'un autre côté, la réponse des bactéries aux conditions du milieu en fonctionnement normal ou sous stress.

Certaines molécules d'EPS sont bien connues pour provoquer la corrosion des métaux. En effet, elles facilitent l'adhérence bactérienne aux surfaces métalliques. Les EPS sont essentiels dans l'interaction bactérienne avec le substrat grâce à leurs interactions hydrophobes ou électrostatiques et parce qu'ils garantissent également la présence des agents oxydants. Beech et al. (1996) suggèrent que certains EPS ont une affinité très élevée pour les ions ferreux ce qui explique leur adhérence aux surfaces métalliques. D'après Sand et Gehrke (1999) certaines bactéries oxydent les sulfures insolubles dans les surfaces métalliques afin d'obtenir de l'énergie nécessaire au métabolisme bactérien. Les produits finaux de ces réactions sont l'acide sulfurique et des ions métalliques solubilisés. Ce procédé continue jusqu'à la décomposition totale du métal.

Dans le cas des agrégats en suspension, les EPS sont également impliqués dans l'adsorption de métaux lourds car ils possèdent une capacité intrinsèque d'adsorption des cations. Ceci est applicable aux métaux tels que le Cd, Zn, Pb, Cu et Sr (Sutherland, 1999).

I.3.2.2. Rôle des EPS dans le procédé de traitement des eaux usées

L'agrégation entre les floccs bactériens est favorisée par différents types d'interactions. Ces interactions correspondent aux forces décrites par la théorie DLVO (Zita et Hermansson, 1994), aux liaisons établies par les polymères extracellulaires (Flemming et Leis, 2001), aux pontages par des cations multivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{3+}) (Keiding et Nielsen, 1997) et aux interactions hydrophobes (Urbain et al., 1993). L'importance de la matrice polymérique sur les différentes étapes du procédé de traitement des eaux usées (**biofloculation, décantation et déshydratation des boues**) a été examinée dans différentes études.

Bien que l'influence des EPS sur la structuration des floccs ait été souvent étudiée, les résultats montrent une grande controverse due à la complexité de la nature des agrégats. La nature des agrégats varie en fonction de multiples facteurs dans les stations d'épuration. Les tendances générales rapportées dans les différentes études sont résumées ci-dessous :

L'incidence des EPS sur les procédés de floculation, décantation et déshydratation a été étudié par Bala et al. (2010). Les EPS produits par différentes souches bactériennes ont été examinés en termes de leur capacité à faire flocculer des particules de kaolin et de favoriser la décantation et déshydratation des boues biologiques. Cette étude a confirmé l'augmentation de la capacité de floculation des particules en présence des EPS de type "slime EPS". Ce type d'EPS a notamment amélioré la décantation des boues urbaines permettant d'obtenir dans tous les cas des valeurs de SVI inférieures à 150 mL/g. Egalement, la déshydratation de boues a été améliorée avec une diminution significative du temps de filtration des boues, en présence de "slime EPS". Ce type d'EPS est produit par certaines souches bactériennes. Ceci suggère que les bactéries produisent une diversité des EPS ayant des caractéristiques différentes avec des implications dans la floculation, sédimentation et déshydratation des boues.

Li et Yang (2007) ont associé les différentes caractéristiques des EPS, pour la floculation, décantation et déshydratation des boues, aux substrats administrés. L'étude de Sponza (2003) a comparé les résultats obtenus sur cinq réacteurs pilotes alimenté chacun avec de l'eau provenant, d'une station urbaine, d'une papeterie, d'une industrie textile, d'une industrie pétrochimique et d'un vignoble. Une faible valeur de l'indice de décantation (SVI)

indiquant une bonne décantation, a été associée avec une quantité importante des EPS spécialement des protéines. D'après Zhang et al. (2007a), les protéines constituant les EPS jouent un rôle primordial dans la formation des granulés biologiques dans un bioréacteur batch. D'autres études comme celle de Wilén et al. (2008b), au contraire, ont montré que une forte concentration de protéines dans les floccs a été liée avec une mauvaise séparation entre la boue et l'eau épurée.

Liao et al. (2001) ont montré que l'augmentation de la concentration des EPS dans les boues a induit une diminution de la qualité de la décantation des boues. Par contre, la floculation de boues n'a pas été modifiée par la variation de la concentration des EPS.

En conclusion, des tendances générales sur l'implication et la responsabilité des EPS dans la décantation de boues ne peuvent pas être posées et le sujet reste toujours en débat (Liu et Fang, 2003, revue qui regroupe près de 200 publications).

Concernant la **déshydratation** des boues, Vesilind (1997) classe l'eau contenue dans les boues en différents groupes: *i*) libre, l'eau qui peut être retirée simplement par décantation; *ii*) interstitielle liée, une partie est enlevée par déshydratation mécanique *iii*) « vicinale », l'eau associée aux agglomérats; *iv*) l'eau liée d'hydratation, l'eau associée chimiquement aux agglomérats, elle est retirée seulement par séchage thermique (Colin et Gazbar, 1995).

Le conditionnement chimique des boues (par des cations inorganiques ou par des polymères cationiques) est une des stratégies fréquemment mise en œuvre pour la déshydratation mécanique des boues. Cependant, cette technique permet d'enlever, au maximum, 50 % de l'eau contenue dans les boues (United States Patent No. 3772191). Les problèmes de déshydratation sont dus au fait que l'eau est fortement retenue dans les boues par les EPS (Sutherland, 2001). D'après Flemming (1996), il existe deux types d'interactions entre les molécules de l'eau et les polymères EPS : *(i)* Les interactions électrostatiques qui sont des interactions actives grâce à la présence des dipôles permanents des molécules de l'eau et des dipôles induits dans les groupes fonctionnels des EPS. *(ii)* Les liaisons hydrogènes : liaisons établies entre les molécules d'eau et les groupes hydroxyles des EPS (particulièrement présents dans les polysaccharides). De plus, les liaisons hydrogènes contribuent à la structure tertiaire de protéines.

La déshydratation de boues est une opération nécessaire, dans la gestion d'une station d'épuration, pour le transport de boues, leur épandage ou leur incinération (Spellman, 2009).

La déshydratation des boues a un impact économique important du fait qu'elle représente entre 25 à 50 % de coûts totaux d'opération d'une station d'épuration (Baeyens et al., 1997).

Puisque les EPS sont fortement hydratés, afin de prévenir la dessiccation des cellules, la déshydratation des boues, par des méthodes mécaniques, est inversement dépendante de la quantité d'EPS. Ceci est dû, en grande partie, à l'eau liée dans les EPS (Keiding et al., 2001). Ainsi, une augmentation de la quantité d'EPS dans les boues provoque une détérioration de la déshydratation (Liu and Fang, 2003). Mikkelsen et Keiding (2002) ont étudié des boues provenant de dix stations d'épuration des eaux traitant des effluents mixtes (eaux urbaines et eaux industrielles). Ils ont également observé que les boues contenant de faibles quantités d'EPS présentent une capacité de déshydratation plus élevée. Les protéines dans les EPS ont été établies comme constituant majeur des EPS influant le piégeage de l'eau dans la matrice du floc.

Les substances solubles d'origine biologique (fraction soluble des EPS) sont le facteur principal du **colmatage de membranes** (Judd, 2008) contrairement aux EPS liés dans les boues qui ne sont pas significativement impliqués dans le colmatage (Meng et al. (2009) rassemblant plus de 200 références). Rosenberger et al. (2006) ont montré que les substances solubles responsables du colmatage des membranes, sont d'origine microbienne et ne correspondent pas aux substances non dégradées de l'influent ; ces substances proviennent des molécules contenues dans les boues transférées vers la phase soluble. Selon les mêmes auteurs, les polysaccharides sont des molécules ayant une forte influence sur le colmatage. Wisniewski et Grasmick (1998) ont montré que les contraintes des cisaillements auxquelles la boue est exposée dans le bioréacteur à membranes, modifient la composition et les caractéristiques biologiques des boues. Cette destruction des floccs contribue à augmenter la fraction soluble et provoque ensuite le colmatage des membranes. Le colmatage peut être de deux types : (i) Le colmatage réversible qui peut être éliminé *in situ* par différents moyens mécaniques (bulles d'air, rétrolavage, augmentation de la vitesse tangentielle), et (ii) le colmatage irréversible qui nécessite obligatoirement un lavage chimique de la membrane (Jiang et al., 2003). Le colmatage est un inconvénient opérationnel majeur dû à la réduction dans le temps de la performance de la filtration et à l'augmentation de coûts opérationnels à cause de la maintenance/changement de la membrane (Le-Clech et al. 2006).

Dans les stations d'épuration, la biomasse est souvent soumise aux conditions de stress générées par les variations du milieu. Selon Bott et Love (2002), les microorganismes

présents dans les systèmes de traitement biologiques s'adaptent physiologiquement aux chocs toxiques par l'activation d'une réponse microbienne au stress. Cette réponse induit la détérioration de la performance du traitement car l'agrégation des floccs est menacée. En effet, la réponse au stress implique un efflux de potassium provoquant une défloculation des agrégats avec un relargage du matériel lié dans les boues vers la phase liquide. Cette réponse bactérienne au stress est souvent associée à une modification de la croissance optimale bactérienne et de l'activité bactérienne (Hazen et Stahl, 2006). D'après Menniti et al. (2009), la contrainte de cisaillement dans des bioréacteurs à membranes, génère du stress bactérien et contribue à l'érosion du flocc. Le cisaillement provoque également le relargage des EPS liés dans les boues vers la phase soluble. Toutefois, les floccs soumis à des contraintes de cisaillement importantes sur des longues périodes n'ont pas généré des quantités importantes d'EPS solubles. Ceci suggère le développement des EPS qui retiennent plus fortement le contenu biologique des floccs. Au contraire, quand le cisaillement a été effectué sur des courtes périodes, les floccs ont été détériorés et le matériel biologique a été libéré vers la phase soluble. Ceci laisse penser que l'adaptation microbienne au stress nécessite un temps. Dans les cas de stress microbien, dû à la présence de composés toxiques (chloroforme et chrome), Aquino et Stuckey (2004) ont observé l'augmentation significative de la concentration de substances solubles. En conséquence, une augmentation de la production des EPS indiquerait que les bactéries luttent contre le stress environnemental.

I.3.2.3. Analyse des EPS: extraction, caractérisation et quantification des EPS

a) Extraction des EPS

Les EPS enveloppent les cellules dans les floccs et constituent la structure de floccs reliées par des cations. De ce fait, leur analyse nécessite au préalable une étape d'extraction. Une méthode d'extraction: *(i)* doit garantir le minimum de lyse cellulaire ; *(ii)* doit permettre d'obtenir une quantité significative des EPS extraits ; *(iii)* ne doit pas apporter une contamination aux espèces extraites par les réactifs utilisés (Frolund et al., 1996).

Les méthodes d'extraction peuvent être physiques ou chimiques. Dans la littérature, on distingue sept différentes méthodes qui sont brièvement présentées dans le tableau I. 1. Chaque méthode présente divers modes d'actions pour déstructurer les liaisons qui retiennent les EPS dans la matrice biologique.

Tableau I. 1. Récapitulatif des principales méthodes d'extraction des EPS

Type d'extraction	Méthode	Description
Physique	Centrifugation	<ul style="list-style-type: none"> • Technique douce ne provoquant pas de lyse cellulaire. • Technique (de contrôle) qui sert aux comparaisons des rendements d'extraction car elle ne nécessite pas d'ajout de réactifs chimiques. • La quantité des EPS extrait est très faible comparée à d'autres méthodes (Liu et Fang, 2002 ; Comte et al., 2007). • Conditions d'extraction : 20 000 g, 20 min (Liu et Fang, 2002) ; 4000 g, 20 min (Comte et al., 2007).
	Thermique	<ul style="list-style-type: none"> • Technique qui provoque la lyse cellulaire à cause de la dissolution des polymères de la membrane cellulaire. • Dénaturalisation des EPS extraits (Karapanagiotis et al., 1989). • Conditions d'extraction : 80°C, 1 h (Frolund et al., 1996)
	Ultrasons	<ul style="list-style-type: none"> • Déstructuration des agrégats. • Détection de la lyse cellulaire même pour des temps de sonication faibles (Zhang et al., 2007b). • Conditions d'extraction : 25 kHz, 0-30 min (Zhang et al., 2007b).
Chimique	Echange d'ions avec résine	<ul style="list-style-type: none"> • Très bonne extraction des EPS avec peu de lyse selon les conditions de l'extraction (Frolund et al. 1996). • Le méthode la plus utilisée actuellement. • Conditions d'extraction : 6,5-105 g résine/g MVS, 2000g, 1-17 h (Frolund et al., 1996) ; 70 g résine/ g MVS, 600 rpm, 1 h (Liu et Fang, 2002).
	EDTA	<ul style="list-style-type: none"> • Provoque la lyse cellulaire : les EPS extraits contiennent de l'ADN intracellulaire (Liu et Fang, 2002). • Contamination de l'échantillon par les réactifs d'extraction (Comte et al., 2007). • Conditions d'extraction : EDTA 2 % pendant 3 h à 4°C (Comte et al., 2007 ; Liu et Fang, 2002).
	NaOH	<ul style="list-style-type: none"> • Augmente le pH, dissocie les groupes acides et génère la répulsion des EPS chargés négativement (Liu et Fang, 2002). • Conditions d'extraction : 1 N pendant 3 h à 4°C (Comte et al., 2007 ; Liu et Fang, 2002)
	Formaldéhyde ou Glutaraldéhyde	<ul style="list-style-type: none"> • Le formaldéhyde fixe les cellules car il établit des liaisons avec les protéines et l'ADN, et empêche la solubilisation des lipides (Gavrilov et Razin, 2009). De ce fait, il prévient la lyse cellulaire. • Conditions d'extraction avec formaldéhyde : 36,5 % pendant 1 h à 4°C (Comte et al., 2007 ; Liu et Fan, 2002), avec Glutaraldéhyde : 10 % pendant 12 h à 4°C (Comte et al., 2007).

MVS : matière volatile en suspension

Des nombreuses études ont été consacrées à la comparaison des méthodes d'extraction (Frolund et al., 1996 ; Park et Novak 2007 ; Liu et Fang 2002). Frolund et al. (1996) ont évalué trois méthodes d'extraction différentes: l'extraction par la résine échangeuse d'ions,

l'extraction basique (avec NaOH à pH 11) et l'extraction thermique (à 80°C). Ils ont noté un taux d'extraction deux fois supérieur avec la résine échangeuse d'ions (temps d'extraction de 17 heures) par rapport à deux autres méthodes. La quantité d'EPS extraite augmente de façon logarithmique avec le temps d'extraction. Cependant, les rendements d'extraction sont spécifiques aux différentes espèces constituant les flocs (protéines, polysaccharides, lipides, ADN). En ce qui concerne les protéines et les polysaccharides (espèces majoritaires des EPS), une durée d'extraction de plus de 6 heures n'augmente pas significativement le rendement. Toutefois, l'augmentation du temps d'extraction induit une augmentation de la lyse cellulaire. Ils ont en effet noté une absence de la lyse cellulaire pour une durée d'extraction inférieure à 2 heures. En revanche, après 9 heures d'extraction, le pourcentage de la lyse cellulaire atteint 60 à 70 %.

Liu et Fang (2002) ont comparé trois méthodes d'extraction, l'extraction par EDTA, l'extraction par formaldéhyde et l'extraction par la résine échangeuse d'ions. Du fait d'un faible taux d'extraction avec le formaldéhyde, il s'est avéré nécessaire de compléter la méthode avec une extraction basique (NaOH) ou l'ultrasonification pour obtenir un taux d'extraction plus élevé par comparaison à l'EDTA et la résine échangeuse d'ions. Malgré le rendement d'extraction plus important avec le formaldéhyde + NaOH, il est nécessaire d'effectuer par la suite des purifications de l'échantillon par dialyse et lyophilisation afin d'enlever les espèces chimiques rajoutées. L'extraction avec l'EDTA a montré une importante quantité d'ADN qui a été associée à la lyse cellulaire.

Park et Novak (2007) ont étudié trois méthodes d'extraction des EPS: l'extraction par la résine échangeuse d'ions, l'extraction par les sulfures et l'extraction par le NaOH. Leur conclusions sont les suivantes :

- l'utilisation de la résine échangeuse d'ions a permis une meilleure extraction des espèces majoritaires des EPS (protéines et polysaccharides). De plus, la résine a montré une extraction sélective des EPS reliés aux cations Ca^{2+} et Mg^{2+} contenus dans les floc ;
- l'extraction des EPS par les sulfures a permis d'extraire de manière sélective les EPS attachés aux ions ferriques Fe^{+3} ,
- enfin, l'extraction par le NaOH s'est montré spécifique des EPS reliés par les ions Al^{3+} .

Ainsi, chaque méthode d'extraction a une sélectivité cationique qui permet la solubilisation d'EPS de différents types. Il est à noter que la quantité d'EPS extraite est étroitement liée à la méthode d'extraction. Cette étude, qui a permis d'expliquer la divergence des résultats retrouvés dans la littérature, a également permis de vérifier le modèle du floc

proposé par Novak et al. (2003). En effet, ces derniers ont suggéré que le floc est constitué de trois fractions différentes d'EPS : (1) les protéines extracellulaires de type lectine et des polysaccharides liés par des pontages Ca^{2+} et Mg^{2+} ; (2) les EPS liés aux ions Fe^{3+} et (3) les EPS liés aux ions Al^{3+} .

Les travaux de Comte et al. (2007) ont permis également de mettre en évidence la diversité des EPS. En effet, grâce à une évaluation chromatographique de tailles des molécules extraites par chacune de ces sept méthodes (cf Tableau I.1), ces derniers ont mis en évidence un profil de tailles des molécules extraites en fonction de la méthode d'extraction. Les profils relatifs aux méthodes chimiques (EDTA, NaOH, formaldéhyde et glutaraldéhyde) ainsi que celui de la méthode thermique varient considérablement entre eux et sont bien différents des autres méthodes. Ces variations sont attribuées d'une part à la modification chimique des espèces induite par les méthodes chimiques et, d'autre part, à la sélectivité des espèces extraites par chaque méthode. Il est à noter que l'extraction par la méthode thermique provoque l'hydrolyse des molécules.

Certaines études proposent la combinaison de méthodes afin d'obtenir un taux important des EPS extrait. Ras et al. (2008b) se sont basés sur l'extraction des protéines des boues. Ils ont proposé un protocole d'extraction qui intègre trois types d'extraction différentes, l'extraction de type mécanique (ultrasonification (37 W, 2 min – 2 min X 5), de type ionique (résine échangeuse d'ions (70 g/ g MVS) et EDTA (0,5 – 2 %, 1 h)) et de type hydrophobe (éthanol 20 - 50 % et Tween 20, entre 1 et 2 h). D'après les auteurs, ce protocole permet l'extraction entre 45 et 49 % de protéines totales extractables du floc. De plus, aucune lyse cellulaire n'a été identifiée.

Bien que de multiples efforts ont été effectués afin de trouver la(les) meilleure(s) méthode(s) d'extraction, la plupart des études (Wilén et al., 2008a ; Jin et al., 2003 ; Lyko et al., 2007) cherchant à examiner l'activité de boues biologiques dans les différents procédés de traitement, appliquent la méthode d'extraction d'EPS par la résine échangeuse d'ions. Toutefois, la comparaison de résultats de différentes études serait simplifiée si une seule méthode d'extraction était utilisée comme référence.

Dans cette thèse, notre choix s'est orienté sur la méthode d'extraction par la résine échangeuse d'ions (Frolund et al., 1996). Cette méthode donne un rendement d'extraction d'EPS suffisamment important, ne provoque pas de lyse cellulaire dans des conditions contrôlées et permet d'extraire les EPS majoritaires (protéines et polysaccharides) qui semblent avoir un rôle spécial dans l'agglomération et la décantation de boues. Malgré tout, il

faut garder à l'esprit qu'une méthode d'extraction si efficace qu'elle soit, peut constituer en soi, un biais dans l'observation des EPS réellement présents au sein de la boue.

b) Caractérisation des EPS

Les EPS extraits constituent un mélange de différentes macromolécules (protéines, polysaccharides, lipides, ADN). Afin de mieux comprendre le comportement bactérien dans les boues activées, lors de cette thèse, les EPS ont été caractérisés par trois méthodes : *I*) par la chromatographie d'exclusion par taille qui permet d'obtenir des informations sur la concentration et la répartition stérique de molécules ; *II*) par la spectroscopie infrarouge qui renseigne sur la nature chimique des espèces, et *III*) par dosage de protéines et des polysaccharides réalisé par les méthodes classiques de spectroscopie UV-Vis.

Caractérisation des EPS par chromatographie liquide haute pression d'exclusion par taille

La chromatographie d'exclusion par taille permet de séparer un mélange de molécules de différentes tailles en groupes. Dans cette technique, l'échantillon à analyser est porté par une phase mobile percolant à travers la colonne de séparation. La colonne est remplie d'une phase stationnaire ayant des tailles des pores contrôlées. Les molécules contenues dans l'échantillon ne peuvent pénétrer que dans des pores ayant un diamètre plus élevé que la section de la molécule. La taille de molécules correspond à leur rayon hydrodynamique, celui-ci est défini par la nature chimique de la molécule et par les conditions chromatographiques de la séparation. Le rayon hydrodynamique est le rayon occupé par une macromolécule prenant en compte à la fois sa distribution spatiale et sa couche d'hydratation. Les molécules de plus grandes masses molaires dont le volume hydrodynamique est supérieur à la taille de pores, vont contourner la phase stationnaire sans la pénétrer et ces molécules sont exclues de pores. Par conséquent, ces molécules vont être éluées à un temps très court (correspondant au volume d'exclusion total). Les molécules ayant des masses molaires les plus faibles dont le diamètre est inférieur aux diamètres de pores fins, seront retenues par la phase stationnaire suite à leur passage dans tous les pores. Ces molécules sont éluées en dernier. Toutes les autres molécules, seront retenues par la phase stationnaire, en fonction de leur taille. En conclusion, le temps de rétention des molécules est inversement proportionnel à leur masse molaire. Le temps de rétention est établi par une courbe d'étalonnage tracée grâce à des molécules de tailles standard.

Chaque groupe de molécules correspondant à un pic chromatographique est constitué soit d'une molécule pure soit d'un mélange des molécules, de nature différente, mais de taille similaire. La figure I. 9 montre schématiquement, la séparation effectuée par la chromatographie d'exclusion par taille.

Eventuellement, il peut exister des molécules qui interagissent avec la phase stationnaire par des interactions physico-chimiques. Dans ce cas, la séparation n'est pas strictement réalisée en fonction de la taille de molécules. Ces molécules seront éluées en dernier car leur parcours est ralenti par les interactions avec la phase stationnaire.

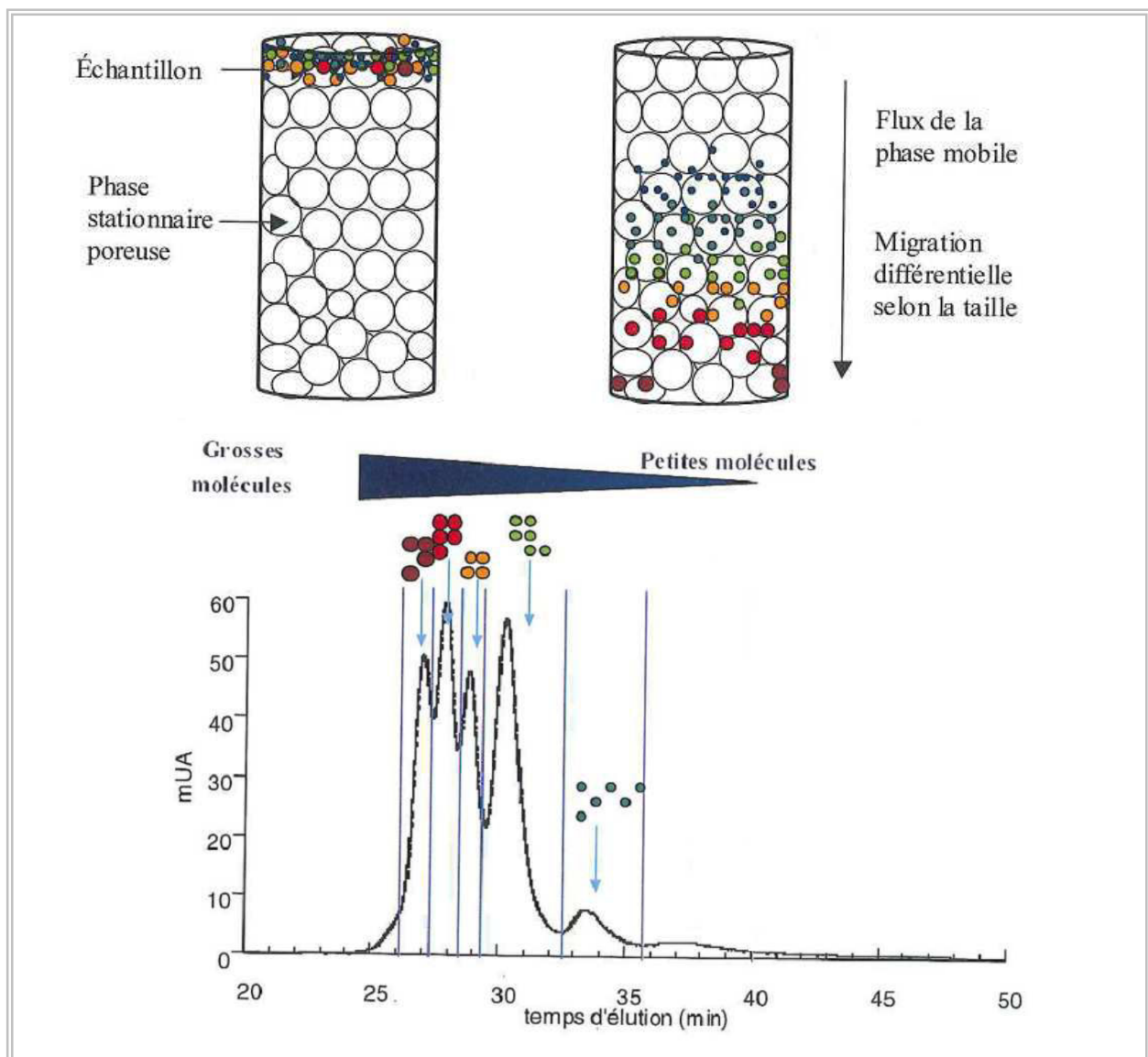


Figure I. 9 Représentation schématique du principe de la chromatographie d'exclusion stérique.

L'importance de la masse molaire des biopolymères dans la structuration de floccs a été démontré dans différentes études (Higgins et Novak, 1997). Horan et Eccles (1986) ont indiqué que les molécules de masses molaires élevées contribuent à obtenir des floccs denses et

arrondis. D'autres auteurs (Forster, 1985) ont rapporté qu'une décantation déficiente est liée à la présence de molécules de faibles tailles dans les floccs. Ces résultats ont motivé des études de caractérisation par taille des EPS, par une équipe du LEM. Görner et al. (2003) ont proposé la caractérisation des EPS par la chromatographie d'exclusion par taille afin d'identifier les différentes masses molaires des fractions constituant les EPS. La séparation des EPS en fractions selon leurs tailles a permis de simplifier un mélange très complexe des EPS à des fractions plus simples. Ensuite, les fractions ont été analysées plus aisément en spectroscopie infrarouge pour identifier leur nature chimique. Cette étude a constaté la prépondérance des protéines sur toutes les fractions. Les protéines retrouvées dans les EPS possèdent des masses molaires de 45 à 670 KDa. Les polysaccharides ont été moins fréquents avec de petites tailles, inférieures à 1 KDa.

La technique de chromatographie stérique couplée à la spectroscopie infrarouge, a été ensuite appliquée pour l'étude des EPS de boues provenant de trois stations d'épuration (Garnier et al., 2005). Les auteurs ont identifié que les EPS de grandes masses molaires étaient présentes dans les boues lors d'une bonne décantation. Par contre, les EPS de faibles masses molaires constituaient les boues dans les situations de crise, de mauvaise décantation.

Par ailleurs, la caractérisation par taille des EPS a été également utile dans les études de colmatage des membranes. Le travail de Nagaoka et al. (2005) a montré que les molécules d'EPS ayant une masse molaire supérieure à 1000 KDa ont significativement contribué au colmatage des membranes.

Caractérisation des EPS par spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

L'interaction entre la matière et le rayonnement infrarouge présente la particularité d'être totalement non destructrice compte tenu des énergies mises en jeu comprises entre 0,02 eV (600 cm^{-1}) et 0,5 eV (4000 cm^{-1}). Elle permet l'observation des objets biologiques sans altérer leurs propriétés initiales.

La matière présente la particularité d'absorber le rayonnement infrarouge à des longueurs d'ondes particulières, propres à chaque groupe chimique. L'absorption du faisceau infrarouge sur la matière est accompagnée de la mise en vibration d'assemblages atomiques spécifiques du composé examiné. Chaque molécule possède des fonctions et des configurations plus ou moins caractéristiques et possédera donc des modes de vibration propres caractéristiques des fonctions chimiques présentes. Ces modes de vibration sont à l'origine des bandes d'absorption. De cette manière, la représentation des bandes d'absorption

en fonction des longueurs d'onde balayées de l'infrarouge constitue un spectre, véritable empreinte digitale de la molécule.

La technique de spectroscopie infrarouge permet d'une part, la caractérisation qualitative de l'échantillon par l'identification de groupes fonctionnels et d'autre part, la quantification en suivant l'intensité des bandes d'absorption caractéristiques à chaque groupe fonctionnel. En effet, l'intensité de la vibration/rotation de molécules est proportionnelle à la quantité de molécules présentes, c'est-à-dire proportionnelle à la concentration et à l'épaisseur de l'échantillon.

Plusieurs études ont utilisé la technique d'infrarouge dans différentes applications : la caractérisation des EPS, le suivi de la formation d'un biofilm sur des surfaces, l'identification de molécules responsables du colmatage de membranes, l'identification des microorganismes et l'identification de constituants de la membrane cellulaire (Schmitt et Flemming, 1998 ; Characklis W. et Marshall K., 1990; Isner et Williams, 1993). Schmitt et al. (1995) ont suivi, par FTIR, la croissance d'un biofilm, notamment la formation de polysaccharides en fonction de différents substrats. Ha et al. (2010) ont étudié par FTIR la composition des EPS ainsi que la composition de la paroi cellulaire de la souche bactérienne *Shewanella oneidensis*. Les changements génétiques de cette souche ont été identifiés par infrarouge comme des variations des groupes carboxyles de la paroi cellulaire. Etudiant les boues des stations d'épuration, Garnier et al. (2005) ont publié une base de données de différentes familles des EPS contenues dans les boues. Par micro-spectroscopie infrarouge, quatre familles différentes d'EPS ont été identifiées : les protéines, les polysaccharides, les acides organiques et les lipides.

A titre d'exemple, la figure I.10 présente les principales bandes d'infrarouge des fonctions chimiques rencontrés dans les EPS.

Dans notre cas, l'étude de la composition des EPS de floccs bactériens nécessite une étape préliminaire de préparation de l'échantillon avant l'analyse. En effet, les échantillons aqueux doivent être séchés préalablement à l'analyse afin de limiter l'apport de l'eau qui absorbe en infrarouge, et qui empêche l'identification d'autres groupes fonctionnels. Cette étape de préparation de l'échantillon est très laborieuse car des dépôts et des séchages consécutives de l'échantillon doivent être réalisés jusqu'à l'obtention d'une quantité de matière suffisante pour avoir un signal d'absorbance adéquat à l'exploitation du spectre.

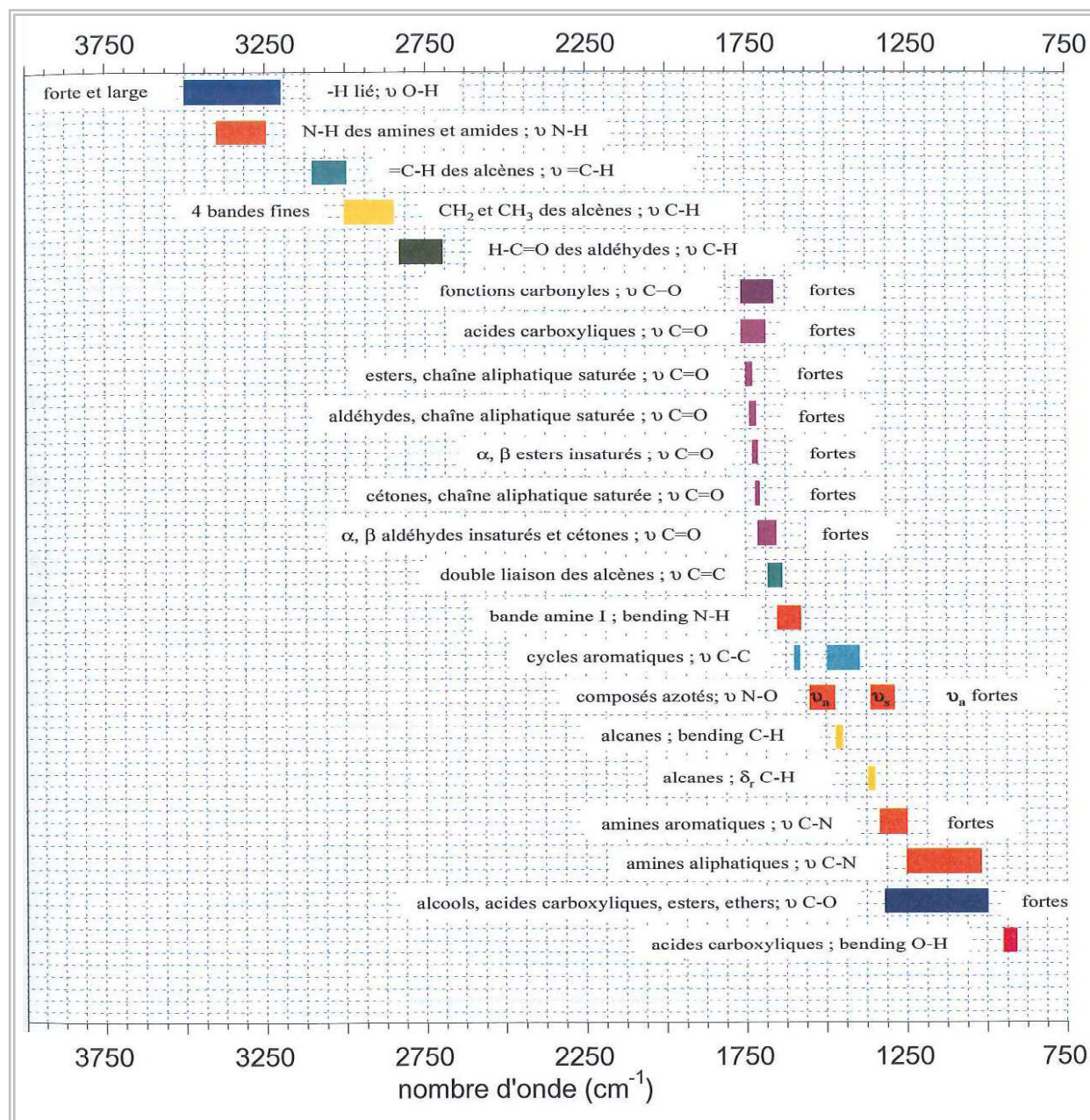


Figure I. 10. Bandes d'absorption infrarouge des principales fonctions chimiques des EPS [Garnier et al., 2005].

c) Quantification des EPS par les méthodes colorimétriques classiques

La quantification des espèces majoritaires des EPS (protéines et polysaccharides) a été souvent réalisée par des méthodes colorimétriques. Les méthodes colorimétriques reposent sur la coloration développée par des réactions chimiques entre les fonctions chimiques de la

molécule à doser et des réactifs. La couleur obtenue est fonction de la concentration de l'espèce à doser. La mesure de l'absorbance de la couleur est effectuée par spectroscopie UV-Visible.

Quantification de protéines:

Trois méthodes classiques de dosage de protéines par colorimétrie se distinguent dans la littérature. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients. Le tableau I. 2 présente un descriptif des méthodes colorimétriques existantes pour le dosage des protéines.

Tableau I.2. Méthodes de dosage des protéines par la spectroscopie UV-Vis.

Méthode	Description
Méthode de Lowry et al., (1951) (réaction de Biuret)	<ul style="list-style-type: none"> • Avantages: <ol style="list-style-type: none"> 1. Capable des mesurer des composés contenant au moins deux liaisons peptidiques. 2. Réponse spectrométrique semblable pour différentes types de protéines (Raunkjaer et al., 1994) 3. Pas d'interférences avec les saccharides (Raunkjaer et al., 1994) • Inconvénients: <ol style="list-style-type: none"> 1. Sensibilité faible (méthode non conseillée dans le cas des eaux peu chargées). 2. Interférences avec les acides humiques (Frolund et al., 1995), les sulfites (Box, 1983) et le fer, les lipides et détergents (Peterson, 1977). 3. Sur-estimation de la concentration de protéines (Raunkjaer et al., 1994)
Méthode de Bradford et al. (1976) (réaction utilisant le bleu de Coomassie)	<ul style="list-style-type: none"> • Avantages: <ol style="list-style-type: none"> 1. Rapidité de la méthode. 2. Pas d'interférence avec d'autres composés organiques. • Inconvénients : <ol style="list-style-type: none"> 1. Réactivité différente pour les différents types de protéines 2. L'utilisation de la protéine sérum albumine bovine habituellement considérée comme la molécule étalon, n'est pas appropriée. Cette protéine réagit beaucoup plus fortement que la moyenne des protéines (Davis, 1988) 3. Réponse spectroscopique très faible due au fait que les composés contenant moins de 8 liaisons peptidiques ne sont pas inclus dans l'analyse. Sous-estimation de la concentration de protéines (Raunkjaer et al., 1994) 4. Interférences avec des détergents.
Méthode de l'acide Bicinchonique BCA (Smith et al., 1985)	<ul style="list-style-type: none"> • Avantages: sensibilité importante • Inconvénients: <ol style="list-style-type: none"> 2. Très sensible aux saccharides (Raunkjaer et al., 1994) 3. Les différentes protéines ont des réponses spectroscopiques différentes (Ras et al., 2008a)

Outre les méthodes présentées dans le tableau I.2, il existe deux autres méthodes de mesure de protéines : la mesure de l'absorbance UV-Visible à 280 nm et la méthode de dosage de Kjeldahl.

La mesure directe de l'absorbance à 280 nm est une méthode rapide d'estimation du contenu des protéines. Cependant, cette méthode présente des inconvénients majeurs : (i) l'absorbance dépend fortement du type de protéine, (ii) plusieurs substances de nature différente sont également absorbées à cette longueur d'onde.

La méthode Kjeldahl dose l'azote total organique (l'ammonium et les acides aminés) contenu dans l'échantillon. En conséquence, la mesure de la concentration des protéines n'est pas directe mais elle doit être estimée par une relation entre l'azote organique et les protéines.

Dans le cas des eaux usées, le choix de la méthode la plus appropriée pour la quantification de protéines, n'est pas facile. Cependant, la méthode de Lowry a été plus fréquemment utilisée dans les diverses études scientifiques. La méthode de Lowry se base sur deux réactions chimiques. En premier lieu, la réaction de biuret qui implique le traitement des liaisons peptidiques avec le sulfate de cuivre, en solution alcaline. En deuxième lieu, la réduction des complexes formés est effectuée par le réactif de Folin-Ciocalteu. Comme résultat, une solution bleue est obtenue. La mesure de l'absorbance de la solution formée est réalisée par spectroscopie UV-Visible à 750 nm.

Certains travaux ont proposé des améliorations à la méthode classique de Lowry, afin d'éviter les différentes interférences rapportées (c.f. tableau I.2). Raunkjaer et al. (1994) ont évalué les trois méthodes colorimétriques (Lowry, Bradford et BCA). La méthode de Lowry a été la plus recommandée, ils ont démontré que les interférences, dans les eaux usées, ont une faible contribution. En effet, les deux autres méthodes ont montré une réponse très limitée dans le cas des eaux usées. Ces effluents montrent une contribution significative des protéines ayant des courtes chaînes inférieures à huit liaisons peptidiques. La quantification de ces espèces n'est pas possible à travers la méthode de Bradford. De plus, la concentration des sucres dans les eaux usées est considérable de ce fait l'utilisation de la méthode BCA est exclue à cause des interférences protéines/sucres.

Pour pallier l'interférence des acides humiques dans le dosage de protéines par la méthode de Lowry, Frolund et al. (1995) ont proposé une correction à la méthode classique de Lowry. Il s'agit d'effectuer deux dosages en parallèle : (a) le protocole de la méthode de Lowry traditionnelle, (2) le même protocole mais en absence du réactif CuSO_4 . Les auteurs ont estimé que l'absence de CuSO_4 diminue l'absorbance des protéines de 80 %. La réponse

spectroscopique des protéines et des acides humiques lors de deux dosages, a été exprimée mathématiquement afin de pouvoir calculer la concentration « réelle des protéines » et la concentration « réelle des acides humiques ». Ainsi :

$$\text{Abs (avec CuSO}_4\text{)} = \text{Abs PR} + \text{Abs HA} \quad (\text{Eq. I.4})$$

$$\text{Abs (sans CuSO}_4\text{)} = 0,2 \text{ Abs PR} + \text{Abs HA} \quad (\text{Eq. I.5})$$

$$\text{Abs HA} = \text{Abs (sans CuSO}_4\text{)} - 0,2 * \text{Abs PR} \quad (\text{Eq. I.6})$$

Par combinaison des équations (1a), (1b) et (1c):

$$\text{Abs PR} = 1.25 \times [\text{Abs(avec CuSO}_4\text{)} - \text{Abs (sans CuSO}_4\text{)}] \quad (\text{Eq. I.7})$$

Ces dernières années, plusieurs études ont consisté à doser les protéines dans les différents procédés de traitement des eaux, avec cette méthode corrigée. Néanmoins, lors de cette thèse, nous avons évalué la méthode corrigée et elle a présenté des ambiguïtés importantes (les résultats de cette évaluation sont présentés dans la section IV.1.4). La méthode corrigée génère une concentration en acides humiques même en leur absence. La concentration en protéines est sous-estimée et les erreurs de mesure sont très importantes, lorsque les concentrations des espèces sont basses. L'utilisation dans la littérature récente, de la méthode corrigée, a conduit à considérer les acides humiques comme l'un des principaux constituants de la boue. Par conséquent, bien qu'imparfaite, la méthode classique de Lowry est privilégiée pour doser les protéines, lors de cette thèse.

Quantification des polysaccharides:

Deux méthodes existent pour la quantification des polysaccharides. Le mécanisme d'action est le même pour les deux méthodes, les polysaccharides sont hydrolysés à travers le chauffage par un acide fort (l'acide sulfurique). Ensuite, les saccharides réagissent avec le réactif spécifique à chaque méthode. La méthode de Dubois (Dubois et al., 1956) utilise le phénol. Ce réactif produit la même intensité de couleur pour tous les polysaccharides. La deuxième méthode utilise l'Anthrone (Dreywood, 1946). L'intensité de la couleur produite par l'Anthrone varie en fonction du type de polysaccharide (Koehler, 1952). Toutefois, les résultats obtenus sont plus élevés avec le phénol qu'avec l'Anthrone et quelques fois, en présence du phénol, ils sont moins reproductibles (Raunkjaer et al., 1994). D'après Herbert et al. (1971), l'Anthrone a l'inconvénient de réagir plus fortement avec les hexoses et plus faiblement avec les pentoses et heptoses.

Dans le cas des eaux usées, les deux méthodes de dosage de polysaccharides (Dubois et l'Anthrone) ont été indistinctement utilisées dans la littérature. Il n'existe pas de choix privilégié. Certaines études ont employé la méthode de l'Anthrone (Frolund et al., 1996 ; Wilén et al., 2008b ; Yu et al., 2008) et d'autres, ont fait appel à la méthode de Dubois (Li et Yang, 2007 ; Sponza, 2002 ; Leandro et al., 2003).

Dans cette thèse, nous avons utilisé arbitrairement la méthode de Dubois.

I.4. PRÉSENCE DE MÉDICAMENTS DANS L'ENVIRONNEMENT

« On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique » (Directive 2004/27/CE du 31 mars 2004 transposée en droit national en France par la Loi n°2007-248 du 26 février 2007). Après ingestion, les médicaments subissent des transformations chimiques dans les organismes vivants donnant naissance à des métabolites. Selon la molécule considérée, le taux d'excrétion du composé sous sa forme native varie de 30 à 90 % de la concentration initiale administrée (Hirsch et al., 1999 ; Ternes, 2001). Hors de l'organisme, les substances pharmaceutiques peuvent également subir des transformations structurales par des procédés biotiques ou abiotiques. Les transformations biotiques sont effectuées par les bactéries et les cultures fongiques présentes dans l'environnement et dans les stations d'épuration des eaux usées (Gröning et al., 2007). Les transformations abiotiques sont relatives à l'oxydation, l'hydrolyse et la photolyse de la molécule mère (Mendez-Arriaga et al., 2008 ; Boreen et al., 2003). Les métabolites sont un sujet préoccupant car d'une part, ils peuvent avoir une toxicité similaire ou supérieure à celle des composés parents (Andreozzi et al., 2003) et d'autre part, les métabolites peuvent être plus stables que leurs composés parents et ainsi avoir un potentiel d'accumulation plus important dans l'environnement (Kümmerer, 2009a). En effet, certaines études de dégradation photochimique avec la lumière naturelle montrent l'apparition possible de dérivés photochimiques plus toxiques que les composés parents (Della Greca et al., 2004). Les composés pharmaceutiques sous leur forme métabolisée ou inchangée arrivent par les

réseaux d'égouts aux stations d'épuration ou bien par l'épandage de fumier de bétail aux eaux de surface. Heberer (2002) propose différentes sources et voies de contamination de l'environnement par les substances pharmaceutiques (figure I.11).

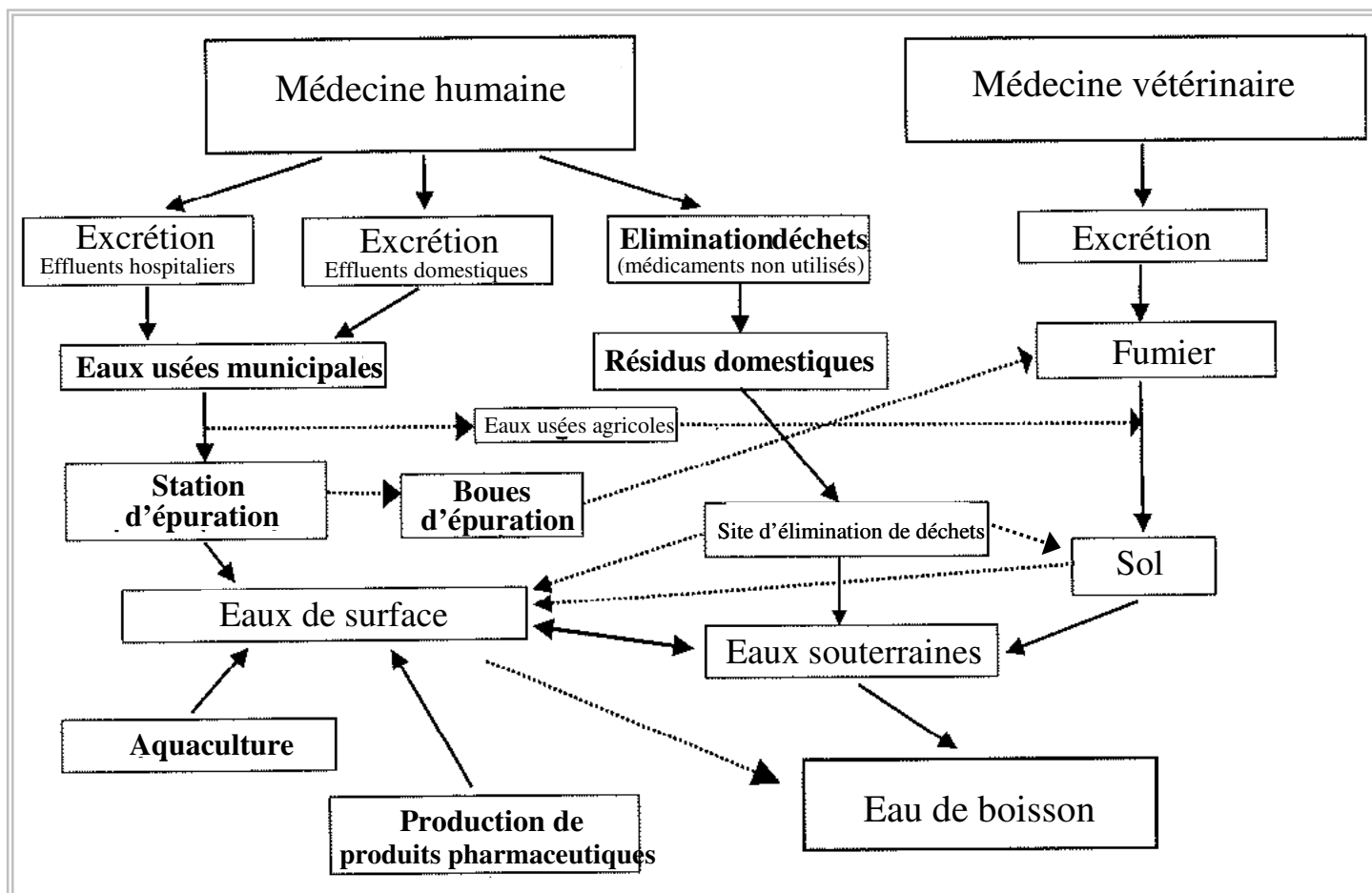


Figure I.11. Possibles sources et voies de contamination de l'environnement par les substances pharmaceutiques [Source : Heberer (2002) modifié].

D'après diverses études réalisées à travers le monde, la présence de plus de 80 composés pharmaceutiques de différents types a été constatée à des concentrations allant jusqu'au $\mu\text{g/L}$ dans tous les compartiments aquatiques (Heberer, 2002) : dans les effluents issus des stations d'épuration, dans les eaux de surfaces et dans les eaux potables (Jones et al., 2005 ; Ternes, 1998 ; Kümmerer, 2001 ; Heberer, 2002). Ainsi, de nombreux produits pharmaceutiques ne sont pas complètement éliminés dans les stations d'épuration et sont rejetés dans les eaux réceptrices, ce qui constitue une problématique environnementale sérieuse de ces dernières années (Joss et al., 2004 ; Clara et al., 2005).

La sorption des différents composés pharmaceutiques sur des sédiments ou bien sur des boues biologiques est une voie d'élimination de ces molécules de la phase liquide. Les

produits pharmaceutiques contiennent souvent des groupes fonctionnels tels que les fonctions carboxyliques, aldéhydes et amines pouvant interagir avec la matière organique (Golet et al., 2003). En conséquence, la sorption augmente avec l'augmentation de la quantité de matière organique dans les agrégats. La photolyse constitue une alternative supplémentaire d'élimination des composés pharmaceutiques essentiellement dans les eaux de surfaces (Werner et al., 2007). Certains antibiotiques sont sensibles à la lumière (c.f. tableau I.3) mais toutes les molécules ne sont pas photo-dégradables (Turiet et al., 2005). La désactivation de certaines molécules par hydrolyse est également possible mais dépend du type de composé. Ainsi, les antibiotiques de type β -lactam et les oxytétracyclines sont rapidement hydrolysés (Längin et al., 2009).

Devenir des composés pharmaceutiques

Une grande partie des produits pharmaceutiques arrivant jusqu'aux stations d'épuration provient des eaux résiduaires urbaines et hospitalières ainsi que des rejets des industries pharmaceutiques. La présence d'une grande variété de substances actives dans l'environnement aquatique, dans les fumiers et dans les sols met en évidence le fait que les composés pharmaceutiques ne sont complètement éliminés, ni dans les stations d'épuration ni dans l'environnement (Kümmerer, 2001). Les composés les plus fréquemment détectés dans les stations d'épuration sont les antibiotiques, antiépileptiques, composés anticancéreux, produits de contraste, régulateurs de lipides (Ternes et Joss, 2006 ; Ayscough et al., 2000).

Les composés pharmaceutiques tels que les agents cytostatiques, les antibiotiques et les hormones font l'objet d'une attention spéciale dû aux risques toxicologiques qu'ils représentent pour les organismes (Kümmerer, 2001). Ceci justifie notre intérêt particulier notamment pour le cyclophosphamide (agent cytostatique) et différents antibiotiques, dont une description plus détaillée est faite ci-dessous :

- **Les agents cytostatiques.** Ce sont des composés utilisés dans des traitements anticancéreux. La majorité des agents cytostatiques exercent leur activité sur les cellules cancéreuses par l'intermédiaire d'une interaction directe ou indirecte sur l'ADN (Johnson et al., 2008). Les agents cytostatiques possèdent des propriétés embryotoxiques d'inhibition de la division cellulaire, ils sont cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction. En effet, Pomati et al. (2006) ont observé une inhibition allant jusqu'à 30 % de la prolifération de cellules embryonnaires humaines en présence d'un cocktail pharmaceutique constitué de 13 médicaments différents (concentrations de

l'ordre de ng/L) dont la cyclophosphamide. La communauté européenne interdit la décharge de toute substance dont le pouvoir cancérigène est prouvé dans le milieu aquatique (Directive du conseil 80/68/EWG, 1991 ; directive du conseil 76/464/EWG, 2000).

Selon Webb et al. (2003), les agents cytostatiques posent des problèmes puisqu'il n'y a pas de dose seuil en-dessous de laquelle aucun effet cancérigène ne peut se produire. Parmi les agents cytostatiques existants, les plus souvent utilisés dans la chimiothérapie sont le cyclophosphamide et l'ifosfamide (Buerge et al., 2006). Les quantités utilisées de ces médicaments, en Allemagne, ont été estimés entre 200 et 400 kg/an (Kümmerer, 2001). Le cyclophosphamide n'est pas complètement métabolisé dans le corps humain et jusqu'à 20 % de la dose injectée peut quitter le corps sous la forme inchangée (Gilard et al., 1994). Dans une étude réalisée en Allemagne, dans les stations d'épuration, l'effluent montre une concentration persistante de cyclophosphamide entre 6 et 17 ng/L avec une concentration dans l'affluent de 8 à 143 ng/L (Steger-Hartmann et al., 1997). En Suisse, Buerge et al. (2006) ont détecté dans l'effluent d'une station d'épuration des concentrations de cyclophosphamide oscillant entre 2 et 11 ng/L.

Vu la faible biodégradabilité de cytostatiques, il est fort probable que ces composés traversent les stations d'épuration et qu'ils atteignent les eaux de surface (Kümmerer, 2001 ; Steger-Hartmann et al., 1997). Le cyclophosphamide présente une faible hydrolyse dans les solutions aqueuses (Gilard *et al.*, 1994). Ceci laisse supposer la persistance de ce composé dans l'environnement. En étudiant l'élimination de la cyclophosphamide (5 µg/L) dans un bioréacteur à membranes, Delgado (2009) a observé une concentration résiduelle dans l'effluent aux alentours de 1 µg/L bien que le taux d'élimination atteint soit de 80 %. L'hydrolyse de la cyclophosphamide a été confirmée comme négligeable et les mécanismes d'élimination majeurs ont été la biodégradation et l'adsorption sur les boues.

Ces composés seraient déversés dans l'environnement à des concentrations faibles mais de manière continue, ce qui pourrait engendrer des effets néfastes au niveau cellulaire pour les microorganismes, d'abord dans les stations d'épuration et ensuite dans les différents compartiments aquatiques environnementaux (Jorgensen et Halling-Sorensen, 2000).

- **Les antibiotiques.** Les antibiotiques sont des molécules obtenues à partir de cultures de micro-organismes ou ils sont produits à travers une synthèse chimique. Ils ont une action ciblée sur les microorganismes : ils présentent un pouvoir soit bactéricide soit bactériostatique. L'action bactéricide est attribuée à une substance qui provoque la mort bactérienne, tandis que l'action bactériostatique correspond à un empêchement de la croissance des bactéries (Scholar et Pratt, 2000). Certains antibiotiques agissent sur la paroi bactérienne en bloquant sa synthèse D'autres antibiotiques se fixent sur les hélices de l'ADN et empêchent sa réplication, certains antibiotiques inhibent la production des protéines, et d'autres voies du métabolisme cellulaire voire encore agissent au niveau de la biosynthèse de l'acide folique (Baron, 1996) (figure I.12).

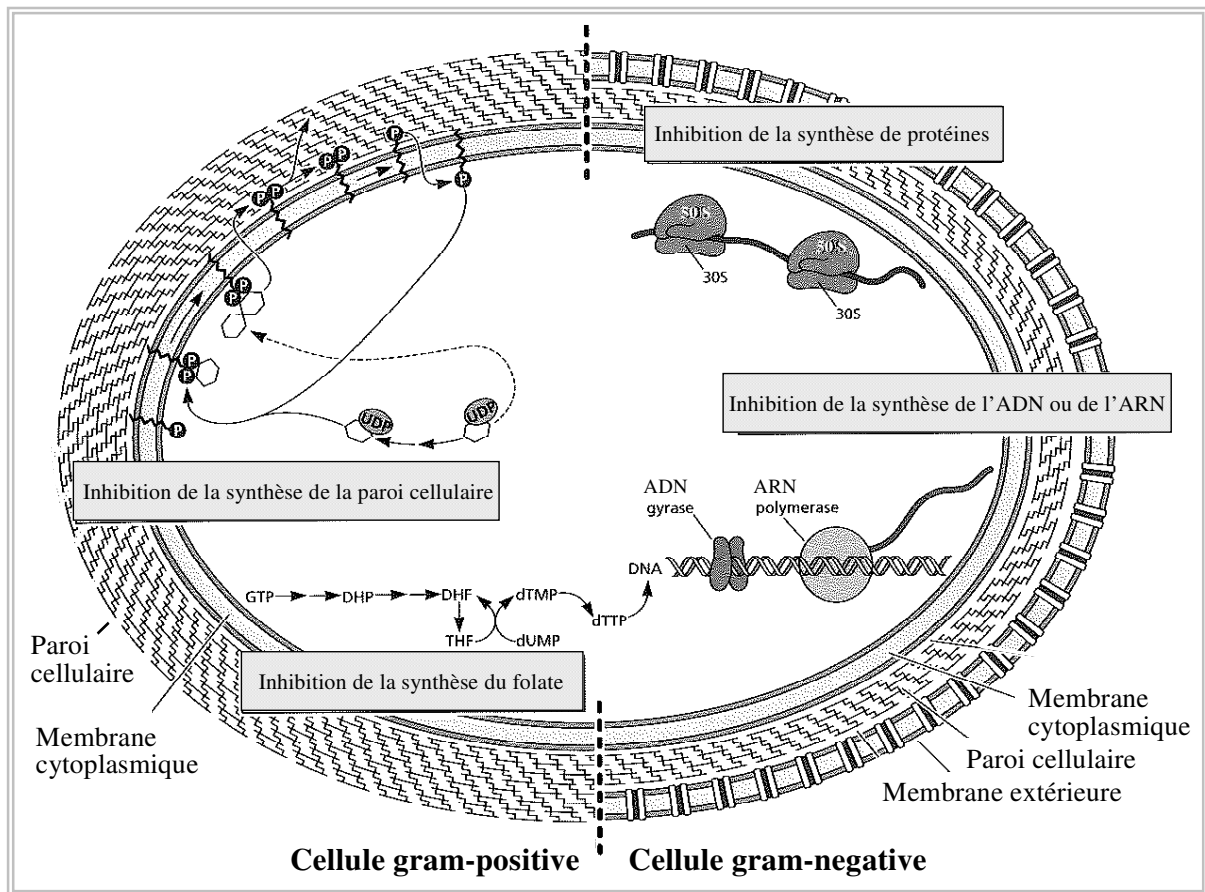


Figure I.12. Voies d'actions des antibiotiques sur les microorganismes [source : Walsh, 2003]

Malgré les effets souhaités des applications thérapeutiques des antibiotiques, ces mêmes effets sont aussi néfastes pour des microorganismes non-ciblés présents dans l'environnement (Kümmerer, 2009a). Des tests ont montré des effets toxiques (altérations sur la croissance et la reproduction) sur des bactéries soumises à des expositions de long terme à certains

antibiotiques (Froehner et al., 2000). Ceci constitue un risque environnemental important car la consommation mondiale d'antibiotiques est estimée entre 100 000 et 200 000 tonnes par an (Wise, 2002). Vu que les métabolites des antibiotiques sont souvent plus facilement solubles dans l'eau que les composés parents (Kümmerer, 2009b), les métabolites sont assez persistants. Des études ont montré que pratiquement tous les compartiments aquatiques (eaux de surfaces, souterraines et de mer) sont polluées par ces molécules (Hernández et al., 2007 ; Alexy et Kümmerer, 2006 ; Batt and Aga, 2005 ; Christian et al., 2003 ; Hirsch et al., 1999). Leur présence est liée à la consommation spécifique d'antibiotiques dans chaque pays.

Les antibiotiques affectent directement la vie cellulaire. Les bactéries, les microorganismes fongiques et les algues sont les premiers concernées. Des effets secondaires non négligeables peuvent également être occasionnés sur l'équilibre naturel des écosystèmes (Kümmerer et al., 2009b). Ces dernières années, il a été mis en évidence que la présence des antibiotiques dans les matrices environnementales contribue à l'augmentation du potentiel de résistance bactérienne, et plus préoccupant encore, la résistance qui peut être développée par les bactéries pathogènes (Kümmerer, 2001). La résistance s'acquiert par sélection naturelle suite à une mutation génétique ou par transfert de gènes entre deux espèces. Quatre voies de résistance aux antibiotiques ont été identifiées (Kümmerer, 2004) : synthèse des enzymes pouvant séquestrer ou dégrader l'antibiotique soit à l'intérieur soit à l'extérieur de la cellule, modification du site de fixation de l'antibiotique, blocage de l'accès de l'antibiotique à la bactérie par réduction de la perméabilité de la membrane (modification du nombre de protéines membranaires), expulsion de l'antibiotique en dehors de la cellule.

Dans cette thèse, nous avons étudié l'influence des antibiotiques sur la biomasse à travers l'analyse des molécules extracellulaires formées par les bactéries, dans les boues des stations d'épuration. Cinq antibiotiques différents, appartenant à quatre familles différentes, ont été évalués lors de cette thèse : l'Erythromycine et la Roxithromycine (famille des macrolides), le Sulfamethoxazole (famille des sulfamides), l'Amoxicilline (famille des pénicillines) et la Tétracycline (famille des tétracyclines). Une description plus détaillée de ces familles d'antibiotiques est présentée dans le tableau I.3. Ce tableau résume les concentrations, rapportées dans la littérature, de ces cinq antibiotiques dans les effluents hospitaliers et dans les stations d'épuration (affluent, bassin biologique et effluent).

Tableau I.3. Concentrations d'Erythromycin, Roxithromycin, Sulfamethoxazole, Amoxicillin et Tétracycline rapportées dans la littérature : dans les stations d'épuration et dans les effluents hospitaliers. Récapitulatif des principales études pour l'élimination des ces antibiotiques des effluents et les modes d'action des antibiotiques

Antibiotiques		Concentration à la STEP			Concentration dans les effluents hospitaliers [ng/L]	Commentaires
Classe	Nom	Affluent [ng/L]	Bioréacteur [ng/L]	Effluent réacteur biologique [ng/L]		
MACROLIDES : Constituent la deuxième classe des antibiotiques les plus utilisés en médecine humaine dans les pays de la communauté européenne entre 1998-2005 (ESAC). Les macrolides sont principalement bactériostatiques. Ils sont mieux supportés par les bactéries gram négatives, grâce à l'imperméabilité relative de la membrane externe, que par les bactéries gram positives (sans membrane externe) (Pechère, 2001). Les macrolides inhibent le mécanisme du <i>quorum sensing</i> (communication cellulaire au sein d'une communauté microbienne) (Tateda et al., 2004 ; Nalca et al., 2006).	ERYTHROMYCINE	470-810 ^a 70 ± 120 E _{H2O} ^d détecté ^{b,c}	détecté ^{b,c}	80 ± 60 ^d	N.D. ^{b,c}	L'Erythromycine est souvent utilisée contre les infections du tract respiratoire, infections de la peau et surtout quand les infections sont persistantes aux pénicillines. L'Erythromycine inhibe la synthèse protéique des cellules. L'Erythromycine se lie à la molécule 50 S du ribosome et bloque la chaîne de peptidyl-transférase (enzyme qui constitue le centre actif du ribosome, elle catalyse la formation de la liaison peptidique entre deux acides aminés) (Schlunzen et al., 2001). Dans les effluents des stations d'épuration, l'Erythromycine-H ₂ O est le métabolite des macrolides le plus fréquemment détecté (Watkinson et al., 2009). Ceci a montré que l'Erythromycine traverse le procédé de traitement des eaux sans être éliminée (Hirsch et al., 1999). En effet, l'Erythromycine n'est pas significativement absorbée sur les boues biologiques restant ainsi dans la phase liquide (Göbel et al. 2005).
	ROXITROMYCINE	0-18 ^b ~ 8 ^c 20 ± 20 ^d	0-60 ^b	0-100 ^b ~ 20 ^c 20 ± 10 ^d	~ 50 ^c	La Roxithromycine est plus facilement tolérée en médecine humaine que l'Erythromycine. Göbel et al. (2005) ont observé que la Roxithromycine, de même que l'Erythromycine, traverse les procédés traditionnels de traitement des eaux par boues activées, et est retrouvée dans l'effluent. L'absorption de la Roxithromycine sur des boues activées a été rapportée comme non significative.
PENICILLINES: Ils constituent la classe d'antibiotique la plus consommée dans la communauté européenne entre 1998-2005 (ESAC). Les pénicillines ont des propriétés bactériostatiques. Ils agissent par inhibition de la formation de la paroi cellulaire bactérienne. La moitié β-lactame se lie à l'enzyme transpeptidase qui devrait se lier aux molécules de peptidoglycane de la paroi cellulaire, empêchant ainsi la multiplication des bactéries.	AMOXICILLINE	190-280 ^b ~ 1400 ^c		0-30 ^b < 50 ^c	90 ^c	L'amoxicilline appartient au groupe des β-lactames (amides cycliques). Le noyau β-lactame est dégradé par certains agents pathogènes à travers l'enzyme β-lactamase, ceci cause l'inactivation de l'antibiotique. En outre, les groupes β-lactames ne sont pas considérés comme des polluants environnementaux importants car ils subissent une dégradation thermique jusqu'à la minéralisation en CO ₂ et H ₂ O (Hirsch et al., 1999).

Antibiotiques		Concentration à la STEP			Concentration dans les effluents hospitalières [ng/L]	Commentaires
Classe	Nom	Affluent [ng/L]	Bioréacteur [ng/L]	Effluent réacteur biologique [ng/L]		
SULFAMIDES : Elles empêchent la synthèse de l'acide folique, substance nécessaire au métabolisme des bactéries. Ces 50 dernières années, les résistances bactériennes sont devenues fréquentes (plus de 38 cas de résistances bactériennes ont été identifiés (Roberts, 2005).	SULFAMETHOXAZOLE	360-500 ^b	185-200 ^b	270-320 ^b	1300-2100 ^b	Le sulfaméthoxazole est appliqué dans le traitement des infections humaines (bronchites, méningites, infections aux yeux et infections urinaires) (www.medicinenet.com). Le sulfaméthoxazole n'est plus utilisé seul comme antibiotique dû aux résistances bactériennes développées. Il est donc utilisé en combinaison avec le triméthoprim (www.medicinenet.com). Le principal métabolite N ⁴ -acétylsulfaméthoxazole qui compte jusqu'à 50 % de la dose administrée de sulfaméthoxazole, est généralement retransformé en sa molécule parent (Göbel et al., 2005). L'absorption du sulfaméthoxazole sur les boues urbaines a été rapporté. Par contre le N ⁴ -acétylsulfaméthoxazole n'est pas absorbé même s'il est présent à des concentrations plus élevées dans les effluents. En conséquence, ce métabolite est souvent détecté dans les rivières (Göbel et al., 2005). Drillia et al. (2005) dans leur travail réalisé en réacteur batch avec des boues alimentées par un substrat synthétique, ont observé que les microorganismes peuvent utiliser le sulfaméthoxazole comme source d'azote quand il n'existe pas d'autre source d'azote facilement dégradable.
		250 ± 2750 ^c		50 ± 150 ^c	400-2100 ^c	
		430 ± 200 ^d		280 ± 560 ^d	100 ± 200 ^c	
TÉTRACYCLINES : sont des bactériostatiques. Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en se fixant à la sous-unité 30 S des ribosomes. Les tétracyclines ont tendance à former des complexes avec les cations divalents (Ca ²⁺ et Mg ²⁺) (Halling-Sorensen et al., 2002).	TÉTRACYCLINE	0-35 ^b	0-20 ^b	0-30 ^b	< 40 ^c	La tétracycline subit une dégradation photochimique et forme différents produits. Une partie de ces produits sont très solubles, ceci induit la stabilité de ces molécules dans les eaux de rivières. D'après Watkinson et al. (2007), la tétracycline est significativement éliminée de la phase liquide (~50 %) par absorption sur les boues urbaines. Cependant, la tétracycline a été souvent détectée dans les effluents des stations d'épuration ce qui suggère que son élimination n'est pas complète (Watkinson et al., 2009).
		< 10 ^c		< 20 ^c		

N.D = non détecté; Erythromycin-H₂O (E_{H2O})

^a Gulkowska et al. (2008) ; ^b Watkinson et al. (2007) ; ^c Watkinson et al. (2009) ; ^d Göbel et al. (2005) ; ^e Brown et al., 2006

I.4.1. INFLUENCE DES COMPOSÉS PHARMACEUTIQUES SUR L'ACTIVITÉ BACTÉRIENNE

Les antibiotiques peuvent être des agresseurs bactériens dans les stations d'épuration. Ils attaquent surtout les bactéries qui se trouvent à l'extérieur des agrégats mais les antibiotiques échouent lorsqu'il s'agit d'atteindre les cellules enveloppées à l'intérieur des biofilms (Stewart et Costerton, 2001). Cet échec de pénétration serait dû à une hétérogénéité des agrégats liée aux micro-environnements dans les agrégats avec des gradients de nutriments et des gradients d'activité physiologique des bactéries (Mah et O'Toole, 2001). Des tests avec des biofilms modèles ont montré la survie des bactéries au sein des agrégats, même lorsque l'antibiotique dépasse de cent ou mille fois la concentration inhibitrice minimale de la bactérie (concentration mesurée en suspension) (Ceri et al., 1999). En effet, les bactéries enveloppées dans les biofilms sont mille fois plus résistantes aux antibiotiques que celles dans les suspensions liquides (Everst, 2006).

En présence d'une agression extérieure, les bactéries localisées à l'interface entre la phase liquide et l'agrégat perdent leur activité en premier. Cette perte d'activité a été mise en évidence par respirométrie dans le cas d'un biofilm de *K. pneumoniae* en présence d'un biocide (Huang et al., 1995). D'après Stewart (2001), dans la constitution d'un agrégat biologique, les bactéries auraient des fonctions différentes. Ainsi, en présence d'antibiotiques agissant en conditions aérobies, les bactéries localisées dans les zones aérobies des biofilms subissent l'attaque de l'antibiotique. Néanmoins, elles ne freinent pas la consommation de l'oxygène même en perdant leurs capacités de reproduction. Ceci permet la protection des cellules localisées au sein du biofilm. Cette organisation les aide à surmonter des situations catastrophiques. De cette manière, certaines cellules ont un rôle de protection pendant que d'autres se développent.

Mah et O'Toole (2001) ont présenté certaines hypothèses pour expliquer les mécanismes qui permettent aux communautés microbiennes de surmonter les effets néfastes des antibiotiques. La première hypothèse suggère que la matrice polymérique extracellulaire (le glycocalix et d'autres constituants) forment une première barrière qui retarde ou limite la pénétration de l'agent antibactérien. Cependant, cette barrière n'est pas complètement imperméable. La deuxième hypothèse suppose une pénétration incomplète de l'antibiotique à l'intérieur du biofilm. A ce sujet, Stewart et Costerton (2001) considèrent plus plausible la désactivation des antibiotiques à la surface de biofilms que leur pénétration interrompue, dû

au fait que les biofilms ne sont pas des barrières impénétrables à la diffusion. La troisième hypothèse suggère une réponse bactérienne particulière face à la situation de stress générée par la présence de l'antibiotique. La réponse aux stress induit des changements physiologiques dans les bactéries comme un acte de protection aux agressions extérieures. Une réponse bactérienne implique la variation des proportions de protéines transmembranaires, ce qui contribue à la résistance aux antibiotiques. Cette variation de protéines induit la réduction de la perméabilité de la couverture cellulaire. Une autre réponse possible au stress est régulée par un facteur (RpoS) manifesté seulement pendant la phase stationnaire de croissance bactérienne (Hengge-Aronis, 1996). L'étude de Desai et al. (1998) montre que la résistance bactérienne aux antibiotiques est maximale dans la phase stationnaire de croissance. Ceci montre que le ralentissement de la croissance bactérienne contribue à la survie bactérienne en présence d'antibiotiques.

L'acclimatation de boues à la présence de composés xénobiotiques (les toxines ou les médicaments) est une stratégie qui permet aux bactéries d'acquérir la capacité de dégrader ces types de composés. Néanmoins, la nécessité de cette période d'acclimatation indique que les boues ne possèdent pas la capacité de dégrader naturellement ces molécules. Chong et al. (2008) ont montré que des boues activées deviennent capables de dégrader un composé xénobiotique (l'acide 2,4 dichlorophenoxyacétique) grâce à une période d'acclimatation. La période d'acclimatation a consisté à exposer les bactéries au composé xénobiotique et au glucose. Cependant, l'étude a démontré que les bactéries perdent cette capacité de dégradation suite à l'absence du composé nuisible sur des périodes de longue durée. En outre, les bactéries ne sont pas capables de dégrader le polluant quand il est réintroduit de manière isolé. Certaines bactéries du consortium bactérien auraient la capacité de développer un mécanisme de dégradation de ces composés par une modification génétique. Les cellules ayant acquis cette capacité peuvent ensuite utiliser le composé xénobiotique comme un substrat (Chong, 2009). Un exemple de ce phénomène est l'étude de Drillia et al. (2005). Dans cette étude le sulfaméthoxazole est utilisé comme source de carbone et d'azote par les bactéries. Le sulfaméthoxazole est à l'heure actuelle utilisé en combinaison avec le triméthoprim dû au développement de différentes formes de résistances bactérienne au sulfaméthoxazole (www.medicinenet.com). Ceci peut donc expliquer la capacité des bactéries à utiliser ce composé comme une source d'énergie.

Une voie de bio-transformation des composés xénobiotiques est le co-métabolisme. Elle consiste à faire dégrader le composé par les bactéries en même temps qu'elles métabolisent un

substrat qui favorise leur croissance. Cependant, la présence du polluant peut inhiber le métabolisme du substrat (Ely et al., 1997). Pour éviter ce phénomène, un apport périodique du substrat (comme nutriment) doit se réaliser afin de favoriser la production des enzymes (Alvarez-Cohen et Speitel, 2001). La dégradation du trichloroéthylène a été possible par co-métabolisme. Les bactéries nitrifiantes produisant des enzymes oxydases ont été capables de dégrader le trichloroéthylène en présence d'ammonium, ce dernier étant le substrat (Alpaslan et Çeçen, 2005).

1.4.2. INFLUENCE SUR LES PERFORMANCES DE L'ÉPURATION

L'inhibition de l'activité bactérienne occasionnée par la présence de composés pharmaceutiques influence la dégradation de la matière organique dans les installations de traitement des eaux usées. La dégradation des composés pharmaceutiques dans les stations d'épuration varie de zéro à presque une dégradation complète. Ceci est fonction du type de composé à dégrader et du type de procédé qui a lieu (Hirsch et al., 1999).

Selon différentes études, la présence d'antibiotiques perturbe globalement la nitrification. La nitrification constitue une étape du traitement des eaux à la fois importante et sensible aux conditions du milieu.

Dionisi et al. (2007) ont utilisé des réacteurs batch pour l'épuration d'un effluent contenant du substrat synthétique et un cocktail de micropolluants constitué de 10 composés xénobiotiques (concentration de l'ordre du mg/L) ainsi que des métaux lourds. Ils ont observé qu'en présence de micropolluants, une inhibition importante de la consommation de l'ammonium est obtenue tandis que l'élimination de la DCO et les propriétés de décantation des boues sont restées invariables. En effet, la consommation de l'ammonium est seulement de l'ordre du 29 à 37 % en présence des micropolluants tandis que cette consommation atteint 82 % en absence de micropolluants. La fraction de microorganismes nitrifiants diminue de 4,5 % de VSS à 0,5 % de VSS comme résultat de la présence de micropolluants. Selon Campos et al. (2001), l'effet des composés pharmaceutiques sur la nitrification varie avec le type de substance. Ils ont étudié la stabilité d'une culture de bactéries nitrifiantes en présence de deux antibiotiques (chloramphénicol et oxytétracycline hydrochloride). L'oxytétracycline à concentrations moyennes (100-250 mg/L) inhibe à 50 % la nitrification tandis qu'à des concentrations plus faibles (inférieures à 100 mg/L) il n'y a pas d'effet sur la nitrification. Le

chloramphenicol, ne montre aucun effet négatif sur la nitrification pour des concentrations entre 0 – 250 mg/L. D'après Carucci et al. (2006), la ranitidine et la lincomycine montrent un effet significativement négatif sur la nitrification. Par contre, l'atenolol a été fortement éliminé de l'effluent sans aucune inhibition de la nitrification. L'étude de Louvet et al. (2010a) réalisée en réacteurs batch sur des boues activées des stations d'épuration, a montré que les taux de nitrification et d'élimination de la DCO ont diminué en présence d'erythromycine en fonction de l'origine des boues. Egalement, l'intégralité des floes a été menacée avec désagglomération en présence de l'erythromycine. Prado et al. (2009) ont évalué l'influence de la tétracycline utilisant un bioréacteur à membrane pour l'épuration d'un effluent provenant de l'élevage de porcs. La présence de la tétracycline n'a pas eu d'effets significatifs sur l'élimination de la DCO ni de l'ammonium. Cependant, la désagglomération des boues a provoqué la diminution de la biomasse en présence de l'antibiotique. Delgado (2009) a étudié l'utilisation d'un bioréacteur à membrane pour le traitement d'un effluent contenant du cyclophosphamide et ses principaux métabolites. Il a signalé que le rendement d'élimination de la DCO et de l'azote restent très élevés en présence du médicament. En présence de ce médicament, la diminution de la biomasse a été observée sur des boues relativement « jeunes » de 50 jours. Néanmoins, sur des boues de 70 jours, les modifications observées sur la biomasse n'ont pas été significatives.

La sorption de composés pharmaceutiques sur les boues activées a été évaluée comme un mécanisme d'épuration de la phase liquide. A ce sujet, Joss et al. (2006) ont évalué dans la phase soluble, le taux de dégradation de divers composés pharmaceutiques utilisant le coefficient d'adsorption de ces micropolluants sur les boues biologiques. En effet, ils proposent de classer les composés pharmaceutiques selon leur taux de dégradation. Ainsi, la classification faite montre que parmi les 32 composés pharmaceutiques étudiés, la plupart sont partiellement dégradés (15 sur 32), d'autres ne sont pas du tout dégradés (13 sur 32) et seulement 4 sur 32 composés ont montré une dégradation biologique supérieure à 90 %. Les composés qui sont les plus difficiles à dégrader sont ceux appartenant à la famille de macrolides et sulfonamides. De plus, l'étude a montré que la dilution des effluents réduit la capacité de dégradation de ces composés. En conséquence, il est recommandé que le traitement des effluents soit fait à la source.

Afin d'augmenter l'élimination de composés pharmaceutiques de la phase soluble, la combinaison des procédés biologiques avec des procédés d'oxydation chimique est une option à envisager pour une bonne élimination de polluants de l'eau (Klavarioti et al., 2009).

D'après Bursch et al. (2003), l'élimination des perturbateurs endocriniens des eaux est obtenue en augmentant l'âge de boues dans le procédé de traitement biologique et en considérant des phases alternées d'oxydation. Gonzalez et al. (2009) proposent pour le traitement d'un effluent contenant du sulfaméthoxazole (200 mg/L), un procédé hybride d'oxydation par photo-fenton avec un traitement biologique complémentaire. Le procédé d'oxydation est une étape préliminaire au traitement biologique (réalisé dans des réacteurs batch). L'effluent prétraité par oxydation contient des composés intermédiaires de l'antibiotique comme seule source de carbone disponible pour l'épuration biologique. Ils obtiennent ainsi une élimination presque totale de la DCO. Une étape anaérobie complémentaire permet de réduire les nitrates obtenant ainsi une élimination de l'azote.

Etant donné qu'en utilisant les traitements biologiques l'élimination totale des composés pharmaceutiques est limitée, des procédés chimiques ont été proposés. Par exemple, l'adoption du procédé d'oxydation avancé peut contribuer considérablement à la dégradation de certains composés pharmaceutiques. L'ozonation est une voie chimique de transformation qui permet d'éliminer les effets pharmaceutiques des composés sur la matière organique (Ternes et al., 2003). Néanmoins, l'ozonation n'est pas efficace sur tous les types de molécules. Certaines conditions sont nécessaires telles que la présence de double liaison C-C et des liaisons aromatiques ou azotées. Andreozzi et al. (2005) ont montré que l'ozonation permet de dégrader l'amoxicilline. Cependant, différents composés intermédiaires ont été formés comme résultat de l'ozonation. En effet, Li et al. (2008) ont signalé que les métabolites formés, suite au procédé d'ozonation, sont encore plus toxiques que leurs molécules parents.

Le procédé d'adsorption sur charbon actif a été également évalué dans différentes études pour l'élimination de divers micropolluants. Par exemple, Snyder et al. (2007) ont étudié l'adsorption sur charbon actif des 13 composés pharmaceutiques et de 7 perturbateurs endocriniens ainsi que d'autres micropolluants. Ils ont rapporté une élimination supérieure à 90 % de tous les composés étudiés.

I.5. UTILISATION DES CULTURES FONGIQUES POUR LE TRAITEMENT DES EAUX USÉES

Bien que les espèces fongiques possèdent une bonne capacité de dégradation de différents composés organiques et inorganiques des eaux usées, leur étude est fréquemment négligée par comparaison à l'étude de microorganismes bactériens (Gadd, 2008). La plupart des microorganismes fongiques sont acidophiles c'est-à-dire que leur croissance est favorisée à des conditions de pH acide (entre 4 et 6). A l'inverse, les pH alcalins sont nuisibles à leur survie. Ces espèces ne sont pas directement affectées par certaines molécules reconnues comme des substances toxiques pour les bactéries tels que les antibiotiques et les métaux lourds. Par contre, ce sont des microorganismes fortement sensibles à des températures élevées (supérieure à 37 °C). De plus, l'absence d'hydratation produit un stress cellulaire et affecte défavorablement la physiologie des cellules. La plupart des espèces fongiques présentes dans les eaux sont strictement aérobies et ne peuvent pas vivre en absence d'oxygène (Kavanagh, 2005).

Les espèces fongiques possèdent une grande capacité de production d'enzymes liée à leur deux types de systèmes enzymatiques extracellulaires : un système hydrolytique qui produit des hydrolases responsables de la dégradation des polysaccharides, et un système oxydatif de dégradation des composés ligniques et phénoliques (Sánchez, 2009). L'emploi de cultures fongiques et de leurs enzymes pour le traitement ou l'élimination de polluants, est de plus en plus utilisée car elles ne représentent aucun danger pour l'environnement. C'est le cas par exemple du traitement des effluents, qui ont connu un grand intérêt scientifique au cours de ces dernières années.

Les effluents de l'industrie papetière (production de pulpe de papier et du papier en général) sont caractérisés par : *i*) une demande biochimique et chimique importante en oxygène (DBO et DCO), *ii*) des grandes concentrations de nutriments, *iii*) une présence importante de solides en suspension, *iv*) une toxicité élevée, et *v*) une couleur permanente de l'eau (Pokhrel et Viraraghavan, 2004). Le traitement de ce type d'effluents peut être efficacement réalisé par des cultures fongiques.

Les cultures fongiques dégradent les matériaux ligno-cellulosiques et réduisent la couleur des effluents par l'action de certaines enzymes synthétisées (Sakurai et al., 2001; Pokhrel et Viraraghavan, 2004). Par exemple, l'application de l'espèce fongique *T. versicolor* sur des effluents papetiers a permis la réduction de 68 % de la couleur et de 52 % de composés

lignoides (Ortega-Clemente et al., 2009). Les cultures fongiques présentent aussi des propriétés de biosorption responsables d'une réduction significative de la couleur des effluents et de la toxicité des eaux (Prigione et al. 2008, Park et al. 2007, Sakurai et al., 2001; Pokhrel et Viraraghavan, 2004). D'après, D'Annibale et al. (1999), les cultures fongiques participent non seulement à la biosorption mais aussi à la dégradation des composés aromatiques (principalement responsables de la couleur dans les effluents). Les cultures fongiques synthétisent des enzymes de type oxydases pour pouvoir dégrader les composés aromatiques ; ce processus de dégradation a lieu dans la matrice extracellulaire.

L'action fongique sur les composés aromatiques a été également utilisée pour l'épuration des effluents d'industries de teinture (Nozaki et al., 2008). Les composés phénoliques, qui ont une activité antibactérienne dans l'eau, sont efficacement éliminés par des souches fongiques dans le cas des effluents de l'industrie alimentaire du café et de l'huile d'olive (D'Annibale et al., 2006). Denizli et al. (2004) ont étudié l'élimination des chlorophénols (phenol, *o*-chlorophenol, *p*-chlorophenol et 2,4,6-trichlorophenol) de la phase liquide par adsorption sur la biomasse. Ils ont déterminé une capacité d'adsorption jusqu'à 2 mmol/g des polluants par le champignon *Phanerochaete chrysosporium*.

Certains composés pouvant être toxiques pour les organismes procaryotes (bactéries), sont moins nocifs pour les organismes eucaryotes (cultures fongiques). Dans le cas des effluents toxiques pour les bactéries, l'utilisation de cultures fongiques peut représenter une alternative biologique efficace. Les cultures fongiques ont une grande capacité de tolérance pour les métaux lourds qui s'adsorbent sur la surface des agrégats sans que l'existence de cultures fongiques soit affectée (Aguilera et al., 2008).

En ce qui concerne les procédés d'épuration, la nitrification, étape sensible aux changements environnementaux de la station, a été souvent considérée comme un procédé exclusivement bactérien. Cependant, d'après Guest et Smith (2002), les cultures fongiques ont certains avantages sur la performance de la nitrification: les cultures fongiques présentent un rendement de nitrification plus élevé que les bactéries et une résistance importante à l'inhibition du traitement de l'azote. Kurakov et Popov (1996) ont montré que les microorganismes fongiques complètent la nitrification dans une seule réaction et produisent de un à quatre fois plus de nitrates que les bactéries autotrophes. Mannan et al. (2005) ont observé un très bon rendement d'élimination de la DCO (environ 94 %) après deux jours de traitement des affluents domestiques avec le champignon *Penicillium corylophilum*.

Une autre application des cultures fongiques vise à améliorer la séparation boue/eau. Alam et Fakhru'l-Razi (2003) ont examiné la décantation et déshydratation des boues urbaines en les traitant avec deux cultures fongiques (*Aspergillus niger* et *Penicillium corylophilum*). Des solides facilement décantables (80 % de la quantité de solides totaux) ont été formés avec des champignons tandis que les boues sans traitement fongique ne contiennent que 5% de solides décantables. Ainsi, la boue traitée par des cultures fongiques a des meilleures caractéristiques de déshydratation. Une application récente des cultures fongiques pour la réduction des boues est le procédé breveté MyCET® (Nicaud, 2008) qui, à température et pression ambiante et sans ajout de produits chimiques permet d'obtenir une réduction de plus de 30 % de la boue (selon le fabricant).

La production des EPS est aussi une propriété naturelle de cultures fongiques. Les polysaccharides sont amplement produits par les cultures fongiques. De ce fait, certaines études visent à maximiser la production de polysaccharides avec des finalités commerciales (Forabosco et al., 2006). Les polysaccharides ayant des caractéristiques adhésives présentent différentes applications dans le domaine pharmaceutique et alimentaire (Sutherland, 1996).

Les enzymes constituent également un composant important des substances fongiques extracellulaires excrétées. Dans les applications de traitement de l'eau, les peroxydases fongiques extracellulaires (peroxydase de lignine, peroxydase de manganèse) et les laccases fongiques sont les deux classes principales d'enzymes évaluées pour l'élimination des composés phénoliques toxiques des eaux usées industrielles et pour la dégradation des xénobiotiques persistants (Ikehata et al., 2004). Wen et al. (2010) utilisent l'enzyme peroxydase de manganèse produite par le champignon *Phanerochaete chrysosporium* comme un biocatalyseur dans la dégradation de la tétracycline et l'oxytétracycline. Ils traitent des effluents contenant 50 mg/L de chaque antibiotique et ils atteignent des pourcentages de dégradation de 72 % pour la tétracycline et 84 % pour l'oxytétracycline sur une période de 4 heures. D'Souza et al. (2006) ont utilisé une espèce fongique marine pour la décoloration des effluents de l'industrie textile. Les résultats montrent une décoloration totale des effluents industriels et une décoloration quasi totale des mélanges aqueux de neuf teintures différentes. L'enzyme majoritaire impliquée dans le processus de décoloration était la laccase. L'adsorption de métaux lourds sur les agrégats fongiques est attribuée à la présence des EPS. La quantité d'EPS augmente avec l'augmentation de la concentration de métaux lourds dans la liqueur par un mécanisme de protection semblable à celui de bactéries en présence de stress (Aguilera et al. 2008). Papinutti (2010) a étudié la production des EPS de cultures fongiques

provenant du bois. Il a constaté une relation inverse entre la quantité de biomasse et la production des EPS. En effet, ils ont noté une augmentation des EPS tandis que le nombre de cellules diminue. Cette corrélation a été également vérifiée par Aguilera et al. (2008) dans le cas de biofilms des rivières formés par des cultures fongiques. Ils ont déterminé que le constituant majeur des EPS sont les polysaccharides. Papinutti (2010) suggère que la production des EPS par les cultures fongiques est associée avec le mécanisme de protection contre la dessiccation.

Dans cette thèse, l'étude des cultures fongiques a été suscitée d'une part, par la production des EPS, acteurs de la structuration des floccs, et d'autre part, par l'observation empirique de l'amélioration de la décantation avec l'ajout d'additifs fongiques dans une papeterie.

I.6. SUIVI DU FONCTIONNEMENT D'UNE STATION DE TRAITEMENT DES EAUX USÉES

Une station d'épuration est soumise à des contraintes de normativité qui veillent à contrôler la qualité des effluents. De ce fait, la station doit maintenir une bonne performance du procédé de traitement avec une qualité satisfaisante de l'effluent. Pour cela, le suivi et le contrôle permanent et automatique des paramètres essentiels à chaque étape du procédé est nécessaire (Dégremont, 2005).

Puisque la station regroupe un ensemble de procédés de différents types (physiques, physico-chimiques et biologiques), plusieurs paramètres nécessitent d'être mesurés le long du procédé de traitement des eaux et suivis temporellement (Metcalf et Eddy, 2003). Ces paramètres sont : *des paramètres physiques* (concentration de solides, turbidité, couleur, adsorption, température, conductivité, densité, pH et débits entre autre), *des paramètres physico-chimiques* (alcalinité, demande chimique en oxygène (DCO), carbone organique total (COT), concentration en oxygène dissous, phosphore, ammonium, nitrates et nitrites, sulfures, huiles et graisses) et *des paramètres biologiques* (demande bio-chimique en oxygène (DBO₅), mesures de microorganismes pathogènes, indicateurs biologiques, identification de microorganismes (bactéries, virus) et test de toxicité biologique, entre autres).

Ces paramètres subissent des fluctuations selon la qualité de l'affluent. Ces fluctuations peuvent être de plusieurs sortes : *fluctuations ponctuelles ou instantanées* : polluants

indésirables arrivant à la station d'épuration; *fluctuations horaires* : pics dans les heures du matin de concentrations des molécules pharmaceutiques et de leurs métabolites dans les stations d'épuration des eaux urbaines; *fluctuations journalières ou mensuelles* : dans les stations d'épuration de papeteries, les pics de concentration des différents polluants dépendent de l'élaboration journalière ou mensuelle du produit final de la papeterie (réactifs et procédés différents peuvent être impliqués) (Lacorte et al., 2003) ; *fluctuations saisonnières* : la diminution de la température de la liqueur du réacteur biologique en hiver influence négativement la performance du traitement. Les dysfonctionnements biologiques (e.g. le développement excessif des bactéries filamenteuses) des stations d'épuration se rajoutent à la variabilité du système.

L'ensemble de ces fluctuations engendre une instabilité permanente du procédé et rend plus difficile l'obtention d'une qualité constante de l'effluent dans le temps. Le système de contrôle doit être dynamique avec une détection rapide de toute déviation ou anomalie pour pouvoir corriger ou modifier à temps des consignes ou des fonctionnements d'équipements (Metcalf et Eddy, 2003). Des mesures en ligne de différents paramètres opérationnels à manipuler (température, pH, débits, concentration en oxygène dissous) et des mesures quotidiennes de paramètres de suivi (DCO, MES, azote ammoniacale, entre autre) doivent être effectuées pour contrôler la qualité de l'eau traitée. L'enregistrement de mesures engendre une quantité considérable d'informations qui nécessitent d'être analysées afin de caractériser et de décrire les conditions qui gouvernent le système.

D'après Sanchez et al. (1996), le suivi et le contrôle d'un système de traitement des eaux peuvent uniquement être réalisés par une approche multi-disciplinaire incluant :

- le monitoring (suivi quantitatif et qualitatif de paramètres réalisé en continu),
- le contrôle (conservation de la valeur d'une variable en réduisant les coûts d'opération),
- la connaissance expérimentale (recueil d'un savoir-faire spécifique à une station),
- l'expertise (évaluation d'un expert dans le domaine),
- la modélisation (assemblage des lois mathématiques et des équations pour simuler les différents procédés).

L'approche appliquée dans cette thèse pour le suivi du fonctionnement de trois stations d'épuration de papeteries, commence par l'analyse des données collectées. La base de données est une source précieuse d'information qui caractérise le système soumis à des

conditions particulières. La connaissance expérimentale du système est obtenue par l'analyse statistique de données et par l'identification du comportement de chaque variable. Ainsi, la dynamique du procédé a été identifiée et les variables influençant la qualité de l'effluent ont été distinguées.

I.6.1. ANALYSE STATISTIQUE DE DONNÉES

La statistique permet le traitement de données et l'analyse statistique de données cherche à identifier et à décrire les caractéristiques et les tendances de variables. L'analyse statistique consiste essentiellement à l'étude de la variabilité (dispersion des variables dans un système). Ces deux outils sont particulièrement adoptés dans des systèmes présentant un nombre très important de données. C'est ce qui sera le cas dans cette étude notamment pour la compréhension et l'inter-comparaison du fonctionnement des différentes stations de traitement des eaux.

Voici quelques exemples d'application de l'analyse statistique de données sur des procédés de traitement des eaux usées. Afin de décrire la performance de la décantation de boues d'un réacteur batch séquentiel, Ng et al. (2000) ont évalué statistiquement les données des mesures opérationnelles. L'étude comporte deux phases : « la phase de diagnostic » où les corrélations entre les variables du procédé ont été établies et, « la phase d'analyse » dans laquelle l'indice de Mohlman (paramètre permettant l'estimation de la décantation) est décrit par des expressions mathématiques en fonction des autres variables mesurées dans le procédé. Ils ont montré que l'indice de Mohlman était fonction de la DCO (demande chimique en oxygène) de l'affluent, de la quantité de biomasse, du ratio nutriments/biomasse, du pH et du flux d'air dans le bassin biologique. Mujunen et al. (1998) ont étudié les données recueillies dans des stations d'épuration de papeteries. Ils ont utilisé la méthode statistique des moindres carrés pour déterminer les paramètres opérationnels influençant la décantation, l'élimination de la DCO et de l'azote total. Ils ont noté qu'une augmentation de la quantité de bactéries filamenteuses (préjudiciable à la décantation), est liée à la diminution de la concentration d'oxygène dissous dans le bassin biologique et aux changements de la DCO de l'affluent. Les problèmes de « bulking » ont été liés à un faible ratio nutriments/biomasse dans le bassin biologique. Ils ont aussi constaté que les nutriments (azote et phosphore) ont un rôle important dans l'élimination de la DCO et de l'azote total.

Parmi les différentes techniques statistiques d'analyse des données, l'analyse en composantes principales (ACP) est utilisée car elle présente l'avantage de réduire la dimensionnalité et la colinéarité des données. La réduction de la dimensionnalité permet de résoudre l'inconvénient du traitement des magnitudes et des unités apportées par les diverses variables traitées. La redondance entre les données est limitée par la réduction de la colinéarité (Aguado et Rosen, 2008 ; Kourti et al., 1996). Dans la méthode ACP, la compression de l'information et la réduction de la dimensionnalité d'une base de données sont obtenues par le calcul des *variables latentes*. Chaque variable latente est une combinaison linéaire des variables de départ. Ces variables latentes sont calculées afin de conserver la plus grande part de la variabilité du système. Dans le nouvel espace créé, la force de la corrélation entre variables est évaluée par le coefficient de corrélation. Une matrice de corrélation présente les coefficients calculés pour tout le système. Les données sont regroupées sous forme d'un tableau. Ce tableau présente *les variables* qui sont des individus ayant un même caractère ainsi que *les observations* qui correspondent aux valeurs d'une variable décrivant une évolution.

L'ACP fournit également une représentation graphique de ces corrélations établies entre variables (l'interprétation de résultats devenant ainsi plus simple). Des plans bidimensionnels (cercle de corrélation) illustrent la variabilité du système par la localisation de variables pouvant avoir une contribution majeure ou faible dans le système (figure I.13). Ainsi les variables qui contribuent plus fortement à la variabilité du système sont localisées près du bord du cercle, contrairement aux variables qui ne sont pas expliquées par le système et qui se situent près du centre. Les variables qui évoluent de la même manière (variables corrélées) sont proches entre elles. Les variables qui se corrélaient négativement forment un angle de 180° et celles qui sont indépendantes entre elles forment un angle droit.

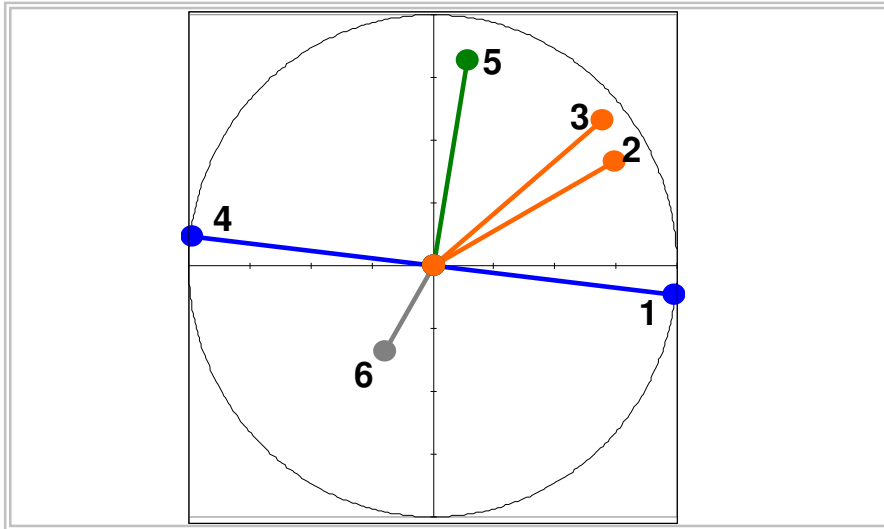


Figure I.13. Cercle de corrélation représentant les liaisons entre les variables.
Corrélation positive : variables 2 et 3 ; corrélation négative : variables 1 et 4 ; indépendance entre variables 1 et 5. La variable 6 n'est pas décrite dans la variabilité du système.

De cette manière les liaisons existantes entre les variables sont identifiées. Ceci permet de retrouver des comportements qui vont servir à comprendre le fonctionnement du système. Une fois accomplie cette « phase de diagnostic », la « phase d'analyse » permet la description de variables à travers des expressions mathématiques. Pour des raisons de simple utilisation dans les stations d'épuration, lors de cette thèse, la description mathématique a été limitée à des expressions simples : régressions multiples de type linéaire et de type exponentiel de deuxième degré.

Expression linéaire multiple : $y = a + m_1 * x_1 + m_2 * x_2 + \dots$ (Eq. I.8)

Expression polynomiale de 2^{ème} degré : $y = a + m_1 * x_1 + m_2 * x_1^2 + \dots$ (Eq. I.9)

Par cette démarche, une description empirique basée sur les mesures technologiques enregistrées, reflète les caractéristiques du système à des conditions données. Cette méthode a des potentialités stratégiques pour la maîtrise du fonctionnement d'une station d'épuration. La méthode permet de répertorier les différentes situations d'opération dans la station d'épuration et de les décrire par des expressions mathématiques pour une meilleure compréhension du procédé. Ceci permet de visionner les corrections nécessaires pour éviter des disfonctionnements à la station.

I.7. CONCLUSIONS

Le traitement des eaux usées par voie biologique fait l'objet de recherches continues afin d'optimiser les procédés en déterminant les meilleures conditions favorisant l'élimination des polluants. Une partie d'études s'intéresse à l'activité des microorganismes lors de la dégradation de la matière organique. Plusieurs thématiques sont abordées par les scientifiques, entre autres, (i) la présence de molécules xénobiotiques et leur incidence sur l'activité microbienne ; (ii) l'influence des paramètres opérationnelles sur les caractéristiques des agrégats microbiens et sur les performances de l'épuration ; (iii) la séparation de la biomasse de l'eau épurée. Des nombreuses études ont montré que les EPS sont produits naturellement par les microorganismes, reflètent leur comportement et déterminent la structure des agrégats biologiques et leur propriétés. Notre travail de thèse s'inscrit dans ce contexte de recherche dont ce chapitre a fait un état de l'art.

La présence des composés xénobiotiques en différents points du cycle de l'eau (notamment dans les effluents urbains et les eaux de surfaces) a été clairement démontré. Différentes techniques pour leur élimination et/ou transformation dans les eaux usées ont été étudiées et proposées. Cependant, l'influence des xénobiotiques sur le comportement microbien n'a pas été encore suffisamment approfondie. Le présent travail vise à apporter des nouvelles connaissances sur la sensibilité de la biomasse à la présence de deux types de molécules pharmaceutiques, notamment à travers l'étude des EPS.

Les résultats des investigations menées jusqu'ici sur la décantation des boues et l'implication des EPS sont controversés. Certains résultats démontrent que c'est la nature chimique des EPS qui détermine les caractéristiques de décantation des boues. D'autres résultats, par contre, montrent que la quantité des EPS est le facteur le plus important dans la décantation des boues. D'autres études encore révèlent qu'aucun de deux facteurs (nature et quantité des EPS) n'a d'influence significative sur la décantation des boues. Il s'agit donc d'un terrain d'investigation complexe dû au fait que chacune des études n'a pas été réalisée dans les mêmes conditions. De plus, la décantation des boues est déterminée par de multiples paramètres qui varient en même temps (l'agrégation de la biomasse, les liaisons avec les cations, les conditions hydrodynamiques...), ce qui pourrait expliquer la divergence sur les résultats.

Notre étude vise à prendre en compte d'une part, tous les paramètres enregistrés sur la station d'épuration et, d'autre part, l'analyse physico-chimique des boues et notamment des EPS. Dans le cas d'une mauvaise décantation récurrente des boues, nous envisageons d'étudier également le phénomène d'amélioration de la décantation par l'ajout de cultures fongiques.

CHAPITRE II.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. PROVENANCE DES ÉCHANTILLONS

Toutes nos études ont été réalisées sur des boues réelles provenant de stations d'épuration/réseaux d'assainissement. Les boues des stations d'épuration des eaux urbaines ont été étudiées dans un contexte d'exposition aux molécules pharmaceutiques. Les boues provenant des stations d'épuration industrielles des papeteries ont servi à l'étude de la décantation et à l'évaluation du procédé de traitement.

II.1.1. EAUX USÉES URBAINES

Les boues urbaines ont été utilisées dans la réalisation des études suivantes :

- a) Pour évaluer l'impact de l'agent anticancéreux (le cyclophosphamide) sur la biomasse, nous avons utilisé des boues biologiques alimentées par les eaux urbaines du réseau d'assainissement de la commune de Brax. L'étude a été réalisée en bioréacteur à membrane.
- a) Dans l'étude de l'impact des antibiotiques sur la biomasse, nous avons utilisé des boues prélevées dans deux stations d'épuration : la station d'épuration des eaux urbaines d'Epinal-Golbey et celle de Nancy-maxéville. Ces deux stations d'épuration utilisent le procédé à boues activées. L'étude a été réalisée en réacteur batch.

Réseaux d'assainissement des eaux urbaines de Brax

L'eau résiduaire urbaine utilisée pour l'alimentation des bioréacteurs à membrane lors de deux campagnes expérimentales provenait du réseau d'assainissement des eaux urbaines de Brax. L'eau prélevée a été enrichie avec une solution contenant du Viandox ®. L'utilisation de la solution de Viandox ® a permis d'ajuster la concentration en DCO de l'affluent des bioréacteurs (Delgado, 2009). La caractérisation des eaux prélevées suivant la campagne d'expériences est présentée dans le tableau II.1.

Tableau II.1. Concentrations moyennes en DCO, MES et azote de l'eau résiduaire de Brax durant les campagnes expérimentales [Delgado, 2009].

Paramètre	Durant la campagne I	Durant la campagne II
DCO totale (mg/L)	205 ± 115	405 ± 355
MES (mg/L)	175 ± 115	395 ± 380
Azote soluble (mg/L)	43 ± 16	50 ± 16

Station d'épuration d'Epinal-Golbey

La station d'épuration d'Epinal-Golbey (figure II.1) a été dimensionnée pour 80 000 éq. habitant mais à l'heure actuelle, elle reçoit une charge journalière correspondant à 55 000 éq. habitant. Elle traite des eaux urbaines et des eaux issues d'une charcuterie industrielle. Le tableau II.2 montre les valeurs moyennes des paramètres caractérisant l'affluent à la station durant la période de prélèvements.

Après le traitement primaire habituel de dégrillage, dessablage et dégraissage; le traitement biologique de l'eau est réalisé dans un bassin rectangulaire constitué de deux lignes de traitement (carrousels) opérant en parallèle. Chaque ligne comporte un bassin d'aération de 5 000 m³ et un clarificateur de 31 m de diamètre. Les bassins d'aération permettent à la fois l'élimination du carbone et l'élimination de l'azote ; l'élimination de l'azote est réalisée grâce à des cycles alternés d'aération (1 à 3 h) et d'anoxie (2 à 3 h) effectués en fonction du potentiel redox. L'aération dans chaque bassin est assurée par des diffuseurs d'air et des agitateurs. L'élimination du phosphore est réalisée dans le même bassin par précipitation physico-chimique. Il s'agit du procédé classique à boues activées avec recirculation d'une partie des boues décantées. Le débit de recirculation des boues décantées vers le bassin biologique représente 100 % du débit d'eau d'entrée du bassin. Le temps de séjour des boues dans le bassin biologique est de 10 à 15 jours.

Les boues en excès sont épaissies par flottation et conditionnées par du chlorure ferrique et Ca(OH)₂. La boue épaissie résultante est pressée dans un filtre presse pour obtenir une pâte plus facile à transporter ; l'eau enlevée dans cette étape est recyclée pour être traitée dans le procédé biologique.

Les boues prélevées pour nos expériences en réacteur batch, provenaient du circuit de recirculation des boues du décanteur secondaire vers le bassin biologique. Ces boues épaisses

ont été diluées par de l'eau prélevée à la sortie du dessableur (entrée traitement biologique). Cette dilution a permis d'obtenir une concentration en MES similaire à celle de la boue du bassin biologique. L'élimination de polluants contenus dans l'eau usée de dilution a été suivi.

Tableau II.2. Concentrations moyennes des paramètres caractérisant l'affluent à la station d'Epinal-Golbey

Paramètre	Valeurs moyenne
Débit d'entrée	20 000 m ³ /j
DBO ₅	104 mg/L
DCO	210 mg/L
MES	120 mg/L
N-NH ₄	20 mg/L
NTK	27 mg/L
Phosphore total	3,4 mg/L



Figure II.1. Plan de la station d'épuration d'Epinal-Golbey

1. Bassin biologique, 2. Réservoir eaux d'orage, 3. Prétraitement, 4. Conditionnement des boues, 5. Traitement tertiaire (phosphore), 6. Clarificateurs, 7. Décanteur primaire (non utilisé).

Station d'épuration de Nancy-Maxeville

La station d'épuration traite deux types d'effluents : des effluents urbains provenant des vingt communes de la communauté urbaine du Grand Nancy (340 000 éq. habitant) et des effluents industriels provenant des brasseries de Champigneulle (310 000 éq. habitant). La figure II.2 présente le plan général de la station. L'arrivée des eaux usées à la station est séparée selon leur origine. Les eaux usées urbaines (tableau II.3) subissent un traitement primaire traditionnel (dessablage, déshuilage et décantation lamellaire), elles sont ensuite dirigées vers le traitement secondaire. D'autre part, les effluents industriels arrivant à la station sont traités d'abord par de l'oxygène pur, ils rejoignent ensuite le traitement secondaire. Le traitement secondaire, bien qu'identique pour les deux types d'effluents, est réalisé de manière séparée pour chaque effluent. Le traitement secondaire a subi des variations récentes. Actuellement, la première étape du traitement secondaire consiste en un traitement aéré des effluents au lieu d'un traitement anoxie. Ensuite, les effluents sont envoyés dans un réacteur biologique (Biolift ®) qui est un bassin aéré constitué des plusieurs cellules : 18 cellules pour la filière des eaux urbaines et 14 cellules pour la filière des eaux industrielles. Chaque cellule (170 m^3) est un réacteur à lit de sable fluidisé, les grains de sable de faible granulométrie sont maintenus en suspension par un flux hydraulique créé par la recirculation interne dans la cellule. Ces grains de sable servent de support pour le développement du biofilm bactérien composé de bactéries autotrophes et hétérotrophes. Du fait des fortes contraintes de cisaillement rencontrées dans le Biolift ®, une partie du biofilm se détache et des bactéries plus ou moins libres peuvent se retrouver en suspension. Le dégazeur/dessableur permet la récupération des sables pour la recirculation. Compte tenu du dégazeur et du passage dans le clarificateur, les floccs se reconstituent. La surface spécifique de fixation sur sable est estimée entre 900 et $1800 \text{ m}^2/\text{m}^3$ de réacteur. En présence d'oxygène la nitrification est assurée dans le Biolift ®.

Après le passage par le Biolift ®, l'effluent est dirigé vers les bassins d'anoxie « aval » où la dénitrification a lieu. Du méthanol est rajouté à l'entrée du bassin anoxie pour enrichir la liqueur en carbone facilement assimilable par les bactéries. Ensuite, la liqueur mixte est décantée dans les clarificateurs. Une partie de la boue décantée est recyclée vers le premier bassin aéré et l'autre partie de la boue est dirigée vers l'étape d'épaississement. A la sortie des clarificateurs, un traitement physico-chimique permettant d'éliminer les phosphates, est appliqué à l'eau épurée avant que celle-ci ne soit rejetée à la Meurthe.

Pour l'examen de l'impact de différents antibiotiques sur la biomasse, nous avons utilisé les boues prélevées dans le circuit de recirculation à la sortie du clarificateur. Ces boues ont été diluées avec l'eau usée du dessableur de la filière eau urbaine.

Tableau II.3. Concentrations moyennes des paramètres caractérisant l'affluent à la station de Nancy-Maxeville

Paramètre	Valeurs moyennes filière eau urbaine
Débit d'entrée	100 000 m ³ /j
DCO	100 – 400 mg/L
DBO5	40 – 200 mg/L
MES	40 - 200 mg/L
NTK	10 - 30 mg/L
Phosphore total	~ 10 mg/L



Figure II.2. Plan de la station d'épuration de Nancy-Maxeville

II.1.2. STATIONS D'ÉPURATION DES EAUX INDUSTRIELLES DES PAPETERIES

Les trois stations d'épuration de papeteries utilisent le procédé à boues activées. Pour des raisons de confidentialité, nous ne pouvons pas préciser les noms des stations. C'est pourquoi, nous allons les appeler station A, station B et station C. Ces trois stations se situent dans l'Est de la France.

La caractérisation des boues de chacune de ces trois stations d'épuration a fait partie du diagnostic intégral du procédé de traitement. Le diagnostic comportait une première partie d'exploitation statistique de données pour la description du procédé, notamment de l'étape de décantation des boues, et une deuxième partie d'analyse physico-chimique des boues pour l'évaluation de l'activité bactérienne. Dans chacune des stations étudiées, les boues utilisées dans l'étude des EPS correspondent à des boues biologiques prélevées dans le bassin d'aération.

Station d'épuration de la papeterie A

Toutes les eaux de lavage utilisées au niveau de la machine à papier et les eaux issues des différentes purges sont envoyées vers la station d'épuration. Le tableau II.4 présente la caractérisation de l'affluent de la station durant la campagne de prélèvements (du 29/01/08 au 16/04/09) et les conditions d'opération.

Après une première étape de dégrillage, les eaux usées sont dirigées vers le décanteur primaire (1900 m³) où l'élimination d'une grande partie des matières en suspension est réalisée par décantation. Ensuite, le traitement biologique des eaux est effectué dans un bassin aéré à cultures libres (cultures en suspension). Il s'agit d'un bassin circulaire (16600 m³) où l'apport d'air est réalisé par des diffuseurs d'air et par des agitateurs de surface (les agitateurs de surface servent surtout au refroidissement de la liqueur mixte du bassin). Un apport en acide phosphorique est assuré dans ce bassin biologique pour faciliter l'action bactérienne. Le bassin biologique d'aération et le clarificateur font partie d'un même dispositif général ; le bassin d'aération constitue la partie annulaire extérieur et le clarificateur constitue la partie centrale. Dans le clarificateur (5600 m³), un temps hydraulique estimé à environ 10 heures permet à la boue de se densifier. Une partie de la boue décantée est recirculée vers le bassin biologique constituant le procédé à boues activées, et l'autre partie des boues est dirigée vers l'étape d'épaississement. L'eau séparée de la boue par décantation est collectée par la

surverse du clarificateur, elle constitue l'eau épurée. Après une étape de filtration sur sable, une grande partie de l'eau épurée et filtrée est réutilisée dans les ateliers de l'entreprise, l'autre partie des eaux traitées est versée dans la rivière. Les boues décantées extraites sont d'abord épaissies et ensuite pressées dans un filtre à presse ; à la fin ces boues sont réutilisés par une briqueterie.

Tableau II.4. Principales caractéristiques de l'affluent de la station A et conditions d'opération.

Paramètre	Concentration moyenne
Débit d'entrée	12 000 ± 2000 m ³ /j
MES entrée	680 ± 200 mg/L
DCO entrée	130 ± 40 mg/L
Temps de séjour hydraulique	40 h
Age de boues	50 j

Station d'épuration de la papeterie B

Les eaux d'entrée de la station d'épuration proviennent des différents points des ateliers de production de pâte à papier et des machines à papier. Les eaux collectées issues des procédés subissent un dégrillage avant d'être envoyées à la station d'épuration. La caractérisation de l'affluent de la station évaluée durant la campagne de prélèvements (du 07/02/08 au 22/04/09) ainsi que les conditions opératoires sont présentés dans le tableau II.5. L'affluent arrive dans un premier bassin de neutralisation prévu pour assurer le contrôle du pH par l'ajout de Ca(OH)₂. Ensuite, l'eau est séparée des particules les plus denses dans le décanteur primaire (3500 m³). La surverse du décanteur primaire est dirigée vers le bassin tampon (5000 m³) prévu pour assurer un débit constant d'eau d'entrée à l'étape du traitement biologique. Suite au bassin tampon, des tours de refroidissement permettent de réduire la température des effluents. Le traitement biologique est un système à boues activées. Les boues formées suite à l'aération des effluents sont dirigées vers une étape de décantation pour être séparées de l'eau épurée ; ces boues décantées sont ensuite soit recirculées vers le bassin d'aération soit retirées du système. Le traitement biologique comporte deux lignes de traitement fonctionnant en parallèle. Chaque ligne a des caractéristiques particulières. En effet, les dispositifs d'aération, la géométrie et le volume des bassins ainsi que l'ajout des nutriments sont différents en fonction de la ligne. La première ligne de traitement comporte

un réacteur de forme rectangulaire avec un volume de 17 000 m³, l'aération dans ce bassin est assurée par des aérateurs de surface. La deuxième ligne de traitement comporte un réacteur de forme circulaire avec un volume de 22 000 m³ tandis que l'aération est réalisée par des diffuseurs d'air générant de fines bulles. Dans chaque ligne, un clarificateur est destiné à la décantation de la liqueur du bassin d'aération respectif, le temps de résidence des eaux dans les clarificateurs est estimé à environ 10 heures, le décanteur de la première ligne compte un volume de 3500 m³ et celui de la deuxième ligne 5000 m³. La surverse du clarificateur suit un traitement par flottation en présence d'un coagulant pour l'élimination des agrégats biologiques encore présents après l'étape de décantation. L'effluent est dirigé vers une étape de filtration sur sable et ensuite l'eau épurée est soit réutilisée dans les ateliers de l'entreprise soit versée dans la nature. Les boues extraites du système sont épaissies par un procédé physico-chimique avec l'ajout du sulfate d'aluminium et d'un polymère commercial. Les effluents issus de cette étape d'épaississement sont reintroduit au procédé du traitement dans le bassin de neutralisation.

L'étude des EPS a été réalisée sur les boues de deux bassins d'aération (des caractéristiques différentes) afin de déterminer si l'activité biologique varie d'un bassin à l'autre ; les deux bassins reçoivent le même affluent mais les caractéristiques des effluents de sortie ne sont pas identiques.

Tableau II.5. Principales caractéristiques de l'affluent de la station d'épuration de la papeterie B et conditions d'opération.

Paramètre	Concentration moyenne
Débit d'entrée	18 000 ± 4 000 m ³ /j
MES entrée	4 000 ± 800 mg/L
DBO ₅ entrée	800 ± 100 mg/L
DCO entrée	4 000 ± 600 mg/L
Temps de séjour hydraulique	Ligne 1 : ~ 3 j Ligne 2 : ~ 3 j
Age de boues	~ 40 j

Station d'épuration de la papeterie C

Le tableau II.6 présente la caractérisation des affluents de la station d'épuration ainsi que les conditions opératoires durant la période d'échantillonnage (du 18/03/08 au 20/04/09). Un premier bassin de stockage (3000 m³) assure un débit constant des effluents dans la station d'épuration quand le débit d'entrée est supérieur au débit moyen (par exemple, lors d'un lavage de la machine à papier). La première étape du traitement des affluents est le prétraitement traditionnel de dégrillage, dessablage et dégraissage. Ensuite, les eaux issues des procédés sont dirigées vers le décanteur primaire (300 m³) pour l'élimination d'une grande partie des matières en suspension. Les boues décantées produites à cet stade sont envoyées vers l'étape d'épaississement. La phase liquide obtenue par la surverse du décanteur primaire est envoyée vers le traitement secondaire. Quand la température de l'effluent est supérieure à 30°C, l'effluent passe par des tours de refroidissement avant le traitement secondaire. L'eau partiellement éliminée des matières en suspension va ensuite subir le traitement secondaire (traitement biologique). Le traitement biologique a lieu dans un bassin aéré (3000 m³) qui comporte 4 sections. L'effluent circule de manière continue de la section 1 à la section 4. Les trois premières sections sont équipées chacune avec un aérateur de surface qui assure l'aération de la liqueur. La dernière section sans agitateur simule une étape anoxie. Ensuite, dans le clarificateur, la séparation entre les boues et l'eau épurée s'effectue par décantation. Une partie de l'eau obtenue de la surverse du clarificateur est versée dans la rivière et l'autre partie est réutilisée dans les différents ateliers de l'entreprise. Les boues biologiques formées sont soit recirculées soit envoyées vers une étape d'épaississement pour ensuite être valorisées en compost.

Tableau II.6. Principales caractéristiques de l'affluent de la station d'épuration de la papeterie B et conditions d'opération.

Paramètre	Concentration moyenne
Débit d'entrée	4500 ± 500 m ³ /j
MES entrée	1300 ± 1200 mg/L
DCO entrée	1700 ± 1000 mg/L
Temps de séjour hydraulique	18 h
Age de boues	< 3 j

II.1.3. INSTALLATIONS UTILISÉES

Cette section décrira le mode opératoire et les caractéristiques des différents réacteurs utilisés : bioréacteur à membranes, réacteur batch et installation pilote à boues activées.

II.1.3.1. Bioréacteur à membranes

Les bioréacteurs à membrane ont été utilisés lors de l'évaluation de l'impact de l'agent anticancéreux (le cyclophosphamide). L'étude a été effectuée en collaboration avec le Laboratoire de Génie Chimique (LGC) de Toulouse. Le fonctionnement des réacteurs entre dans le cadre de la thèse de Delgado (2009) et l'analyse des EPS des boues issues de ce traitement a été réalisée dans le cadre de la présente thèse.

Deux bioréacteurs à membrane externe (figure II.3) avec des caractéristiques identiques ont fonctionné en parallèle. Ces bioréacteurs opéraient pendant des longues durées, la première campagne expérimentale a compté 160 jours pendant lesquels les réacteurs ont fonctionné en continu et la deuxième campagne, 223 jours.

Les bioréacteurs ont étéensemencés par des boues activées provenant d'une station d'épuration. L'alimentation en continue des réacteurs a été réalisée par des eaux usées provenant du réseaux d'assainissement des eaux urbaines de Brax, eaux qui ont été enrichies par du Viandox ®. L'ajout du Viandox ® a permis de travailler avec une concentration en DCO suffisante pour un développement rapide de la biomasse. Un des bioréacteurs contenait le cocktail pharmaceutique : le cyclophosphamide et ses principaux métabolites . Il s'agit des principaux métabolites générés par le métabolisme humain lors de l'ingestion du cyclophosphamide durant les traitements anticancéreux. Les proportions utilisées du cyclophosphamide et de ses métabolites ont respecté la stœchiométrie de ce qui peut être excréter par les urines. L'autre bioréacteur en l'absence du cocktail a servi de contrôle.

Un bac de stockage avec une pompe fonctionnant à débit constant ont assuré l'alimentation en parallèle en eaux usées de deux bioréacteurs. De manière séparée, une autre pompe a apportée en continu le Viandox ®. L'ajout du cocktail pharmaceutique a été réalisé selon les concentrations données dans la littérature pour 5 µg/L de cyclophosphamide (tableau II.7).

La cuve (20 L) qui contenait la liqueur biologique a été équipée d'un agitateur pour le mélange complet du contenu. Différentes électrodes placées à l'intérieur de la cuve ont servi à contrôler le niveau de la liqueur mixte et la concentration en oxygène dissous ainsi qu'à

mesurer la température et le pH. Les cycles d'aération ont été contrôlés à l'aide d'une minuterie. La membrane (Membralox ®) est placée à l'extérieur de la cuve. La filtration de la membrane était réalisée de l'intérieur vers l'extérieur. La taille des pores de la membrane était de 0,1 µm (Pall Exekia, France). La vitesse tangentielle le long de la membrane a été contrôlée par la pompe d'injection de la liqueur. La pression transmembranaire a été suivie et enregistrée à l'aide du logiciel DasyLab. La différence de pression entre l'entrée et la sortie du module membrane a été établie grâce à des capteurs de pression et des manomètres. Se référer à Delgado (2009) pour plus de détails.

L'étude des EPS a été réalisée sur des boues issues de deux bioréacteurs. La liqueur mixte prélevée dans la cuve d'aération a été centrifugée pour séparer les boues épaissies et le surnageant. Les boues épaissies ont servi à l'analyse des EPS liés dans les floccs et le surnageant à servi à l'analyse des substances solubles. Les substances solubles contenues dans les perméats (après filtration par la membrane) ont été également analysés.

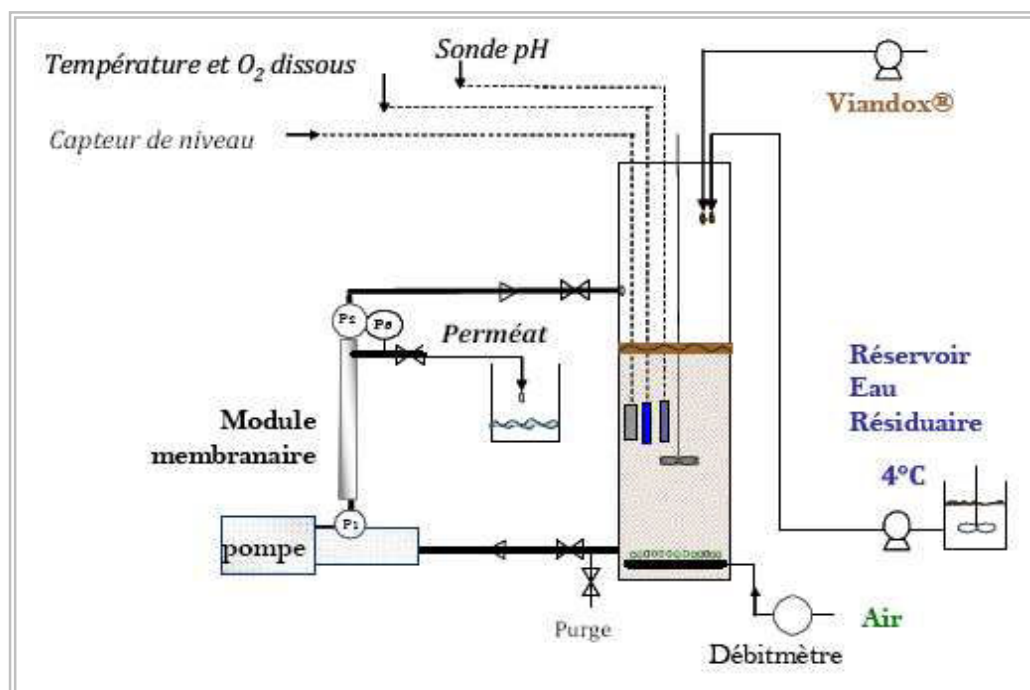


Figure II.3. Schéma du bioréacteur à membrane externe. [Repris de Delgado (2009)].

Tableau II.7. Composition du cocktail pharmaceutique ajouté à un des bioréacteurs [Delgado, 2009]

Composé	Concentration moyenne
Cyclophosphamide	5000 ng/L
Moutarde phosphoramide	8883 ng/L
Acroléine	2250 ng/L
Deschloroethylcyclophosphamide	1667 ng/L
4-Ketocyclophosphamide	580 ng/L
Moutarde norazotée	517 ng/L

II.1.3.2. Réacteur batch

Quatre réacteurs fonctionnant en parallèle (figure II.4) ont été utilisés pour l'étude de l'impact des différents antibiotiques sur la biomasse. L'étude a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP de Nancy). Le fonctionnement des réacteurs batch entre dans le cadre de la thèse de Louvet (2010b). L'étude des EPS des boues exposées aux différents antibiotiques a été réalisée dans le cadre de la présente thèse au Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM) de Nancy.

La durée du fonctionnement des réacteurs batch a été fixée à 24 h, pendant cette période aucun ajout supplémentaire de nutriments a été réalisé. Au début de l'expérience, les réacteurs ont été chargés avec de la boue épaisse (provenant du circuit de recirculation des boues biologiques de la station d'épuration) et avec de l'eau usée d'entrée de la station. Cette dilution des boues épaisses a été réalisée afin d'évaluer la capacité de la biomasse à éliminer les polluants contenus dans l'eau d'entrée de la station. 1 L des boues épaisses a été diluée avec 2 L d'eau d'entrée de la station. Cette dilution des boues épaisses permet d'obtenir une liqueur mixte de concentration similaire à celle du bassin biologique. Pendant la durée du fonctionnement des réacteurs, seule une quantité minimale de liqueur mixte a été prélevée chaque heure pour mesurer la concentration en DCO et en ammonium. L'étude des EPS (substances solubles et EPS liés) a été réalisée sur la liqueur mixte prélevée avant et après la culture de 24 h dans les réacteurs batch.

Le volume de chaque réacteur était de 4 L. L'aération de la liqueur contenue dans les réacteurs a été assurée pendant toute la durée de l'expérience par un diffuseur d'air placé au fond de chaque réacteur. Ce système d'aération a permis également une bonne agitation de la

liqueur. Pour chaque expérience, un réacteur sans antibiotique a servi de témoin. Dans les trois autres réacteurs, l'antibiotique étudié a été rajouté. L'intervalle de concentration d'antibiotiques étudié va de 0,1 à 20 mg/L. Les concentrations d'antibiotiques sont du même ordre de grandeur que la concentration des effluents des industries pharmaceutiques (Larsson et al., 2007; Li et al., 2008). Cependant, ces concentrations sont plus élevées que celles des rejets urbains.

Cette étude réalisée sur des boues réelles des stations d'épuration des eaux urbaines a permis d'évaluer la réponse bactérienne sous des conditions de choc générées par la présence d'antibiotiques. De ce fait, aucune acclimatation préalable de la boue n'a été réalisée.



Figure II.4. Réacteurs batch de 4 L utilisés dans l'expérimentation avec les antibiotiques.

II.2. CARACTÉRISATION DES BOUES BIOLOGIQUES

II.2.1. CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE

Les boues utilisées lors de nos expériences ont été caractérisées en termes de matières sèches (MS), matières en suspension (MES), matières volatiles en suspension (MVS), volume de boue décantée, indice de décantation de Mohlman (SVI) et taille de floc.

Les MS, MES et MVS ont été déterminées selon les méthodes normalisées (APHA et al. (2005) « Standard methods 2540 G : total, fixed and volatile solids in solid and semisolid samples »). Pour la mesure des matières sèches, les échantillons prélevés ont été disposés dans un creuset et ont subi un séchage en four à 105°C jusqu'à stabilisation du poids. Pour la mesure des matières en suspension, les échantillons ont d'abord été centrifugés à une vitesse de 4500 g ensuite ils ont subi un chauffage à 105°C jusqu'à stabilisation du poids.

Les paramètres de décantation (volume de boues décantées et indice de Mohlman) ont été mesurés suivant le protocole de méthodes normalisées 2710 D « Test of sludge : sludge volume index (APHA et al., 2005) ». Le volume de boue décantée a été obtenu par la lecture, dans une éprouvette de 1 L, du voile de boue décantée ; cette lecture est reportée en mL de boue décantée par L d'échantillon. Pour obtenir l'indice de Mohlman (SVI), le volume de boue décantée a été divisé par la concentration en MES de l'échantillon.

La distribution de taille des floccs a été mesurée lors de l'étude des boues des stations d'épuration des papeteries. La mesure de la distribution de taille a été réalisée par diffraction de la lumière. Un granulométrie laser He-Ne (granulomètre Malvern Mastersizer S) avec un faisceau de lumière de 630 nm a été utilisé. La longueur focale sélectionnée a permis la mesure de taille des agglomérats entre 0,05 et 900 μm . La mesure s'appuie sur la théorie de diffraction de Fraunhofer selon laquelle l'angle de diffraction est inversement proportionnel à la taille des agrégats. La diffraction de la lumière par la présence des agrégats dans une solution donne la répartition granulométrique des agrégats. La mesure nécessite que les agglomérats soient éloignés les uns des autres. Pour ce faire, un volume limité d'échantillon (entre 5 et 10 mL) a été additionné à 1 L de phase liquide (en principe la phase liquide est transparente au faisceau laser). Pour ne pas modifier les conditions des agrégats biologiques, la phase liquide utilisée à chaque mesure correspond au surnageant obtenu suite à une étape de centrifugation des boues prélevées. Nous avons travaillé à une obscurité optimale de l'appareil (~ 12 %). La solution a été recirculée en continu à vitesse constante à l'aide d'une pompe péristaltique. La taille moyenne reportée dans ce manuscrit correspond à la taille de 50 % des agrégats.

II.2.2. CARACTÉRISATION MICROSCOPIQUE DES BOUES

L'observation microscopique des floccs a été réalisée lors de l'étude des boues des stations d'épuration des papeteries. L'échantillon a été tout d'abord décanté pendant quelques heures, le culot a été fixé par le glutaraldehyde (2,5 % v/v) pour maintenir la structure des floccs intacte avant l'analyse microscopique. Ensuite, l'échantillon a été stocké à 4°C. La préparation de l'échantillon pour l'analyse microscopique comprend une étape de coloration. La coloration choisie a permis de différencier les acides nucléiques des bactéries des polymères extracellulaires contenant des liaisons hydrophobes (Wirtanen et al., 2001). La préparation de l'échantillon a été réalisée le jour même de l'analyse, l'échantillon a été imprégné pendant 20 min. par une solution d'acridine orange (22 μM acridine orange, 5 mM

EDTA, 0.15 M NaCl, 0.1 M phosphate-citrate tampon pH 6; Sigma-Aldrich). Ensuite l'échantillon a été lavé trois fois avec de l'eau ultra pure afin d'éliminer l'excès de réactif. Sous la fluorescence du microscope, la coloration verte est associée aux acides nucléiques des cellules et la coloration orange aux EPS contenant des liaisons hydrophobes.

La caractérisation de la structure 3D des boues est réalisée par microscopie confocale à balayage (CLSM). Un microscope inversé (NIKON TE 2000 U) est équipé avec une tête confocale (Radiance 2100 Rainbow, Biorad). La caméra (Nikon CFI Plan Fluor Apo 20 X (NA 0.7 WD 1 mm)) a été utilisée pour explorer les échantillons.

Trois signaux différents ont été séparés et collectés:

- (1) L'émission de fluorescence des cellules entre 530-560 nm (excitation à 488 nm).
- (2) L'émission de fluorescence des EPS supérieure à 600 nm (excitation à 457 nm)
- (3) La réflexion diffuse entre 480-490 nm associée à la matière réfléchissante (e.g. particules minérales)

L'acquisition des séries d'images (512 x 512 pixel²) à une résolution de 0,674 µm par pixel dans l'axe Z et à une résolution verticale de 2,23 µm a été réalisée par le logiciel LaserSharp2000TM software (Bio-Rad cell science division). Les images prises à différentes hauteurs de l'axe vertical (différentes couches) ont été déconvoluées pour mitiger la distorsion de l'image créée par l'optique microscopique. Ce traitement a permis d'améliorer la détection automatique des bords de la structure et par conséquent l'analyse quantitative des images a été plus précise. Les images en 3D ont été traitées à l'aide du logiciel AutoQuant X v1.4.1 (MediaCybernetics). Ensuite, la contribution de chaque composante analysée (cellules, EPS et matière réfléchissante de floccs) a été quantifiée. Pour ce faire, les images projetées ont été binarisées et le comptage des points a été réalisé à l'aide du logiciel MacBiophotonics ImageJ software (NIH, Bethesda, Maryland, USA). Puisque le résultat obtenu par l'analyse d'images projetées était identique à celui des différentes couches de l'échantillon, l'analyse des images projetées est retenue pour l'évaluation de tous les floccs. Les résultats de chaque constituant ont été présentés en pourcentage de contribution non-superposée par rapport à la totalité de la surface du flocc.

II.3. PROTOCOLES ANALYTIQUES

II.3.1. EXTRACTION DES EPS LIÉS DANS LES FLOCS

Les EPS liés dans les flocs notamment par les cations divalents ont été extraits par la méthode de la résine échangeuse d'ions proposée par Frolund et al. (1996). Nous avons modifié légèrement cette méthode (4 heures d'extraction) pour extraire une quantité plus importante d'EPS nécessaire pour l'analyse chromatographique. La figure II.5 montre le schéma du protocole d'extraction.

Avant l'extraction des EPS, la liqueur mixte prélevée a été épaissie par centrifugation pendant 15 min. à 4500 g. Afin de normaliser le protocole, une quantité fixe de boue centrifugée égale à 10 g a été utilisée pour l'extraction. Le volume de liqueur mixte nécessaire (V_i) pour obtenir 10 g de boue centrifugée dépend de chaque échantillon.

La résine ionique (DOWEX 50 x 8 Na⁺, 20-50 mesh, Fluka, France) a été soumise à un conditionnement avant l'extraction : 6 g de résine + 20 mL de NaCl 0,2 M sous agitation pendant 1 heure.

L'extraction a été réalisée sous agitation, un bain de glace maintenait une température constante de la solution aux alentours de 4 °C (température nécessaire pour limiter l'activité bactérienne, Frolund et al., 1996). Dans le bécher contenant la résine et la solution de NaCl, les boues centrifugées sont rajoutées. Les boues sont maintenues en contact avec la résine échangeuse d'ions pendant 4 heures à une température de 4 °C et sous agitation. Le principe d'extraction repose sur un échange des ions bivalents (notamment Ca⁺² et Mg⁺² responsables en partie de la cohésion des flocs bactériens) par les ions monovalents apportés par la résine. Les EPS sont donc libérés vers la solution aqueuse (V_f) et récupérés dans le surnageant après une étape de centrifugation (4500 g pendant 15 min).

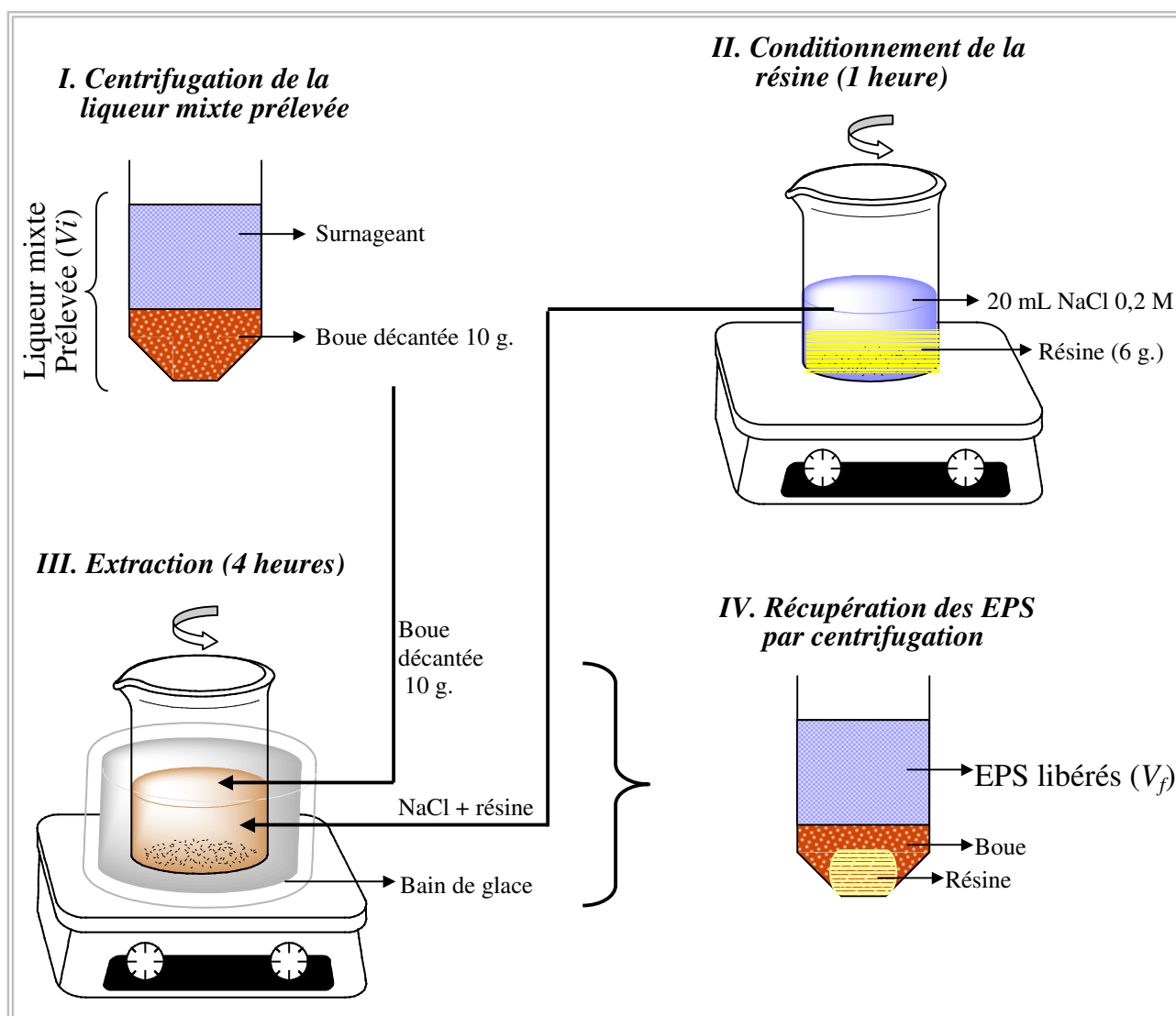


Figure II.5. Schéma du protocole d'extraction des EPS liés dans les boues.

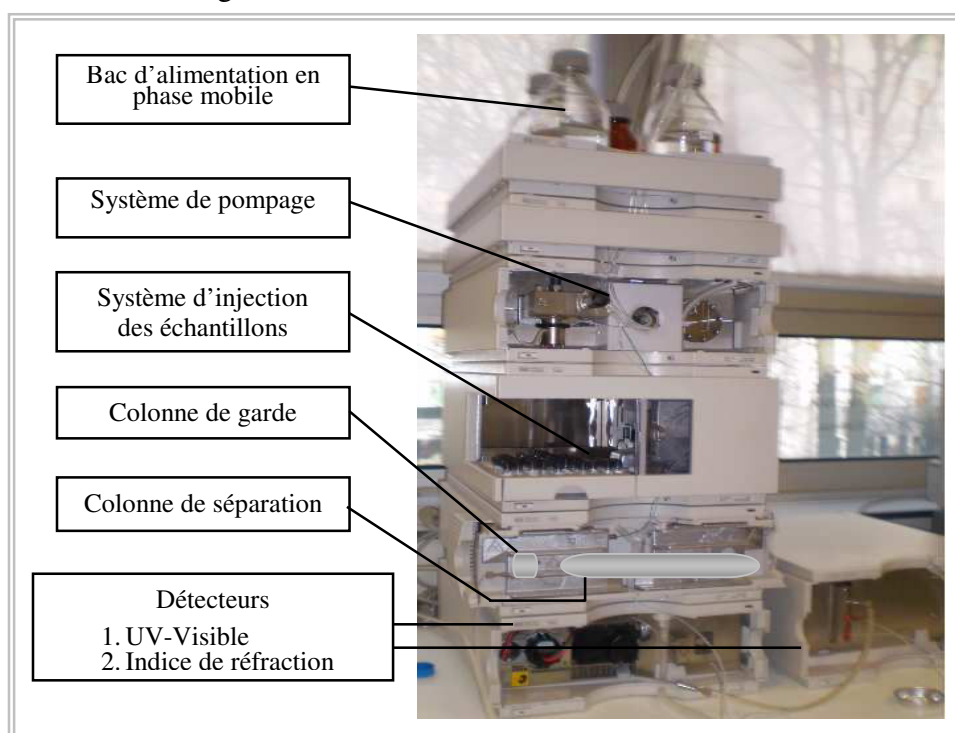
Suite à l'extraction des EPS liés dans les boues, nous avons caractérisé et quantifié les EPS. Le volume de la liqueur mixte prélevée (V_i) et le volume des EPS récupérés (V_f) après centrifugation ont permis de connaître la concentration initiale des EPS dans la liqueur prélevée (Eq. II.1).

$$Conc_{EPS} \text{ (liqueur prélevé)} = \frac{V_f * Conc_{EPS} \text{ (récupérés)}}{V_i} \quad \text{Eq. II.1}$$

La caractérisation des EPS liés dans les boues a été réalisée par différentes méthodes, notamment l'analyse par chromatographie d'exclusion par taille, l'analyse par spectroscopie infrarouge et le dosage des principaux constituants des EPS (protéines et polysaccharides) par spectroscopie UV-Vis.

II.3.2. ANALYSE DES EPS PAR LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE D'EXCLUSION PAR TAILLE

Le chromatographe utilisé pour cette analyse est un ensemble Hewlett Packard série 1100. L'appareil (schématisé dans la figure II.6) comporte un système d'injection de la phase mobile (pompe quaternaire avec dégazeur à vide), un système d'injection automatique des échantillons, une colonne de garde, une colonne chromatographique et deux détecteurs. La colonne chromatographique spécifique à la séparation stérique de mélanges des protéines et des polysaccharides est une colonne ZORBAX (GF-250, 25 cm x 9.4 mm, Agilent Technologies, France). La phase mobile utilisée était du NaCl 0,2 M (débit d'injection 1 mL/min). L'appareil dispose de deux détecteurs, un détecteur UV-Visible à barre d'iodes permettant l'acquisition simultanée entre les longueurs d'onde de 190 à 400 nm. Le deuxième détecteur à indice de réfraction a été destiné à la détection des polysaccharides. Ce système chromatographique a été géré à l'aide du logiciel HPChemStation qui a permis l'acquisition et le traitement des chromatogrammes.



La colonne chromatographique contient une phase stationnaire constituée de particules poreuses en silice. Ces particules sont recouvertes avec une phase diol combinée avec un stabilisateur au Zirconium. D'après le fabricant, ce traitement rend la phase stationnaire plus performante à la séparation stérique des composés organiques : ce traitement minimise

l'adsorption des protéines et réduit les interactions possibles entre les composés à séparer et la phase stationnaire.

La séparation de molécules par leur taille est réalisée en fonction de leur rayon hydrodynamique (déterminé par la nature chimique de la molécule et par les conditions chromatographiques de la séparation, c.f. section I.3.2.3). Le rayon hydrodynamique correspond au rayon occupé par une macromolécule prenant en compte à la fois sa distribution spatiale et sa couche d'hydratation.

L'étalonnage de la colonne est une indication de la masse molaire apparente d'une molécule dans un solvant donné. Chaque pic chromatographique correspond à un groupe de molécules de même masse molaire (plus strictement du même rayon hydrodynamique). Chaque groupe peut correspondre soit à un groupe de molécules pures, soit à un mélange de molécules avec des fonctions chimiques différentes. L'estimation de la masse molaire des différents groupes de molécules a été réalisée à l'aide de la courbe d'étalonnage établie pour des protéines et des polysaccharides. La référence à l'étalonnage suppose que les différentes molécules du mélange analysé interagissent de manière identique avec la phase stationnaire et exhibent les mêmes mécanismes d'interaction que les molécules étalons.

Pour l'étalonnage, nous avons utilisé des protéines et des polysaccharides car ils constituent les composés majoritaires des EPS. La courbe d'étalonnage est présentée dans la figure II.7. Le volume total d'exclusion indiqué dans la figure fait référence à l'exclusion des molécules des grandes tailles de pores de la phase stationnaire. D'autre part, le volume de pénétration total correspond à l'élution des molécules de très petites tailles. Les masses molaires des polysaccharides utilisés correspondent à 0,18 ; 0,74 ; 5,9 ; 11,8 ; 22,8 ; 47,3 ; 112 ; 212 ; 404 ; 788 kDa (Polymers Labs, Phenomenex). La colonne a été également étalonnée par des protéines étalon (insuline bovine 5,7 kDa, ribonucléase A bovine 13,7 kDa, myoglobuline 17,6 kDa, albumine de poulet 44,3 kDa, β -amylase 56 kDa, albumine bovine sérum 66 kDa, Apo-transferrin 78 kDa, IgG human sérum 160 kDa, thyroglobuline 670 kDa; Sigma-Aldrich, France).

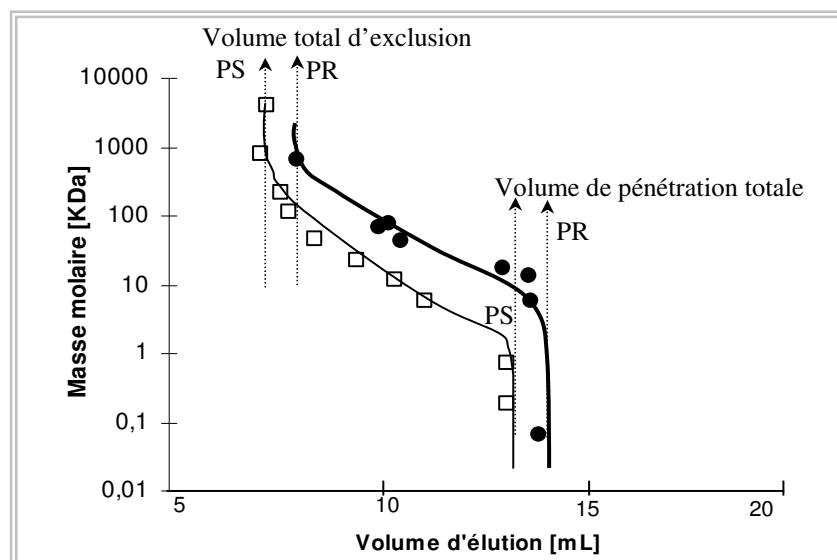


Figure II.7. Courbe d'étalonnage de la colonne chromatographique.
 (●) Protéines (PR), (□) Polysaccharides (PS).

II.3.3. ANALYSE DES EPS PAR LA TECHNIQUE DE SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

L'analyse des EPS a été réalisée grâce à un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier à simple faisceau (Bruker IFS 55) construit sur la base d'un interféromètre du type MICHELSON avec un laser He-Ne. La séparatrice est une séparatrice à coin cube en KBr. Le détecteur est du type (DTGS – Deuterated Triglycine Sulfate) non refroidi. Le diamètre du faisceau infrarouge traversant l'échantillon était de 8 mm. Toutes les mesures ont été réalisées en mode transmission entre 4000 et 600 cm^{-1} (64 scans, résolution 4 cm^{-1}) par dépôt sur lame de ZnSe. L'acquisition et le traitement des spectres ont été réalisés à l'aide du logiciel OPUS.

Pour réaliser l'analyse infrarouge, l'échantillon a subi un conditionnement préalable. Un volume standard d'échantillon de 100 μL a été déposé sur la lame de ZnSe. L'échantillon, ne devant pas contenir de l'eau libre, a été séché dans un dessiccateur au vide modéré jusqu'à obtenir un dépôt solide sur la lame. En effet, la présence d'eau liquide perturbe fortement le spectre infrarouge en raison de la largeur des bandes d'absorption de l'eau qui couvrent une grande partie du spectre dans la zone 3500-3000 cm^{-1} et 1680-1580 cm^{-1} . Des dépôts successifs d'échantillon ont été réalisés afin d'accroître son épaisseur et disposer ainsi d'une intensité d'absorption significative pour réaliser ensuite l'exploitation des spectres.

Comme cela a été décrit préalablement dans la section I.3.2.3, chaque molécule possède des modes de vibrations particuliers sous l'action d'un rayonnement infrarouge, ce qui est à l'origine des bandes d'absorption caractéristiques de chaque fonction chimique. Les

différentes fonctions chimiques sont identifiées grâce à la position des bandes d'absorption (associée à l'énergie de vibration d'un groupe chimique), à l'intensité des bandes et leur profils. On distingue deux types de vibrations : les vibrations d'élongation ou de valence (modification de la longueur des liaisons chimiques) et les vibrations de déformation (modification des angles de ces liaisons).

Les fonctions chimiques principales retrouvées dans la matière organique, notamment dans les boues activées et dans les EPS des boues, correspondent aux groupes fonctionnels : OH, NH, CH, C=O, C=C et C-O. Les groupes OH se retrouvent entre autres dans les alcools, les phénols et les acides carboxyliques. Leur domaine d'absorption s'étend de 3650 à 2700 cm^{-1} . Les groupes NH forment les liaisons amine, amide et ammonium ; la présence ou l'absence des bandes d'absorption des groupes carbonyles (-C=O) permet d'établir la différence entre les vibrations dues aux fonctions amine et amide. Les vibrations d'élongation du groupe NH se positionnent entre 3500 et 2250 cm^{-1} et celles de déformation s'étendent entre 1650 et 1450 cm^{-1} . Les vibrations des groupes carbonyles sont de forte intensité entre 1815 et 1400 cm^{-1} . Les protéines sont un exemple des composés organiques constitués par des groupes NH et -C=O, la liaison peptidique de protéines (fonction amide) se caractérise par la présence de trois bandes d'absorption (i) l'amide I (-C=O), (ii) l'amide II (H-N-C=), et (iii) l'amide III (-C-N-). Les groupements CH forment les fonctions de type CH, CH₂ et CH₃ qui constituent les chaînes alkyles. Les vibrations d'élongation des groupement CH absorbent entre 3000 et 2800 cm^{-1} . Dans la matière organique les vibrateurs de type C=C se trouvent dans les fonctions de type vinylique et aromatique. Les vibrations d'élongation du groupe C=C absorbent dans la région 1660 à 1630 cm^{-1} . Les groupements C-O font partie des quatre grandes familles : ester, alcool, acide et éther. Il s'agit des bandes de forte intensité qui absorbent dans la région 1370 et 1070 cm^{-1} (vibration d'élongation). L'identification spectrale s'est appuyée aussi sur la base de données décrite par Garnier et al. (2005).

La figure II.8 présente à titre d'exemple un spectre infrarouge caractéristique des EPS avec l'identification des bandes d'absorption. On retrouve sur le spectre toutes les bandes caractéristiques d'un mélange protéinique/polysaccharidique.

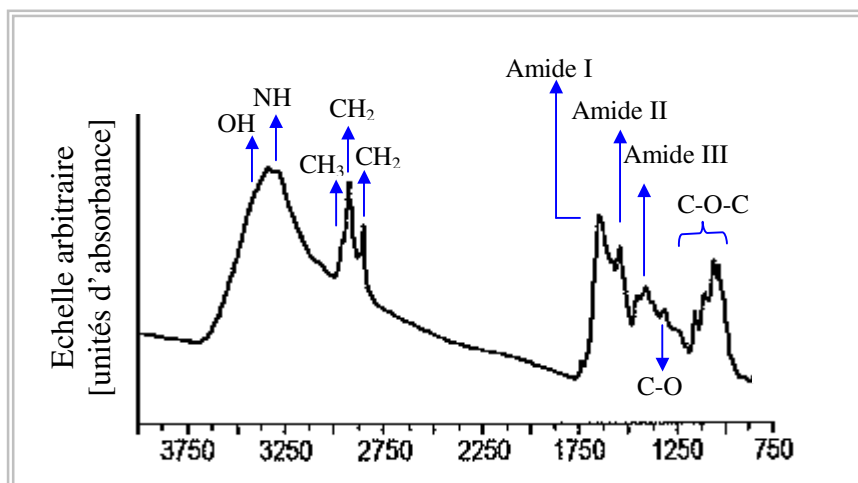


Figure II.8. Identification des bandes d'absorption caractéristique des EPS

II.3.4. DOSAGE DES PROTÉINES ET DES POLYSACCHARIDES

Les dosages des protéines et des polysaccharides ont été réalisés par spectrophotométrie UV-Vis utilisant les méthodes classiques de Lowry (dosage protéines) et de Dubois (dosage polysaccharides).

La méthode de Lowry (Lowry et al., 1951) s'appuie sur deux réactions chimiques, la première est la réaction de Biuret où les liaisons peptidiques des protéines réagissent avec le sulfate de cuivre en milieu alcalin. La deuxième réaction est la réduction du réactif phosphomolybdique-phosphotungstique (Folin-Ciocalteu) par le complexe protéinique préalablement formé. Une coloration bleue est le résultat de ces réactions, l'absorption étant mesurée à 750 nm. La protéine étalon utilisée comme référence était le sérum albumine bovine (BSA) préparé à des concentrations entre 20 et 200 mg/L pour l'étalonnage. Toutes les mesures ont été réalisées en duplicata.

Le kit commercial (Kit Micro Lowry® TP0300, Sigma-Aldrich) basé sur la méthode classique de Lowry est simple d'utilisation. Ce kit commercial intègre la modification de Peterson (ajout du dodecylsulfate de sodium (Peterson, 1977)) pour faciliter la dissolution de lipoprotéines. La coloration bleue formée est mesurée à 750 nm (région où l'absorbance est la plus importante). Nous avons utilisé ce kit commercial pour le dosage de protéines.

La méthode de Lowry, la plus utilisée, est sensible aux interférences induites par certains composés tels que : les composés phénoliques, l'EDTA et l'ammonium. L'interférence majeure dans le dosage des protéines vient des acides humiques car le réactif de Folin-Ciocalteu utilisé dans la méthode de Lowry est utilisé également pour la détermination des acides humiques (Box, 1983). D'après Raunkjaer K. et al. (1994),

l'interférence des acides humiques dans le cas du dosage de protéines dans les eaux usées ne présente pas une difficulté majeure. En effet, les acides humiques sont censés avoir une contribution faible dans ce genre d'effluents. L'interférence des acides humiques est plus importante dans les sols, les lixiviats de décharges organiques (MacCarthy et al., 1990) et dans certaines eaux naturelles (Kang et al., 2002; Leenheer et al., 2003). La section IV.1.3.2. présente une évaluation de trois méthodes principales de dosage de protéines dans les eaux usées : la méthode classique de Lowry, la méthode de Lowry modifiée et le dosage utilisant le kit commercial (Kit Micro Lowry®).

Le dosage de polysaccharides a été réalisé par la méthode de Dubois (Dubois, 1956). Cette méthode s'appuie sur la réaction des glucides avec l'acide sulfurique. Le produit formé se combine facilement avec le phénol et donne une coloration rose. L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 485 nm. Cette méthode est très sensible puisqu'elle permet de détecter des quantités de glucides pouvant atteindre 1 µg. La molécule étalon utilisée pour la réalisation de la courbe d'étalonnage a été le glucose à des concentrations comprises entre 10 et 100 mg/L.

Les mesures de l'absorbance (protéines et polysaccharides) ont été toutes réalisées au moyen d'un spectrophotomètre à double faisceau du type SHIMADZU UV-2501 PC. Cet instrument permet la mesure photométrique en différents modes : absorbance, transmittance et reflectance. Nos mesures ont été réalisées en mode absorbance. Deux cellules positionnées en parallèle sont traversées par le faisceau de lumière. Une comparaison de la valeur de l'absorbance entre ces deux cellules est réalisée par l'instrument. Une cellule ne contenant pas la substance chromophore à doser constitue la référence de la mesure et la deuxième cellule contenant le chromophore constitue l'échantillon. Le chromophore se réfère à différentes fonctions chimiques qui absorbent la lumière entre 185 et 1000 nm. Plus l'espèce chromophore est concentrée plus elle absorbe la lumière.

La spectrophotométrie s'appuie sur le fait que toute solution colorée traversée par un faisceau de lumière ne laisse passer qu'une fraction de la lumière incidente. La fraction absorbée correspond aux bandes d'absorption spécifique du composé. Dans le cas de la spectroscopie UV-Vis ces absorptions sont essentiellement dues à des transitions entre nuages électroniques. La loi de Beer-Lambert est le support quantitative de cette méthode. Elle établit qu'à une longueur d'onde donnée, l'absorbance de la lumière est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution au travers de l'équation Eq. II.2.

$$A = \epsilon * l * c \qquad \text{Eq. II.2.}$$

A = Absorbance à une longueur d'onde donnée.

ϵ = Coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante en solution ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$).

l = Longueur du trajet optique (cm).

c = concentration de l'espèce absorbante ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Une courbe d'étalonnage spécifique à chaque méthode nous a permis de relier l'absorbance mesurée et la concentration des substances. Les résultats sont exprimés en unités de concentration de l'espèce étalon. Pour les protéines, il s'agissait du sérum albumine bovine et pour les polysaccharides du glucose.

CHAPITRE III.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre regroupe les résultats d'études réalisées au cours de la thèse ; ils sont présentés en trois sections principales :

1. La première concerne l'évaluation et la validation des protocoles analytiques. Un examen plus exhaustif de la technique de quantification des protéines par la méthode de Lowry (spectrophotométrie UV-Vis) est présenté sous forme d'un article accepté à la publication.
2. La deuxième est relative à l'impact des produits pharmaceutiques sur les boues activées et sur la formation des substances polymériques extracellulaires. Deux types de composés pharmaceutiques ont été suivis en réacteurs de laboratoire : un composé anticancéreux et ses métabolites, et des antibiotiques. Une partie des résultats est présentée sous forme d'articles (un article publié et un article accepté à la publication)
3. Enfin, la troisième section présente les résultats issus de l'étude des boues avec un intérêt particulier sur leur décantation dans les stations d'épuration des papeteries. La première partie des résultats concerne l'utilisation des cultures fongiques en réacteur pilote de laboratoire pour l'amélioration du procédé de décantation. Une deuxième étude concerne les résultats du suivi de trois stations d'épuration de papeteries pendant plusieurs mois. L'évaluation du procédé de traitement par des méthodes statistiques a permis la caractérisation et la compréhension du fonctionnement de chaque station ainsi que l'évaluation de la décantation. Les deux études (ajout des agents fongiques et suivi de trois stations d'épuration) sont présentées sous forme de deux articles soumis à la presse.

III.1. ÉVALUATION ET VALIDATION DES PROTOCOLES ANALYTIQUES (MÉTHODE D'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE, MÉTHODE D'EXTRACTION DES EPS ET MÉTHODE DE DOSAGE QUANTITATIVE DES EPS PAR UV-Vis)

III.1.1. VALIDATION DE LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE

La chromatographie liquide d'exclusion par taille permet de séparer le mélange des substances polymériques contenues dans les boues. La séparation est réalisée selon la taille hydrodynamique des molécules dans les conditions données : caractéristiques de la colonne et de la phase mobile. Chaque pic du chromatogramme peut représenter une espèce pure ou un mélange des espèces. La surface des pics du chromatogramme peut être considérée comme représentative de la concentration des espèces. Les constituants majeurs des EPS dans les boues sont des protéines et des polysaccharides, raison pour laquelle, nous avons utilisé la colonne ZORBAX destinée spécifiquement à la séparation de ces macromolécules. Nous présentons ici, la validation de la technique chromatographique en trois parties. La première partie a été consacrée au choix de la phase mobile, la deuxième au choix de la longueur d'onde et dans la troisième partie, nous avons vérifié la reproductibilité de l'analyse.

III.1.1.1. Choix de la phase mobile

La méthode d'analyse chromatographique des EPS a été mise au point (Görner et al., 2003 ; Garnier et al., 2005) dans notre laboratoire. Dans ce travail de thèse, la phase mobile utilisée correspond à une solution de NaCl 0,2M qui permet d'obtenir une bonne séparation des molécules des EPS équivalente à celle avec la solution phosphatée préconisée par le fabricant de la colonne. L'utilisation de la phase mobile phosphatée (130 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄) est gênante pour les analyses éventuelles des fractions chromatographiques par spectroscopie infrarouge à cause du recouvrement des bandes en particulier dans la région d'élongation des groupes PO₄ (1200-1000 cm⁻¹).

La figure III.1 montre la comparaison des courbes d'étalonnage utilisant le NaCl à différentes forces ioniques et la phase mobile commerciale (phase phosphatée). Les différentes courbes obtenues sont très proches entre elles. Dans notre cas, nous avons favorisé l'utilisation d'une phase mobile à forte force ionique (NaCl 0,2 M) pour réduire les

éventuelles interactions ioniques entre les molécules de l'échantillon et la phase stationnaire de la colonne. De cette manière, la séparation pourra se faire essentiellement en fonction des tailles hydrodynamiques des molécules.

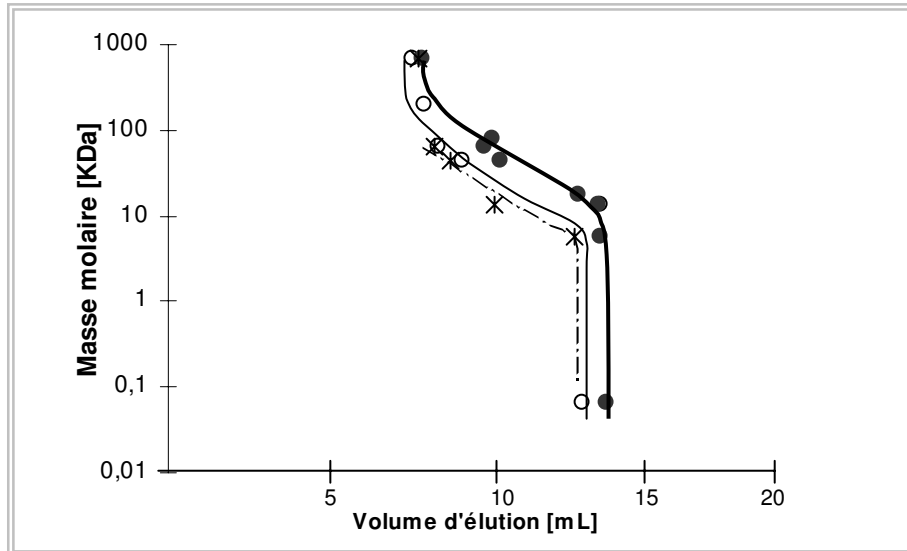


Figure III.1. Courbe d'étalonnage des protéines étalons incluant le NaN_3 à différentes forces ioniques de la phase mobile. (\circ) NaCl 0,13 M/ Na_2HPO_4 0,02 M ($I = 0,2$ M); (\bullet) NaCl 0,2 M; ($*$) NaCl 0,05 M.

III.1.1.2. Choix de la longueur d'onde de détection UV-vis

L'examen de la réponse spectrométrique du détecteur UV-vis a été réalisée à différentes longueurs d'onde sur des boues de diverses origines. La figure III.2 présente des chromatogrammes, en 3 D (absorbance, volume d'élution et longueur d'onde), pour des boues de deux origines différentes : les boues issues des bioréacteurs à membrane et les boues provenant d'une station d'épuration des eaux urbaines. L'intensité de l'absorbance varie selon la longueur d'onde. Pour les boues de deux origines, on peut observer que des intensités plus importantes sont obtenues à des longueurs d'onde plus faibles. De ce fait, la longueur d'onde de 215 nm a été retenue comme la longueur d'analyse pour nos études. Le détecteur à UV-Vis permet l'enregistrement simultané des chromatogrammes à différentes longueurs d'ondes. Nous avons vérifié systématiquement que l'absorption soit la plus élevée à la longueur d'onde de 215 nm.

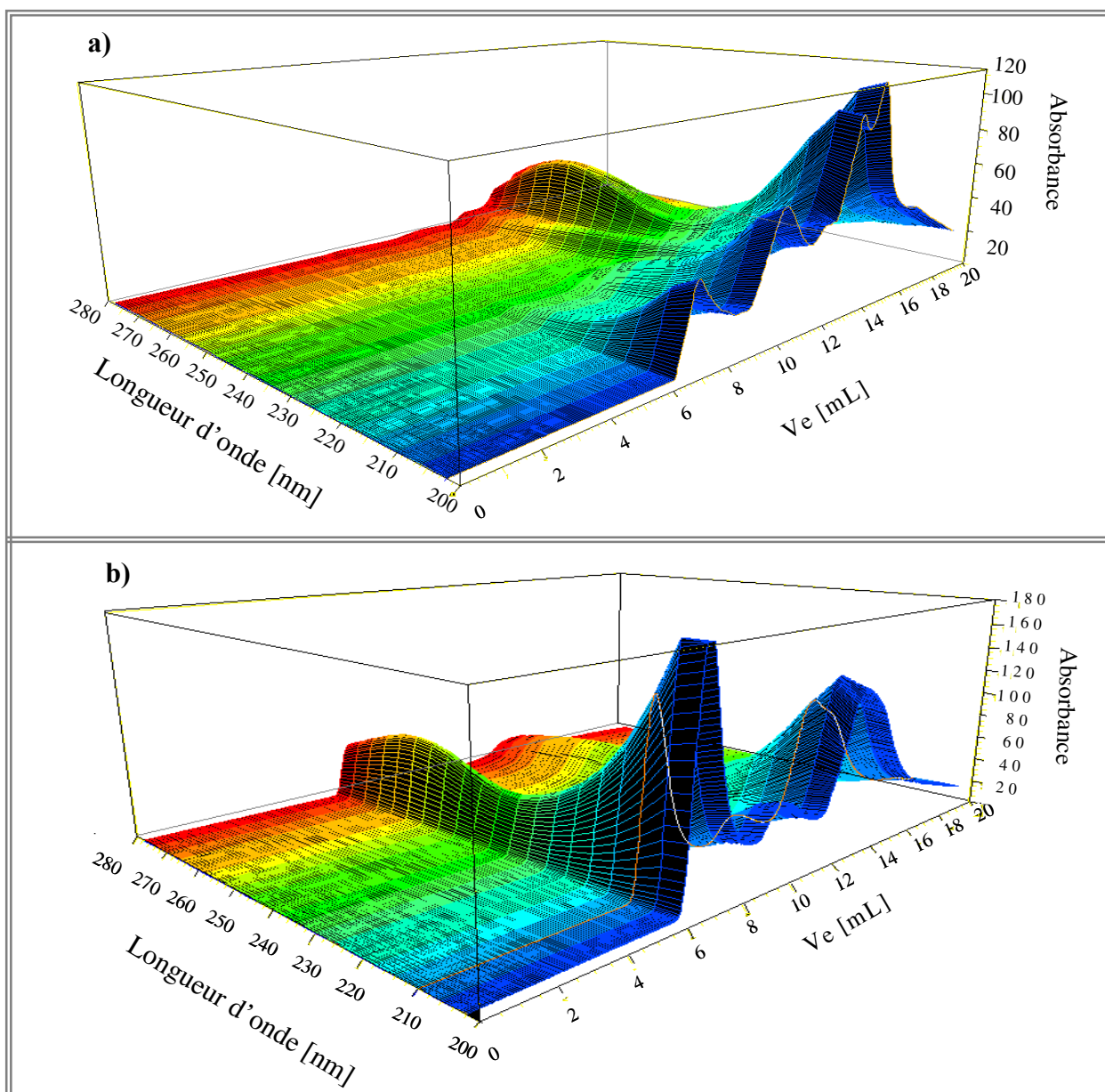


Figure III.2. Chromatogrammes enregistrés à différentes longueurs d'onde avec un détecteur UV-vis barre d'iodes pour des boues provenant : (a) du bioréacteur à membranes et (b) d'une station des eaux urbaines.

III.1.1.3. Reproductibilité de l'analyse chromatographique des EPS

Systématiquement un même échantillon a été injecté plusieurs fois dans la colonne chromatographique. Le même profil chromatographique avec le même temps d'éluion a confirmé la reproductibilité de l'injection des échantillons et la reproductibilité de la réponse de l'appareil. A titre d'exemple, la figure III.3 montre les chromatogrammes obtenus de deux injections différentes d'un même échantillon dans la colonne de séparation. L'intégration de la surface chromatographique montre une variation d'environ 5 % entre les deux injections.

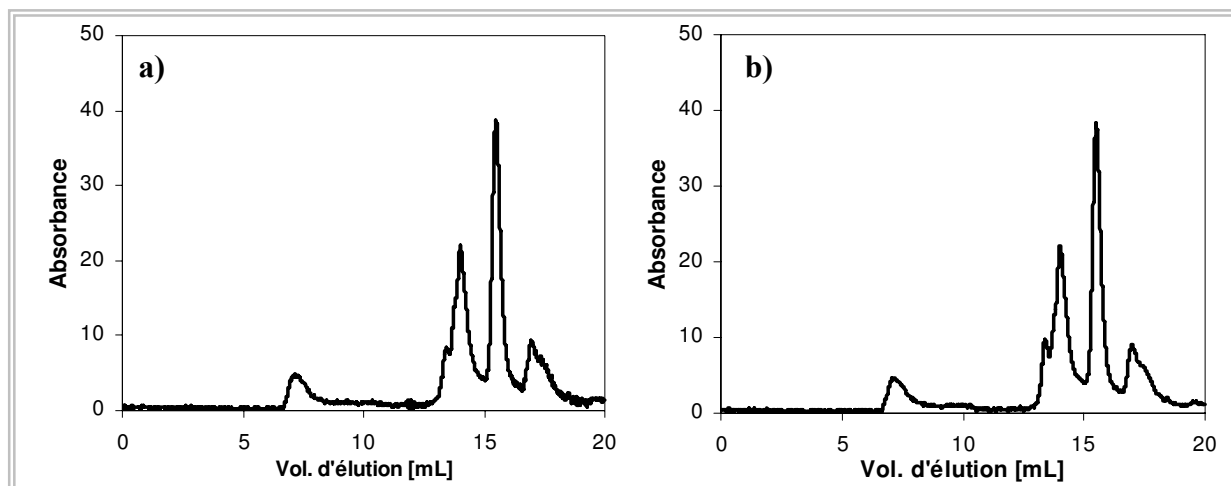


Figure III.3. Chromatogrammes obtenus pour un même échantillon ; (a) injection A, (b) injection B.

III.1.2. REPRODUCTIBILITÉ DE LA METHODE D'EXTRACTION DES EPS

Pour déterminer la reproductibilité de la méthode d'extraction des EPS, deux extractions en parallèle ont été réalisées de manière systématique sur des échantillons provenant d'une même source. Les échantillons ont été préparés de la même manière (vitesse et temps de centrifugation) préalablement à l'extraction. Les mêmes conditions d'opération du protocole d'extraction (voir section III.3.1) ont été appliquées (quantité de résine, vitesse d'agitation, temps d'extraction, température d'extraction). Les échantillons traités ainsi et provenant de la même source ont été injectés dans la colonne chromatographique (figure III.4). L'intégration de la surface chromatographique correspondant à des échantillons obtenus en parallèle montre une variation aux alentours de 7 %.

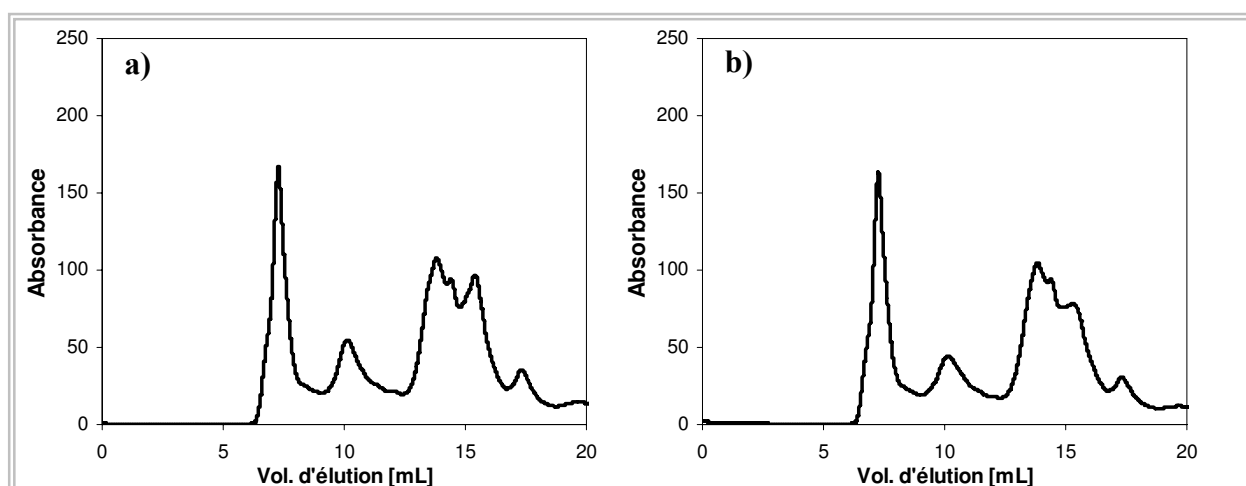


Figure III.4. Chromatogrammes des EPS provenant des extractions réalisées en parallèle des boues du même origine ; (a) extraction A, (b) extraction B.

III.1.3. ÉVALUATION DES MÉTHODES DE DOSAGE QUANTITATIVE DES EPS PAR UV-Vis

III.1.3.1. Appréciation de l'erreur opératoire liée aux méthodes classiques de dosage des protéines et des polysaccharides

Afin d'apprécier l'erreur opératoire (reproductibilité, fonctionnement d'appareillage), deux séries de mesures ont été faites :

Série 1 : Un même échantillon d'une solution des EPS extraits a été analysé quatre fois par spectroscopie UV-Vis. L'écart entre les mesures a caractérisé l'erreur liée à l'appareillage.

Série 2 : Deux prélèvements (A et B) ont été effectués dans une même solution d'EPS extraits. Chaque prélèvement a été analysé deux fois successivement. L'écart entre les mesures, même s'il intègre aussi l'erreur décrite par la série 1, a traduit principalement le biais lié à l'ensemble du protocole de préparation à l'analyse UV des protéines et des polysaccharides.

Le tableau III.1 rassemble les résultats issus de ces deux séries de mesures. Pour les mesures de la série 1, on constate que quelle que soit la famille analysée (protéines ou polysaccharides), l'erreur liée à la mesure par spectroscopie UV est faible, inférieure à 2 %. Par contre, l'erreur engendrée par le protocole opératoire et la mesure spectroscopique est plus importante : elle est de 6 % pour l'analyse des polysaccharides et de 15 % pour l'analyse de protéines.

Tableau III.1. Mesure de l'absorbance des protéines et des polysaccharides du même échantillon et des échantillons du même origine dosés en parallèle.

		Polysaccharides		Protéines		
		Absorbance	Erreur [%]	Absorbance	Erreur [%]	
Mesure du même échantillon	1	0,899	< 2	0,743	< 2	
	2	0,901		0,758		
	3	0,884		0,746		
	4	0,891		0,751		
Dosage en parallèle	A	1	< 6	0,849	< 15	
		2		0,847		0,802
	B	1		0,855		0,738
		2		0,871		0,786

III.1.3.2. Interférences des acides humiques sur la méthode de dosage des protéines

Surpris par l'apparition, dans la littérature récente (après l'année 1995), des acides humiques en tant que constituants majeurs des EPS et sachant que pendant des années, ils avaient été considérés comme un des composés mineurs des EPS, nous avons décidé d'évaluer la méthode de dosage de Lowry modifiée proposée par Frolund et al. (1995). La modification proposée par Frolund et al. a été réalisée afin de minimiser l'interférence des acides humiques sur le dosage de protéines. L'évaluation de cette méthode a montré qu'elle est insuffisante pour la différenciation entre les protéines et les acides humiques. La méthode de Lowry modifiée peut générer des acides humiques dans des solutions contenant uniquement des protéines. Ces résultats sont présentés sous forme d'article accepté à *Science of the Total Environment*, 2010.

The pitfalls of protein quantification in wastewater treatment studies

Avella A.C.*, Görner T., de Donato Ph.
Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy-Université, CNRS, 15 avenue du Charmois,
54500 Vandoeuvre les Nancy, France.

Article accepté à *Science of the Total Environment*, 2010.

Abstract

Proteins, as one of the principal components of organic matter in wastewater, require adequate quantification to determine their concentration in the different stages of wastewater treatment process. Recent studies have used the *corrected Lowry* method for protein quantification arguing that this method can differentiate proteins from interfering humic substances. In this study, the *classic Lowry* method, the *corrected Lowry* method and a commercial assay kit were assessed for the protein quantification in the presence of humic acid.

Keywords: protein quantification, Lowry method, humic acid interference, UV-Vis spectroscopy.

1. Introduction

Characterization and quantification of principal organic matter (protein and polysaccharide) in wastewater treatment is necessary for a better understanding of the transformations through the biological wastewater treatment processes. The activated sludge is comprised of microbial cells embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS), inorganic particles and multivalent cations (Sutherland, 2001; Urbain et al., 1993). The EPS represent a major sludge structural component and have a variable composition which was reported mainly as polysaccharides (40-95 %), proteins (<1-60 %), lipids (<1-40 %) and nucleic acids (<1-10 %) (Flemming and Wingender, 2001).

Many studies over the past 20 years and recent reviews have examined the EPS characterization and their role in the different stages of wastewater treatment (Le-Clech et al. 2006, Liu and Fang, 2003). They have reported often contradictory results. Lapidou and Rittman (2002) reviewed investigations about EPS characterization: in early studies polysaccharides were found to be the predominant components, however proteins were reported in later studies as the main EPS component and nucleic acids also appeared in significant amounts. Recently, humic acids were found to be an important EPS component (Fan et al. 2006; Lyko S. et al. 2007).

The composition of the EPS as a consequence of biological behaviour change with the variability of the wastewater treatment conditions. Moreover, use of the different methods for the EPS analysis increase the complexity of the EPS characterization. There exists various techniques for isolating/extracting EPS from the activated sludge and also different methods for EPS quantification. When considering the total protein (PR) content determination in EPS and in wastewater, there are many debates about the most accurate method.

There are essentially three different methods for protein quantitative analysis: *Lowry* method (1951), *Kjeldahl-N* method (AOAC) and *Bradford* method (Bradford M., 1976). Raunkjaer K. et al. (1994) compared these three methods and emphasized that the choice of the best method is not obvious if PR is to be analysed in wastewater. They concluded that the

most accurate method for PR measurement in wastewater is the *Lowry* method because it was appropriate to measure the small proteins and also the dipeptides molecules. However they admitted that the *Lowry* method is probably sensitive to interfering compounds. Davis (1988) tested the *Lowry* method on various kinds of PR and observed only slight variations, an important fact, because wastewaters can contain different PR.

The *Lowry* method is based on two chemical reactions. The first step is the biuret reaction, where peptide bonds in protein react with copper in alkaline solution. The second step is the reduction of the phosphomolybdic-phosphotungstic reagent (Folin-Ciocalteu's reagent) by the copper treated protein. The absorbance of the developed coloration measured at 750 nm is related to the PR concentration by a calibration curve.

The principal disadvantage of the *Lowry* method is the risk of interference from many substances (Box 1983; Davis, 1988; Peterson, 1979). For example, Box (1983) reported that Folin-Ciocalteu's (F-C) reagent was used for determination of humic substances in soils and in fresh waters. According to Raunkjaer K. et al. (1994), the concentration of humic substances in wastewater can be expected to be negligible compared to the PR concentration, but the risk of interference should be considered. The presence of humic-type constituents was considered only in the case of natural waters (MacCarthy et al., 1990) and municipal waste landfills leachates (Kang et al., 2002; Leenheer et al., 2003), but not in traditional wastewater treatment plant.

In recent years, a *corrected Lowry* method was applied for sludge analysis arguing that it enables the distinction of the presence of proteins from humic acids (HA) (Frolund et al., 1995). Indeed, Lowry et al. (1951) reported in their original paper a significant increase of PR coloration, from 5 to 15 times (according to protein species) when the protein sample was submitted to the copper-alkaline treatment. The *corrected Lowry* method is based on two spectrophotometric measurements. The first absorbance measurement is done on sample solutions treated by CuSO_4 reagent followed by F-C reagent treatment (as in the *classic Lowry* method). In this case an important spectrophotometric response with proteins and also with humic acids in the sample is obtained. The second measurement is made on solutions submitted only to F-C reagent without the copper pre-treatment. This second spectrophotometric response decreased to 20 % in the case of PR absorbance, while the humic acid absorbance remained unchanged. Using values from both measurements it is mathematically possible to calculate the PR and HA contribution from the difference in absorbances between the solution pre-treated by copper reagent and the one without copper treatment (assuming that the molar extinction coefficient ϵ remains the same whatever reactive is used). It can be written (Frolund et al, 1995):

$$\text{Abs (with CuSO}_4\text{)} = \text{Abs PR} + \text{Abs HA} \quad (1)$$

$$\text{Abs (without CuSO}_4\text{)} = 0,2 \text{ Abs PR} + \text{Abs HA} \quad (2)$$

$$\text{Abs HA} = \text{Abs (without CuSO}_4\text{)} - 0,2 * \text{Abs PR} \quad (3)$$

Combination of (1), (2) and (3) gives following expression:

$$\text{Abs PR} = 1.25 \times [\text{Abs (with CuSO}_4\text{)} - \text{Abs (without CuSO}_4\text{)}] \quad (4)$$

Frolund et al. applied this *corrected Lowry* method in analysis of activated sludge (1995) and of EPS (1996) and in both studies the proteins were found to be the most abundant components. Jahn and Nielsen (1995) applied the *corrected Lowry* method to analyse the EPS

in two sewer lines: the PR were found to be the major EPS component in one of the sewer lines while the HA were prevailing in the second sewer line. Moreover, the modifications in the PR/HA ratio in the sewer biofilm changed over the seasons (Jahn and Nielsen, 1998).

The composition of the organic matter may be affected by the different parameters in complex biological systems. Thus it is not easy to characterize the organic matter especially when lacking a reliable method for PR determination. The aim of our study was to evaluate the protein measurement by the *classic Lowry* method, by the *corrected Lowry* method and by the commercial assay kit® (Sigma-Aldrich). This kit is based on the *classic Lowry* method with Peterson et al. (1977) modification: addition of sodium dodecylsulfate facilitates the dissolution of relatively insoluble lipoproteins and decreases the possible detergent and lipid interferences. The methods were assessed on commercial molecules of bovine serum albumin and humic acid.

2. Materials and methods

The humic acids from two suppliers (humic acid 5368 from Fluka, Switzerland, and humic acid, sodium salt from Aldrich, Germany) and protein Bovine Serum Albumin (BSA) (Aldrich, France), were used to prepare the solutions for calibration curves. The mixtures PR-HA were arbitrarily prepared in mass ratio 1:1. UV-Vis spectrophotometric response is very sensitive to the sample preparation, therefore each solution at each concentration was prepared in duplicate within the concentration range of 0-100 mg/L for proteins and 0-100 mg/L for humic acids. These concentrations were arbitrarily chosen so that the measured absorbance did not exceed the value of 1 (strict validity of Beer-Lambert law). The results obtained with humic acids from both suppliers were identical. Therefore, we are only presenting here the results obtained with HA-sodium salt supplied by Aldrich. The absorbance measurements were done at 750 nm using UV-Vis Spectrophotometer UV-2501 PC against the blank solution relative to each method.

3. Results and discussion

The calibration curves for PR and for HA obtained with standard PR and HA solutions treated with CuSO₄ and F-C reactive (*classic Lowry* method) and treated only with F-C reactive (*corrected Lowry* method) are presented in figure 1a and 1b respectively. The calibration curves obtained with the commercial kit are in figure 1c. It can be observed that whatever the applied method, the HA gave a significant spectrophotometric response. This clearly shows that the presence of HA in an unknown sample analysed for PR content contributes to the total measured absorbance and leads thus to an overestimated PR concentration.

BSA protein exhibited an important spectrophotometric signal when the *classic Lowry* method (with copper and F-C treatment) and the commercial kit (containing also a copper and F-C reagent) were used (figure 1a and 1c). The absence of the copper treatment induced a significant decrease (about 80 %) of the BSA protein solution absorbance (fig. 1b), as described by Frolund et al. (1995). The commercial assay kit gave the highest spectrophotometric response for PR and for HA (figure 1c), probably due to the presence of the dodecylsulfate.

When mixtures of HA and PR were measured, the additivity was very well respected at low concentrations with all methods. At higher concentrations more or less important deviations were observed. It is not surprising; it is a common phenomenon which can be

explained by slight variations of the ϵ coefficient due to the increase of molecular interactions affecting the chromophore response at 750 nm.

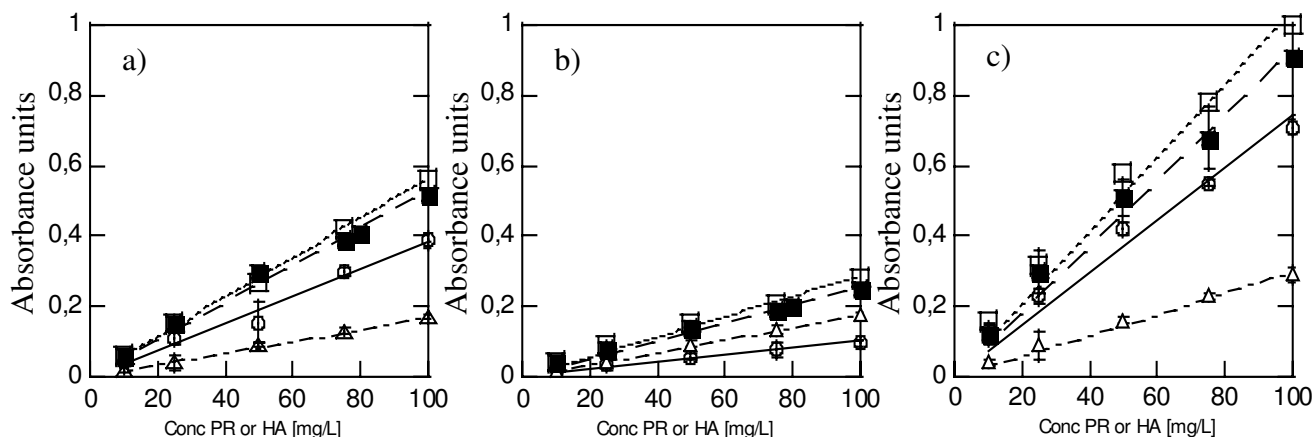


Figure 1. Absorbance measurements. Calibration curves for proteins, humic acids and their mixtures (1:1 mass ratio): a) Classic Lowry method using CuSO_4 ; b) In absence of CuSO_4 reactive, only F-C treatment and c) Commercial assay kit Sigma-Aldrich. (\circ) proteins, (Δ) humic acids, (\blacksquare) measured absorbance of mixture PR:HA (1:1) and (\square) calculated absorbance of mixtures as sum of PR and HA.

From the presented measurements it can be observed that the *corrected Lowry* method makes it possible to distinguish mathematically, by corrective relations (3 and 4), the contribution of HA and of PR to the measured absorbance in a mixture. Thus theoretically the “true” protein values could be found. However it is necessary to draw attention to some pitfalls. The absence of CuSO_4 reactive made the protein spectrophotometric response less sensitive and thus more exposed to random measurement errors, especially when solutions with low absorbance values are measured. Making the subtraction of two measured values (one of them with a relatively important random error), and using the resulting value for concentration determination can lead to some artefacts. Table 1, column I presents all absorbance values (a, b, c, d) measured on duplicate solutions of pure protein (corresponding to the PR calibration curves on figure 1a and figure 1b).

Let us now consider these PR calibration solutions prepared with standard protein BSA as unknown samples (containing proteins and perhaps also humic acid). Applying the corrective relations (3 and 4) to the measured absorbance values, the unknown PR and HA concentrations can be calculated. The calculated PR concentrations are in the column II: four calculated values ac, bd, ad and bc were obtained from individual measured values (e. g.: ac value was calculated from measurements a and c). The mean value \bar{Y} and standard deviation δ were calculated from ac, bd, ad and bc results. The same approach was applied for the HA concentration determination (column III).

Table 1. Measured absorbance of pure PR solutions (column I), considered as unknown samples for PR determination (column II) and HA determination (column III) applying corrective approach (relations 3 and 4). \bar{Y}_{PR} and \bar{Y}_{HA} are the mean values of PR and HA concentrations respectively and δ the corresponding standard deviation. PR % error was established from the \bar{Y}_{PR} values and X_i , corresponding nominal PR values.

PR conc. [mg/L] X_i	I				II						III				
	Measured absorbance				PR calculated concentration [mg/L]						HA calculated concentration [mg/L]				
	With CuSO4		Without CuSO4		ac	bd	ad	bc	$\bar{Y}_{PR} + \delta$	Error [%]	ac'	bd'	ad'	bc'	$\bar{Y}_{HA} + \delta$
	a	b	c	d											
10	0.038	0.042	0.021	0.026	5.5	5.1	3.9	6.7	5.3 ± 1.4	47	9.7	12.8	13.3	9.1	11.2 ± 2.1
25	0.085	0.106	0.034	0.036	16.3	22.5	15.6	23.1	19.4 ± 3.7	22	12.4	10.7	13.8	9.3	11.5 ± 2.3
50	0.155	0.212	0.048	0.058	34.3	49.4	31.1	52.6	41.9 ± 10.7	16	12.3	11.3	19.6	4.1	11.8 ± 7.8
75	0.286	0.300	0.073	0.083	68.4	69.7	65.2	72.9	69.0 ± 3.9	8	11.5	16.7	18.7	9.4	14.1 ± 4.6
100	0.373	0.394	0.094	0.098	89.6	95	88.3	96.3	92.3 ± 4.0	8	14.1	13.9	17	11	14.0 ± 3.0

We can see that the “*corrected method*” approach induces two kinds of problems:

a) It “generates” the humic acids in spite of their absence in the sample of pure proteins due to the random variations of measured absorbance values. When absorbance measurements are made on very diluted samples, an important content of humic acids can be found in solutions (see \bar{Y}_{HA} values found in solutions containing 10 and 25 mg PR concentrations X_i).

b) The PR concentrations are underestimated (\bar{Y}_{PR} values were lower than the corresponding true PR concentrations X_i . The PR concentrations were influenced by errors going from 47 % at 10 mg/L up to 8 % at 100 mg/L solution). The error is particularly important at low measured absorbances, however this is a normal phenomenon in spectrophotometric measurements.

This can lead to important errors when the *corrected Lowry* method is used for the PR determination. The humic acids can be found as an important or major constituent, even when they are absent; especially when solutions are diluted and low absorbances (< 0.1) are measured.

4. Conclusion

The protein determination in complex biological samples is not an obvious task, so various methods and their improvements have been proposed by different authors for decades. The *Classic Lowry* method, and the commercial assay kit are sensitive to the humic acid presence, thus they can overestimate the protein content when humic acids are present in studied samples. The commercial kit has the advantage of being simple to use. Moreover, the measured absorbances are nearly twice the absorbances given by the *classic* method for the same concentrations, so it is more sensitive to low protein concentrations.

The *corrected Lowry* method, can generate the humic acids even when they are absent in the sample and underestimate the protein content. Moreover, when very diluted solutions are measured, the errors can be very important and even give false results.

These observations lead to the following suggestion: When low PR concentrations are measured (< 25 mg/L), as in the case of some wastewater with a low PR load, the *corrected Lowry* method should be avoided. In this case, the use of the commercial kit giving a relatively significant PR signal (0.1 to 0.2 AU, see figure 1c) limits the error of the quantification. For a high protein content (> 50 mg/L) (some effluent or sludge samples), the *corrected Lowry* method can be used with a quantification error better than 16 %.

The purpose of this report was to draw attention to the pitfalls of PR determination. Before undertaking the PR quantification of samples in wastewater studies, it is necessary to assess the most appropriate method for a given type of the sample. Special care must be taken when solutions are diluted and measured absorbance is very low (< 0.1).

References

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Official Method 991.20.
- Box, J.D. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Wat. Res* 1983; 17: 511-525.
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem* 1976; 72 (1-2): 248-254.
- Davis, E.M. Protein assay: a review of common techniques. *Am. Biotechnol. Lab* 1988; 6: 28-37.
- Fan, F., Zhou, H., Husain, H. Identification of wastewater sludge characteristics to predict critical flux for membrane bioreactor process. *Water Research* 2006; 40 (2): 205-212.
- Flemming, H.C., Wingender, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. In: *Extracellular polymeric substances – the construction material of biofilms*. Flemming H.C. and Leis A. (eds.). *Wat. Sci. Tech* 2001; 43 (6): 1-8.
- Frolund, B., Griebe, T., Nielsen, P.H. Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 1995; 43 (4): 755-761.
- Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 1996; 30 (8): 1749-1758.
- Jahn, A., Nielsen, P.H. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Wat. Sci. Tech* 1995; 32 (8): 157-164.
- Jahn, A., Nielsen, P.H. Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Wat. Sci. Tech* 1998; 31 (1): 17-24.
- Kang, K.H., Shin, H.S., Park, H. Characterization of humic substances present in landfill leachates with different landfill ages and its implications. *Wat. Res* 2002; 36 (16): 4023-4032.
- Lapidou, C.S., Rittmann, B.E. A unified theory for extracellular polymeric substances soluble microbial products, and active and inert biomass. *Wat. Res* 2002; 36 (11): 2711-2720.
- Le-Clech, P., Chen, V., Fane, T.A.G. Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Review. Journal of Membrane Science* 2006; 284 (1-2): 17-53.
- Leenheer, J.A., Nanny, M.A., McIntyre, C. Terpenoids as major precursors of dissolved organic matter in landfill leachates, surface water and groundwater. *Environ. Sci. Technol* 2003; 37 (11): 2323-2331.
- Liu, Y., Fang, Herbert H.P. Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling and dewatering of activated sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2003; 33 (3): 237-273.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 193: 265-275.
- Lyko, S., Al-halbouni, D., Wintgens, T., Janot, A., Hollender, J., Dott, W., Melin T. Polymeric compounds in activated sludge supernatant – characterisation and retention mechanisms at a full-scale municipal membrane bioreactor. *Wat. Res* 2007; 41 (17): 3894-3902.
- MacCarthy, P., Clapp, C.E., Malcom, R.L., Bloom, P.R. *Humic substances in soil and crop sciences: selected readings*. Madison, Wisconsin, Soil Sci. Society of America; 1990.
- Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analyt. Chem* 1977; 83: 346-356.
- Peterson, G.L. Review of the folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analyt. Biochem* 1979; 100: 201-219.
- Raunkjaer, K., Hvitved-Jacobsen, T., Nielsen P.H. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Wat. Res* 1994; 28 (2): 251-262.
- Sutherland, I.W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology* 2001; 9 (5): 222-227.
- Urbain, V., Block, J.C., Manem, J. Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. *Wat. Res* 1993; 27 (5): 829-838.

III.2. IMPACT DE PRODUITS PHARMACEUTIQUES SUR LES BOUES ACTIVÉES : FORMATION DES SUBSTANCES POLYMÉRIQUES EXTRACELLULAIRES

III.2.1. INTRODUCTION

Selon une étude comparative réalisée par la DREES (Direction de la Recherche des Etudes de l'Evaluation et des Statistiques) la vente de médicaments en pharmacie a atteint en 2004 près de 70 milliards d'euros dans les cinq principaux marchés européens: Allemagne, Italie, France, Espagne et Royaume-Uni. Parmi eux, la consommation en France par habitant est supérieure de plus de 40 % comparée aux quatre autres pays. La consommation excessive, spécialement des antibiotiques, présente des risques sanitaires car elle contribue au développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques et compromet l'efficacité de ces traitements. En effet, une étude réalisée en France sur 19 000 patients des hôpitaux, répartis sur 7 régions en France, a montré que le taux de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques est particulièrement élevé en France : 50 % de souches *S. pneumoniae* analysées sont résistantes à la pénicilline G et aux macrolides (Trystram et al., 2004).

Dans l'organisme, l'élimination des médicaments, en général, est essentiellement rénale, une quantité importante est éliminée par les urines et les matières fécales, et se retrouve ainsi dans les effluents hospitaliers et domestiques (Heberer, 2002). Ces médicaments, métabolisés ou non, constituent un risque potentiel pour l'environnement. Dans les stations d'épuration, ces molécules peuvent être partiellement dégradées par les bactéries, adsorbés par les boues ou bien, elles peuvent persister dans la phase liquide et atteindre ainsi les eaux des surfaces (Kümmerer, 2009a) où elles seront préjudiciables à différents organismes.

Dans ce chapitre nous nous intéressons à l'effet que peuvent avoir certaines molécules pharmaceutiques sur l'activité biologique des boues provenant des stations d'épuration. Deux types de médicaments ont été étudiés, *a*) une molécule de type cytostatique, utilisée dans le traitement anticancéreux (le cyclophosphamide), et *b*) cinq antibiotiques très largement consommés en médecine humaine. Notre principal objectif était d'étudier l'activité bactérienne en présence de ces composés pharmaceutiques. Pour l'atteindre, la formation des EPS a été suivie en tant qu'indicateur du comportement bactérien. En effet, le suivi des EPS

permet d'évaluer la réponse bactérienne en situation de stress induit par la présence des molécules pharmaceutiques.

III.2.2. EFFET DE LA PRÉSENCE D'UN AGENT CYTOSTATIQUE SUR LA FORMATION DE SUBSTANCES POLYMÉRIQUES EXTRACELLULAIRES DANS LES EAUX USÉES MUNICIPALES TRAITÉES DANS UN BIORÉACTEUR A MEMBRANE

L'étude, en présence de l'agent anticancéreux cyclophosphamide, a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Génie Chimique (LGC) de Toulouse. Le fonctionnement des réacteurs entre dans le cadre de la thèse de Delgado L.F. (2009) intitulée « Bioréacteurs à membrane externe pour le traitement d'effluents contenant des médicaments anticancéreux ». La technologie du bioréacteur à membranes paraît très prometteuse pour l'élimination des composés pharmaceutiques persistants. L'analyse des substances polymériques extracellulaires dans ce système de bioréacteurs à membranes a été réalisée dans le cadre de la présente thèse au Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM) de Nancy.

Cette étude s'articule autour de deux campagnes : I) la première campagne s'est opérée avec des boues acclimatées de 20 jours et âgées de 50 jours, et II) la deuxième campagne a été effectuée avec des boues acclimatées de 107 jours et âgées de 70 jours. Les résultats de la première campagne (boues peu acclimatées et relativement jeunes) sont présentés sous forme d'article ci-joint publié dans le journal *Bioresource Technology* **101 (2010), pag 518 - 526** (section III.2.2.1). Les résultats de la deuxième campagne (boues mieux acclimatées et plus âgées) sont rassemblés dans la section III.2.2.2., ces résultats ont été présenté lors du Congrès de GRUTTEE (2009) dans le travail intitulé « Bioréacteur à membrane pour le traitement d'effluents d'oncologie : Effets de la conduite du procédé sur les exopolymères, performances ».

III.2.2.1. Campagne expérimentale I (période d'acclimatation de 20 j) (*Bioresource Technology* **101 (2010), pag 518 – 526)**

Cette section présentée sous forme d'article, rassemble les résultats de la première campagne d'expérimentation avec une période courte d'acclimatation des boues de 20 j et une âge de boue de 50 j.



Effect of cytostatic drug presence on extracellular polymeric substances formation in municipal wastewater treated by membrane bioreactor

A.C. Avella^{a,*}, L.F. Delgado^b, T. Görner^a, C. Albasi^b, M. Galmiche^a, Ph. de Donato^a

^aLaboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy-Université, CNRS, 15 avenue du Charmois, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France

^bLaboratoire de Génie Chimique, UMR CNRS 5503, 5 rue de Paulin Talabot, 31106 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2009

Received in revised form 28 July 2009

Accepted 6 August 2009

Available online 10 September 2009

Keywords:

Extracellular polymeric substances

Size exclusion chromatography

Infrared and UV–Vis spectroscopy

Anticancer drug

Membrane bioreactor

ABSTRACT

The effect of the cyclophosphamide and its main metabolites on extracellular polymeric substances (EPS) formation was investigated. Two lab-scale membrane bioreactors were followed in parallel (one with the cytostatic drugs, the second without). Chromatographic and spectroscopic studies (UV–Vis spectroscopy and IR spectroscopy) showed that the presence of CPs induced an increase in EPS concentration in the biological sludge, especially of soluble substances, mainly polysaccharides and proteins. Size exclusion chromatography analysis revealed that in the presence of CPs, macromolecular EPS were formed (polysaccharides corresponding to about 6 kDa and proteins to about 18 kDa). The formation of EPS seemed to be a protection mechanism. More important membrane fouling in reactor with CPs seemed to be related to the retention of an increased amount of soluble substances.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pharmaceuticals and other micropollutants in wastewater pose a new challenge to wastewater professionals and to the pharmaceutical industry. Pharmaceuticals are designed to exhibit biological activity in humans and may have negative effects on aquatic organisms. Compounds with a very potent mechanism of action such as cytostatic drugs, present a particular environmental concern though consumption rates and expected concentrations in the environment may be low (e.g. Kümmerer, 2001).

The alkylating antineoplastic drug cyclophosphamide (CP) is one of the oldest known cytostatics and is one of the most frequently used in cancer chemotherapy (Kümmerer, 2001). After application to patients the agent is renally excreted, whereby up to 20% of the dose may leave the body unmetabolized. Besides its cytotoxic effects, CP presents teratogenic and mutagenic properties and is a known human carcinogen (Steger-Hartmann et al., 1997). It is transformed via hepatic and intracellular enzymes to active alkylating metabolites, 4-hydroxycyclophosphamide, aldophosphamide, acrolein and phosphoramidate mustard (Joqueviel et al., 1998).

The increasing use of anticancer drugs and their presence in wastewater is a relatively new issue and only few studies have been reported (Kümmerer, 2001; Lenz et al., 2007; Steger-Hartmann et al., 1997). When the micropollutant-contaminated wastewaters reach biological treatment systems, they may negatively affect the performance of the treatment plant, due to the possible inhibi-

tion of biological activity. Although much research is being directed towards the study of the removal mechanisms of micropollutants (Uruse and Kikuta, 2005), little attention is being given to the effect of micropollutants on the plant performance. The biological degradation in municipal wastewater treatment contributes only to a limited extent to the overall load reduction of different pharmaceutical compounds (Joss et al., 2006).

Some studies have indicated a significantly better removal of persistent pharmaceuticals by membrane bioreactor (MBR) technology (Bernhard et al., 2006; Weiss and Reemtsma, 2008). Nevertheless, the main problem in membrane application is a rapid decline of permeation flux due to the membrane fouling which requires a frequent membrane cleaning/replacement thus increasing the operation costs (Judd, 2008). Considerable investigations have been conducted over the last years in order to better understand the complex fouling mechanisms and recent reviews have been published (Le-Clech et al., 2006; Meng et al., 2009). There is a general consensus that the soluble EPS in sludge supernatant contribute significantly to the total specific cake resistance (Nuengjamnong et al., 2005; Rosenberger et al., 2006). Many studies of membrane foulant species have found different and often conflicting trends in fouling, so a comprehensive investigation of foulants remains a topic of interest in research and the application of MBRs (Judd, 2008; Meng et al., 2009). Two types of studies dominate the MBR research referring to: (i) the phenomenon of foulant demonstrates *in situ* (i.e. decrease in permeability) and (ii) physical and/or chemical characterization of the foulant species. This study refers to the second category: it was focused on EPS investigation for a better understanding of biomass behaviour in the presence of anticancer drug.

* Corresponding author. Tel.: +33 383596266; fax: +33 383596285.

E-mail address: catalina.avella@ensg.inpl-nancy.fr (A.C. Avella).

The EPS play an important role in several stages of the activated sludge wastewater treatment process: from sludge flocculation and settling to sludge dewatering. Their role in the sludge was often studied, but not yet clearly established and studies are sometimes controversial (review of Liu and Fang, 2003). The EPS are issued from microbial metabolism and from cell lysis during the biological wastewater treatment; they are a main sludge component keeping the microbial aggregates together in a three dimensional matrix which allows micro-organisms to live at high cell densities in stable mixed population communities. Moreover, the cells produce EPS for their survival and in response to environmental stress (Wingender et al., 1999). The EPS form a complex polymeric network with a large surface area adsorbing pollutants, nutrients and minerals (Finlayson et al., 1998). They are involved in the adhesion of biofilm onto solid surfaces by electrostatic or by polymeric interactions (Tsuneda et al., 2003). Several propositions were made in recent years to describe the relationship between biomass and the EPS located at or outside the cell surface and their soluble part also called soluble microbial products (SMP). Laspidou and Rittmann, (2002) proposed a unified theory for EPS, SMP and active and inert biomass. In this approach, the soluble EPS are actually SMP, active biomass includes bound EPS and inert biomass comprises some bound EPS and the residual dead cells.

The EPS are composed of up to 75–90% of polysaccharides and proteins and small amounts of lipids, DNA and RNA (Wingender et al., 1999). They can be present as pure or mixed components with various functional groups and their molecular size can range from a few hundred to several hundreds of thousands of Daltons (Garnier et al., 2005).

In this study, we focused on EPS production in presence of cyclophosphamide and its main metabolites (all called later CPs) treated by MBR. The results presented here were obtained with reactors running under steady-state conditions for 4 weeks, after 132 days of continuous operation. The EPS were examined by UV–Vis and infrared spectroscopy for protein and polysaccharide content. They were more deeply investigated by size exclusion chromatography and infrared spectroscopy to obtain information about macromolecular size distribution and possible chemical changes, respectively. Their size and presence were then related to the functioning of the MBRs and especially to transmembrane pressure (TMP) and EPS retention/permeation.

2. Methods

2.1. Reactors and operating conditions

The schematic diagram of cross-flow MBR is shown in Fig. 1. Two identical lab-scale cross-flow MBR were run in parallel. Each reactor was inoculated with activated sludge from a municipal sewage treatment plant (dry weight, 3 g/L). The raw water used (identical for both reactors) was composed of domestic water (9.75 L/day with an average COD of 550 mg/L) and completed with Viandox® (0.25 L/day) to reach the required chemical oxygen demand (COD) of around 2300 mg/L. Treatment was operated in aerobic/anoxic conditions. Mixed liquor suspended solids (MLSS) were measured according to the analytical methods described in the standard methods 2540 G (APHA et al., 2005).

Operating conditions of MBRs during the experimentation were as following: working volume: 20 L; temperature: 25–32 °C; pH: 7–8; flux: 75 L m⁻² h⁻¹; inlet COD: 2300 mg/L; organic loading rate: 1.15 kg COD m⁻³ d⁻¹; sludge retention time (SRT): 50 days; hydraulic retention time (HRT): 48 h; MLSS (at steady-state) in R1: 8.89 g/L and in R2: 10.84 g/L; F/M (food/microorganism, at steady-state) in R1: 0.13 kg COD/kg MLSS/d and in R2: 0.11 kg

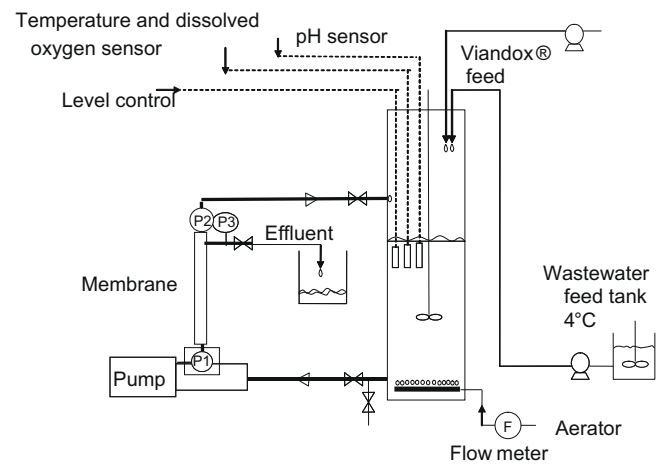


Fig. 1. Schematic diagram of lab-scale MBR. Pressure gauge (P) at the membrane entrance (P1), at the membrane outlet (P2) and at the permeate outlet (P3).

COD/kg MLSS/d; aeration cycle: 2 min aeration/23 min without aeration; dissolved oxygen: 0–4.5 mg/L.

The membrane modules were ceramic tubular Membralox® (MF) with 0.0055 m² of surface area and pore size of 0.1 μm (Pall Exekia, France). The transmembrane pressure (TMP) which indicates the extent of membrane fouling was regularly monitored.

The cyclophosphamide (5 μg/L) and its main metabolites (acrolein 2.25 μg/L, phosphoramidate mustard 8.88 μg/L, 4-ketocyclophosphamide 0.58 μg/L, nitrogen mustard 0.517 μg/L) were continuously added to reactor R1, whereas R2 served as a control. Chemicals were supplied by NIOMECH, part of IIT GmbH (University of Bielefeld, Universitätsstr. 25, DE-33615 Bielefeld): D-18845-4-keto-cyclophosphamide; D-18846-phosphoramidate mustard; D-19990-nitrogen mustard hydrochloride and by SIGMA (St Quentin Fallavier, France) 01680 acrolein; C0768 cyclophosphamide.

2.2. EPS analysis

2.2.1. Sampling and samples preparation

Three kinds of samples were analysed: (i) the supernatant of the mixed liquor, (ii) the membrane permeate and (iii) the sludge biomass (settled pellets). The mixed liquor sampled from reactors was centrifuged (20 min at 4200 g) to separate the biomass (settled pellets) from the supernatant. The soluble matter present in the supernatants (S) and in the permeates (P) were directly analysed by methods described later. The settled biomass, before further analysis, was submitted to EPS extraction according to Frolund et al. (1996) with modification: extraction time of 4 h instead of 1 h; these samples will be called B.

2.2.2. Total protein and total polysaccharides analysis

For a total protein (PR) and total polysaccharides (PS) content, the classical UV–Vis methods were applied. Proteins determination was done with the total proteins kit; Micro Lowry® (Lowry et al., 1951) with Peterson's modification (Sigma–Aldrich, France) using bovine serum albumin as a standard for calibration from 20 to 200 mg/L, absorbance was measured at 750 nm. Polysaccharides were determined according to the classical Dubois protocol (Dubois et al., 1956) at 485 nm, calibration was done with glucose in the concentrations from 10 to 100 mg/L. All samples were measured in duplicate.

2.2.3. High pressure size exclusion chromatography

The EPS were analysed by high pressure size exclusion chromatography (HPSEC) to estimate molecular sizes of present chemical species (Garnier et al., 2005). The separation of EPS samples was

carried out on a Hewlett Packard 1100 series chromatograph. A Zorbax Bio series column (GF-250, 25 cm × 9.4 mm, Agilent Technologies, France) thermostated at 25 °C was used. The mobile phase (flow rate 1 mL/min) was 0.2 M NaCl. The detection was carried out at 25 °C with a diode array UV detector at 215 nm. All samples were filtered with 0.2 μm (Chromafil®) filters prior to injection. The column elution volumes V_e were calibrated by standard polysaccharides (180, 738, 3700, 5900, 11 800, 22 800, 47 300, 112 000, 212 000, 404 000 and 788 000 Da; Polymers Laboratories, France) and standard proteins (bovine insulin 5730 Da, ribonuclease A from bovine 13 700 Da, myoglobin 17 600 Da, chicken albumin 44 300 Da, β-amylase 56 000 Da, bovine serum albumin 66 000 Da, apo-transferrin 78 000 Da, IgG from human serum 160 000 Da, thyroglobulin 670 000 Da; Sigma–Aldrich, France).

2.2.4. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

Spectral analysis was performed on FT-IR spectrometer (Bruker IFS 55 with DTGS detector). All measurements were made in transmission mode in the 4000–600 cm^{-1} range (64 points scans, resolution $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$). Each sample was deposited as droplets $3 \times 100 \mu\text{L}$ in the centre of a ZnSe slide, the material was dried under low vacuum until was formed a solid film. The diameter of the IR spot was 5 mm. The spectra were treated using OPUS software.

3. Results

3.1. Steady-state conditions

The cumulative sludge production, SP_{cum} [kg], for the total reactor operation time was calculated from the Eq. (1) and is shown in Fig. 2a. Sampling days are indicated by arrows.

$$SP_{cum} = \sum SP_i \cdot \Delta t = \frac{\sum_{i=1}^{i=160} Q_{ES} \cdot MLSS_i \cdot (t_i - t_{i-1})}{1000} \quad (1)$$

SP_i is the quantity of sludge leaving the bioreactor per time unit [g/d], Q_{ES} is the excess sludge volume withdrawal rate [L/d], $MLSS$ is the mixed liquor suspended solids concentration in the reactor [g/L] and t is the sampling day [d]. In control reactor R2 the $MLSS$ values were always higher than in reactor R1 (with CPs).

The study presented here was focused over the period of the last 4 weeks of the total reactors' operation time in both reactors; R1 (with CPs) and R2 (control). In this period, the reactors have reached a steady-state as shown in Fig. 2a by the constant slopes of the tendency line of both reactors. It corresponds to 50 days of sludge retention time. Thus, it may be assumed that the biomass was completely adapted to the imposed operating conditions. Therefore, possible differences between the two MBR were only due to the presence of CPs.

3.2. Total protein and total polysaccharide analysis

Study of bioreactor liquor supernatants: to comply PR and PS content with $MLSS$ evolution, all PR and PS values were normalized per g of $MLSS$. The normalized values are presented in Fig. 3. It can be seen that in supernatants, in the presence of CPs (Fig. 3a) the normalized PR and PS concentrations were significantly higher than in control reactor (Fig. 3b) where they remained fairly constant. So it seems that it was CPs presence which induced the increase of soluble PR and PS.

Study of permeates: the permeates analysed for PR and PS content are presented in Fig. 3c and d. Only slight concentrations of these two main EPS components persist in permeates, after membrane filtration.

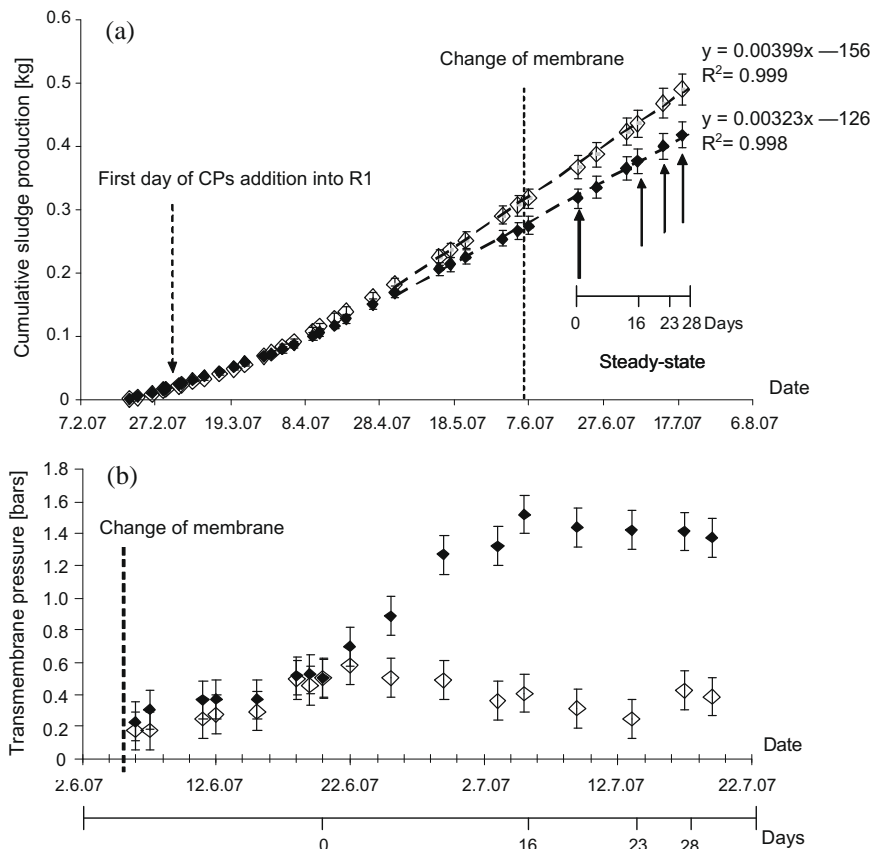


Fig. 2. (a) Evolution of cumulative sludge production against total reactor operation time. (b) Evolution of transmembrane pressure over the steady-state. ♦, R1 (with CPs) and ◇, R2 (control).

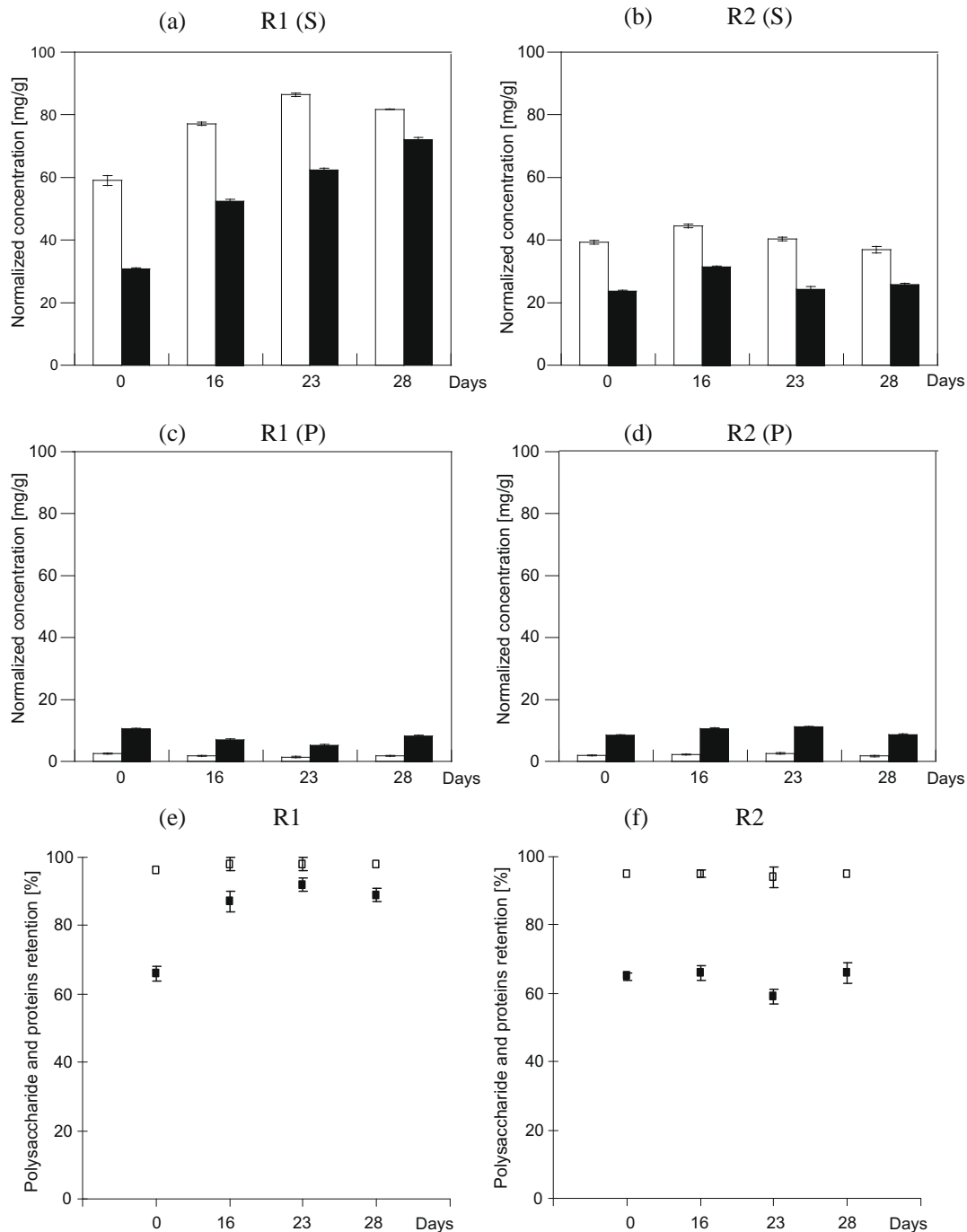


Fig. 3. Evolution over the steady-state running time of: normalized concentrations of polysaccharides (□) and proteins (■) in supernatants (a and b) and in permeates (c and d) in reactors R1 and R2, respectively. Percentage of polysaccharides (□) and of proteins (■) retention by membrane in reactors R1 and R2 (e and f).

3.3. High pressure size exclusion chromatography study

To provide more information about the EPS in both reactors and in all phases the HPSEC analysis was performed. Three types of samples were followed: the supernatants (S), the permeates (P), both directly injected onto the column, and the bound EPS (B) extracted from the sludge before analysis. To observe the influence of CPs on the EPS production by biomass, the chromatograms were normalized per gram of biomass (MLSS values as mentioned above). The area of peaks can be considered in approximation as representative of EPS concentration. This simplified approach (assuming all species having the same detector answer) is unavoidable

because of the outstanding complexity of EPS which contain various polysaccharides and proteins, each with their own different chain lengths and moreover which are involved in molecule associations (Garnier et al., 2005). The chromatograms (Fig. 4) give following information:

- (1) The main effect of the CPs presence on biomass was a significant increase of soluble EPS concentration in supernatants of the R1 reactor (Fig. 4a) while in the control reactor R2 (Fig. 4b), EPS concentration remained constant for the steady-state period. The EPS in supernatants had a wide range of molecular sizes with no predominant size family

(for PR: from 670 KDa to less than 0.9 KDa and for PS: from 404 KDa to less than 0.7 KDa). The addition of CPs in R1 induced an increased concentration of macromolecular compounds with $8 \text{ mL} < V_e < 13 \text{ mL}$ (peak maximum corresponding to PR of about 18 KDa and PS of about 6 KDa). The EPS

concentration increased also in the sludge (bound fraction, Fig. 4e) with CPs presence but to a significantly smaller degree than in supernatants.

(2) All chromatograms of supernatants and bound EPS in both reactors (Fig. 4a, b, e and f) contained high macromolecular

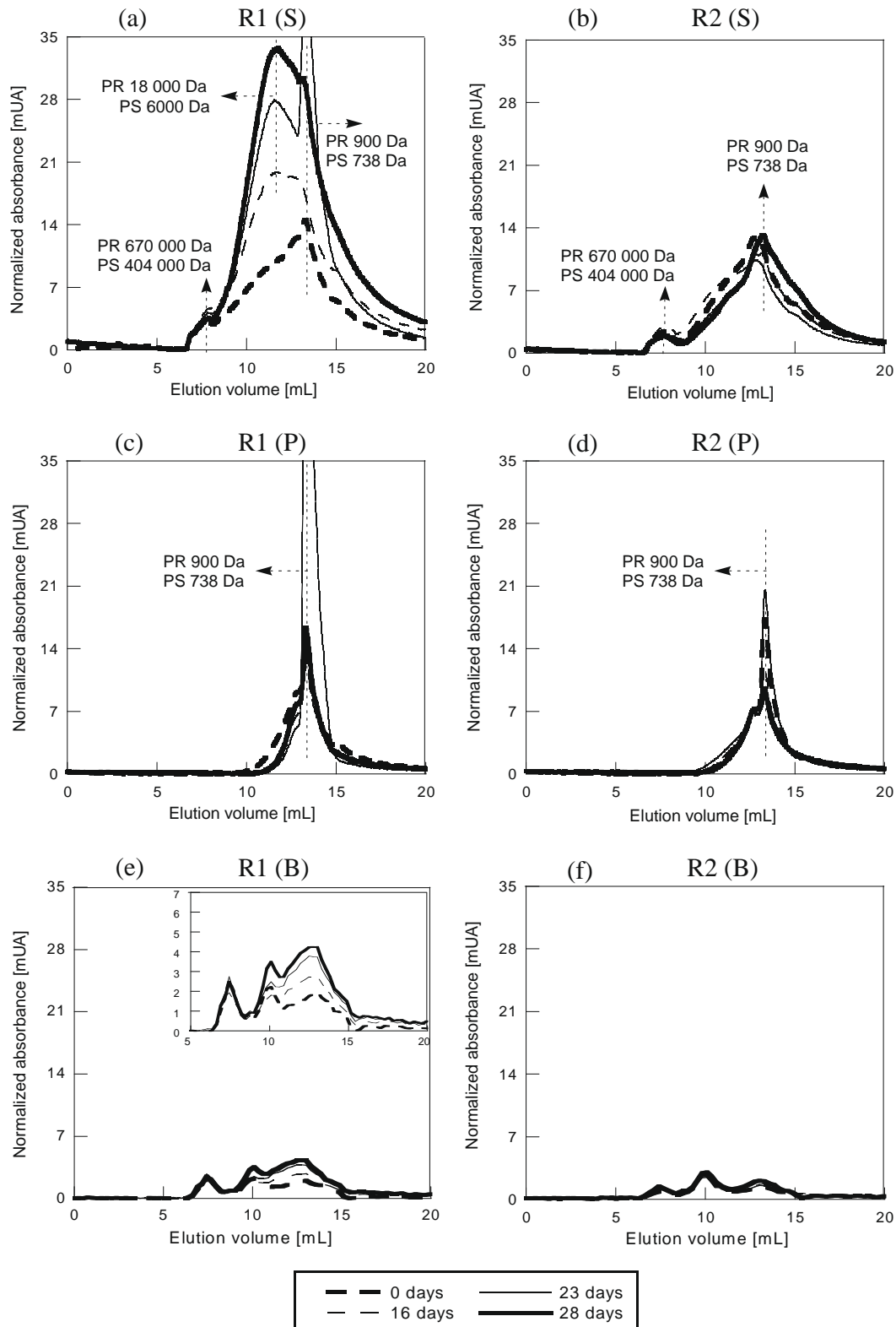


Fig. 4. Normalized chromatograms of soluble EPS present in supernatants (a and b) and in permeates (c and d) and of bound EPS (e and f) in reactors R1 and R2 respectively.

compounds with V_e about 7.5 mL (corresponding to PR of about 670 KDa and PS of 404 KDa). The concentrations of these species remained constant over time regardless of the reactor: this indicates that they were not influenced by the presence of CPs. (A lonely peak in the supernatant R1 (Fig. 4a) on the 23rd day's sampling is an outlier, it was also observed in corresponding permeate Fig. 4c).

- (3) More simple chromatographic profiles were obtained from permeates issued from R1 and R2 (Fig. 4c and d). According to the column calibration, only oligomers molecules smaller than 0.9 KDa for proteins and smaller than about 0.7 KDa for polysaccharides were present in permeates. This shows clearly that the membrane filtration eliminated an important part of the soluble macromolecules in reactor's bulk solutions.

3.4. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

To obtain more chemical information about the EPS present in both reactors, samples were submitted to FTIR analysis. Different components can be identified from their specific infrared profiles and the bands intensity can be related to the amount of compounds.

The most representative samples (according to HPSEC results, Fig. 4) were chosen for FTIR analysis. The corresponding FTIR spectra are presented in Fig. 5.

The supernatant samples from R1 and R2 (Fig. 5a and b), have IR spectra displaying similar features with six characteristic bands at 835, 1067, 1370, 1616, 2934 and 3370 cm^{-1} . The samples from the control reactor R2 do not exhibit any significant variation over time, whereas in the samples from R1, the intensity of the IR bands

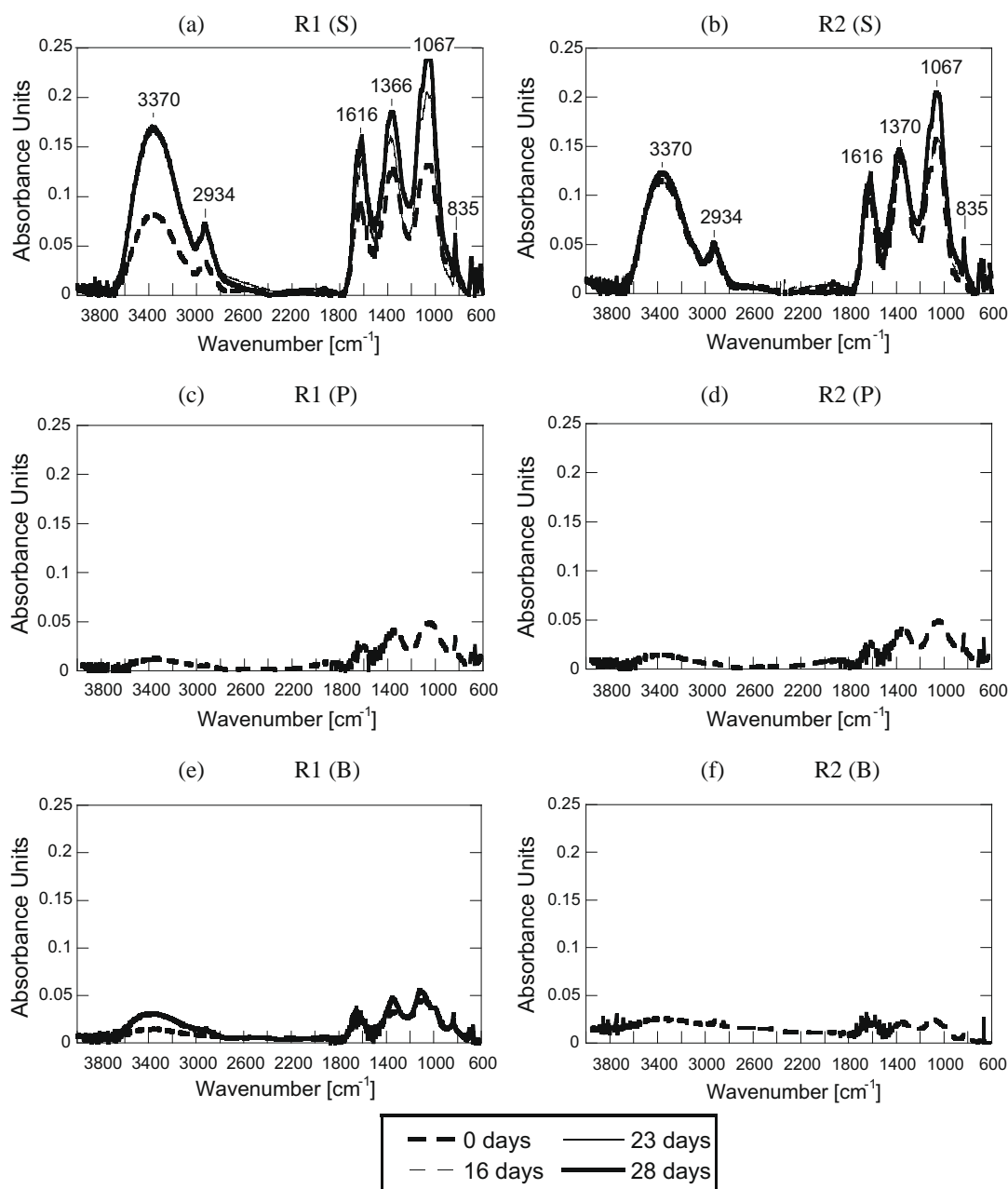


Fig. 5. Evolution of IR spectra of supernatants (a and b), permeates (c and d) and bound EPS (e and f) over time in the reactors R1 and R2 respectively.

increased however with no variation in band positions. The IR spectra revealed that the presence of anticancer drug induced an increase in the concentration of various chemical species however their chemical nature remained unchanged. Spectra corresponding to EPS in permeates and in bound EPS (Fig. 5c–f) display broad infrared bands with a relatively low intensity, therefore they were not submitted to further examination.

The IR profile of supernatants samples reveals the presence of various chemical species. In order to determine which band combinations correspond to a given species, we have analysed the evolution of the band's intensity ratio and the band's area ratio against time. As both methods provided similar results, only the intensity analysis will be presented in this paper. The approach used here was based on the two following assumptions: (i) constant band ratios refer to the same chemical species, (ii) variable ratios refer to bands that do not belong to the same species. This approach can only be applied when a significant evolution in the global infrared

response against time is observed, as was the case for the R1 supernatant samples. Therefore the data from these samples (Fig. 5a) will be treated: Fig. 6 (I) shows, on the left side, the evolution of the intensity ratio of various band combinations against time. Among the six different investigated bands, two groups of bands were identified: the first group is formed by the combination of bands at 3370, 2934 and 1067 cm^{-1} (Fig. 6a), the second group is composed of bands at 1370 and 1616 cm^{-1} (Fig. 6b). These band combinations allow us to build corresponding independent IR profiles (Fig. 6 (I), on the right side) which are representative to the main chemical groups present in the EPS mixture: the first band combination is typical of IR spectra of polysaccharide species (Fig. 6a), the second combination indicates the presence of an amine or amide functions and is likely indicative of protein-type species (Fig. 6b). However, it does not allow the complete identification of the protein-type family, which should exhibit additional IR signals at around 3300 cm^{-1} and at around 1000 cm^{-1} , these

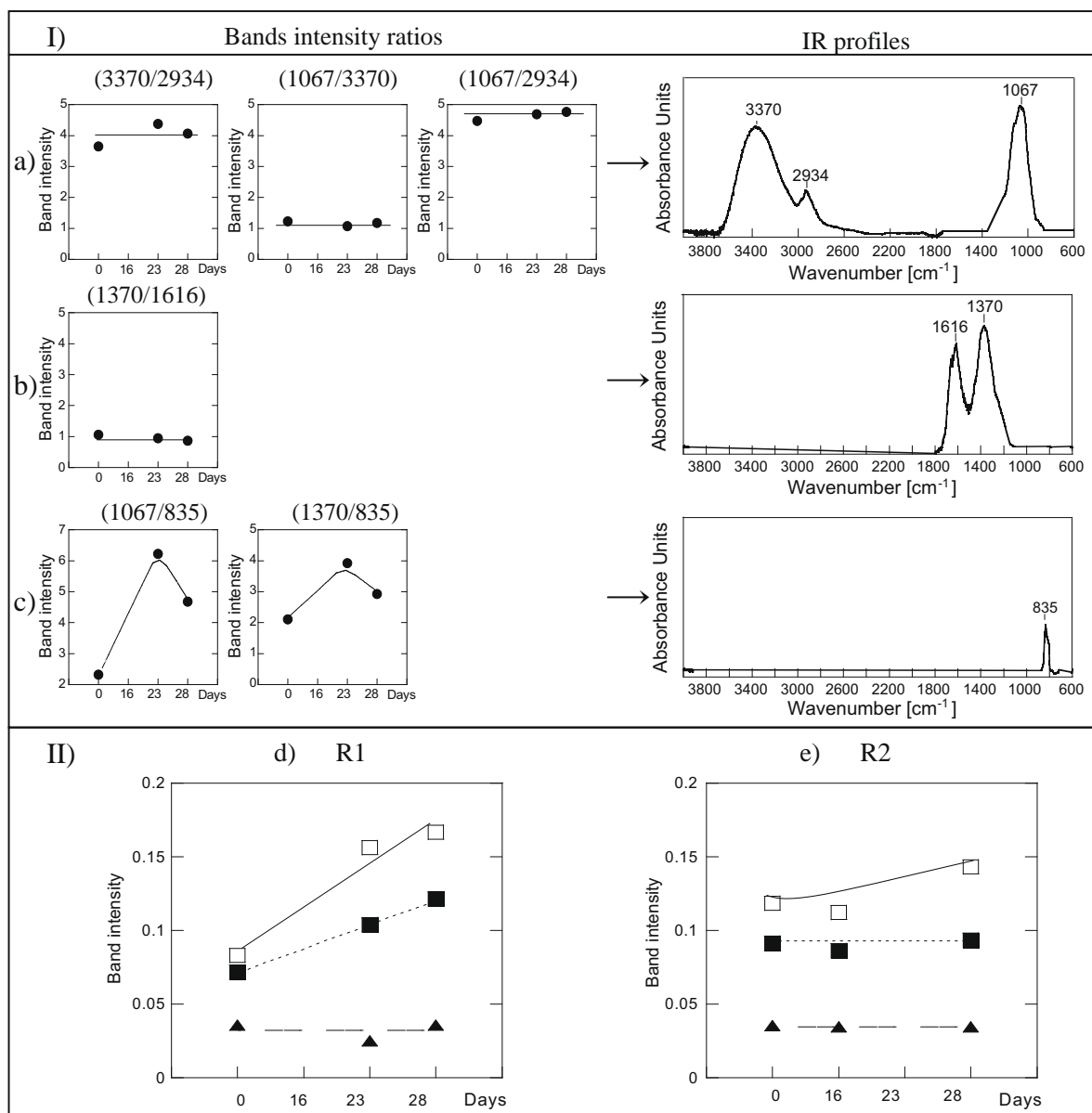


Fig. 6. (I) Determination of the IR profiles of major chemical species present in the R1 supernatant. Band combination and typical IR profile of: (a) polysaccharide, (b) protein-type moieties and (c) inorganic nitrates. (II) Evolution over time of IR bands of polysaccharide (\square), amine/amide (\blacksquare) and nitrate (\blacktriangle) species in the supernatant of reactor R1 and R2 (d and e).

signals are masked in our samples by dominant polysaccharides. Indeed, band intensity ratio analysis is not able to assign the minority contributions to a given IR profile. The band at 835 cm^{-1} was not involved in any combination, it characterizes inorganic nitrate groups (Fig. 6c).

Once the various species were identified, it was possible to follow their evolution over time referring to their characteristic bands. Polysaccharides were followed by the intensity of their signal at 1067 cm^{-1} , proteins at 1616 cm^{-1} and nitrate evolution was related to the band at 835 cm^{-1} . In the control reactor (Fig. 6e), PR band intensity remained constant over time and only a slight increase in polysaccharide intensity was observed. In contrast, PR and PS species significantly increased in the reactor with CPs (Fig. 6d) and PS increment seems to be more important. In both reactors the nitrate band intensity was constant.

The FTIR approach confirmed the significant increase of PR and PS species in bulk solution in the reactor with CPs presence as previously seen by UV–Vis analysis. Moreover, it showed that the CPs presence did not seem to induce any chemical changes in soluble species.

4. Discussion

The chromatographic and UV–Vis analysis showed that CPs presence induced an increased formation especially of soluble macromolecular EPS with their main components PR and PS. It is known that biomass generates microbial intra or extra cellular components that participate in the formation of aggregates, and EPS in the bulk solution due to cell renewal, cell lysis or deliberate excretion for some purposes (Lapidou and Rittmann, 2002). Aquino and Stuckey (2004) observed an increased concentration of soluble EPS with a high molecular size in anaerobic chemostat in the presence of toxicants (chloroform or chromium). Hydrolysis did not seem to contribute to EPS accumulation and they suggested that EPS were produced by bacteria to cope with stress. In our case all observations argue for similar phenomenon. HPSEC showed that high macromolecular PR and PS (M.W.: 670 KDa and 404 KDa, respectively) were almost identical in both reactors; they were present in supernatants and in bound fraction. Their concentration did not change over reactor running time. Moreover, no significant increase in oligomers compounds appeared in CPs reactor. This suggests that EPS hydrolysis cannot be the principal factor responsible for the increase of macromolecular PR and PS species of 18 KDa and 6 KDa, respectively, in bulk solution. It was reported (Bott and Love, 2002) that bacterial stress response mechanism called K^+ efflux is a significant contribution to the deflocculation. In our case the floc volumetric diameters were not at all diminished (Delgado, 2009) in reactor with pharmaceuticals, they were identical or sometimes higher than in control reactor. Thus in reactor with pharmaceutical, the increased amount of soluble EPS, in relation to control MBR, can not be attributed to the floc disintegration and to the subsequent EPS material release. As both reactors had identical operating conditions except the presence of CPs, it was likely that bacteria produced EPS for better survival in hostile environment. Henriques and Love (2007) found that the EPS matrix inside sludge flocs was a protective barrier for bacteria exposed to chemicals toxins octanol and cadmium.

Our results corroborate the Aquino and Stuckey (2004) study on soluble microbial products (SMP) in bioreactor spiked with chloroform or chromium: they observed enhanced soluble microbial production, composed mainly of PR and PS and no change in SMP composition in toxin's presence. They suggested that some SMP might be deliberately excreted by micro-organisms in cell to cell communication (quorum sensing). It is now established that the quorum sensing influences the biofilm development or aggregates

dispersion (Parsek and Greenberg, 2005) regulating the excretion of PS or PR for biomass survival. It was found that bacteria are a thousand times more resistant to antibiotics in a biofilm than in liquid suspension (Everst, 2006).

The application of MBR technology in wastewater treatment for removal of CPs was previously studied by Delgado (2009). Under steady-state conditions, CPs removal remained quite stable (75–80%) and COD and total nitrogen removal efficiency were not altered by the toxicity of the anticancer drug. However, CPs presence induced a modification of biological suspended solids. The modifications in the biomass and in the bulk solution appeared to influence the membrane performance. In our study, membrane performance was followed by measuring transmembrane pressure (TMP) illustrated in Fig. 2b. It was observed that TMP in R1 (with CPs), increased 3 times more than in the control reactor and the fouling dynamics were faster.

Previous studies have identified the extracellular polymeric substances (EPS) or soluble microbial products (SMP) as one of the most significant factors responsible for membrane fouling (Drews et al., 2006; Janga et al., 2007; Judd, 2008; Le-Clech et al., 2006; Meng et al., 2009) and for membrane deterioration (Tansel et al., 2006). Furthermore, many investigations have been done about the role of PR or PS in membrane fouling mechanisms. However in some cases, the cake resistance was found to be strongly related to PR content in the supernatant (Meng et al., 2006), or to PS having inherent fouling potential (Drews et al., 2006; Rosenberger et al., 2006) or to PR/PS ratio (Arabi and Nakhla, 2008). Indeed, it seems that PR have an important role in synergistic effects PR–PS and the trend towards fouling (Susanto et al., 2008). In our study, membrane filtration efficiently eliminated PS and PR: in control reactor R2 up to 95% of PS and up to 68% of PR (Fig. 3f). In R1 (with CPs), where an increased amount of EPS was presented, PS were retained up to 98% and PR up to 92%, as shown in Fig. 3e. Indeed, the accumulation of EPS in the MBR sludge mixture would facilitate the formation of an EPS fouling gel layer on the membrane surface and eventually pore narrowing/blocking, thus potentially causing a serious fouling problem, as observed in reactor with CPs.

5. Conclusion

Our experiments showed that cyclophosphamide and its mean metabolites in the studied concentrations range influenced the biomass copolymer production. All methods applied for EPS studies (HPSEC, FTIR and UV–Vis) showed clearly that cyclophosphamide presence induced an increase in soluble EPS (mainly proteins of about 18 KDa and polysaccharides of about 6 KDa) in bulk solution and to a much lower degree in EPS bound in the sludge. The increase of these macromolecular species may be attributed to a protection mechanism. Their retention by the membrane was very efficient and was most likely related to the more important membrane fouling of reactor with cyclophosphamide.

References

- APHA – American Public Health Association, AWWA – American Water Works Association, WEF – Water Environment Federation, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. Washington, DC, USA.
- Aquino, S.F., Stuckey, D.C., 2004. Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research* 38 (2), 255–266.
- Arabi, S., Nakhla, G., 2008. Impact of protein/carbohydrate ratio in the feed wastewater on the membrane fouling in membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science* 324 (1–2), 142–150.
- Bernhard, M., Müller, J., Knepper, T.H., 2006. Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. *Water Research* 40 (18), 3419–3428.
- Bott, C., Love, N., 2002. Investigating a mechanistic cause for activated sludge deflocculation in response to shock loads of toxic electrophilic chemicals. *Water Environment Research* 74 (3), 306–315.

- Delgado, L.F., 2009. Bioréacteur à membrane externe pour le traitement d'effluents contenant des médicaments anticancéreux: élimination et influence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur le procédé. PhD thesis, INP Toulouse, France.
- Drews, A., Vocks, M., Iversen, V., Lesjean, B., Kraume, M., 2006. Influence of unsteady membrane bioreactor operation on EPS formation and filtration resistance. *Desalination* 192 (1–3), 1–9.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3), 350–356.
- Everst, S., 2006. Bacterial Conversations. C&EN, Washington, October 23, pp. 17–26. <<http://www.CEN-online.org>>.
- Finlayson, J.C., Liao, B., Droppo, T.G., Leppard, G.G., Liss, S.N., 1998. The relationship between the structure of activated sludge flocs and the sorption of hydrophobic pollutants. *Water Science and Technology* 37 (4–5), 353–357.
- Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 30 (8), 1749–1758.
- Garnier, Ch., Görner, T., Lartiges, B., Abdelouhab, S., de Donato, Ph., 2005. Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: a combined size-exclusion chromatography and infrared microspectroscopy study. *Water Research* 39 (13), 3044–3054.
- Henriques, I.D.S., Love, N.G., 2007. The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins. *Water Research* 41 (18), 4177–4185.
- Janga, N., Ren, X., Kim, G., Ahn, Ch., Cho, J., Kim, I.S., 2007. Characteristics of soluble microbial products and extracellular polymeric substances in the membrane bioreactor for water reuse. *Desalination* 202 (1–3), 90–98.
- Joqueviel, C., Martino, R., Gilard, V., Malet-Martino, M., Canal, P., Niemeyer, U., 1998. Urinary excretion of cyclophosphamide in humans, determined by phosphorus-31 nuclear magnetic resonant spectroscopy. *Drug Metabolism and Disposition* 26 (5), 418–428.
- Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., McArdell, C.S., Ternes, T.A., Thomsen, A., Siegrist, H., 2006. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing of classification scheme. *Water Research* 40 (8), 1686–1696.
- Judd, S., 2008. The status of membrane bioreactor technology. *Trends in Biotechnology* 40 (2), 109–116.
- Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere* 45 (6–7), 957–969.
- Lapidou, Ch.S., Rittmann, B.E., 2002. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research* 36 (11), 2711–2720.
- Le-Clech, P., Chen, V., Fane, T.A.G., 2006. Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Review. Journal of Membrane Science* 284 (1–2), 17–53.
- Lenz, K., Koellensperger, G., Hann, S., Weissenbacher, N., Mahnik, S.N., Fuehracker, M., 2007. Fate of cancerostatic platinum compounds in biological wastewater treatment of hospital effluents. *Chemosphere* 69 (11), 1765–1774.
- Liu, Yan, Fang, Herbert H.P., 2003. Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling and dewatering of activated sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 33 (3), 237–273.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin–Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Meng, F., Zhang, H., Yang, F., Zhang, S., Li, Y., Zhang, X., 2006. Identification of activated sludge properties affecting membrane fouling in submerged membrane bioreactors. *Separation and Purification Technology* 51 (1), 95–103.
- Meng, F., Chae, S.-R., Drews, A., Kraume, M., Shin, H.-S., Yang, F., 2009. Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material. *Water Research* 43 (6), 1489–1512.
- Nuengjamong, Ch., Kweon, J.H., Cho, J., Polprasert, Ch., Ahn, K.-H., 2005. Membrane fouling caused by extracellular polymeric substances during microfiltration processes. *Desalination* 179 (1–3), 117–124.
- Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology* 13 (1), 27–33.
- Rosenberger, S., Laabs, C., Lesjean, B., Gnirss, R., Amy, G., Jekel, M., Schrotter, J.C., 2006. Impact of colloidal and soluble organic material on membrane performance in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Water Research* 40 (4), 710–720.
- Steger-Hartmann, T., Kümmerer, K., Hartmann, A., 1997. Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36 (2), 174–179.
- Susanto, H., Arafat, H., Janssen, E.M.L., Ulbricht, M., 2008. Ultrafiltration of polysaccharide-protein mixtures: elucidation of fouling mechanisms and fouling control by membrane surface modification. *Separation and Purification Technology* 63 (3), 558–565.
- Tansel, B., Sager, J., Garland, J., Xu, S., Levine, L., Bisbee, P., 2006. Deposition of extracellular polymeric substances (EPS) and microtopographical changes on membrane surfaces during intermittent filtration conditions. *Journal of Membrane Science* 285 (1–2), 225–231.
- Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A., Hirata, A., 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters* 223 (2), 287–292.
- Urase, T., Kikuta, T., 2005. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Research* 39 (7), 1289–1300.
- Weiss, S., Reemtsma, T., 2008. Membrane bioreactors for municipal wastewater treatment – a viable option to reduce the amount of polar pollutants discharged into surface waters? *Water Research* 42 (14), 3837–3847.
- Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. (Eds.), 1999. *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer, Heidelberg.

III.2.2.2. Campagne expérimentale II (période d'acclimatation de 107 j)

La période d'acclimatation de boues permet aux boues de s'adapter aux conditions opératoires des réacteurs. D'autre part, dans les bioréacteurs à membrane, l'âge des boues est un paramètre fondamental qui détermine la diversité biologique des boues. Les bioréacteurs à membrane opèrent généralement à des âges de boues élevés, ce qui permet l'implantation de microorganismes à croissance lente. Deux campagnes d'expériences ont été réalisées afin d'établir d'une part, les différences du comportement bactérien entre boues des caractéristiques différentes déterminées principalement par la période d'acclimatation et l'âge de boue ; et d'autre part, d'estimer l'effet de l'agent anticancéreux sur les boues. Le même cocktail pharmaceutique (composition et concentration) a été utilisé lors des deux campagnes. La concentration du cocktail simule la concentration du cyclophosphamide et ses principaux métabolites dans les urines humaines. Le cocktail est constitué du cyclophosphamide et de ces métabolites générés lors de l'ingestion humaine de 5 µg/L de cyclophosphamide.

Deux réacteurs fonctionnant en parallèle sont étudiés, un réacteur contient la molécule anticancéreuse et ses métabolites (R1), et l'autre réacteur sans les molécules pharmaceutiques sert de contrôle (R2). Dans les bioréacteurs à membrane, la variation de la vitesse tangentielle est une stratégie pour lutter contre le colmatage des membranes. En tenant compte du colmatage des membranes présenté lors de la première campagne à une vitesse tangentielle de 4 m/s, la vitesse tangentielle de démarrage de cette deuxième campagne a été fixée à 5 m/s (se référer à Delgado (2009) pour plus de détails). La durée totale de l'expérience est de 223 jours dont 107 jours de stabilisation sans l'ajout du cocktail pharmaceutique. A partir du jour 108, l'ajout du cocktail a été réalisé de manière continue. L'analyse des EPS correspond à la période d'opération des réacteurs en présence du cocktail pharmaceutique.

L'activité bactérienne est suivie à travers la caractérisation des substances polymériques dans tous les « compartiments » du réacteur : dans la liqueur mixte du réacteur (dans le surnageant et dans les boues centrifugées) ainsi que dans le perméat. L'évolution des substances polymériques est présentée par les chromatogrammes de la figure III.5. Les chromatogrammes, en 3 D, décrivent : la concentration des substances polymériques en absorbance (axe z), la répartition des tailles des molécules en volume d'élution (axe y) et l'évolution dans le temps (axe x). Les différentes couleurs, données en fonction de l'intensité de l'absorbance des espèces dans les chromatogrammes, permettent de mieux visualiser les variations de concentration des espèces (l'intensité de l'absorbance est associée à la

concentration). Les faibles concentrations sont illustrées en couleurs atténuées (gris), par contre, les concentrations élevées des molécules sont présentées en couleurs plus accentuées (rouge). Les résultats sont organisés en deux colonnes, chaque colonne étant relative à un réacteur. L'organisation en lignes permet de distinguer chaque « compartiment » analysé.

Etude des surnageants: On peut observer (figure III.5 (a et b)) que la concentration des substances solubles traduite par la surface des chromatogrammes est faible dans les deux bioréacteurs hormis les trois derniers prélèvements du réacteur témoin (les jours 204, 209 et 223). Les substances polymériques solubles contenues dans les surnageants sont constituées principalement par : (i) un groupe des molécules de grande taille ayant un volume d'élution (V_e) d'environ 7,5 mL (protéines > 670 KDa et polysaccharides ~ 400 KDa), et (ii) des molécules des petites tailles ayant un V_e maximum d'environ 13 mL (protéines < 17 KDa et polysaccharides < 0,7 KDa).

Etude des perméats: Les profils chromatographiques des perméats (figure III.5 (c et d)) sont simples et constitués uniquement par une seule famille de composés de petites tailles (V_e maximum d'environ 14 mL (protéines < 5 KDa et polysaccharides < 0,2 KDa)). Ceci est parfaitement normal, la membrane a effectué son rôle de filtration. La concentration des composés dans les perméats est assez constante le long de l'expérience, à l'exception des 3 dernières dates de prélèvements du réacteur témoin, ce qui a également été observé dans les surnageants.

Etude des EPS liés dans les boues: La distribution des tailles des constituants des EPS dans les boues est assez complexe avec trois familles majoritaires des molécules: molécules de grandes tailles, des moyennes tailles et des petites tailles. Les molécules de grandes tailles avec un V_e de 7 mL correspondent aux masses molaires de protéines > 670 KDa et polysaccharides ~ 788 KDa. Ensuite, les molécules de moyennes tailles avec un V_e de 11 mL correspondent aux protéines ~ 40 KDa et polysaccharides ~ 11 KDa. Enfin, les molécules avec un V_e > 14 mL sont des oligomères (protéines < 5 KDa et polysaccharides < 0,7 KDa). D'autres molécules ne suivant pas la séparation stérique dans la colonne chromatographique peuvent se retrouver sur la dernière fraction des molécules éluées (V_e > 16 mL).

On peut observer une concentration relativement constante des EPS liés dans le réacteur témoin, tandis qu'en présence du cocktail pharmaceutique, la concentration des EPS liés croit jusqu'à un maximum atteint le 157^{ème} jour. On constate une diminution de la quantité des

EPS pour le jour 190 et ensuite une légère augmentation de la concentration des EPS est reprise.

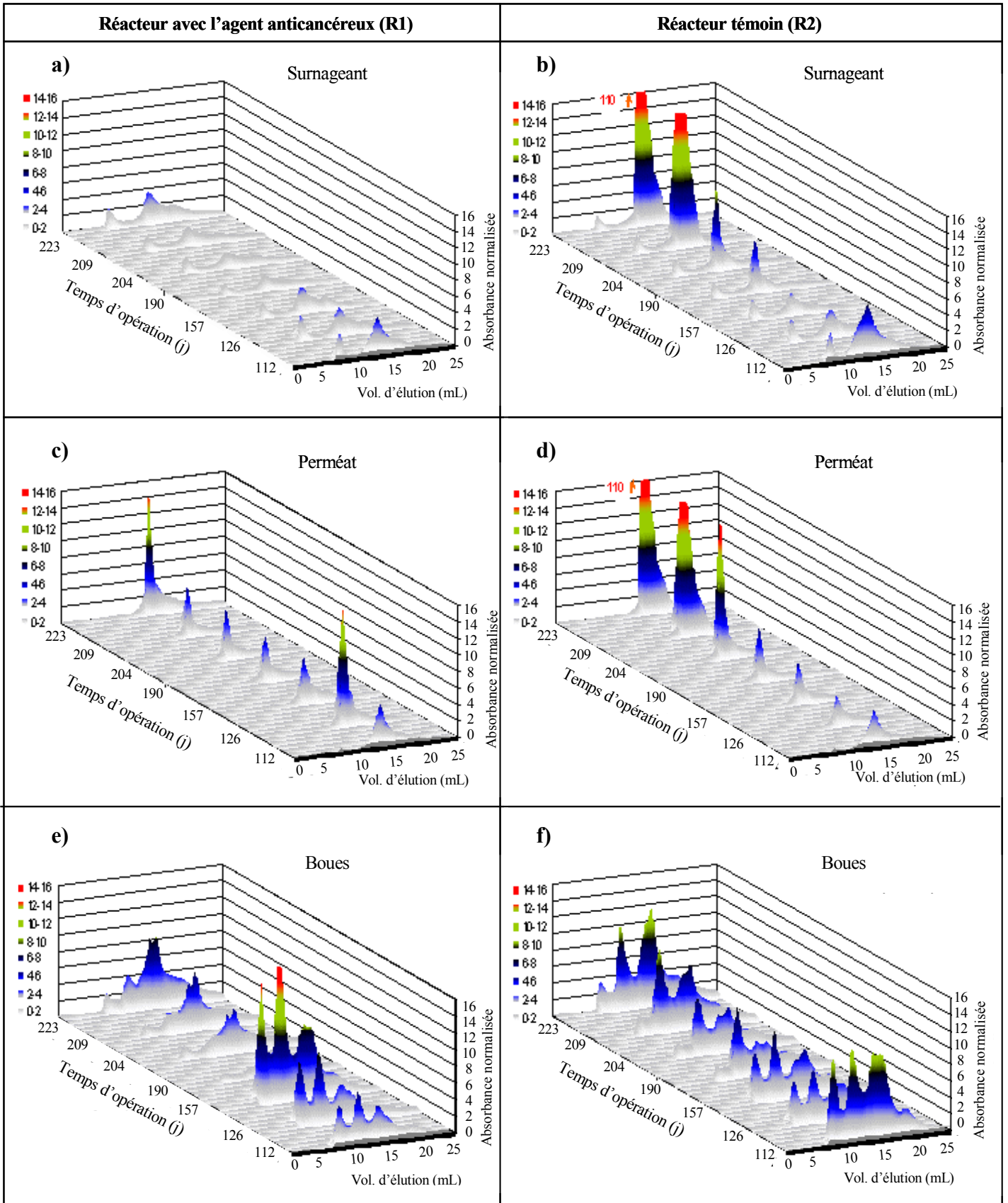


Figure III. 5. Profils chromatographiques des surnageants, perméats et EPS liés dans les boues présents dans le réacteur avec l'agent anticancéreux et le réacteur témoin.

Ces résultats montrent que :

- La formation des EPS liés dans les boues est provoquée par la présence de l'agent anticancéreux car dans le réacteur témoin aucune variation significative n'est présentée (figure III.5 (e et f)).
- Les boues retiennent bien leur matériel interne puisque une augmentation de la concentration d'EPS liés dans les boues n'induit pas d'augmentation sur la quantité des espèces dans la phase liquide (figure III.5 (e et a)).
- La diminution drastique, le jour 190 (figure III.5 e), de la quantité d'EPS liés dans les boues, semblerait être due à une consommation des EPS et non pas à un relargage des espèces vers la phase liquide. En effet, la concentration des substances solubles reste constante dans le temps. L'origine de la diminution d'EPS n'a pas pu être identifiée dans cette étude. Cependant, dans la littérature, ce comportement a été décrit dans des conditions de famine microbienne (manque de nutriments facilement biodégradables) (Wolfaardt G. et al., 1999). Ce jour 190, les chromatogrammes (figure III.5 (e et f)) montrent une disparition des molécules de grandes tailles dans les deux réacteurs (en présence et en absence du cocktail pharmaceutique). Ceci nous amène à penser qu'un phénomène non-identifié lié à la conduite de deux bioréacteurs aurait pu avoir lieu.
- L'augmentation extraordinaire de la concentration d'espèces dans le surnageant du réacteur témoin, trois derniers prélèvements (figure III.5 b), est visible aussi dans les perméats. Il s'agit des molécules de petites tailles qui traversent la membrane. Pour expliquer cette augmentation, les conditions opératoires des réacteurs nécessitent d'être analysées, ce qui sera abordé dans la partie discussion.

III.2.2.3. Discussion

Les deux campagnes expérimentales montrent des analogies et des différences en termes de comportement de la biomasse étudiée à travers la production des EPS.

Les analogies sont les suivantes :

- 1) La présence du cocktail pharmaceutique induit l'augmentation de la concentration des EPS liés dans les boues (pour la campagne I, figure 4e (page 123) et pour la campagne II, figure III.5e), tandis qu'en absence de CPs, la concentration des EPS liés reste stable dans le temps (pour la campagne I, figure 4f (page 123) et pour la campagne II, figure III.5f).

Dans les deux campagnes, le mécanisme de protection bactérienne s'est développé en présence du cocktail pharmaceutique. Les bactéries produisant des EPS dans les boues s'enveloppent dans une matrice plus épaisse pour se protéger et pour atténuer l'action nuisible de l'agent anticancéreux à l'intérieur des agrégats biologiques.

- 2) En présence ou en absence du médicament, tous les perméats sont constitués uniquement de molécules de petites tailles (pour la campagne I, figure 4c et 4d (page 123) et pour la campagne II, figure III.5c et III.5d)). Ceci est dû à la filtration par la membrane de la liqueur mixte. Les membranes retiennent efficacement des macromolécules volumineuses.
- 3) La répartition molaire des EPS liés dans les boues est polydisperse avec des molécules d'une grande gamme de masses molaires. On retrouve des molécules de grandes, des moyennes et des petites tailles (figure 4e et 4f (page 123) et figure III.5e et III.5f)).

Les différences rencontrées entre les deux campagnes sont :

- 1) Dans la campagne II (boues bien acclimatées et âgées de 70 j), la concentration des substances polymériques dans les surnageants est minime par rapport à la concentration des EPS liés (figure III.5). Au contraire, dans la campagne I (boues peu acclimatées et âgées de 50 j), la concentration des substances solubles a été largement supérieure à celle des EPS liés dans les boues (figure 4, page 123).
- 2) Lors de la I^{ère} campagne (boues peu acclimatées et relativement jeunes) en présence du cocktail pharmaceutique, l'augmentation de la concentration des EPS liés a induit en même temps une augmentation de la quantité des substances solubles. Par contre, les boues mieux acclimatées et âgées de 70 j (II^{ème} campagne), se comportent différemment, la concentration des substances solubles dans les surnageants reste constante bien que la concentration des EPS liés dans les boues augmente dans le temps.

Le comportement distinct des boues dans les deux campagnes a été aussi observé lors du colmatage des membranes. L'étude du colmatage des membranes a été réalisée dans le cadre de la thèse de Delgado (2009). Nous présentons ici, une partie des mesures effectuées par Delgado afin de corrélérer les paramètres opératoires des réacteurs avec le comportement bactérien. Ces corrélations nous ont permis d'expliquer en partie les phénomènes de colmatage des membranes ainsi que la réponse bactérienne à la présence du composé

anticancéreux. La figure III.6 présente le suivi de la pression transmembranaire lors de deux campagnes.

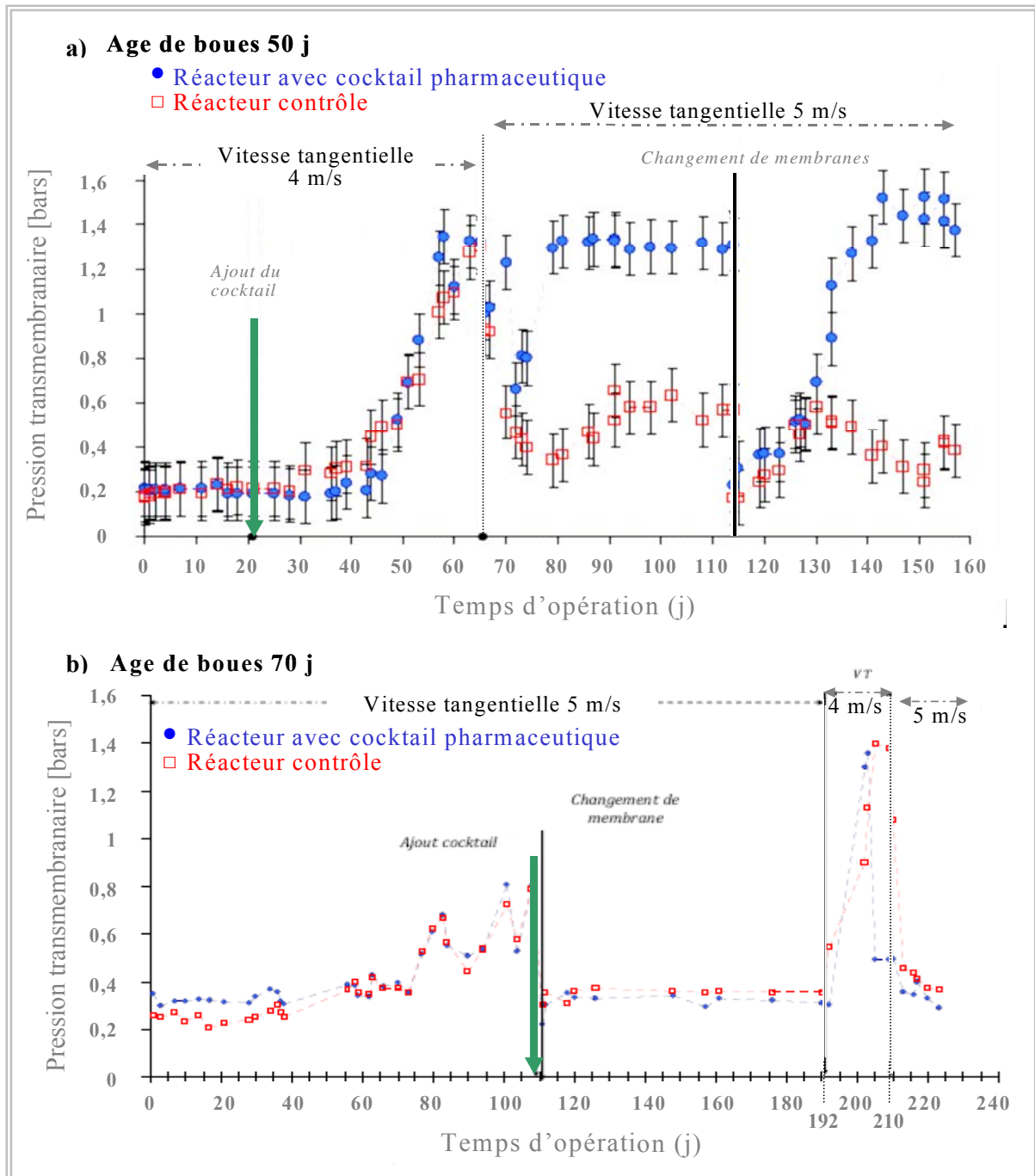


Figure III.6. Evolution dans le temps de la pression transmembranaire des bioréacteurs pour les deux campagnes d'expériences [Repris de Delgado (2009)].

Les boues de la campagne I (figure III.6a) soumises à une vitesse tangentielle de 4 m/s, ont montré le même comportement dans le bioréacteur avec le cocktail pharmaceutique que dans le bioréacteur contrôle. La pression transmembranaire a subi la même augmentation,

dans les deux bioréacteurs, jusqu'au colmatage des membranes. L'élévation de la vitesse tangentielle à 5 m/s, a tout d'abord, provoqué le détachement du matériel fixé aux membranes avec la diminution instantanée de la pression transmembranaire. Ensuite, les deux bioréacteurs ont montré un comportement distinct : celui avec le cocktail pharmaceutique a présenté une pression transmembranaire qui augmente jusqu'au colmatage des membranes, tandis que dans le réacteur contrôle, la pression transmembranaire est restée basse et le colmatage des membranes n'a pas eu lieu. Ce phénomène se répète après le changement des membranes. En effet, l'étude des EPS par chromatographie a révélé l'augmentation de la concentration des EPS en présence de l'agent anticancéreux. Cette augmentation a été associée avec un mécanisme de protection bactérienne face à la présence des composés pharmaceutiques. L'augmentation de la concentration des EPS liés dans les boues en fonction du temps (figure 4e (page 123)), a été corrélée avec l'augmentation des substances solubles (figure 4a (page 123)). Les flocs sensibles à la contrainte de cisaillement élevée (vitesse tang. de 5 m/s) ont libéré une partie de leur matériel vers la liqueur mixte. Ceci a induit l'augmentation de la concentration des substances solubles dans la liqueur mixte et a provoqué l'élévation de la pression transmembranaire contribuant ensuite au colmatage de la membrane du réacteur avec le cocktail pharmaceutique.

La deuxième campagne (boues acclimatées de 107 j et âgées de 70 j, figure III.6b) a débuté à une vitesse tangentielle de 5 m/s pour éviter le colmatage des membranes. Sous ces conditions, la pression transmembranaire est restée pratiquement identique dans les deux bioréacteurs (en présence et en absence de l'agent anticancéreux). Ceci indique l'absence du colmatage des membranes en présence du cocktail pharmaceutique. La diminution de la vitesse tangentielle à 4 m/s (changement sur les conditions hydrodynamiques) a généré l'augmentation de la pression transmembranaire. Une fois la vitesse tangentielle remise à 5 m/s, le matériel provoquant le colmatage s'est détaché et la pression transmembranaire a diminué. Les deux bioréacteurs ont présenté le même comportement en terme de colmatage des membranes, néanmoins, les analyses d'EPS ont montré que l'activité bactérienne était différente dans les deux bioréacteurs. En présence de l'agent anticancéreux, nous avons constaté une augmentation de la concentration des EPS liés dans les boues en fonction du temps d'opération (figure III.5e) tandis que dans le réacteur témoin, la quantité des EPS liés dans les boues a été stable dans le temps (figure III.5f). En présence du cocktail pharmaceutique, les EPS liés dans les boues se sont montrés fermement retenus dans la structure des boues sans être relargés vers la phase liquide. En raison de la stabilité de la

concentration des substances solubles (figure III.5a), la pression transmembranaire est restée aussi stable. Les bactéries continuent à produire des EPS dans les boues face au stress mais les floccs semblent très résistants aux contraintes de cisaillement. De ce fait, moins de matériel agrégé dans les floccs est libéré vers la liqueur mixte.

Delgado (2009) a montré que les floccs en présence du cocktail pharmaceutique, lors de la deuxième campagne, présentent systématiquement un diamètre moyen légèrement supérieur ($23 \pm 2 \mu\text{m}$) que ceux du réacteur contrôle ($18 \pm 2 \mu\text{m}$). En microscopie confocale, les floccs en présence du cocktail pharmaceutique se montrent mieux agglomérés avec des agrégats plus denses et plus compacts (figure III.7a) que ceux du réacteur contrôle (figure III.7b), (se référer à Delgado (2009) pour plus de détails). Ceci expliquerait la robustesse des boues en présence du cocktail pharmaceutique, face aux changements hydrodynamiques (variation de la vitesse tangentielle). En effet, un changement de la vitesse tangentielle de 5 à 4 m/s semble avoir détérioré l'agrégation des boues seulement dans le réacteur contrôle avec la libération des molécules de petites tailles vers la phase liquide (analyse chromatographique, figure III.5b). Tandis que dans le réacteur avec le cocktail pharmaceutique, aucune altération de la concentration de substances solubles n'a été observée, ceci a montré une résistance supérieure des floccs au cisaillement.

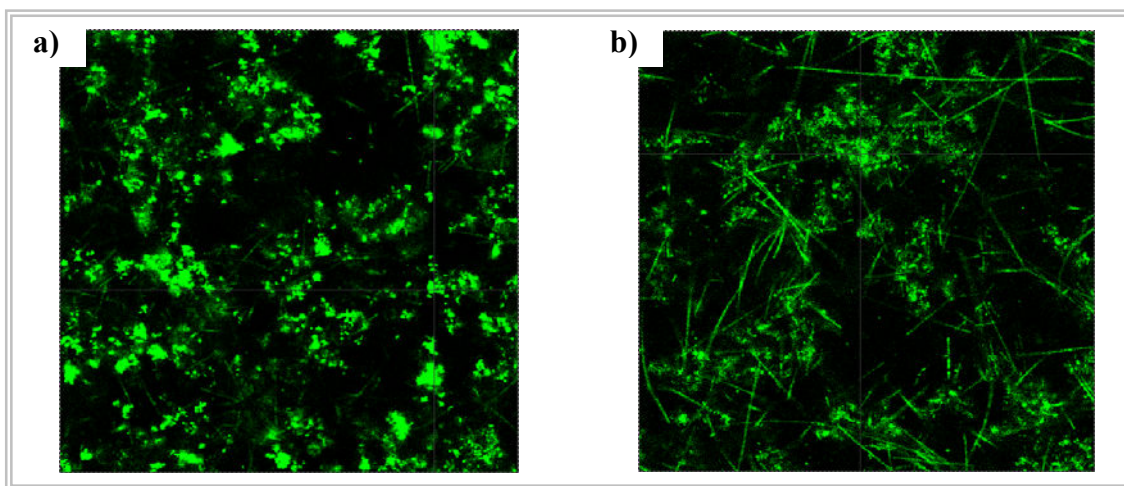


Figure III.7. Photographie de floccs ($186 \mu\text{m} \times 186 \mu\text{m}$) en microscopie confocale: a) bioréacteur avec le cocktail pharmaceutique, et b) bioréacteur contrôle. [Source : Delgado, 2009].

Les deux campagnes (boues peu acclimatées et jeunes, et boues mieux acclimatées et plus âgées) montrent des différences en terme d'agrégation des floccs. Les boues peu acclimatées et jeunes (campagne I) se montrent sensibles aux contraintes de cisaillement (vitesse tang. de 4 m/s) tandis que les boues mieux acclimatées et plus âgées (campagne II) ne se désagrègent pas à une contrainte de cisaillement supérieure (vitesse tang. de 5 m/s). Pour

mieux comprendre ces différences, examinons les conditions opératoires des réacteurs dans les deux campagnes. Le tableau III.1 présente un résumé des principaux paramètres maintenus dans les réacteurs pour chacune des campagnes [source : Delgado, 2009].

Tableau III.1. Paramètres opérationnels lors des deux campagnes expérimentales [source: Delgado, 2009]

Paramètre	Campagne I	Campagne II
Âge de boue (J)	50	70
Durée totale	160 jours	223 jours
DCO totale à l'entrée (mg/L)	2609 ± 512	1774.7 ± 629.6
Vitesse tangentielle le long de la membrane (démarrage)	4 m/s	5 m/s
Ajout du cocktail	Dès jour 21	Dès jour 108
Temps de séjour hydraulique (h)	48	32

Durant la deuxième campagne, une période d'adaptation de 107 j (sans la présence du cocktail) a été significativement plus longue comparée à la période d'adaptation de 20 jours pour la 1^{er} campagne. Ce temps d'adaptation plus important lors de la II^{ème} campagne, a permis à un consortium bactérien très riche de s'adapter pendant une durée plus importante aux contraintes de cisaillement élevées (vitesse tang. 5 m/s) avant d'être exposé à la présence du cocktail pharmaceutique. Pour des boues jeunes (50 j) de la campagne I et à des conditions de cisaillement plus douces (vitesse tang. 4 m/s), le consortium bactérien a été exposé relativement tôt au stress du cocktail pharmaceutique. Ces deux aspects, le temps d'adaptation de la boue et la richesse du consortium bactérien (déterminée par l'âge de boues), semblent avoir une importance remarquable sur la formation de boues et sur les caractéristiques de résistance des boues aux contraintes de cisaillement. Bien que d'autres paramètres, tels que la DCO à l'entrée et le temps de séjour hydraulique, aient également varié entre les deux campagnes, ils ne semblent pas expliquer le comportement différent des boues entre les deux expériences.

CONCLUSION

Les deux campagnes d'expériences réalisées sur des réacteurs à membrane ont permis de comparer le comportement des boues de caractéristiques différentes. La période d'acclimatation des boues et le temps de séjour des boues (âge de boues) étaient différents pour chaque campagne. Une courte période d'acclimatation (20 j) des boues âgées de 50 j, ont généré des boues fragilisées vis-à-vis des contraintes de cisaillement dans les réacteurs. Cela a induit une libération d'une partie des EPS liés dans le floc vers la phase soluble. Par contre les floccs des boues bien acclimatées pendant 107 j et âgées de 70 j étaient très robustes, ils ne se sont pas désagrégés.

La concentration des EPS a augmenté significativement en présence du cocktail pharmaceutique. Cette formation plus importante d'EPS en présence du cocktail a été associée à un mécanisme de défense face à l'agression des molécules nuisibles (le cyclophosphamide et ses métabolites). Par contre, en l'absence du cocktail, la concentration d'EPS est resté constante.

La libération du matériel lié vers la phase liquide a contribué au colmatage des membranes. Ce colmatage était d'autant plus fréquent que la concentration des substances solubles a augmenté dans le temps dû à la forte formation des EPS en présence d'agent anticancéreux.

Dans le traitement des effluents contenant des composés nuisibles aux bactéries, la production élevée des EPS va nécessiter l'usage des boues bien acclimatées aux conditions des réacteurs. Cette recommandation est faite pour éviter que la libération du matériel lié, occasionnée par des contraintes de cisaillement, soit très importante et provoque un colmatage fréquent des membranes.

III.2.3. COMPORTEMENT DES BOUES ACTIVÉES DANS UN RÉACTEUR BATCH EN PRÉSENCE D'ANTIBIOTIQUES : ÉTUDE DES SUBSTANCES POLYMÉRIQUES EXTRACELLULAIRES

Après avoir étudié l'impact de la présence d'un agent anticancéreux, nous allons nous attacher à appréhender de la même façon l'impact d'agents antibiotiques. Cette étude effectuée en présence des antibiotiques s'inscrit dans le cadre du projet ANR ANTIBI EAU réalisée en partenariat avec le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP de Nancy). La conduite des réacteurs batch entre dans le cadre de la thèse de Louvet J.N. (2010b) intitulée « Effet des antibiotiques présents dans les eaux usées sur le procédé d'épuration par boues activées ». L'étude des substances polymériques extracellulaires des boues exposées aux différents antibiotiques a été réalisée dans le cadre de la présente thèse au Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM) de Nancy.

La première partie de cette étude porte sur 5 antibiotiques: érythromycine, roxithromycine, sulfamethoxazole, amoxicilline et tetracycline. Les résultats sont présentés sous forme d'article ci-joint accepté au journal *Water Science and Technology*, 2010. La deuxième partie vise à examiner plus particulièrement l'action de l'Érythromycine à différentes concentrations sur des boues urbaines des différentes origines. Egalement l'action de différentes formes d'érythromycine a été considérée. L'intérêt particulier d'étudier l'Érythromycine repose sur l'importante consommation de ce médicament en France, sa fréquente occurrence dans les effluents des stations d'épuration reporté dans la littérature (Watkinson et al., 2009), et l'inhibition de la dégradation des substrats carbonés et azotés (Alighardashi A., 2007).

III.2.3.1. Étude en présence de 5 antibiotiques

Article accepté à *Water Science and Technology*, en février 2010.

Cette section présentée sous forme d'article, rassemble les résultats obtenus en présence de 5 antibiotiques: érythromycine, roxithromycine, sulfamethoxazole, amoxicilline et tetracycline.

Activated sludge behaviour in a batch reactor in the presence of antibiotics: Study of extracellular polymeric substances

Avella A.C.¹, Essendoubi M.², Louvet J.N.³, Görner T.¹, Sockalingum G.D.², Pons M.N.³,
Manfait M.², de Donato Ph.¹

¹ Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy-Université, LEM UMR CNRS INPL 7569,
15 avenue du Charmois, 54500 Vandœuvre-les-Nancy, France.

² Unité Médicament, Dynamique Intracellulaire, Architecture Nucléaire (MÉDIAN). Reims – Université, UFR
Pharmacie, CNRS UMR 6237, 51 Rue Cognacq-Jay, F-51096 Reims, France.

³ Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC). Nancy – Université, CNRS UMR 5503,
1 rue Grandville B.P 20451, F-54001 Nancy, France.

Article accepté à *Water Science and Technology*, 2010.

Abstract The influence of *Erythromycin*, *Roxithromycin*, *Amoxicillin*, *Tetracycline* and *Sulfamethoxazole* on municipal sludge in batch reactors was investigated. The study was focused on extracellular polymeric substances (EPS) as indicator of bacteria sensitivity to toxic agents. The EPS were analysed by UV-Vis and FT-IR spectroscopies and by size exclusion chromatography. It was found that *Erythromycin* and *Roxithromycin* induced a significant increase of bound EPS in flocs. This was attributed to a protection mechanism of the bacteria. *Erythromycin* was the only antibiotic which inhibited COD and nitrogen removal.

Keywords : antibiotics, sludge extracellular polymers substances, size exclusion chromatography, Fourier transform infrared micro-spectroscopy.

Introduction

Antibiotics are important pharmaceuticals used in human and veterinary medicine. The excretion from medicated animals and the application of the contaminated manure on agricultural land are among the major routes by which veterinary antibiotics enter the environment (Kümmerer, 2009). The municipal wastewater is polluted by antibiotics due to the human excretions. The efficiency of pharmaceuticals removal in municipal treatment plants varies between almost zero values and almost complete removal, depending on the substance and on the process taking place (Hirsch et al., 1999). Most antibiotics are not completely metabolized or eliminated in the body and between 30 % and 90 % are discharged unchanged into the sewage system (Hirsch et al., 1999). The metabolites can be even more stable than the parent compounds and may have a higher potential for accumulation compared to the parent compounds (Kümmerer, 2009). Pharmaceutical active ingredients are complex molecules with different functionalities and physico-chemical and biological properties. They could have undesired effects on non-target organisms present in the environment (Kümmerer, 2009), since they have been designed to cause DNA damage to bacteria or to eukaryotic cells.

Research papers treating antibiotics in water and wastewater systems refer to various items: *i*) Biodegradation of antibiotics by biomass; *ii*) Advanced processes for antibiotics and metabolites removal; *iii*) Antibiotic resistant bacteria; *iv*) Occurrence of antibiotics in the environment. The studies concerning the first item evaluate mainly the biological pollutant removal efficiency and antibiotic toxicity. However, little attention was paid to the action of antibiotics on bacterial behaviour, especially on extracellular polymeric substances (EPS) issued from bacteria metabolism. The production of EPS is a general property of microorganisms and is a response to

stress situations (Wingender et al., 1999), thus they can be considered as an indicator of “well being” of bacteria.

Microorganisms responsible for pollutant degradation in wastewater treatment live and grow in aggregated forms as biofilm or flocs where the main component are EPS (from 50 % up to 90 % of total organic matter). The EPS are key components that determine the physicochemical and biological properties of biofilms and flocs. They are composed of up to 75-90 % of polysaccharides and proteins and small amounts of lipids, DNA and RNA (Wingender et al., 1999). Their molecular sizes range from a few hundred to several hundreds of thousands of Daltons (Garnier et al., 2005).

Wingender et al. (1999) summarized the principal functions attributed to EPS, such as: binding cells and some particles together (cohesion), formation of flocs and biofilms, adhesion to surfaces, cell-cell recognition, retention of water to prevent dehydration under water deficient conditions, sorption of exogenous organic compounds and inorganic ions, enzymatic activities, or protective barrier against adverse abiotic and biotic influences from environment.

The impact of five antibiotics on activated sludge in batch reactors was investigated in the present study: two macrolides (*Erythromycin*, and *Roxithromycin*), one sulfonamide (*Sulfamethoxazole*), one β -lactam (*Amoxicillin*), and *Tetracycline*. Table 1 presents their concentrations reported in various studies in wastewater treatment plant (WWTP) influents and effluents and in hospital effluents. The biological response of real sludge issued from a municipal WWTP to shock load of antibiotics was examined. Hence, no acclimation period was planned and the experiments were carried out in batch reactors with relatively high antibiotic concentration (10 mg/L). Drug manufacture effluents may contain antibiotic concentrations in that order of magnitude (Larsson et al., 2007). At these concentrations the bacteria still survive and it is possible to study the bacteria response such as EPS production. It was reported that crisis situations induced modification of EPS production (Aquino and Stuckey, 2004; Garnier et al., 2005; Avella et al., 2010). The contact time of the experiments was limited to 24 hours with no external nutrients supply. At a longer contact time other undesired process, such as starvation could appear. We have followed the EPS bound to bacteria in flocs and the soluble part in the bulk phase by different methods. The total protein and total polysaccharide contents were examined by UV-Vis spectroscopy. The high pressure size exclusion chromatography (HPSEC) and the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) allowed to obtain information about macromolecular size distribution and possible chemical changes respectively. The pollutant removal efficiency (Chemical Oxygen Demand (COD) and nitrogen) was also followed.

Antibiotic	WWTP			Hospital effluents [ng/L]	Comments
	Influent [ng/L]	Bioreactor [ng/L]	Secondary effluent [ng/L]		
Erythromycin Gulkowska et al., 2008 Watkinson et al., 2007; 2009 Göbel et al., 2005	470-810 d 70 ± 120 E_{H2O}	d	d 80 ± 60	N.D	<i>Erythromycin</i> : macrolide antibiotic. Macrolides were the second antibiotic class mostly used in human care in European countries between 1998-2005 (ESAC, 2007). <i>Erythromycin</i> is usually applied for respiratory tract infections, infections of soft tissues and when infections are persistent to penicillin antibiotics. Its principal metabolite <i>Erythromycin-H₂O</i> is the most frequently detected macrolide antibiotic in WWTP effluents (Watkinson et al., 2009). This indicates its potential to pass through conventional treatment (Hirsch et al., 1999). The elimination of <i>Erythromycin</i> in conventional WWTP is incomplete. It persists in the water phase and no significant sorption process takes place on biological sludge (Göbel et al., 2005).
Roxithromycin Watkinson et al., 2007 Watkinson et al., 2009 Göbel et al., 2005	0-18 ~ 8 20 ± 20	0-60	0-100 ~ 20 20 ± 10	~ 50	<i>Roxithromycin</i> : macrolide antibiotic. It is better tolerated by human than <i>Erythromycin</i> . Göbel et al. (2005) observed that <i>Roxithromycin</i> was persistent in the effluent from WWTP with conventional activated sludge treatment. They reported that no significant sorption of this antibiotic was detected on biological sludge.
Sulfamethoxazole Watkinson et al., 2007 Brown et al., 2006 Watkinson et al., 2009 Göbel et al., 2005	360-500 250 ± 2750 430 ± 200	185-200	270-320 50 ± 150 280 ± 560	1300-2100 400-2100 100 ± 200	<i>Sulfamethoxazole</i> is applied in the treatment of human infections, bronchitis, bacterial meningitis, certain eye infections and urinary tract infections (www.medicinenet.com). <i>Sulfamethoxazole</i> is today almost obsolete as a single agent due to the development of bacterial resistance; now it is used in combination with trimethoprim (www.medicinenet.com). The main human metabolite, N ⁴ -acetylsulfamethoxazole, accounts for about 50 % of the administered parent dose. In conventional WWTP, the elimination of <i>Sulfamethoxazole</i> was found to be incomplete (Göbel et al., 2005). Therefore it is frequently detected in rivers. In sequencing batch reactor Drillia et al. (2005) suggested that bacteria used <i>Sulfamethoxazole</i> as a nitrogen source when more readily biodegradable source of nitrogen was absent. They observed undetectable effluent levels after an acclimation period. Göbel et al. (2005) reported the sorption of <i>Sulfamethoxazole</i> on biological sludge, however N ⁴ -acetylsulfamethoxazole was not detected in sludge despite its high concentrations in the influent.
Amoxicillin Watkinson et al., 2007 Watkinson et al., 2009	190-280 ~ 1400		0-30 < 50	90	<i>Amoxicillin</i> : penicillin antibiotic class. The penicillin was the most consumed antibiotic in European countries (ESAC, 2007). <i>Amoxicillin</i> belongs to β -lactams (cyclic amide) which are not generally considered as important environmental pollutants because they undergo thermal degradation until ultimate mineralisation to CO ₂ and water (Hirsch et al., 1999).
Tetracycline Watkinson et al., 2007 Watkinson et al., 2009	0-35 < 10	0-20	0-30 < 20	< 40	<i>Tetracycline</i> undergoes photochemical degradation and forms a number of degradation products. Many of them are highly soluble and stable in receiving waters. <i>Tetracycline</i> has also a tendency to form relatively stable complexes with double cations such as calcium and magnesium and with particulates matter (Halling-Sorensen et al., 2002). <i>Tetracycline</i> removal of water phase is not complete (Watkinson et al., 2009). However, <i>Tetracycline</i> is eliminated by more than 50% due to sorption on sewage sludge (Watkinson et al., 2007).

Table 1. Concentrations of *Erythromycin*, *Roxithromycin*, *Sulfamethoxazole*, *Amoxicillin* and *Tetracycline* reported in different studies: in WWTP and in hospital effluents

Materials and Methods

Samples and reactors

Two series of experiments were performed with sludge collected in the municipal WWTP of Epinal (France, 50000 eq. inhab.) at two different dates within four weeks. The biomass efficiency for pollutant removal was studied using the inlet wastewater of the WWTP. The fresh inlet wastewater (2 L) was mixed with the sludge (1 L) sampled in the recycling line (where sludge is more concentrated) to obtain the biomass concentration in reactor of about 2,5 g/L (concentration close to the mixed liquor of the secondary tank in the WWTP). Four batch reactors (volume = 4 L) were running simultaneously during 24 hours with the biological mixture and 10 mg/L of each antibiotic (AB). One reactor without AB served as a control reactor. The aeration was performed by the air diffuser at the bottom of each reactor. After 24 hours of operation, the biomass was separated from the supernatant by centrifugation (15 min at 4500g). The soluble matter was directly analysed by methods described later. The settled biomass, before further analysis, was submitted to EPS extraction according to Frolund et al., (1996) using Dowex resin with modification of the extraction time (4 h instead of 1 h). A series of reproducibility experiments were also performed: the reproducibility of two reactors operating in parallel with a WWTP sludge sample and a given antibiotic was around 93 %. The reproducibility of EPS extraction on the same sludge sample was better than 95 %.

Mixed liquor suspended solids (MLSS) were measured according to the 2540 G protocol (Standard methods, 2005).

The soluble COD was measured during the 24 h of culture by UV-vis spectroscopy at 254 nm; this method allows a rapid estimation of COD (Mrkva, 1983). The reproducibility of COD measures was around 99 %. The ammonium content was determined by the Nessler colorimetric method (Hach Nessler Method 8038 on a Hach DR/2400 spectrophotometer (Hach Co., Colorado, USA)) using ammonium chloride for the calibration. The reproducibility was better than 97 %.

Total protein and total polysaccharide analysis by UV-Vis spectroscopy

Protein determination was performed with the Total Protein Kit; Micro Lowry® with Peterson's modification (Sigma-Aldrich, France) using bovine serum albumin as a standard for calibration from 20 to 200 mg/L, absorbance was measured at 750 nm. Polysaccharide were determined according to the classical Dubois protocol (Dubois et al., 1956) at 485 nm, calibration was performed with glucose within the concentration range from 10 to 100 mg/L. All samples were measured in duplicate and the reproducibility was better than 98 %.

HPSEC analysis

Soluble matter and extracted EPS from biomass were analysed by HPSEC to estimate the molecular sizes of present chemical species. The separation of EPS samples was carried out on a Hewlett Packard 1100 series chromatograph. A Zorbax Bio series column (GF-250, 25cm x 9.4mm, Agilent Technologies, France) thermostated at 25°C was used. The mobile phase (flow rate 1 mL/min) was 0.2 M NaCl. The detection was carried out at 25°C with a diode array UV detector at 215 nm. All samples were filtered with 0.2 µm (Chromafil®) filters prior to injection. Each obtained chromatographic peak can be a pure chemical molecule or a mixture of the EPS species and it corresponds to a given hydrodynamic molecular size depending on the nature of chemical species and depending of the chromatographic conditions. The chromatographic column elution volumes V_e were calibrated by the main EPS constituents: protein and polysaccharide. The calibration was carried out by the standard polysaccharides and standard proteins as described elsewhere (Avella et al., 2010). The variation in the chromatogram area of the same sample was less than 7 %.

FTIR analysis

The IR spectral analysis was performed using a High Throughput System (HTS-XT) coupled to a Tensor 27 FT-IR spectrometer (Bruker Optics) in the transmission mode. Thirty microlitres of the suspension were deposited on a 96-well plate made of silicon and dried under mild vacuum. Sample measurements were done in triplicate. The time-averaged signal was collected over 64 scans with a spectral resolution of 4 cm^{-1} .

Results and discussion

The mixed liquor suspended solids (MLSS) were measured at the beginning ($t = 0\text{ h}$) and at the end of experiment ($t = 24\text{ h}$) (figure 1). A decrease of suspended solids appeared in the first series of experiments in the presence of *Erythromycin* and *Roxithromycin* (figure 1a). This was probably due to the release of organic particulate matter from flocs towards the foam accumulated on top of the liquid. In the second series of experiments (figure 1b) no significant variation of MLSS was observed and the biomass seemed to be less sensitive to AB than in the first series. The sludge was sampled four weeks later in the municipal WWTP when the microbial consortium could have been exposed to different conditions.

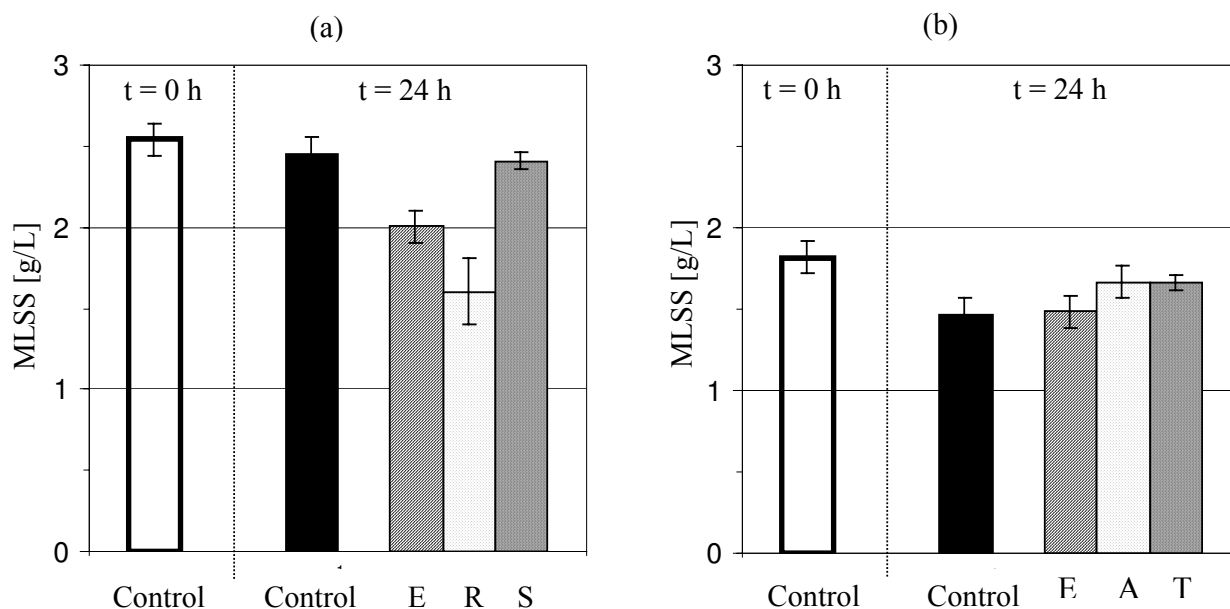
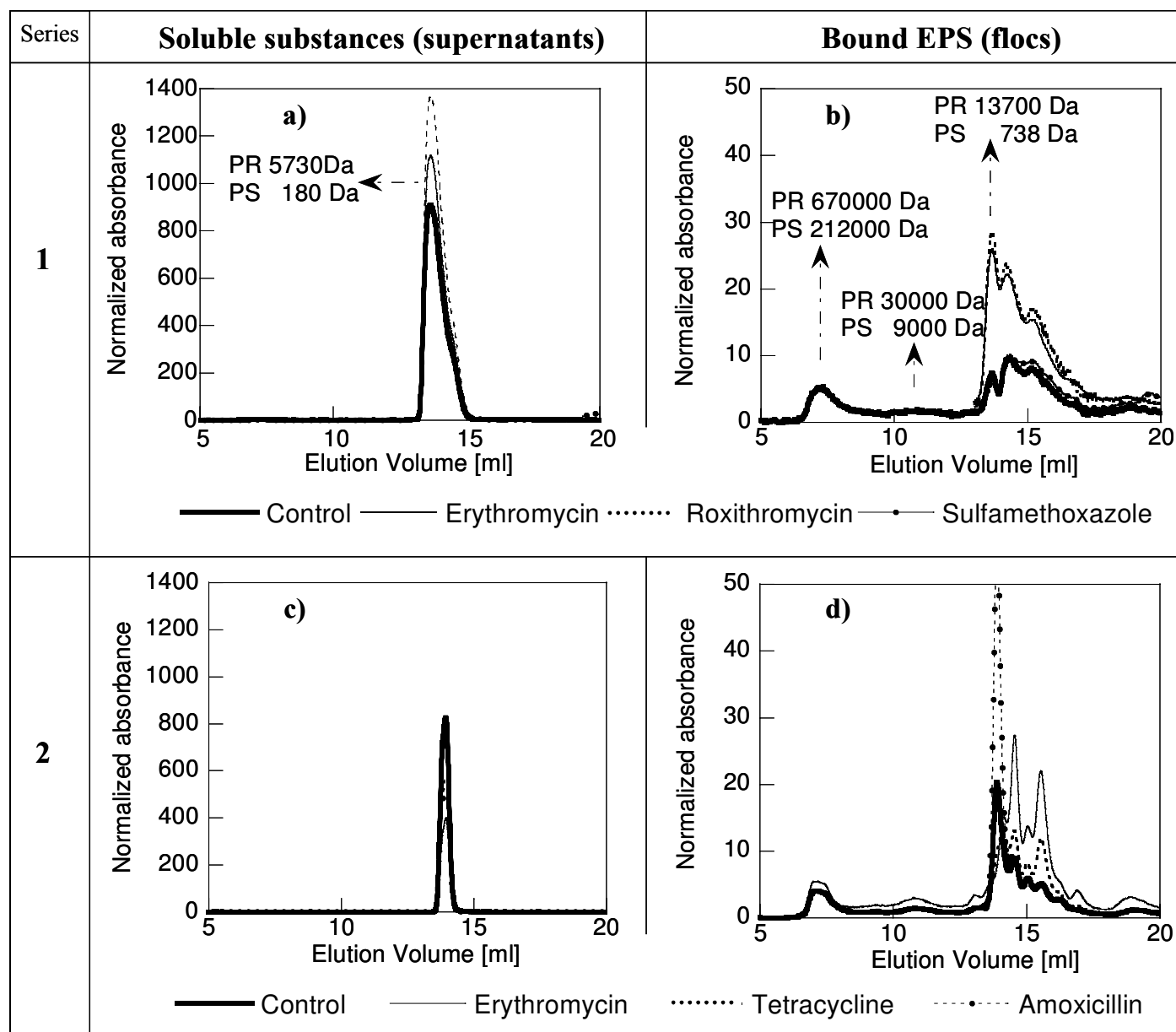


Figure 1. Mixed liquor suspended solids in the control reactor at the beginning of the experiment and after 24 hours of culture and in reactors with different antibiotics after 24 hours.

Erythromycin (E), *Roxithromycin* (R), *Sulfamethoxazole* (S), *Amoxicillin* (A) and *Tetracycline* (T)

(a) first series, (b) second series.

The area of chromatograms can be related to the EPS concentration. Figure 2 shows the chromatograms of EPS (soluble and bound in flocs), obtained in both series of experiments in the presence of antibiotics and in the control reactor. The chromatograms were normalized by dividing their area by the biomass content (assimilated to MLSS) in each reactor, thus they are reported per gram of biomass. Both control reactors did not give identical chromatograms, especially for bound EPS: each had its own fingerprint due to the fact that the sludge was sampled in the WWTP at two



different dates. Consequently, the reactors with AB should be compared only to their corresponding control reactor.

Figure 2. Normalized chromatograms of soluble substances present in supernatants (a and c) and of bound EPS (b and d) in control reactor and in reactors with antibiotics.

The chromatograms of soluble matters (figure 2a and 2c) are very simple: one single peak with a maximum at $V_e = 13.3$ mL corresponding to small molecules (of about 5730 Da for protein and of about 180 Da for polysaccharide calibration). Slight variations in concentration of soluble matter was found between the control reactor and reactors with AB.

The bound EPS (figure 2b and 2d) have a complex chromatographic profile with different peak maxima corresponding to small, medium and high macromolecular species (up to 670000 Da for protein and up to 212000 Da for polysaccharide calibration). The presence of *Erythromycin* and of *Roxithromycin* induced a significant increase of peak corresponding to small size polymers (about 13700 Da for protein and 738 Da for polysaccharide calibration) and of molecules with retention mechanism not strictly based on the size exclusion ($V_e > 13.3$ mL). Results obtained with *Amoxicillin* should be considered with caution because only one peak increased. The increase of

EPS suggests that the biomass was sensitive to the presence of these three antibiotics. On the other hand, *Sulfamethoxazole* and *Tetracycline* seem to have no influence on the bound EPS present in flocs, their chromatograms are practically identical to the EPS in the control reactor.

The total protein and total polysaccharide concentrations determined by classical UV-Vis spectroscopy are presented on figure 3. It can be observed that their distribution is different in soluble and in bound phases. Soluble phases contain higher polysaccharide content than that of protein (except in *Amoxicillin* presence). On the contrary, the bound phases exhibited systematically higher protein content compared to polysaccharide.

In the first series of experiments (figure 3a and 3b), an increase of protein and polysaccharide concentrations was seen mainly in bound EPS in the presence of *Erythromycin* and *Roxithromycin* and to a lesser extent in the presence of *Sulfamethoxazole*. In the second series (figure 3c and 3d) no important variations were observed between the control reactor and reactors with AB, only very slight increase of the protein and polysaccharide content in *Erythromycin* presence and high protein content in soluble phase in reactor with *Amoxicillin*.

Soluble and bound phases were analysed by FTIR. The spectra of soluble phase substances exhibited amine and polysaccharide functionalities. However, amides functions were absent, it means that proteins were not an abundant compound in the soluble phase (results not shown).

The spectra of bound EPS exhibited the bands of proteins and of polysaccharides. Their quantification was performed by integrating their corresponding IR regions: protein at 1500-1700 cm^{-1} (amide groups) and polysaccharide at 900-1200 cm^{-1} (ether groups). The figure 3 shows the FTIR spectra of bound EPS and their corresponding protein and polysaccharide quantification. All spectra were reported per gram of MLSS. It can be observed that spectra exhibit the same IR regions in the presence or absence of antibiotics. Only a global variation in absorbance was noted (figure 3e and 3g) which can be related to the variation of the total amount of protein and polysaccharide (figure 3f and 3h). *Erythromycin* and *Roxithromycin* induced an important increase of bound EPS while *Amoxicillin*, *Tetracycline* and *Sulfamethoxazole* influence was lower.

When comparing the protein and polysaccharide quantification by classical UV-Vis and by FTIR spectroscopy the tendency remained identical: *Erythromycin* and *Roxithromycin* induced the most important increase of bound EPS. Some results may be slightly different due to the fact that each method has its own bias (sensitivity, preparation of samples or interferences).

The DNA patterns were found in the supernatants of all reactors, including the control. It means that the presence of AB did not seem to be at the origin of this phenomenon; it can be attributed to the natural bacterial decay. The thorough examination of IR spectra in the 600-650 cm^{-1} region showed that in the presence of *Erythromycin* a shoulder appeared. This might be related to the guanine presence (Akhebat et al., 1992) relative probably to cells damages.

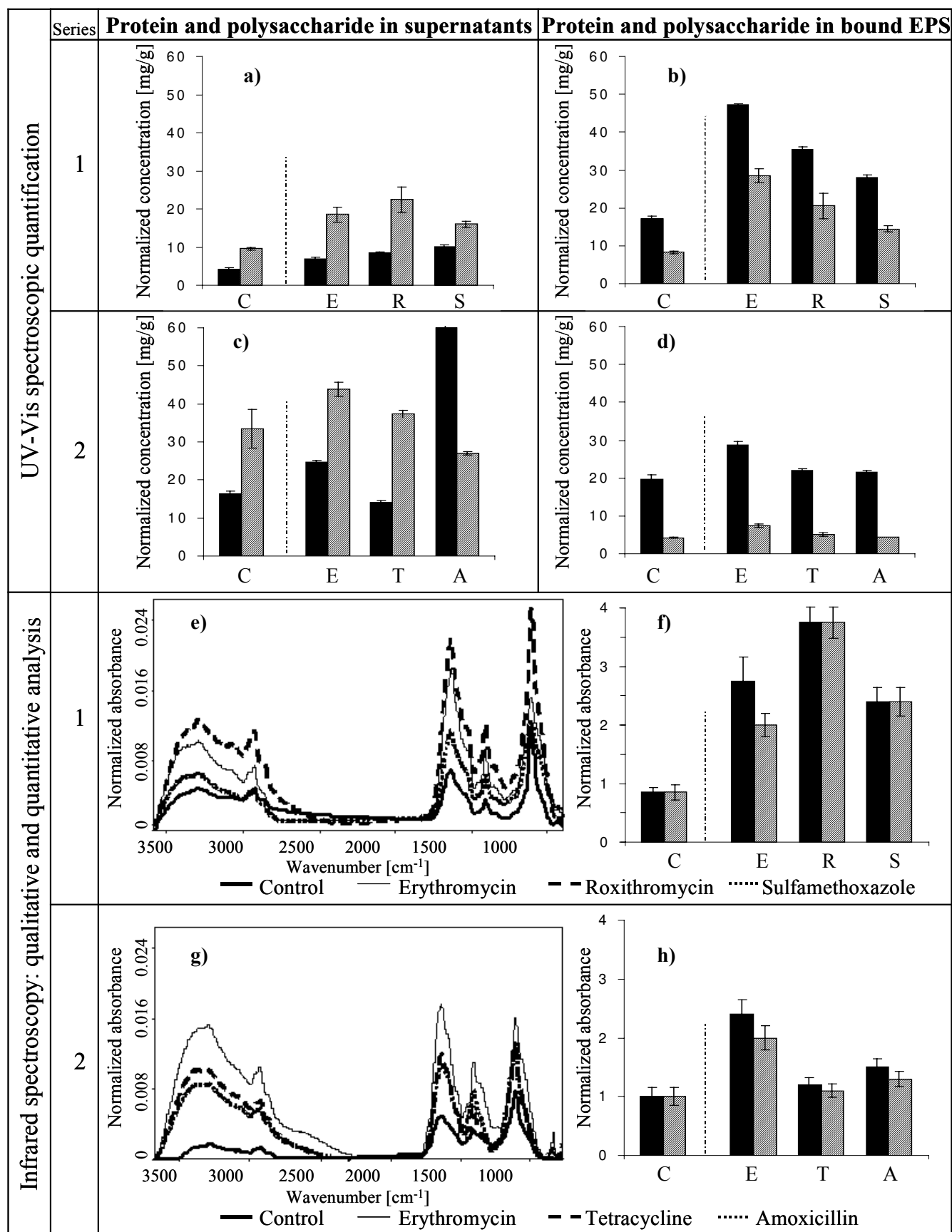


Figure 3. UV-Vis spectroscopic quantification. Normalized concentrations (per gram of MLSS) of protein and polysaccharide present in supernatant (a and c) and in bound EPS (b and d) issued from control reactor (C) and from reactors with antibiotics: *Erythromycin* (E), *Roxithromycin* (R), *Sulfamethoxazole* (S), *Tetracycline* (T) and *Amoxicillin* (A).

Normalized FT-IR spectra of bound EPS (e and g) obtained in experiments of series 1 and of series 2. Quantification of protein and polysaccharide (f and h) by integrating the corresponding IR bands.

■ protein ▨ polysaccharide.

The biomass ability for COD and nitrogen removal was measured in both series of experiments. *Roxithromycin*, *Sulfamethoxazole*, *Amoxicillin* and *Tetracycline* did not alter the bacteria capacity to degrade the pollutants. The COD and nitrogen removal performance (70 % and 55 %, respectively) were identical in the control reactor and in the reactors with these antibiotics. However *Erythromycin* inhibited the biological removal of pollutants in both series. Even when biomass appeared to be less sensitive to AB in second series. In reactor with *Erythromycin* (figure 4), the COD removal was inhibited and the NH_4^+ concentration was reduced only slightly (18 %).

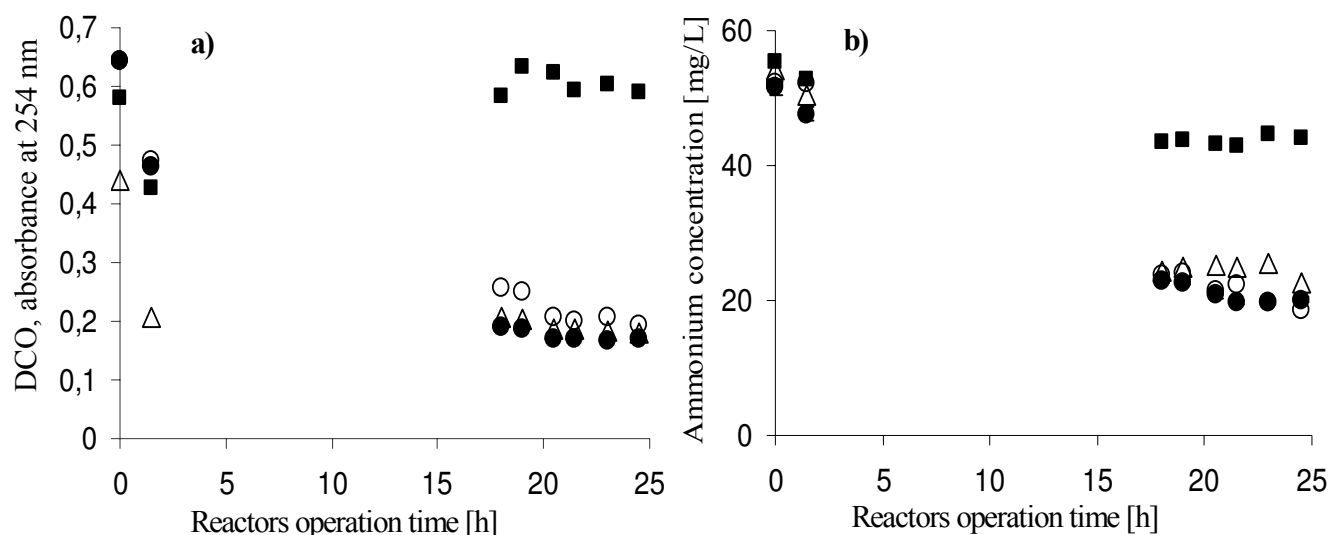


Figure 4. Evolution of the COD and nitrogen removal over the reactors operation time: in control reactor (●) and in reactors with antibiotics: *Erythromycin* (■), *Tetracycline* (○) and *Amoxicillin* (△).

The chromatographic analysis, together with UV-Vis and FT-IR analysis, showed that *Erythromycin* and *Roxithromycin* induced an increase of the bound EPS concentration in flocs. At the same time, these antibiotics provoked a partial disintegration of flocs (observed by the decrease of MLSS). It was reported that bacterial stress response mechanism called K^+ efflux plays a significant role in the deflocculation (Bott and Love, 2002). The release of floc organic matter to the bulk and to the foam can be attributed to this phenomenon. The enhanced EPS production in flocs may be a bacteria response to the stress situation to compensate for the loss of protective barrier. Moreover, *Erythromycin* inhibited the pollutants removal, suggesting that *Erythromycin* has a stronger toxic effect on the biomass than *Roxithromycin*. Indeed, the FTIR spectra exhibited the possible guanine presence only in the supernatant of the reactor with *Erythromycin*. This is a complementary hint about the particular action of *Erythromycin* on biomass.

Stewart and Costerton (2001) suggested that antibiotics might kill free-floating bacteria, but fail to eradicate the bacterial cells still embedded in the biofilm. Antibiotics must cross the thick mixture of EPS to reach their targets cells. In that diffusion process, AB could be deactivated. The bacteria in the surface layers of the biofilm could degrade the antimicrobial agent and could preserve the more deeply embedded cells.

In our experiments the sludge bacteria might have been accustomed to some of AB. Indeed, *Sulfamethoxazole* is today almost obsolete as a single agent due to the development of bacterial resistance; now it is used in combination with trimethoprim

(www.medicinenet.com). Our experiments showed that the biomass exposed to this AB behaved in the same manner as in the control reactor and no complementary EPS were produced. Further, the bacteria were not sensitive to the *Tetracycline* presence. Prado et al. (2009) observed also only a slight impact of *Tetracycline* on biomass at four times higher concentrations than that in our experiments.

Conclusions

The influence of *Erythromycin*, *Roxithromycin*, *Amoxicillin*, *Tetracycline* and *Sulfamethoxazole* on the biological properties of the sludge was studied in lab-scale batch reactors. The study of EPS (bound and soluble fraction) allowed to assess the bacteria sensitivity to different antibiotics.

In spite of shock loads of 10 mg/L, *Amoxicillin*, *Tetracycline* and *Sulfamethoxazole* had no observable impact: the bacteria continued to consume the organic pollution and no significant increase of bound or soluble EPS was found.

Erythromycin and *Roxithromycin* induced an increase of bound EPS in flocs, a phenomenon attributed to the protective mechanism of bacteria exposed to the toxic stress. The release of flocs organic matter to the bulk and foam was also observed. The *Erythromycin* toxic effect on the biomass was more important than that of *Roxithromycin*, the *Erythromycin* presence inhibited the COD and nitrogen removal.

The biomass in WWTP can vary depending on the treatment process, pollutants or climatic conditions and thus it may be more or less sensitive to the antibiotics. The EPS considered as indicator of bacteria behaviour showed that bacteria seem tolerant or to be accustomed to some antibiotics while they can be very sensitive to others such as both studied macrolides. For a better understanding of these antibiotics action on biomass, further studies are necessary.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support of ANR (Project ANTIBI-EAU ANR-07-BLAN-0195-02), project EC2CO, Zone Atelier Moselle (ZAM) and CPER (Lorraine).

References

- Akhebat A., Dagneaux C., Liquier J. and Taillandier E. (1992). Triple helical polynucleotidic structures: an FTIR study of the C+ .G. C triplet. *J Biomol Struct Dyn.*, **10**(3), 577-588.
- Anderson G.G. and O'Toole G.A. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. in: *Bacterial biofilms*. Tony Romeo (ed.). Springer.
- Aquino S. and Stuckey D. (2004). Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research*, **38**(2), 255-266.
- Avella A.C., Delgado L.F., Görner T., Albasi C., Galmiche M. and de Donato Ph. (2010). Effect of cytostatic drug presence on extracellular polymeric substances formation in municipal wastewater treated by membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, **101**(2), 518-526.
- Bott C. and Love N. (2002). Investigating a mechanistic cause for activated sludge deflocculation in response to shock loads of toxic electrophilic chemicals. *Water Environment Research*, **74**(3), 306-315.
- Brown K.D., Kulis J., Thomson B., Chapman T.H. and Mawhinney D.B. (2006). Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*, **366**(2-3), 772-783.
- Drillia P., Dokianakis S.N., Fountoulakis M.S., Kornaros M., Stamatelatou K. and Lyberatos G. (2005). On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: the example of the antibiotic sulfamethoxazole. *Journal of Hazardous Materials*, **122**(3), 259-265.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**(3), 350-356.
- ESAC (2007) (The European Surveillance of Antimicrobial Consumption, 1998-2005) <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3284> (accessed 30 January 2009)

- Frolund B., Palmgren R., Keiding K. and Nielsen P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, **30**(8), 1749-1758.
- Garnier Ch., Görner T., Lartiges B., Abdelouhab S. and de Donato Ph. (2005). Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: a combined size-exclusion chromatography and infrared microspectroscopy study. *Water Research*, **39**(13), 3044-3054.
- Göbel A., Thomsen A., Mcardell C., Joss A. and Giger W. (2005). Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides and trimethoprim in activated sludge treatment *Environ. Sci. Technol.*, **39**(11), 3981-3989.
- Gulkowska A., Leung H.W., So M.K., Taniyasu S., Yamashita N., Yeung L.W.Y., Richardson B.J., Lei A.P., Giesy J.P. and Lam K.S.P. (2008). Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. *Water Research*, **42**(1-2), 395-403.
- Hirsch R., Ternes T., Haberer K. and Kratz K.L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, **225**(1-2), 109-118.
- Halling-Sorensen B., Sengelov G. and Tjornelund J. (2002). Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **42**(3), 263-271.
- Kümmerer K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – a review - part I. *Chemosphere*, **75**(4), 417-434.
- Larsson D., de Pedro C. and Paxeus N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, **148**(3), 751-755.
- Mrkva M. (1983). Evaluation of correlations between absorbance at 254nm and COD or river waters. *Water Research*, **17**, 231-235.
- Prado N., Ochoa J. and Amrane A. (2009). Biodegradation by activated sludge and toxicity of tetracycline into a semi-industrial membrane reactor. *Bioresource Technology*, **100**(15), 3769-3774.
- Standard methods for the examination of water and wastewater (2005). 21st Ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. Washington D.C., USA.
- Stewart P. and Costerton J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms-Review. *The Lancet*, **358**, 135-138.
- Watkinson A.J., Murby E.J. and Costanzo S.D. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*, **41**(18), 4164-4176.
- Watkinson A.J., Murby E.J., Kolpin D.W. and Costanzo S.D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Science of the total environment*, **407**(8), 2711-2723.
- Wingender, J., Neu, T.R. and Flemming, H.C. (eds.) (1999). *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer, Heidelberg.
- <http://www.medicinenet.com/sulfamethoxazole/article.htm/> (accessed 22 June 2009).

III.2.3.2. Étude en présence d'Érythromycine

L'étude précédente de l'influence de différents antibiotiques sur la formation des EPS, a montré un effet plus marqué de l'érythromycine comparé aux autres antibiotiques. Cette influence ajoutée à l'usage important de l'érythromycine en médecine humaine, nous a conduit à examiner plus particulièrement, l'effet de l'érythromycine à différentes concentrations sur l'activité bactérienne des boues des origines différentes.

Les boues étudiées proviennent de deux stations d'épuration des eaux urbaines : la station de Golbey-Epinal et la station de Nancy-Maxeville. Les boues prélevées ont été d'abord caractérisées en termes de concentration en MES, pH et conductivité. Ensuite, les substances solubles et les EPS liés dans les boues ont été caractérisées par chromatographie d'exclusion par taille.

Afin d'étudier la capacité épuratrice de la biomasse pour l'élimination des polluants contenus dans l'eau d'entrée à la station, 1 L des boues a été diluée avec 2 L d'eau d'entrée. Les boues ont été prélevées dans le circuit de recirculation vers le bassin biologique (boues épaisses). La dilution de ces boues épaisses permet d'obtenir une liqueur mixte de concentration similaire à celle du bassin biologique. Ensuite, la liqueur obtenue a été soumise à une culture aérobie de 24 h en présence d'érythromycine, en réacteur batch. La culture était limitée à une durée de 24 h pour éviter de soumettre le consortium bactérien à une durée plus longue sans apport de nutriment. A chaque expérience, un réacteur sans l'antibiotique a servi de témoin. Au bout de 24 h, nous avons analysé les substances solubles et les EPS liés. L'impact de l'érythromycine sur la biomasse a été examiné à différentes concentrations (entre 0,1 et 20 mg/L) ; l'impact de différents types d'érythromycine a été l'objet de la dernière partie de cette évaluation.

III.2.3.2.1. Caractérisation des boues brutes

Dans les deux stations d'épuration, la concentration des boues activées prélevées dans la recirculation se situe dans le même ordre de grandeur, entre 4 et 6 g/L. Le pH de boues prélevées est constant dans chaque station avec des valeurs supérieures dans la station de Nancy ($7,1 \pm 0,2$) que dans la station d'Epinal ($6,5 \pm 0,2$). Les boues prélevées à la station de Nancy ont présenté une quantité d'ions plus élevée (conductivité $0,95 \pm 0,1$ mS/cm) que les boues provenant d'Epinal (conductivité $0,5 \pm 0,1$ mS/cm).

La figure III.8 montre les résultats de l'analyse des substances solubles et des EPS liés dans les boues. Les chromatogrammes présentés correspondent aux EPS des boues prélevées et des boues diluées. Ces chromatogrammes sont normalisés par gramme de MES. La surface des chromatogrammes est proportionnelle à la concentration des EPS.

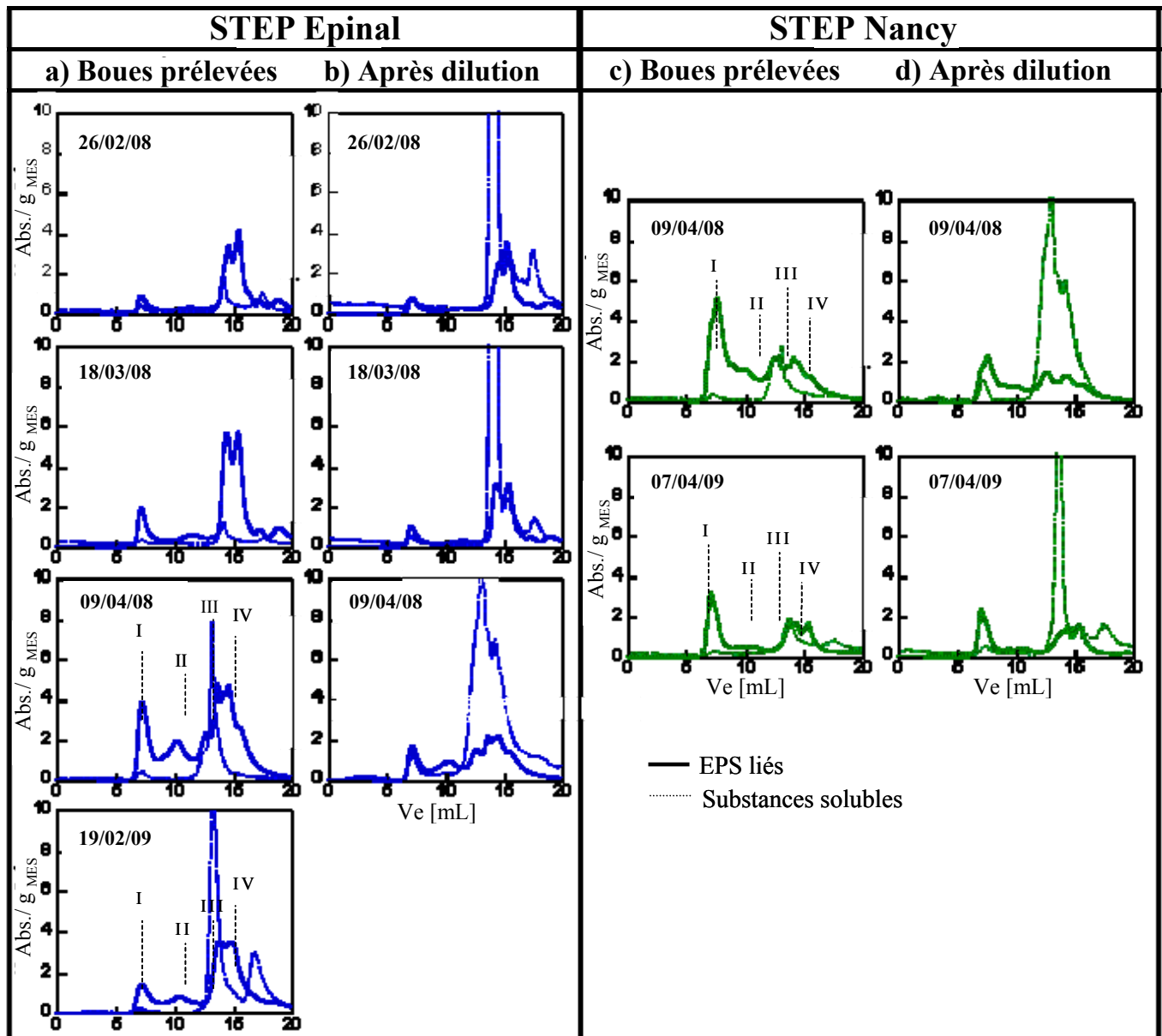


Figure III.8. Profils chromatographiques des substances solubles et des EPS liés dans les boues prélevées (a et c) et dans les boues diluées (b et d) provenant des stations d'Epinal et de Nancy.

La correspondance entre les pics chromatographiques et les masses molaires des étalons, est la suivante :

Groupe I = PR > 670 KDa, PS ~ 788 KDa ; groupe II = PR ~ 78 KDa, PS ~ 11 KDa ;
groupe III = PR ~ 17 KDa, PR ~ 0,7 KDa ; groupe IV = PR < 5 KDa, PS < 0,1 KDa.

On peut observer que chaque station possède un profil caractéristique des *EPS liés dans les boues* (tendance qui se maintient pendant la durée de nos analyses ~ 1 an). A Epinal, les molécules avec un volume d'éluion vers 15 mL sont prépondérants. Par contre, à Nancy, on

observe la prépondérance des espèces avec un volume d'élution vers 7 mL. Chacune de deux stations d'épuration possède donc une signature spécifique des EPS avec une distribution des tailles particulière.

La dilution de la boue par l'eau d'entrée à la station (figure III.8, colonnes b et d) a provoqué une augmentation de la concentration des substances solubles de petites tailles (volume d'élution (V_e) entre 13 et 16 mL). Ceci a indiqué le relargage vers la phase liquide des molécules de petites tailles contenues dans les floes. Pour les deux stations, les profils des *substances solubles* sont plus simples que ceux des EPS liés, les profils des substances solubles sont constitués par une ou deux familles des molécules des petites tailles ($V_e = 13 - 16$ mL). Les volumes d'élution ont été étalonnés par des molécules des protéines et des polysaccharides étalon utilisés pour l'étalonnage des colonnes d'exclusion par taille (figure III.8).

III.2.3.2.2. Impact des différentes concentrations d'Érythromycine

Avant de juger l'effet de l'érythromycine sur la biomasse, examinons d'abord l'impact de la culture des boues pendant 24 h sur les substances solubles et sur les EPS liés. Ensuite, nous allons étudier l'effet de différentes concentrations d'érythromycine sur la biomasse.

Pour les boues des deux origines (Epinal et Nancy), la culture des boues a provoqué une légère modification sur les profils des EPS liés dans les boues comparé aux profils des EPS liés avant la culture (figure III.9). La culture a favorisée la présence de molécules de petites tailles ($V_e \sim 15$ mL) avec une diminution des molécules des grandes tailles ($V_e \sim 7$ mL).

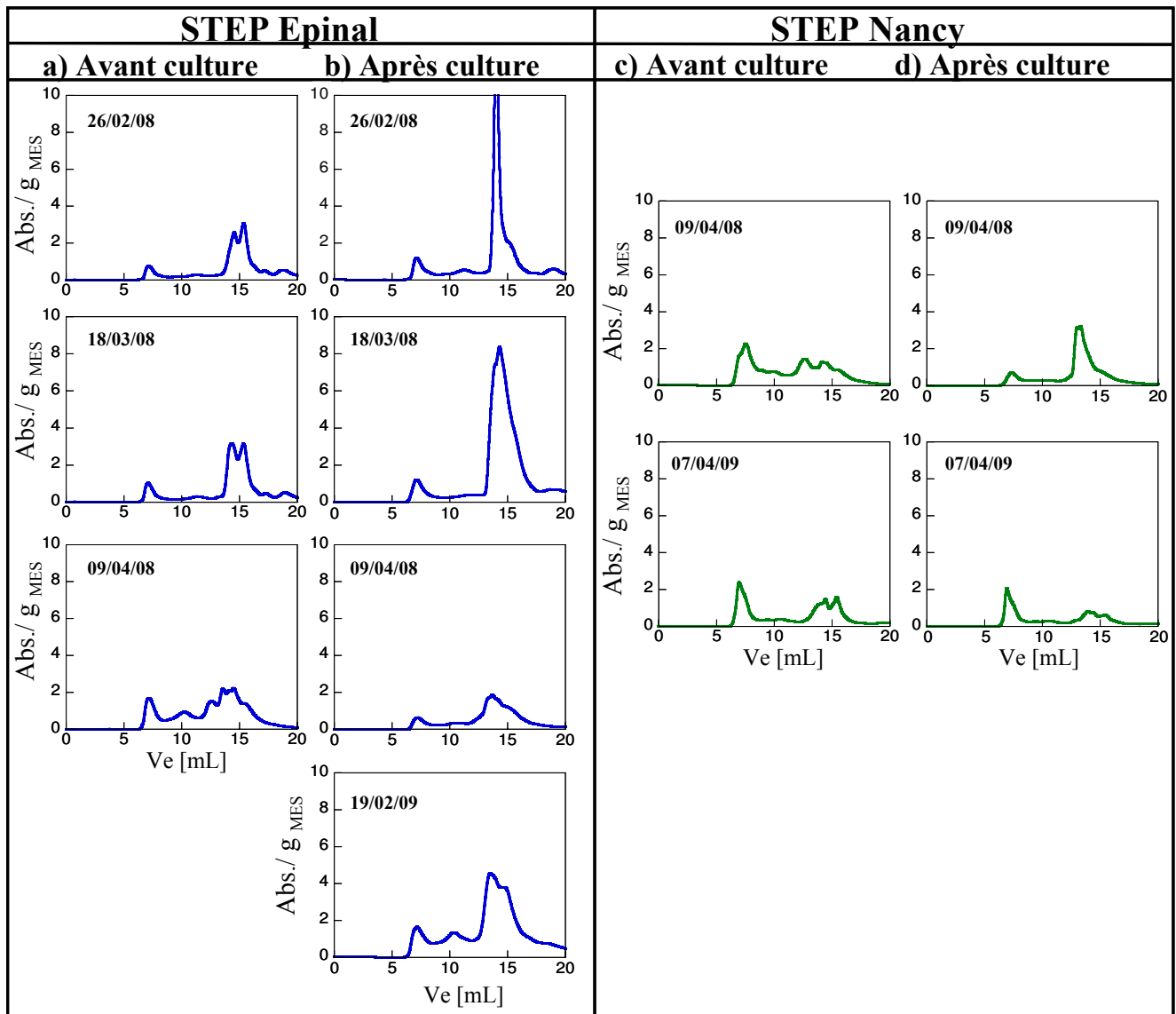


Figure III.9. Comparaison des chromatogrammes des EPS liés dans les boues avant et après culture de 24 h (réacteurs témoin).

- Concentration en érythromycine de 0,1 et 1 mg/L

La figure III.10 présente la teneur en MES et les chromatogrammes des EPS liés dans les boues après culture de 24 h en présence des faibles concentrations d'érythromycine, 0,1 et 1 mg/L. Les profils des EPS liés dans les boues du réacteur témoin servant de référence, sont présentés pour chaque expérience. On peut constater, pour les boues de deux origines, qu'à des faibles concentrations de l'antibiotique 0,1 et 1 mg/L, la valeur de MES est restée pratiquement identique à la valeur de MES du réacteur témoin.

La présence d'érythromycine a provoqué des variations en termes de la concentration des EPS sans influencer la distribution des masses molaires des EPS liés. Au bout de 24 h de culture en présence de l'antibiotique, les boues ont réagi d'une manière différente, selon leur origine. Dans le cas de boues de Nancy, la concentration des EPS liés est restée identique

entre le réacteur en présence de l'antibiotique et le réacteur témoin. Par contre, la concentration d'EPS liés a diminué dans les boues d'Epinal en présence d'érythromycine comparé au réacteur témoin.

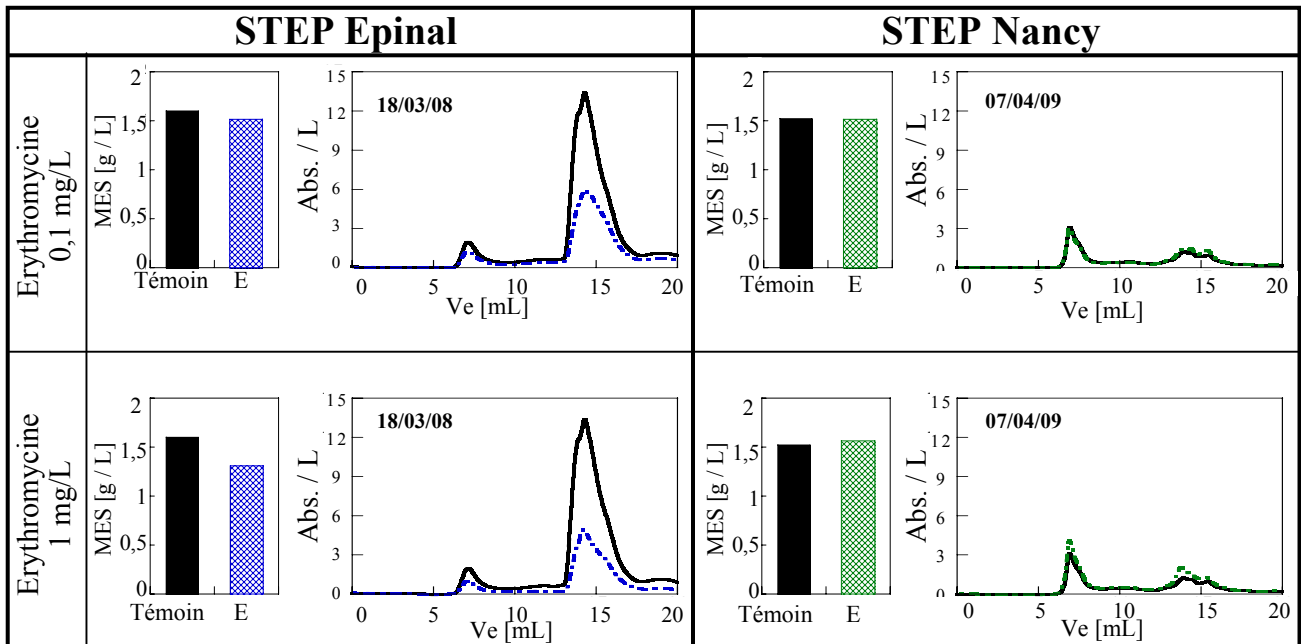


Figure III.10. Teneur en MES et chromatogrammes des EPS liés dans les boues en présence d'érythromycine (E), à 0,1 et 1 mg/L, et dans le réacteur témoin. Culture 24 h. — Réacteur Témoin Réacteur avec Erythromycine.

- Concentration en érythromycine de 10 et 20 mg/L

La présence d'érythromycine à 10 et à 20 mg/L dans le réacteur a induit la désagrégation des boues des deux origines. Ce phénomène observé visuellement a été également accompagné par une diminution significative* des MES (figure III.11). La structure de ces flocs étudiée par Louvet et al. (2010a), par microscopie Brightfield, s'est avérée complètement désagrégée.

La figure III.11 montre que dans le cas de boues d'Epinal, la concentration des EPS liés est plus faible que celle du réacteur témoin. Par contre, pour les boues de Nancy, la concentration des EPS liés a augmenté en présence de l'antibiotique. Une seule expérience celle du 09/04/08 sur les boues d'Epinal, diffère de ce comportement « type ». Il est utile de remarquer que ce jour, la boue d'Epinal a été diluée par l'eau de la station de Nancy afin d'étudier le comportement de boues alimentées par un autre substrat. Il n'est donc pas exclu que l'activité bactérienne aurait pu être modifiée par les caractéristiques de l'eau utilisée de Nancy.

* La désagrégation des flocs accompagnée de la libération du matériel lié vers la phase liquide observées en présence des concentrations élevées d'érythromycine, traduisent la souffrance de la biomasse. La normalisation des chromatogrammes des EPS par gramme de biomasse dans ce cas, peut être trompeuse. Elle peut induire mathématiquement une augmentation de la surface des chromatogrammes par gramme de MES. Ceci occasionnera des ambiguïtés sur l'interprétation des chromatogrammes car on pourrait associer cette augmentation d'EPS à une augmentation de l'activité bactérienne. Pour cette raison, nous présentons dans les figures III.10 et III.11 les chromatogrammes normalisés par volume de liqueur dans le réacteur.

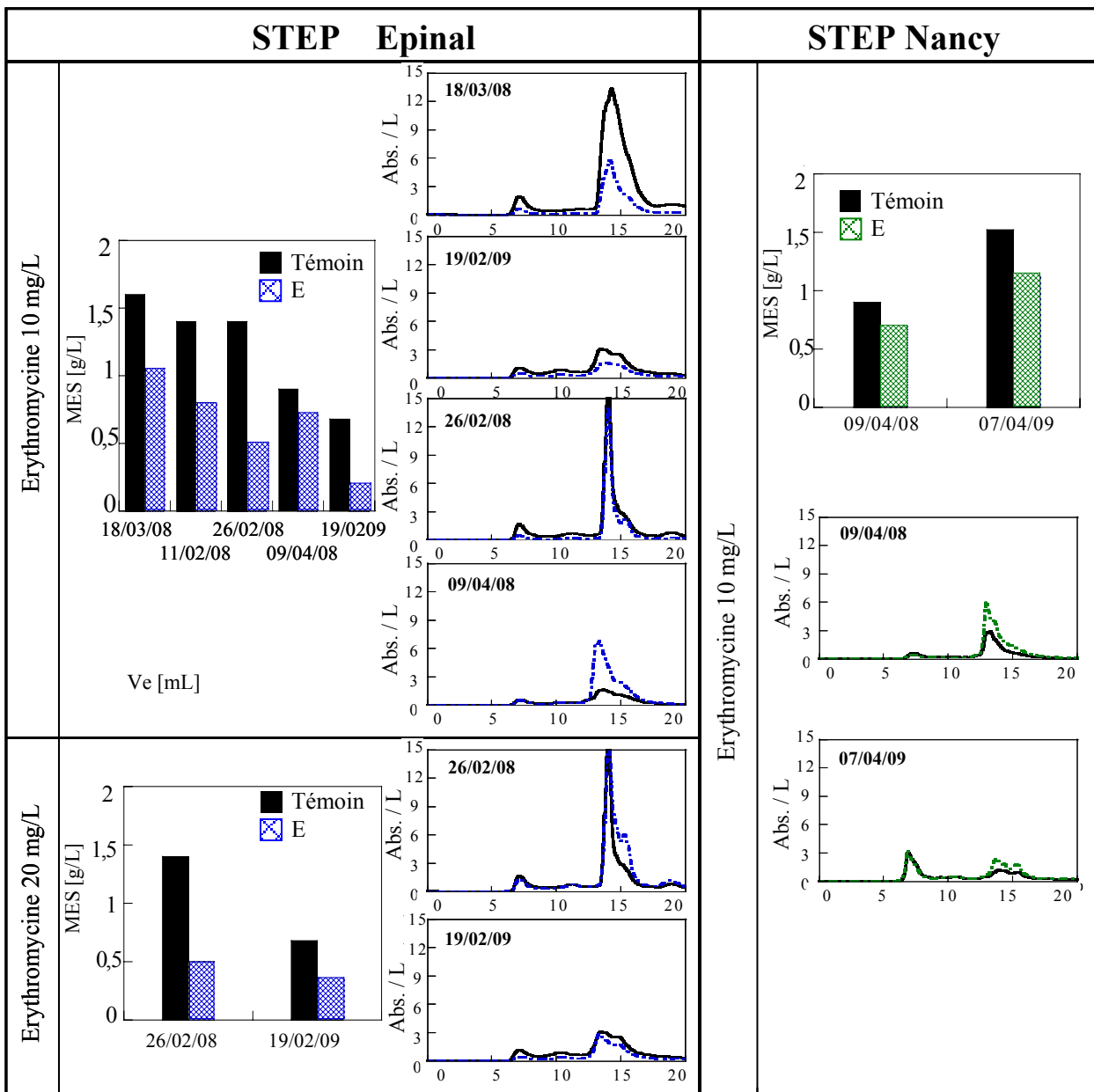


Figure III.11. Teneur en MES et chromatogrammes des EPS liés dans le réacteur témoin et dans les boues en présence d'érythromycine (E) à 10 et 20 mg/L. Culture de 24 h.

— Réacteur TémoinRéacteur avec Erythromycine

L'étude des EPS liés a permis de mettre en évidence le comportement bactérien face à l'antibiotique. Le comportement de la biomasse dépend de l'origine de la boue et donc des caractéristiques spécifiques des boues. Les caractéristiques des boues sont associées aux conditions particulières dans les procédés d'épuration, ce qui seront présentés dans la partie discussion. Dans le cas des boues d'Epinal, la formation d'EPS a diminuée significativement dans tous les domaines des concentrations de l'antibiotique (0,1 – 20 mg/L). Dans le cas de boues de Nancy, à des concentrations faibles d'érythromycine, la production des EPS n'a pas été modifiée, et à des concentrations élevées de l'antibiotique, la production des EPS a été augmentée. Les concentrations en érythromycine supérieures à 10 mg/L, ont eu un effet destructeur sur le floc de deux STEPs.

III.2.3.2.3. Impact des différents types d'Érythromycine

D'après Dujovne (1975), différents types d'érythromycine ont différents effets cytostatiques (effets toxiques avec libération des enzymes cytoplasmiques) sur les cellules microbiennes. L'érythromycine estolate et l'érythromycine cetyl sulfate ont des effets cytostatiques avec une diminution de la croissance bactérienne, tandis que l'érythromycine classique et l'érythromycine stéarate ne présentent pas ces effets. De ce fait, ces deux dernières molécules sont moins nuisibles pour les cellules. Selon ces auteurs, l'effet cytostatique pourrait être associé à l'ajout des groupes surfactants aux antibiotiques (érythromycine estolate et érythromycine cetyl sulfate) pour favoriser leur absorption gastro-intestinale.

Afin d'évaluer l'impact de différents types d'érythromycine sur la biomasse, trois molécules ont été étudiées sur les boues d'Epinal : érythromycine estolate, érythromycine stéarate et l'érythromycine classique.

La figure III.12 montre qu'au bout de 24 heures les trois espèces d'érythromycine ont provoqué pratiquement la même réponse en termes de formation d'EPS, les profils chromatographiques des EPS liés sont très proches. De plus, les expériences réalisées dans le laboratoire LRGP ont montré que ces trois composés avaient une action identique sur le procédé d'épuration (réduction du taux d'élimination de la DCO et de l'ammonium). Ainsi, l'érythromycine estolate ayant un pouvoir surfactant important, n'a pas montré d'autre effet sur l'activité de la biomasse que les deux autres types d'érythromycine. En conséquence, l'effet plus marqué de l'érythromycine estolate, présenté dans la littérature, n'a pas été mis en évidence dans nos études.

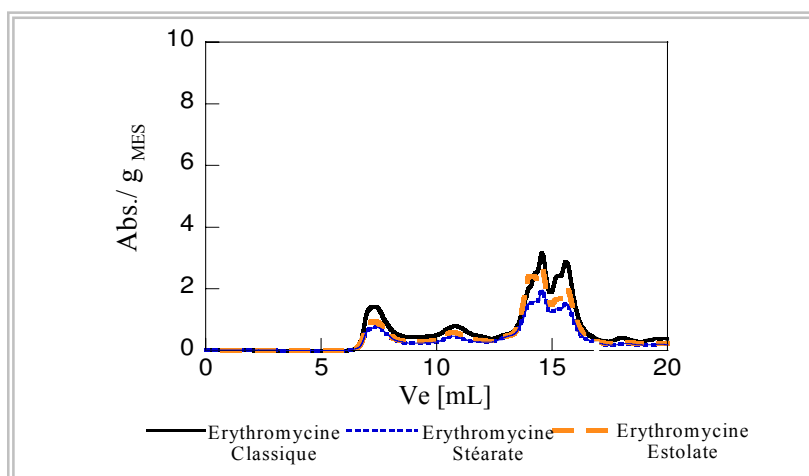


Figure III.12. Profils chromatographiques des EPS liés dans les boues obtenus en présence de trois types d'érythromycine.

III.2.3.2.4. Discussion

En fonction de l'origine des boues, nous avons observé une différence de leur comportement en présence d'érythromycine. En effet, chaque station utilise un procédé de traitement des eaux différent (voir section III.1.1) qui peut influencer le consortium bactérien et par conséquent les propriétés de la boue. Les deux stations ont été conçues pour le traitement biologique de l'azote. Cependant, à Epinal, un système à culture libres des boues activées permet le traitement de l'eau à travers l'alternance des étapes aération/anoxie. Dans ces systèmes les bactéries hétérotrophes ayant un taux de croissance plus élevé que les autotrophes, dominent les surfaces extérieures des floes (Metcalf et Eddy, 2003). Par contre, à Nancy, le traitement biologique est réalisé dans un réacteur à lit de sable fluidisé (Biolift®). Le biofilm bactérien formé sur les grains de sable est constitué de bactéries autotrophes et hétérotrophes. La nitrification qui implique une activité intense des autotrophes est assurée dans ce bassin. Une étape de traitement anoxie est prévue à la suite du réacteur Biolift® pour la dénitrification. Cette différence entre les procédés semble se refléter sur le comportement de la boue en présence d'antibiotique.

En présence de l'érythromycine, la boue d'Epinal a montré une plus faible aptitude à former des EPS comparée à celle de la boue de Nancy à des faibles concentrations de l'antibiotique de 0,1 et 1 mg/L. Cette concentration de l'antibiotique semble ne pas avoir eu d'impact sur l'intégrité des floes, ni sur les boues d'Epinal ni sur les boues de Nancy. En effet, visuellement, les floes semblent conserver leur structure sans se désagréger. La valeur de MES est restée constante. Ceci indique que pour une durée de 24 h en réacteur batch, peu de matériel lié dans les floes a été rélargé vers la phase liquide. Dans d'autres cas (concentrations plus fortes de l'antibiotique), le matériel a été libéré passant à la phase liquide, ceci accompagné par la diminution de MES et d'une quantité considérable de mousse. Louvet et al. (2010a) ont évalué, en fonction de l'origine de la boue, l'action de l'érythromycine à différentes concentrations sur l'élimination de la DCO et de l'ammonium. Nous présentons leurs résultats (figure III.13). Cette figure montre que les boues d'Epinal ont subi une importante perturbation de l'élimination de la DCO, par contre l'élimination de l'ammonium a été peu affectée. Néanmoins, le comportement de la boue de Nancy a présenté une perturbation plus importante en termes d'élimination de l'ammonium.

Pour les boues d'Epinal, la perturbation du traitement du carbone peut être probablement associée à une perturbation des bactéries hétérotrophes car elles utilisent essentiellement le carbone comme source d'énergie.

Par contre, sur les boues de Nancy, la figure III.13 montre une perte surtout de la capacité de la biomasse pour réduire l'ammonium, l'élimination de la DCO est aussi affectée mais dans une moindre mesure. L'activité des bactéries d'élimination de l'ammonium, a été perturbée par la présence de l'antibiotique. A forte concentration d'érythromycine (10 mg/L), l'inhibition de l'élimination de l'ammonium est accompagnée par une importante formation d'EPS liés (mécanisme de défense). A faibles concentrations d'érythromycine (0,1 et 1 mg/L), aucune modification appréciable a été observé ni sur la formation des EPS, ni sur l'intégrité des floccs.

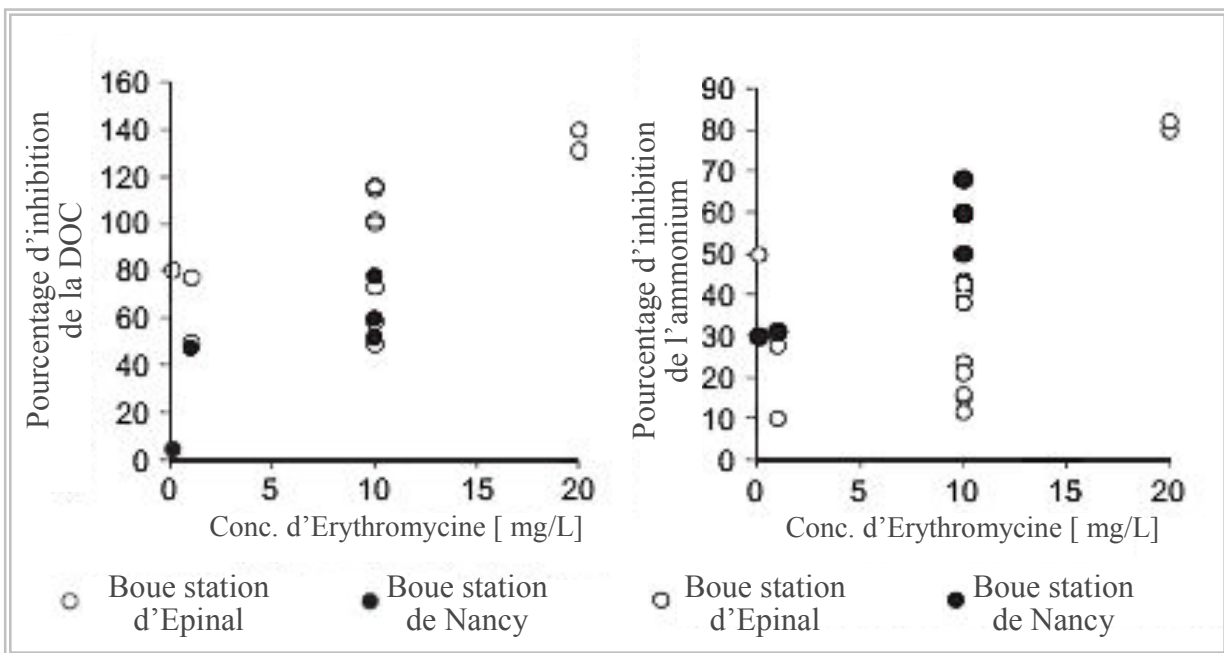


Figure III.13. Pourcentage d'inhibition du taux d'élimination de la DCO et de l'ammonium sur deux stations d'épuration des eaux domestiques : Epinal et Nancy [Repris de Louvet et al. (2010a)].

L'expérience du 09/04/08 montre un changement étonnant du comportement de la boue d'Epinal alimentée par l'eau d'entrée de Nancy, en présence de l'érythromycine. Il s'agit d'une seule expérience, néanmoins, elle peut révéler un phénomène intéressant si elle est confirmée. Ce jour, en présence d'érythromycine, la biomasse a produit une quantité significativement élevée des EPS dans les boues. Pour répondre à la question portant sur les phénomènes qui auraient pu inciter ce changement sur la production d'EPS, on peut prendre en considération les caractéristiques de la boue d'Epinal et de l'eau usée de Nancy. Pour cette expérience du 09/04/08, la boue d'Epinal au lieu d'être alimentée par l'eau usée d'Epinal (130 mg/L), a été alimentée par un effluent plus chargé en DCO celui de l'eau usée de Nancy (160 mg DCO/L). De ce fait, les microorganismes ayant une source de carbone plus abondante

pendant la durée de l'expérience, auraient des conditions favorables pour produire davantage des EPS face à la présence de l'antibiotique.

CONCLUSION

L'étude des EPS comme indicateur de l'activité bactérienne dans un environnement a apporté une meilleure compréhension du comportement de la biomasse. L'effet de l'érythromycine sur les boues provenant de deux stations d'épuration, nous a clairement montré une différence de comportement des boues. Même un phénomène isolé (celui du 09/04/08) semble être en cohérence et s'emboîte comme un morceau de puzzle dans l'image que nous avons pu acquérir sur le comportement bactérien vis-à-vis des antibiotiques.

III.3. ÉTUDE DE BOUES ACTIVÉES DES STATIONS D'ÉPURATION DE PAPETERIES

Après avoir étudié dans les chapitres précédents l'impact de la présence des produits pharmaceutiques (anticancéreux et antibiotiques) sur l'activité bactérienne, nous allons maintenant nous focaliser sur l'étude des boues des stations d'épuration avec un intérêt particulier sur leur décantation.

III.3.1. INTRODUCTION

L'activité industrielle du papier a été catégorisée par le ministère français de l'écologie comme l'une de trois premières activités industrielles les plus génératrices de déchets non dangereux en France (www.ifen.fr). L'industrie papetière utilise des quantités importantes d'eau et d'énergie. De grands volumes d'eau sont nécessaires car l'eau est le support des matières premières papetières. Elle les véhicule dans tout le circuit de fabrication et elle contribue à leur bonne répartition lors de la formation de la feuille de papier (COPACEL - Confédération française de l'industrie des papiers, cartons et celluloses, 2008). La qualité des effluents de l'industrie papetière dépend fortement du type de procédé suivi, de la qualité des matières premières et des technologies appliquées. Les eaux usées peuvent contenir des composés difficiles à dégrader par voie biologique tels que des débris de bois et des matériels solubles du bois (lignine, divers polysaccharides...). Les effluents de l'industrie papetière peuvent provoquer des effets toxiques dans l'environnement et par ailleurs, occasionner des problèmes de couleur et de perte de la qualité esthétique de l'eau du milieu récepteur (Pokhrel and Viraraghavan, 2004).

Dans le contexte français, la production de papiers et de cartons a compté, en 2008, 9420 Ktonnes. La région Lorraine est placée en deuxième position dans la production française avec 1426 Ktonnes de papier produits (COPACEL - Confédération française de l'industrie des papiers, cartons et celluloses, 2008). Cette considérable production suscite des besoins importants de traitement des effluents vu leur quantité et leur qualité.

Dans ce chapitre nous nous focalisons sur l'étude des boues avec un intérêt particulier sur leur décantation dans les stations d'épuration des papeteries. Deux sections comportent ce chapitre. La première partie concerne l'utilisation des cultures fongiques en réacteur pilote de

laboratoire pour l'amélioration du procédé de décantation. La deuxième partie présente les résultats du suivi de trois stations d'épuration de papeteries pendant plusieurs mois.

III.3.2. EFFET DU TRAITEMENT FONGIQUE SUR LA DECANTABILITÉ DES BOUES DES STATIONS D'ÉPURATION DE PAPETERIE

Après l'étude statistique menée sur trois stations d'épuration, dans cette section, nous nous sommes plus particulièrement attachés à étudier l'impact des agents fongiques sur la décantation de boues.

Incités par des améliorations de la décantation observées dans les stations d'épuration industrielles suite à l'ajout des bio-aditifs fongiques, nous avons étudié à l'échelle pilote de laboratoire, le traitement fongique des boues. Pour une meilleure compréhension du phénomène d'amélioration de la décantation, l'étude a été réalisée sur des boues qui présentent une faible qualité de décantation. Cette étude a été effectuée en collaboration avec le Département de Microbiologie de l'IUT de Nancy-Brabois. Les résultats sont présentés sous la forme d'article ci-joint soumis à *Desalination*, 2010.

Effect of fungal treatment on the settleability of the paper mill wastewater sludge

Avella A.C.^{a*}, Gorner T.^a, Chappe P.^b, Guinot–Thomas P.^b, de Donato Ph.^a

^a Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy – Université, CNRS 15 avenue du Charmois B.P. 40 ; 54501 Vandoeuvre les Nancy, France.

^b Génie Biologique Agro-Alimentaire, Nancy-Université, IUT, Le Montet, 54601 Villers les Nancy Cedex, France.

Article soumis à *Biological Control*, 2010.

Abstract

The impact of two fungi additives on sludge settling was studied in a lab scale wastewater treatment pilot. The reactor was fed with the wastewater issued from the paper mill. The fungi additives were composed of a consortium of fungi strains. Several parameters were followed: COD, sludge settling, flocs size, fungi presence and extracellular polymeric substances (EPS). The fungi treatment spectacularly enhanced the sludge settleability. The enhanced production of bound EPS by the biomass may be involved in a better cohesion of bacterial aggregates and increased floc size, resulting in better settling.

Keywords: paper mill wastewater, sludge settleability, fungi, extracellular polymeric substances.

1. Introduction

Successful biological treatment of wastewater depends on the generation and maintenance of the appropriate sludge. The sludge is a complex dynamic biological structure composed of microflora (bacterial consortium) and micro fauna (mainly protozoa and metazoa). The bacteria naturally produces the extracellular polymeric substances (EPS) which form with bivalent cations a network where microorganisms are embedded (Wingender et al., 1999).

The main components of the activated sludge are the EPS accounting from 50 % up to 90 % of the total sludge organic matter. The EPS are issued from bacteria metabolism and are considered as key components determining the physicochemical and biological properties of flocs and biofilms (Wingender et al., 1999; Flemming and Wingender 2001). They are highly hydrated biopolymers retaining a high level of water in the sludge. By binding cells and some particles together, the EPS influence the particle size distribution of the sludge, affecting the sludge settling and the sludge dewatering process. The role of EPS in the sludge was often studied, though the way they act is not clearly established and studies are sometimes controversial (review of Liu and Fang, 2003).

The settling characteristics of sludge depend on different biological, chemical and physical properties. Physical properties of sludge aggregates such as size, density, porosity, or settling velocities have an important impact on the efficiency of the solid/liquid separation. Recently, it was reported that fungal treatment significantly enhanced the separation between sludge and liquid phase. Alam and Fakhru'l-Razi (2003) found that fungi have an important impact on sludge settling and sludge dewatering. Two filamentous fungi, *Penicillium corylophilum* and *Aspergillus niger* were successfully applied for the treatment of domestic wastewater sludge. The quantity of the settleable solids was much higher in the presence of fungi species (80 % of the total solids) than in the fungi absence where the quantity of the

settleable solids was only equivalent to 5 % of total solids. Consequently, the sludge treatment using fungi species resulted in an improvement of the sludge settleability.

Over last ten years many fungal strains were studied for their ability to degrade a variety of structurally divers molecules. Paper and pulp mills, dye and textile industries and alcohol distilleries release large quantities of toxic and intensely coloured waste effluents. The most efficient microorganisms for breaking down these coloured pollutants so far reported are white-rot fungi (D'Souza et al., 2006). The ability of white-rot fungi to degrade different molecules is due to their highly efficient enzymatic system. Fungi have two types of extracellular enzymatic systems: the hydrolytic which produces hydrolases that are responsible for polysaccharides degradation and the oxidative which degrades lignin and opens phenyl rings (Sanchez, 2009). Fungi exhibit also biosorption properties responsible for significant reduction of textile effluents colour and toxicity (Prigione et al. 2008, Sakurai et al., 2001; Pokhrel et Viraraghavan, 2004). Fungi were reported also to be efficient in the nitrification (Guest and Smith, 2002).

The technologies using fungi cultures are environmentally friendly and look very promising for treatment of paper and pulp mill effluents (review of Widsten and Kandelbauer, 2008) or dye wastewaters (review of Fu and Viraraghavan, 2001). The aerated bench bioreactor with an immobilized fungal consortium was used for bioremediation of pulp and paper mill effluent (Malaviya and Rathore, 2007). An important reduction of colour, lignin and COD values was observed already within first 24 hours of reactor operation and the pollutant removal was almost completed in 4 days. The aerobic fungal packed bed bench scale reactor demonstrated extended performance for elimination of recalcitrant effluents during 3 months (Ortega-Clemente et al., 2009). The immobilized cells seem more suitable for process exploitation than freely suspended cultures (Taseli et al., 2004); a continuous packed bed reactor operated successfully for nearly two years allowed to obtain the dechlorination of pulp wastes and the removal of about 76 % of adsorbable organic halogens, 61 % of colour and 65 % of total organic carbon.

Only few scientific studies were devoted to the fungal impact on the sludge settling, dewatering and sludge volumes reduction in spite of positive effects observed on industrial scale (Nicaud O., 2008) using for example MycET® technique. Ferchichi (2009) described that between fungi and bacteria exists a symbiosis phenomenon: fungi induce the hydrolysis of large macromolecules and the smaller compounds are then easily utilised in bacteria metabolism. The aim of this study was to examine, the effect of two fungi mixtures on the settling properties of the activated sludge from a paper mill. The fungi impact was followed by measuring several biological and physicochemical parameters such as COD, EPS production, suspended solids, settled sludge volume, pH and flocs size.

2. Materials et methods

2.1. Lab scale pilot and sampling

The lab scale pilot (Delta-Lab, Grenoble, France) fed continuously by the fresh wastewater issued from WWTP was used in this study. It was composed of four glass vessels (figure 1). An anoxic reactor (30 L) equipped by helical agitation was fed by the industrial effluent issued from a paper mill plant. An aerobic reactor (45 L) received the discharge of the anoxic reactor. An air compressor delivered the air for aeration and two agitators (at the bottom and at the surface) enabled a good homogenisation and oxygenation of the sludge. The content of the aerobic reactor was continuously discharged to the clarifier (35 L). The settled sludge could be recirculated or drown off. Finally, a receptor vessel (30 L) collected treated water before the sewer. The dissolved oxygen concentration was controlled (1 - 3 mg/L); the temperature, pH and redox were measured by specific sensors in aerobic reactor.

The lab scale pilot was filled up with the activated sludge issued from a paper mill WWTP. The biomass concentration (MLVSS) was about 3 or 4 g/L respectively at the beginning of the experiments. The effect of the mixture A was studied during 3 weeks, then the reactor was cleaned and filled up with a new WWTP biomass and the B mixture was added. Nutrients (NH_4^+ 25 %: 4.5 mL/day and phosphoric acid 75 %: 1 mL/day) were supplied to the biomass. The industrial wastewater, introduced continuously to the pilot, was assessed for the total flora on Plate Count Agar (PCA) and moulds and yeasts were numerated on Chloramphenicol Glucose Agar (CGA). The total flora was constant about 10^6 microorganisms/mL and fungal flora varied from non detected up to 10^5 fungi/mL.



Figure 1. Lab scale pilot used for the fungal treatment of wastewater from the paper mill

2.2. Fungi cultures

Two fungi mixtures A and B (liquid concentrates) were prepared from different filamentous fungi (*Geotrichum sp*, *Trichoderma sp*, *Aspergillus sp* and *Mucor sp*). These fungi had been chosen due to their ability to hydrolyse starch and cellulose which are two main compounds in waste paper mill effluents (Botton et al., 1985).

The mixtures A and B varied in fungi strains and in their concentrations. In the mixture A, the fungi concentration was around 2×10^3 fungi/mL (*Geotrichum* : 2×10^2 fungi/mL *Mucor* and *Trichoderma* : 10^3 /mL for each fungi). In the mixture B, the fungi concentration was higher than in A, and reached $1,0 \times 10^5$ fungi/mL (*Aspergillus* and *Geotrichum* were at concentrations between 10^4 /mL and 10^5 fungi/mL respectively, and *Trichoderma* reached 10^4 fungi/mL).

The mixture A or B, was introduced into the aerated reactor at the beginning of each experiment (50 mL the first day and 5 mL/day during the first three days). The fungi presence in the initial mixtures A and B and during the experiment in the biological reactor was followed by usual biological techniques. The chloramphenicol glucose agar was used for enumeration and yeast malt agar for cultures. Chloramphenicol inhibits the bacteria growth

giving a specific response for fungi count. Every enumeration was realised in duplicate or triplicate on Petri dishes.

2.3. Sludge sampling and characterization

The sludge was sampled in the aerobic reactor and the sludge properties were analysed following the standard methods (APHA et al., 2005): mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS) and mixed liquor suspended solids (MLSS) by 2540 G method and the settled sludge volume (SSV) was determined by 2710 C method. The conductivity was measured by the Conductimeter type CD 810 (Tacussel Electronique) and pH by the pH-meter type PHM210 (Tacussel Electronique, Radiometer Copenhagen).

The COD concentration of the pilot outlet water was measured by the UV-Vis spectroscopic method using the commercial kit Nanocolor® COD 300 and COD 1500 (Macherey Nagel, France).

The floc size distribution of activated sludge was measured by particle size analyser (Malvern Mastersizer S) equipped with 2 mW He-Ne laser (the range of 0.05 – 900 μm). From 5 to 10 mL of sampled sludge were taken and the own supernatant of each sample was used as a liquid phase. This suspension was continuously recycled at a constant rate through the sample cell of instrument with a peristaltic pump.

For EPS analysis, the sampled sludge was centrifuged during 15 min at 4500 g to separate the biomass (settled pellets) from the supernatant. The analysis of soluble matter was performed by direct injection of the sludge's supernatant on the size exclusion column (Zorbax 250 series GF-250, 25 cm x 9.4 mm, Agilent Technologies, France) thermostated at 25 °C and calibrated by proteins and polysaccharides standards as described elsewhere (Avella et al. 2010). The bound EPS were extracted from the sludge pellets before chromatographic analysis according to Frolund et al., (1996) protocol with modification: extraction time of 4 h instead of 1 h. The EPS concentrations were expressed in arbitrary units: the chromatogram area were divided per gram of organic matter (measured by MLVSS).

3. Results

Two oxygen concentrations within the range of 1-3 mg/L were tested in both experiments for each fungi mixture. No significant influence of oxygen was observed neither on microbial development nor on physico-chemical properties of activated sludge or treated water. The COD follow-up (results not shown here) indicated that whatever was the fungi additive and during both periods of experiments the COD removal was constant of about 87 – 88 %. The pH values of about 7.7 and conductivity (0.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$) remained also constant.

The fungi *Aspergillus*, *Geotrichum* and *Trichoderma* have been used in this study because of their high enzymes production, much more important than that of bacteria. *Mucor* is not known for its enzyme action, however it grows very well and is always present in the papermill wastewater, in the air as biocontamination and in commercial bioadditives. Therefore we have decided to include it in the mixture A.

Figure 2 shows the fungi evolution in the reactor over time. The fungi growth was more important with the mixture B than with the mixture A. This can be related to a higher initial fungi concentration in B additive. It can be easily noticed that *Mucor* was found in the reactor mixed liquor during the experiment with B mixture in spite of the fact that *Mucor* was not included in B mixture. This shows that *Mucor* was naturally present in the laboratory air and it was introduced in the reactor by a natural inoculation. It can be observed on figure 2 that the mixture A had a latency time of about 12 days. After this adaptation period the fungi growth reached during 2 days the maximum of 1000 fungi /mL. Then the fungi concentration decreased continuously down to the detection limit was attained (< 10 fungi/mL) the 22nd day.

The B mixture had the latency time of 9 days, slightly shorter than with A additive. The period of intensive growth was extended significantly up to 10 days, followed by a rapid decay and non detected fungi presence the 23rd day. In both experiments, *Mucor* and *Trichoderma* strains were more frequently present and at a higher concentrations (up to 10000 fungi/mL) than *Aspergillus* and *Geotrichum* attaining lesser contents (≤ 300 fungi/mL and only a single value of 1000 fungi/mL).

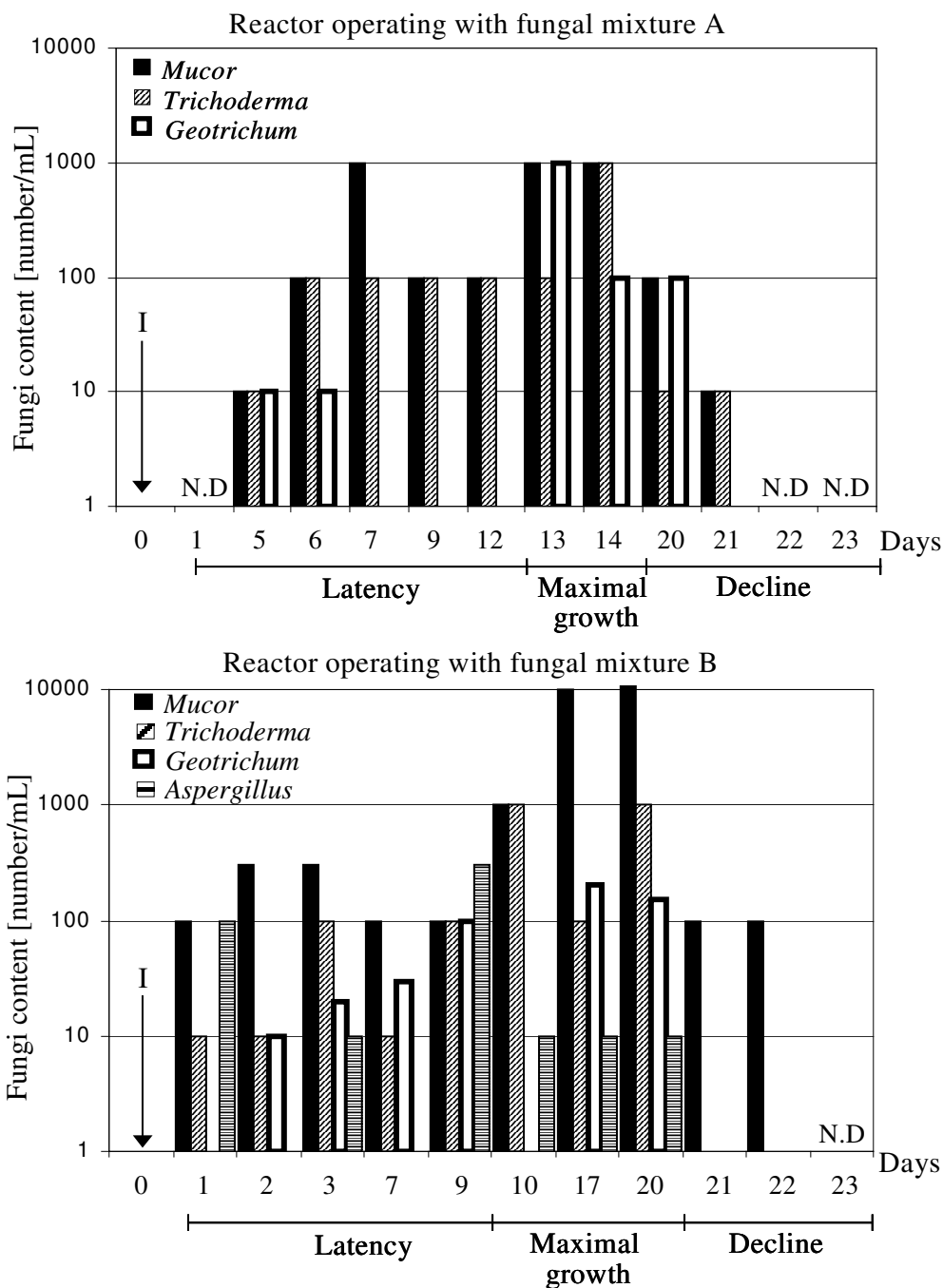


Figure 2. Fungi evolution (number of fungi/ mL) over reactor running time. I. Inoculation. N.D: non detected

The fungi analysis showed that whatever was the additive, fungi disappeared about 20 days after inoculation. The fungi survival was limited, however it is necessary to notice that the sludge biomass continued the pollutant degradation. The COD removal was maintained of 87- 88 % and the settling properties were successfully improved as described below.

It is well known that fungi are acidophiles and psychrotrophe species requiring for their development pH of 5-6 and the temperature between 15-20 °C (Kavanagh, 2005). The usual pH values in the paper mill WWTP wherefrom the sludge and wastewater were issued are usually of about 8 and the temperatures within 30-35 °C. The fungi were able to adapt themselves to conditions in our pilot (pH 7.7 and the temperature of 25 °C) however only for a limited period. Therefore a continuous fungi supply would be necessary in an industrial scale application.

Settling properties

Our main objective was to follow the fungi effect on the sludge settling. The parameter considered for measuring the settling properties was the settled sludge volume (SSV) instead of sludge volume index (SVI) to avoid masking poor settling by a high biomass content. The SSV values and the MLSS content were followed-up during the experiment and are summarized in figure 3. The sludge settling improved spectacularly whatever was the additive A or B especially after 20 days. The SSV values (figure 3a) decreased from 1000 mL (mixture A) and from 760 mL (mixture B) to about 200 mL.

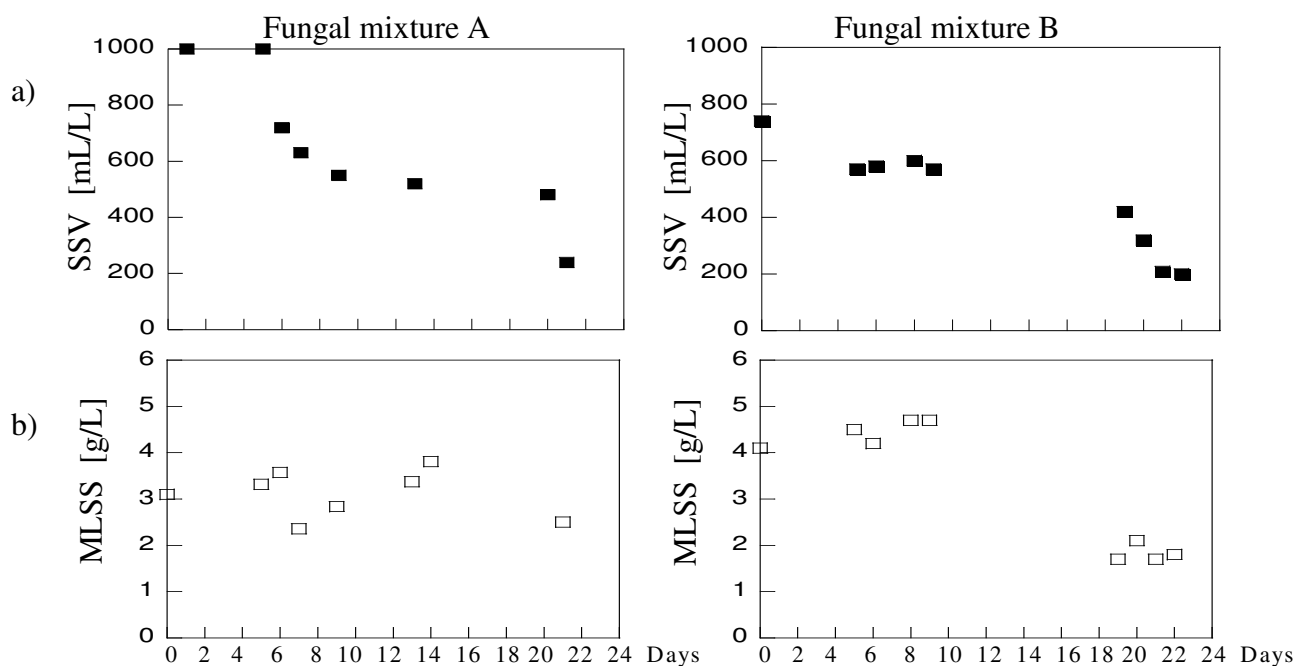


Figure 3. Evolution of a) settled sludge volume (SSV), b) mixed liquor suspended solids (MLSS) over the reactor running time in experiments with fungi mixture A and B.

The EPS increased (figure 4) in both experiments over the operation time. It is interesting to note that at the end of the second experiment an important EPS production per gram of biomass was observed in spite of biomass decrease (assessed as MLVSS, figure 3b).

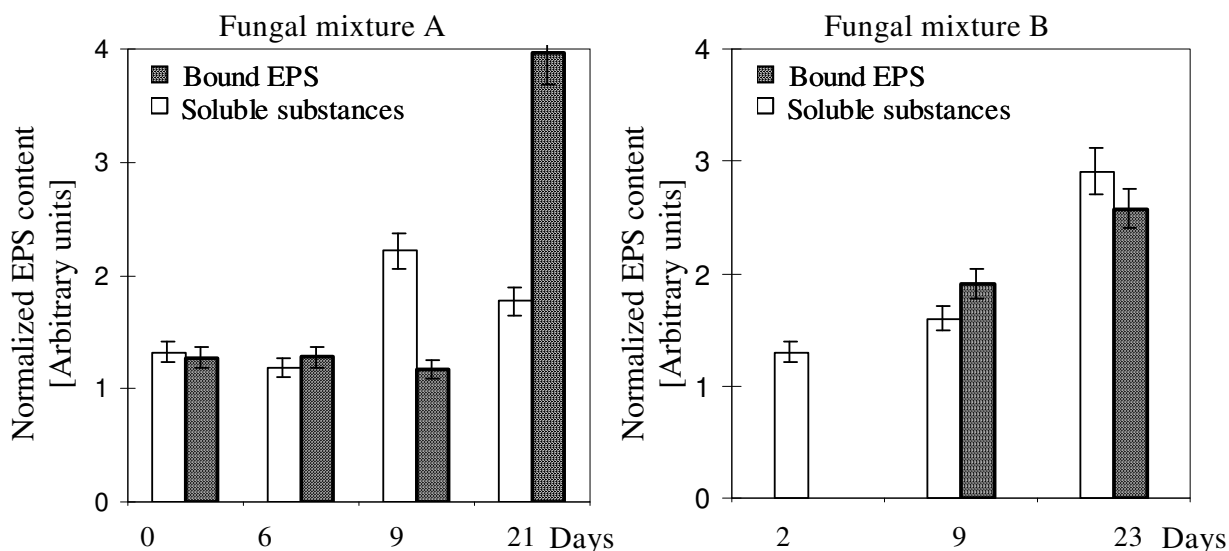


Figure 4. Evolution of soluble substances and bound EPS content normalized per gram of MLVSS over the reactor running time in experiments with fungi mixture A and B.

The chromatograms of EPS normalized by gram of organic matter (MLVSS) in the sludge can be used to follow the biomass activity. A typical chromatogram of soluble matter and bound EPS is shown in figure 5. The number and position of peaks give information about the size distribution of EPS macromolecules and the peak area about the EPS content. The EPS contained large macromolecules (peaks 1 and 2) and smaller polymers (peak 3). Each peak can correspond to an individual polymer molecule or to a mixture of various chemical species (Garnier et al. 2005). Therefore peak calibration was performed (as usually in size exclusion chromatography) by protein and by polysaccharides standards, the most important EPS species. During both experiments, the shape of EPS chromatograms (number of peaks and relative proportion of peak areas) remained identical in the time and whatever was the fungi additive. It means that the fungi presence did not affect the size distribution of EPS polymers, only the chromatogram area (representing the total EPS amount) increased over time (figure 4).

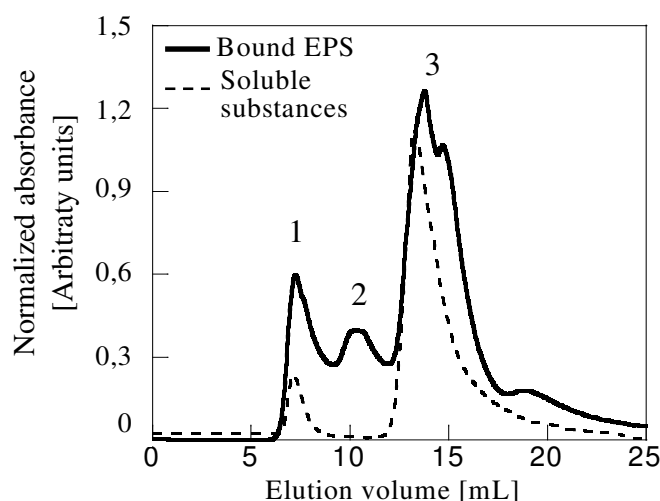


Fig. 5. A typical chromatogram of soluble and bound EPS and corresponding macromolecular sizes according to protein or polysaccharide calibration:

Peak N°1: corresponding to proteins > 670 kDa or polysaccharides ~ 212 kDa

Peak N°2: corresponding to proteins ~ 44,3 kDa or polysaccharides ~ 11,8 kDa

Peak N°3: corresponding to proteins ~ 5,7 kDa or polysaccharides ~ 0,18 kDa

4. Discussion

Fungi, similarly to bacteria, produce also EPS, consisting of a wide variety of macromolecules, depending on microenvironmental conditions. These EPS have a protection role. Several authors (Papinutti, 2010; Aguilera et al., 2008) observed that in hostile conditions (desiccation, pH, heavy metal presence) when the number of fungi cells decreased, the total amount of EPS was enhanced. In our case, the conditions in pilot reactor (pH and temperature) were not optimal for fungi as mentioned above. The enhanced EPS production can be attributed to the fungi stress (followed by fungi death) or it can be issued also from bacterial metabolism. It is not possible to distinguish the fungi and bacteria EPS contributions. It can be only noted that the fungi-bacteria consortium produced more EPS involved probably in a better flocs structuration. The floc sizes measured at the beginning after the fungi inoculation and at the end of both experiments were modified significantly: from around 30 μm up to 60 μm in the first experiment with A mixture and from 70 μm to 110 μm in the second experiment with B mixture.

In this study the fungi treatment improved spectacularly the sludge settling properties. It is difficult to assert if it was due to the observed increased amount of EPS that actually can be involved in a better cohesion of sludge particles making more dense aggregates. According to Alam and Fakhru'l-Razi (2003), filamentous fungal strains immobilize/entrap the solid particles of sludge by their proper growth. They compress them by formation of mycelial pellets resulting in higher diameter of flocs with better settling. In our bioreactor, a good settling was observed about 20 days after fungi inoculation, however at that moment practically no living fungi were found (figure 2). Yet the dead fungal filaments might contribute to the floc structure and compact it. It is very probable, that both phenomena, a higher EPS content and the filamentous fungi structure would contribute to build dense, well settling aggregates.

5. Conclusion

The fungal additives composed of a consortium of fungi strains affected spectacularly the sludge settleability: the SSV values decreased from about 1000 ml/L to about 200 ml/L, after 20 days of fungi presence. The enhanced settling can be correlated with an enhanced EPS production by the biomass. The EPS involved in the floc structure could contribute to form more compact floc and increased floc size resulting in a better settleability. The fungi stress due to the paper mill wastewater characteristics (pH above 7 and temperature above 25 °C) might be at origin of the increased EPS content in the sludge. However further studies are necessary to understand better the mechanism of a very positive concomitant fungi-bacteria effect on the sludge settling.

References:

- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., Martín-Uriz, P.S., Amils, R., 2008. Extracellular matrix assembly in extreme acidic eukaryotic biofilms and their possible implications in heavy metal adsorption. *Aquatic Toxicology* 88 (4), 257-266.
- Alam, M.Z., Fakhru'l-Razi, A., 2003. Enhanced settleability and dewaterability of fungal treated domestic wastewater sludge by liquid state bioconversion process. *Water Research* 37, 1118-1124.
- APHA-American Public Health Association, AWWA-American Water Works Association, WEF-Water Environment Federation, 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21st Ed. Washington, D.C., USA.
- Avella, A.C., Delgado, L.F., Görner, T., Albasi, C., Galmiche, M., de Donato, Ph., 2010. Effect of cytostatic drug presence on extracellular polymeric substances formation in municipal wastewater treated by membrane bioreactor. *Bioresource Technology* 101 (2), 518-526.
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Guy, Ph., Larpent, J., Veau, P., 1985. *Biotechnologies : Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*. Masson. ISBN 2-225-80535-0.

- D'Souza, T.D., Tiwari, R., Sah, A., Raghukumar, C., 2006. Enhanced production of laccase by marine fungus during treatment of collared effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 504-511.
- Ferchichi, M., 2009. Colloque du CTP, Arjo-Wiggins, Arches, France, 17-18 June 2009.
- Flemming, H.C., Wingender, J., 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPS). In: *Extracellular polymeric substances the construction material of biofilms*. *Water Science and Technology* 43 (6), 1-8.
- Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.* 30 (8), 1749-1758.
- Fu, Y., Viraraghavan, T., 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology* 79, 251-262.
- Garnier, Ch., Görner, T., Lartiges, B.S., Abdelouhab, S., de Donato, Ph., 2005. Characterization of activated sludge exopolymers from various origins : A combined size-exclusion chromatography and infrared microscopy study. *Water Research* 13, 3044-3054.
- Guest, R., Smith, D., 2002. A potential new role for fungi in a wastewater MBR biological nitrogen reduction system. *J. Environ. Eng. Sci.* 1, 433-437.
- Kavanagh, K. (Ed), 2005. *Fungi: Biology and applications*. John Wiley and sons. UK.
- Liu, Y., Fang, H., 2003. Influences of extracellular Polymeric substances (EPS) on flocculation, settling and dewatering of activated sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 33 (3), 237-273.
- Malaviya, P., Rathore V.S., 2007. Bioremediation of pulp and paper mill effluent by a novel fungal consortium isolated from polluted soil. *Bioresource Technology* 98, 3647-3651.
- Nicaud, O., 2008. Réduction des boues par le procédé MycET: retour d'expérience sur la station d'épuration de Brieve. In : *Conference abstract: SLUDGE 2008*, Anger, France.
- Ortega-Clemente, A., Caffarel-Mendez, S., Ponce-Noyola, M.T., Barrera-Cortes, J., Poggi-Varaldo, H.M., 2009. Fungal post-treatment of pulp mill effluents for the removal of recalcitrant pollutants. *Bioresource Technology* 100, 1885-1894.
- Papinutti, L., 2010. Effets of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *Bioresource Technology* 101, 1941-1946.
- Pokhrel, D., Viraraghavan, T., 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater – review. *Science of the total environment* 333 (1-3), 37-58.
- Prigione, V., Tigrini, V., Pezzella, C., Anastasi, A., Sannia, G., Varesse, G.C., 2008. Decolourisation and detoxification of textile effluents by fungal biosorption. *Water Research* 42 (12), 2911-2920.
- Sakurai, A., Yamamoto, T., Makabe, A., Kinoshita, S., Sakakibara, M., 2001. Removal of lignin in a liquid system by an isolated fungus. *J Chem Technol Biotechnol.* 77, 9-14.
- Sanchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27(2), 185-194.
- Taseli, B.K., Gökçay, C.F., Taseli, H., 2004. Upflow column reactor design for dechlorination of chlorinated pulping wastes by *Penicillium camemberti*. *Journal of Environmental Management* 72, 175-179.
- Widsten, P., Kandelbauer, A., 2008. Laccase applications in the forest product industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 293-307.
- Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H-C. *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Berlin: Springer 1999

III.3.3. APPLICATION DES MÉTHODES STATISTIQUES ET ANALYSE DES BOUES ACTIVÉES POUR UNE MEILLEURE COMPREHENSION ET DIAGNOSTIC DE TROIS STATIONS D'ÉPURATION DES EAUX USÉES

Des nombreux paramètres technologiques sont quotidiennement enregistrés dans les stations d'épuration. Ils permettent de contrôler la qualité du traitement le long du procédé et la qualité de l'effluent traité. Toutefois, quasiment aucun traitement statistique pouvant permettre d'établir des inter-corrélations entre toutes ces données, n'est appliqué. Il nous est alors apparu opportun d'explorer cette voie. Nous nous sommes intéressés à l'analyse de la base de données car elle renseigne sur les caractéristiques propres à chaque système de traitement. Dans ce chapitre, nous allons présenter l'exploitation statistique des milliers de données issues du procédé de traitement de trois stations d'épuration de papeteries. L'étude des EPS a fourni des informations complémentaires pour une meilleure compréhension du fonctionnement de trois stations. Les trois stations étudiées appelées, pour des raisons de confidentialité, A, B et C, ont des caractéristiques particulières, bien que les trois utilisent le procédé à boues activées. Cette étude est présentée sous la forme d'article soumis à *Water Research*, 2010.

La station d'épuration A traite autour de 13000 m³/j d'eau. Le bassin d'aération et le clarificateur sont intégrés dans la même installation. Il s'agit d'un bassin circulaire à 2 anneaux, l'anneau extérieur correspond au bassin d'aération et celui de l'intérieur au clarificateur. La station B est un cas d'étude intéressant car elle comporte 2 lignes de traitement aérobique qui fonctionnent en parallèle. Les deux lignes sont alimentées par la même eau polluée mais chacune des lignes a ses propres caractéristiques, y compris l'ajout des nutriments. Le bassin de forme rectangulaire (ligne 1) traite autour de 9000 m³/j d'eau, l'aération du bassin est réalisée par des aérateurs de surface tandis que le bassin de forme circulaire (ligne 2) traite autour de 11000 m³/j d'eau et l'aération est assurée par des diffuseurs à fines bulles. Les effluents de deux lignes n'ont pas les mêmes caractéristiques. Enfin, la station C traite autour de 5000 m³/j d'eau, sa particularité est qu'elle comporte un bassin anoxie préalable au bassin d'aération afin de favoriser la dénitrification.

Notre travail a porté sur ces trois stations de papeteries car dans la station A, la décantation était toujours excellente ; dans la station B était systématiquement médiocre avec des différences entre les deux lignes ; et finalement dans la station C, la décantation était aussi systématiquement mauvaise.

Activated sludge analysis by statistical methods for a better understanding and diagnosis of three wastewater treatment plants

Avella A.C.¹, Görner T.¹, Yvon J.¹, Chappe P.², Guinot-Thomas P.², de Donato Ph.¹

¹Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy-Université, LEM UMR CNRS INPL 7569, 15 avenue du Charmois, 54500 Vandœuvre-les-Nancy, France.

²Génie Biologique Agro-Alimentaire, Nancy-Université, IUT, Le Montet, 54601 Villers-les-Nancy Cedex, France.

Article soumis à *Water Research*, 2010.

Abstract

Biological wastewater treatment plants (WWTP) are complex systems to assess. Many parameters are recorded in WWTP to monitor and control the treatment process, providing huge amounts of registered data. Multivariate statistical projection methods named Principal Components Analysis (PCA) together with multiple partial linear regression were used here to diagnose and describe the treatment process of three paper mill WWTPs. Further, the physico-chemical characterization of sludge was performed. The sludge study included analysis of extra-cellular polymeric substances by size exclusion chromatography, and the internal structure of sludge flocs was observed by confocal laser scanning microscopy. The statistical and physico-chemical investigations showed that the sludge settling depended on a combination of various factors resulting from biological activity and operational conditions that were different and specific for each WWTP. This dual approach allowed to draw up a diagnosis of each WWTP running over several months.

Keywords: multivariate statistical analysis, extra-cellular polymeric substances (EPS), activated sludge characterization, sludge settling.

1. Introduction

Many different processes happen simultaneously in biological - wastewater treatment plants (WWTP) leading to the difficulty of the understanding of the whole system. Physical operations are grouped together with chemical and biological processes to remove wastewater pollution. Moreover, the nature of influents continuously changes with time, leading to an important variability of the system. The global process itself evolves over time and biomass must adapt to different conditions. Therefore, several parameters should be recorded in WWTP to monitor the performance of the process over time, in order to detect any special events and to control the effluent quality. The huge amount of registered data requires proper techniques to extract useful information.

Multivariate statistical analysis methods such as Principal Components Analysis (PCA) and Partial Least Squares (PLS) are frequently used to analyse quite large database of quantitative variables/observations and to compress them in order to extract relevant information (Aguado and Rosen, 2008; Kourti *et al.*, 1996). These methods provide a diagnosis of the process from the relationships among measured data and use them to build empirical models for estimating one or more properties of the system (Wise and Gallagher, 1996).

Kourti *et al.*, (1995) presented industrial databases analysis based on PCA and PLS methods. They recognized that statistical methods are promising techniques for industrial applications because these methods treat data in a truly multivariate manner. However, few applications can be found concerning wastewater treatment plants. Statistical methods were used by Morad *et al.*, (2007) in biological wastewater treatment processes to identify the strictly necessary parameters measured in the process. It has been shown that among 22 parameters only 12 should be measured and the remaining 10 can be calculated using linear relationships. Mujunen *et al.*, (1998) used PLS method with cross-validation to describe effluent quality parameters in activated sludge WWTPs. Diluted sludge volume index (DSVI), chemical oxygen demand (COD) reduction and total nitrogen concentration variations could be explained by more than 65 % as functions of some process parameters. In an activated sludge sequencing batch reactor Ng *et al.* (2000) proposed a step by step approach for the identification of the pertinent measured parameters influencing the sludge volume index (SVI). Among four different types of regressions they reported that the best model for SVI was a 2nd degree polynomial equation.

In this study, the wastewater treatment process was assessed by statistical methods and related to the activated sludge characteristics and biological metabolism. The sludge is a complex dynamic biological structure composed of micro flora (microbial consortia) and micro fauna (mainly protozoa and metazoa). The activated sludge process is based on the aerobic biodegradation of organic matter by an active microbial population in an aggregated form. The population naturally produces the extra-cellular polymeric substances (EPS) which form with bivalent cations a network where microorganisms are embedded. Shedding of cell surface material, cell lysis and adsorption from the environment are also sources of EPS. The EPS keep the microbial aggregates together with adsorbed pollutants, nutrients and minerals in a three dimensional matrix (Wingender J. *et al.*, 1999) and determine the physicochemical and biological properties of biofilms. They are the main sludge components and principally responsible for the structural and functional integrity of sludge in WWTP. The EPS are composed of up to 75 - 90 % of polysaccharide and protein and of small amounts of lipids, DNA and RNA (Wingender *et al.*, 1999). They can be present as pure or mixed components with various functional groups and their molecular sizes can range from a few hundred to several hundred thousand daltons (Garnier *et al.*, 2005).

The role of EPS in the sludge was often studied, though the way they act is not yet clearly established and studies are sometimes controversial (Liu and Fang, 2003). Nevertheless, it is known that EPS play an important role in several stages of the wastewater treatment process: from sludge flocculation and settling to sludge dewatering.

Frequent disturbances in wastewater treatment are damageable to the process due to the direct impact on bacterial activity. For example the presence of toxic chemicals can lead to bacteria stress and treatment process deterioration such as deflocculation (Bott and Love, 2002) or membrane fouling by excessively produced EPS (Avella *et al.*, 2010).

This paper presents how the huge amount of data recorded in a WWTP was used to describe the functioning of the treatment process at given technologic conditions. The sludge analysis performed in our laboratory allowed to bring complementary informations, mainly about EPS for a better understanding of the process. We were especially interested in sludge settling properties. Three paper mill WWTPs applying the activated sludge treatment, but with different technologies and loads, were followed over several months. The recorded data compilation was studied by two statistical methods: the PCA and the multiple partial linear regression in order to extract the pertinent information. Firstly, PCA was used to characterize each WWTP by identification of their own relationships among measured data. After that, the multiple regression enabled the building of empirical description of effluent quality parameters by numerical expressions as functions of the parameters measured in the process. The sludge study included analysis of soluble and bound EPS by size exclusion

chromatography and analysis of protein and polysaccharide concentration by UV-Vis spectroscopy.

2. Materials and methods

2.1. Monitoring of WWTP parameters

The three paper mill WWTPs (WWTP-A, WWTP-B and WWTP-C) use activated sludge process however applying different technologies. The influent quality and the number of monitored parameters were also different in each WWTP. The recorded parameters are listed in table 1.

Table 1. Measured parameters in different WWTPs.

Process stage	WWTP-A	WWTP-B	WWTP-C
Influent	Flow [m ³ /d] MLSS [mg/L]	Flow [m ³ /d] MLSS [mg/L] COD [mg/L] BOD ₅ [mg/L]	Flow [m ³ /d] MLSS [mg/L] COD [mg/L]
Inlet to secondary treatment	COD [mg/L] MLSS [mg/L]	Flow [m ³ /d] MLSS [mg/L] COD [mg/L] BOD ₅ [mg/L] TKN-N [mg/L] Total phosphorus [mg P/L]	MLSS [mg/L] COD [mg/L]
Secondary treatment	pH Temperature [°C] NO ₃ ⁻ [mg/L] NH ₃ -N [mg/L] PO ₄ ⁻³ [mg/L] MLVSS [mg/L] SSV [mL/L]	MLVSS [mg/L] Recycle sludge flow [m ³ /d] Recycle sludge MLVSS [mg/L]	MLVSS [mg/L] Recycle sludge MLVSS [mg/L] DO [mg/L] SSV [mL/L]
Effluent	MLSS [mg/L]	Flow [m ³ /d] MLSS [mg/L] COD [mg/L]	MLSS [mg/L] COD [mg/L] Temperature [°C]

Settled sludge volume (SSV); mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS); mixed liquor suspended solids (MLSS); total kjeldahl nitrogen (TKN-N); dissolved oxygen concentration (DO).

2.2. Multivariate statistical analysis

Two statistical methods were applied to WWTP database:

- Principal Component Analysis (PCA) by Pearson's coefficient (linear combinations) (Mackiewicz and Ratajczak, 1993), and
- Multiple regression. Multiple regressions were restricted to linear or polynomial expressions of 2nd degree. For all calculations, the software XLSTAT (Addinssoft Company) was used.

2.3. Physico-chemical analysis of activated sludge

2.3.1. Sampling

Activated sludge samples were collected in aeration tanks of three WWTPs. The soluble fraction and the bound fraction of the sludge were studied. The activated sludge was centrifuged (15 min at 4500 g) to separate the biomass (settled pellets) from the supernatant. The soluble matter present in the supernatants was directly analysed by chromatography for total polymeric substances content and by classical UV-Vis method for protein and polysaccharide concentration. The settled biomass was submitted, before analysis, to EPS extraction.

2.3.2. Activated sludge properties

The standard methods (APHA *et al.*, 2005) were used for sludge characterisation: the mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS), the mixed liquor suspended solids (MLSS) and fixed solids were measured by 2540 G method, the settled sludge volume (SSV) and the sludge volume index (SVI) were determined by 2710 C and 2710 D methods.

Floc size distribution was measured by a Malvern Mastersizer S particle size analyser which enables the measurement of particles within the range of 0.05 – 900 μm by Fraunhofer diffusion of 630 nm light. The own supernatant of each sample was used as a liquid phase and from 5 to 10 mL of sampled sludge was used for measurement. This suspension was continuously recycled at a constant rate through the measurement cell with a peristaltic pump.

2.3.3. Optical analysis by confocal microscopy

20 mL of sludge was put in a test tube. After few hours of settling, the sludge was fixed by 2.5 % glutaraldehyde (v/v) during 4 h and then stored at 4 °C. Before microscopic analysis, the sludge was soaked in acridine orange buffered solution (22 μM acridine orange, 5 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.1 M phosphate-citrate buffer pH 6; Sigma-Aldrich) for 20 min at room temperature then the sludge was washed three times with ultra pure water to remove dye excess. The acridine orange dye stains bacteria nucleic acid and extra-cellular polymeric substances (Wirtanen *et al.*, 2001): green DNA stains were associated to cells and orange stains were obtained by the association with hydrophobic links of extra-cellular polymeric substances.

The characterization of 3D sludge structure was performed by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). The inverted light microscope (NIKON TE 2000 U) was equipped with a confocal head (Radiance 2100 Rainbow, Biorad). A Nikon CFI Plan Fluor Apo 20 X (NA 0.7 WD 1 mm) was used to explore sludge samples. Excitation beams at 457 and 488 nm were provided by a 4 lines argon ion laser. The following signals were separated and collected: (1) green fluorescence emission of cell DNA was recorded in the frequencies range of 530 – 560 nm (excitation at 488 nm), (2) fluorescence emission of EPS was detected over 600 nm (excitation at 547 nm), and (3) backscattered diffuse reflectance in the range of 480-490 nm was used for imaging reflecting matter (e.g. particles). For each channel (i.e. frequencies range), Z-series images (512 x 512 pixel²) at a resolution of 0.674 μm per pixels and a vertical resolution up to 2.23 μm were carried out using LaserSharp2000TM software (Bio-Rad cell science division).

Prior to quantitative image analysis, deconvolution of three-dimensional image stacks was applied to mitigate the distortion created by microscope optics and to enhance automatic detection of the edges of a structure. 3D captured fluorescence images were processed using the AutoQuant X v1.4.1 (MediaCybernetics) software. The Point Spread Function (PSF) was computed for each fluorescence frequencies range (n=3) and the Z-series images were restored independently. Representing images from all WWTP sludges were binarized using MacBiophotonics ImageJ software (NIH, Bethesda, Maryland, USA) in order to quantify

respective contribution of cells, EPS and reflecting matters in sludge flocs. The region of greatest contrast between the empty space surrounding the floc and the fluorescing or reflecting matter was defined to be the structure edge. Applied to Z-series images, this analysis generated automatically a binary mask for each floc components. The results are presented in percentage of the contribution of disjointed components to the total sludge floc surface. The Z-projection of each channel stacks was also considered.

2.3.4. EPS analysis

Two types of samples were analysed, as described later: *i*) the EPS bound in the flocs and *ii*) the soluble matter. Bound EPS were obtained after EPS extraction which was performed according to Frolund *et al.*, (1996) with modification: extraction time of 4 h instead of 1 h.

High pressure size exclusion chromatography analysis

Soluble substances and extracted EPS were analysed by high pressure size exclusion chromatography (HPSEC) to estimate the molecular sizes of the present chemical species. The area of peaks can be considered in approximation as representative of EPS concentration. The separation of EPS samples was carried out on a Hewlett Packard 1100 series chromatograph. A Zorbax Bio series column (GF-250, 25 cm x 9.4 mm, Agilent Technologies, France) with thermostatic control at 25 °C. The chromatographic column elution volumes V_e were calibrated by the main EPS constituents: protein and polysaccharide. The calibration was carried out by the standard polysaccharides and standard proteins as described elsewhere (Avella *et al.*, 2010).

Total protein and total polysaccharide analysis by UV-Vis spectroscopy

For a total protein (PR) and total polysaccharide (PS) content, the classical UV-Vis spectroscopy methods were applied. Protein determination was carried out with the total protein Kit; Micro Lowry® (Lowry *et al.*, 1951) with Peterson's modification (Sigma-Aldrich, France) using bovine serum albumin as a standard for calibration from 20 to 200 mg/L, absorbance was measured at 750 nm. Polysaccharides were determined according to the classical Dubois protocol (Dubois *et al.*, 1956) at 485 nm, calibration was done with glucose for concentrations ranging from 10 to 100 mg/L. All samples were measured in duplicate.

3. Results

3.1. Multivariate statistical analysis

3.1.1. Principal Component Analysis (PCA)

All parameters measured over several months in WWTPs were used for analysis by PCA (Lebart *et al.*, 1979). PCA is a projection method which allows to analyse the correlations among variables visualised in a correlation circle. Only variables far from the biplot center are well statistically explained in the system and were considered here. The variables that are close to each other are in normal correlation, those related to others by a 180° rotation are inversely correlated, whereas the variables related by a 90° rotation are independent. The variables close to the center are independent of the well explained variables. The correlations were calculated according to the Pearson and Spearman coefficients. As two methods provided similar results, Pearson's coefficient was retained for the data analysis.

In order to remove outlying data, we have examined the distribution of observations (measured variables at different dates) in a two-dimensional map. This approach enables to identify global data trend. The data selected in this way, were analysed by applying principal

component analysis to determine the correlations among variables. The three first PCs axes were considered in this study, whereas we presented here (figure 1) only the first two axis (PC1 & PC2) which explain the highest variability of the data.

Because all variables measured in each WWTP were intentionally used for analysis, the explained variability obtained by the two axes (PC1 & PC2) were relatively reduced. Despite this fact, we presented here the general tendency of the data. This tendency was verified by applying partial linear regression among variables and by analysing the third axis (PC1 & PC3) of correlations (not presented here). The last third axe provided an additional explanation of data up to 12 %. Only correlations showing a significant coefficient according to the level of significance were retained. In figure 1, one correlation circle is presented for WWTP A and C; and two correlation circles for WWTP-B. The WWTP B has two process lines working in parallel and each line was analysed independently.

The parameter considered in this analysis for describing the settling properties was the settled sludge volume (SSV) instead of the sludge volume index (SVI) to avoid masking the poor settling by a high biomass content.

WWTP-A.

The following positive correlations can be seen in WWTP-A (figure 1):

- Inlet MLSS to the aeration tank (variable 4) was correlated with inlet COD (variable 3): This means that, the most important oxygen consumer in the inlet of aeration tank was MLSS (rather than soluble matter).
- Biomass in the aeration tank (MLVSS, variable 10) was correlated with settled sludge volume (SSV, variable 12). This is a normal, expected relationship: the biomass has a settling ability and the biomass increase enhances the settled sludge volume.

Inverse correlations were also found:

- Biomass (MLVSS, variable 10) and settled sludge volume (SSV, variable 12) were inversely correlated to NO_3^- concentration in the aeration tank (variable 7): an increase in biomass and in SSV occurred simultaneously with a decrease in NO_3^- concentration. This indicates the balance between nitrification and denitrification processes. Some conditions could promote the nitrification process in WWTP-A: *i*) the longer sludge retention time (50 ± 15 days) which would allow an adequate growth of nitrifying bacteria, *ii*) sufficient concentration of dissolved oxygen in the aeration tank and *iii*) probably a complete BOD_5 mineralization. It is known that denitrifying bacteria growth rate is higher than nitrifying, which would explain the biomass and SSV increase when the denitrifying process happens.

Independence between some variables was also observed:

- Inlet COD to the aeration tank (variable 3) was independent of phosphate concentration (variable 9 expressed as PO_4^{-3}) in the tank: the phosphates fluctuations were not correlated with those of the inlet COD.

WWTP-B.

The results will be presented in two sections: firstly, the common relationships found in both process lines; secondly, the particular characteristics of each line. The common relationships are:

- The suspended solids of influent (MLSS, variable 2) were positively correlated with influent COD (variable 3) which indicates, as in the previous plant, an important O_2 consumption by MLSS in the influent. Since the influent MLSS was not correlated with influent BOD_5 (variable 4), an important fraction of MLSS was assigned as non biodegradable.
- Inlet COD (variable 7) to the aeration tank was positively correlated with COD effluent (variable 16). This means that COD removal was limited (partial removal): a fraction of inlet COD that was not removed in biological treatment was found in the effluent. In

association with the previously described relations, this persistent matter would correspond to the non biodegradable fraction.

- An increase in the influent BOD₅ to WWTP (variable 4) was related to an increase in inlet BOD₅ to the aeration tank (variable 8). This normal, expected relationship showed a partial BOD₅ removal in primary treatment (primary clarifier and pH equalization tank).
- Inlet BOD₅ to the aeration tank (variable 8) and biomass concentration (MLVSS, variable 11) were related together: the biomass seemed to use the inlet biodegradable carbon as a principal energy source. This led to think that the major biological reaction was the BOD mineralization while ammonium transformation played a minor role in the biological process.
- Inlet TKN-N to aeration tank (variable 9) and inlet P (variable 10) were positively correlated. It was probably related to the nutrients addition.

Independence relation was observed:

- The biomass (MLVSS, variable 11) and inlet COD to the aeration tank (variable 7) were independent. That suggests that a significant fraction of COD was non biodegradable matter and did not contribute to bacteria growth. As seen previously, the biomass was mainly sustained by inlet BOD₅ content.

The two process lines were supplied by inlet wastewater of identical quality and used the activated sludge process. However the inlet flows were different in two lines because the geometry and volumes of the two aeration tanks differed. More over the aeration systems were different (turbine aerators in line 1, while submerged diffused air in line 2). The particular characteristics of each line were as follows:

- Biomass content in aeration tank and sludge purge were higher in line 1 than in line 2 (biomass₁ > biomass₂ and sludge purge flow₁ > sludge purge flow₂)
- MLSS in returned activated sludge was higher in line 2 than in line 1 (MLSS_{return 2} > MLSS_{return 1})

That led to a sludge accumulation in the second clarifier which seems to influence the solid/liquid separation: the line 2 provided a better quality effluent: lower MLSS and COD than in line 1.

The explanation of this phenomenon can be attributed to the important sludge column formed in the second clarifier that stimulated the flocs interaction/attraction. This argument is supported also by statistical analysis where effluent MLSS (variable 15) and COD (variable 16) were positively correlated in line 1 (effluent MLSS contributes significantly to COD). In the line 2 the effluent MLSS (variable 15) and COD (variable 16) were independent. As mentioned above, the presence of a high sludge column in line 2 created conditions that breakdown the relation MLSS-COD (MLSS were better aggregated and were retained with better efficiency probably by physical interactions). Consequently, thus the output effluent was of better quality.

WWTP-C.

It is necessary to note that very important fluctuations of recorded measured values were observed in WWTP-C and it was not possible to describe the process using one year of recorded data. Therefore, analysis presented here was performed only on a three months database (from May to July). Figure 1c shows the following positive correlations:

- MLSS and COD evolved together along the treatment process. It was the case in WWTP influent (MLSS-variable 2 and COD-variable 3) and also in the effluent (variables 11 and 12). However, the fluctuations of MLSS in the effluent of WWTP-C (variable 11) cannot be explained by those in the influent (variable 2) because influent MLSS and effluent MLSS were independent for the same day measurements. The same independence can be observed for COD. This could be explained by either *i*) the

biomass coped with the inlet fluctuations thus the effects on effluent were not observed at the same day, or *ii*) the influent MLSS and COD were removed in the process but their presence in effluent had other origins.

- The biomass in aeration tank (MLVSS, variable 6) evolved with inlet COD and inlet MLSS which is revealed by a correlation. That means that suspended organic matter present in the inlet wastewater was involved in the biomass growth.
- Biomass (variable 6) seemed to influence MLSS effluent (variable 11), they are positively correlated. Biomass was probably not completely retained in the clarifier and some release would contribute to MLSS in the effluent. Moreover, the biomass showed a normal, expected relationship with the recycled sludge (MLSS, variable 7) and with the dissolved settled sludge volume (DSSV, variable 10).

3.1.2. Multiple regression

Once the correlations among parameters were established, it was possible to describe by numerical expressions: the settled sludge volume (related to settling quality), and the effluent MLSS and COD (related to effluent quality). Considering the complexity and the multiple contributions of various parameters, only simple types of regressions were examined: linear and polynomial expressions of 2nd degree. The accuracy of numerical expressions to describe the parameters was estimated by the regression coefficient R^2 relating the estimated values to the measured ones.

WWTP-A.

A linear expression based on 12 process variables (not shown), leads to describe 80 % of SSV variance. However it is interesting to notice that only two variables contribute to 70 % of SSV explication (figure 2a). In expression (1), the PO_4^{-3} concentration has an important influence on settling: an increase in PO_4^{-3} was involved in the decrease of SSV, signifying a better settling performance. Actually, in WWTP-A, an external addition of H_3PO_4 into the aeration tank (to reach a PO_4^{-3} concentration from 0.5 to 2 mg/L) seemed to improve the sludge settling.

$$SSV = -42 + 0.2 \times MLVSS - 10 \times C_{PO_4^{-3}} \quad (1)$$

Figure 2 (a) shows the evolution over time of the measured SSV and the calculated SSV (following eq 1). A good accuracy is obtained by the expression (1): the calculated values follow the same tendency of the measured values.

MLSS in the effluent could be described neither by linear nor by polynomial expression of 2nd degree. Indeed, MLSS (variable 11 in correlation circle) was not well defined by PCA method since its projection was close to the centre; it means that others parameters, not measured in the process, clearly affected it.

WWTP-B.

SSV values were not recorded in WWTP-B. Thus, regressions will be focussed on parameters that measure the effluent quality. The numerical description differs for the two process lines: the first line seems to be more simple to describe (Eq. 2 and 3) than the second line (Eq. 4 and 5); just a linear expression provides an acceptable description. Among twelve parameters measured in the process, we selected the most significant parameters according to the coefficient of correlation R^2 to explain the MLSS and COD in the effluent. We considered that the regression coefficients R^2 of about 0.5 - 0.6 (figure 2b and 2c) were acceptable to describe the multivariate system where the parameters have individual and multiple impacts on the biological process and on the effluent quality.

Line 1:

$$\text{MLSS}_{\text{effluent}} = 42.3 + 1 \times 10^{-3} \text{flow}_{\text{influent}} - 0.03 \text{BOD}_{5 \text{influent}} + 6.7 \times 10^{-3} \text{flow}_{\text{biological inlet}} - 1.8 \times 10^{-2} \text{COD}_{\text{biological inlet}} - 4.8 \times 10^{-3} \text{MLVSS}_{\text{recycle}} \quad (2)$$

$$\text{COD}_{\text{effluent}} = 121.7 + 8.4 \times 10^{-3} \text{MLSS}_{\text{influent}} - 6 \times 10^{-2} \text{BOD}_{5 \text{influent}} + 9.3 \times 10^{-3} \text{flow}_{\text{biological inlet}} + 4.5 \times 10^{-2} \text{COD}_{\text{biological inlet}} - 6.2 \times 10^{-3} \text{MLVSS}_{\text{recycle}} \quad (3)$$

Line 2:

$$\begin{aligned} \text{MLSS}_{\text{effluent}} = & 70 + 0.016 \text{BOD}_{5 \text{influent}} + 1.2 \times 10^{-2} \text{COD}_{\text{biological inlet}} - 1.2 \times 10^{-2} \text{BOD}_{5 \text{biological inlet}} \\ & - 0.7 \text{TKN}_{\text{biological inlet}} - 2.5 \times 10^{-2} \text{MLVSS}_{\text{biological tank}} + 6.6 \times 10^{-6} \text{BOD}_{5 \text{influent}}^2 - 6.3 \times 10^{-6} \text{COD}_{\text{biological inlet}}^2 \\ & - 2.8 \times 10^{-5} \text{BOD}_{5 \text{biological inlet}}^2 + 2.3 \times 10^{-2} \text{TKN}_{\text{biological inlet}}^2 + 2.7 \times 10^{-6} \text{MLVSS}_{\text{biological tank}}^2 \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \text{COD}_{\text{effluent}} = & 194 + 2.2 \times 10^{-2} \text{COD}_{\text{influent}} + 0.5 \text{COD}_{\text{biological inlet}} - 0.2 \text{MLVSS}_{\text{biological tank}} \\ & + 0.29 \text{flow}_{\text{MLVSS recycle}} - 1.9 \times 10^{-6} \text{COD}_{\text{influent}}^2 - 1.9 \times 10^{-4} \text{COD}_{\text{biological inlet}}^2 \\ & + 2.3 \times 10^{-5} \text{MLVSS}_{\text{biological tank}}^2 - 3.5 \times 10^{-4} \text{flow}_{\text{MLVSS recycle}}^2 \end{aligned} \quad (5)$$

The accuracy of the calculated MLSS and COD values (following Eq. 2, 3, 4 and 5) and the measured values is presented in figure 2b and 2c for each process line. As shown in the figure, the equations described satisfactory the variables variations over time.

WWTP-C.

The numerical descriptions of the sludge settling and of effluent quality parameters were rather complex in WWTP-C; neither linear nor polynomial expressions were satisfactory. Acceptable regression coefficients R^2 ($R^2 \sim 0.5$) were obtained, only when including all measured parameters which does not have any practical interest. The choice of relevant parameters was not possible due probably to the high multiple dependency of the system or to the lack of the relevant measured parameters.

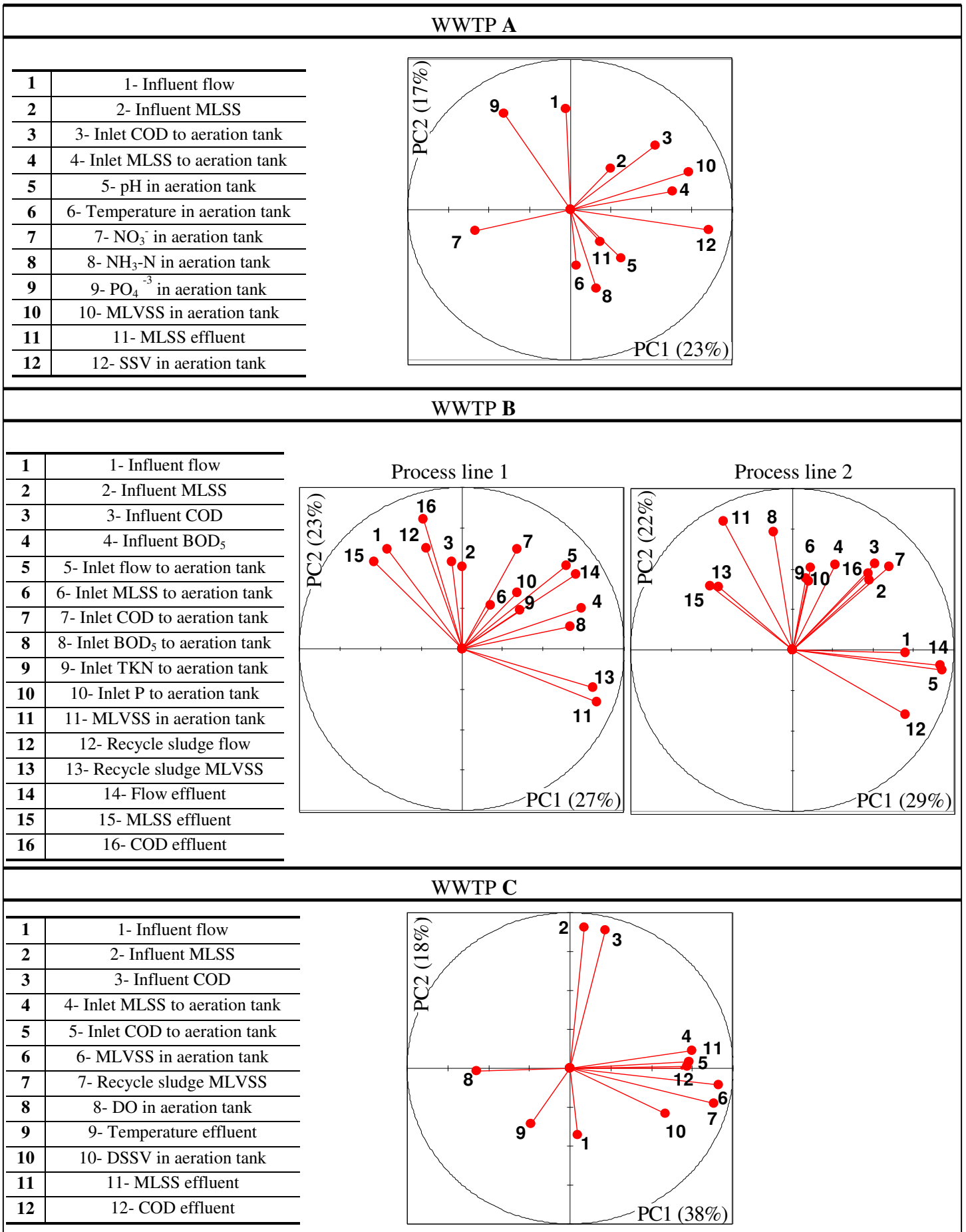


Figure 1. Correlation circles of measured parameters in WWTPs obtained by PCA (PC1 & PC2).

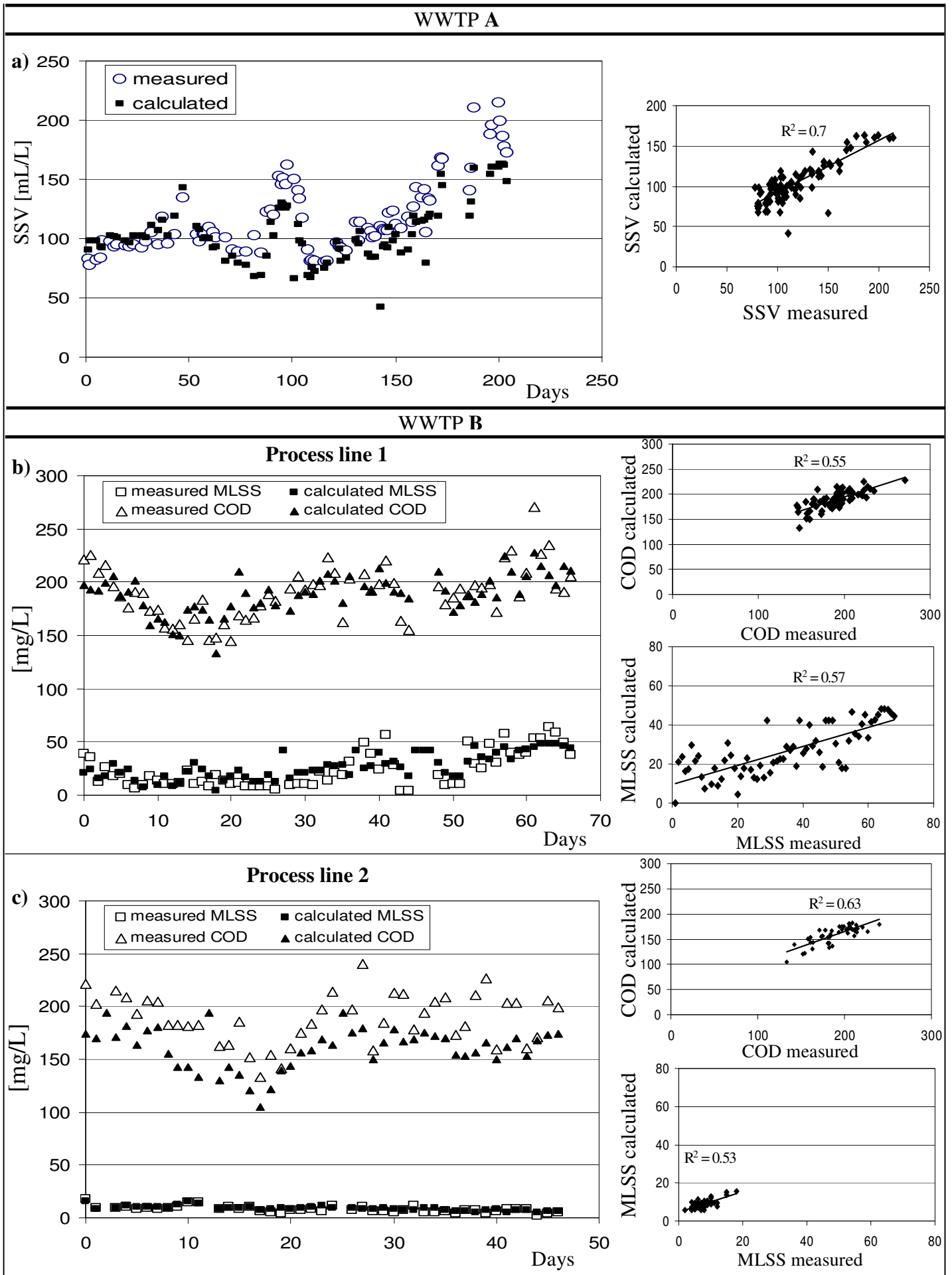


Figure 2. Evolution over time of the measured variables and of the calculated variables. Relationship between measured and calculated variables. a) WWTP-A, b) and c) WWTP-B.

3.2. Physico-chemical analysis of activated sludge

3.2.1. Settling properties

The settling properties of activated sludge sampled in the three WWTPs were evaluated. Figure 3 (a, b, c and d) presents SSV and SVI measures. The SSV was taken as a better indicator describing the sludge settleability than SVI where bad settling can be masked by an important amount of biomass. The SSV values were systematically smaller than 200 mL/L, indicating a good settling in WWTP-A while rather a poor settling was observed in WWTP B and C (SSV~800 mL/L).

Considering the floc size distribution, the mean floc size was taken into account (Fig. 3). Except WWTP-B line 2 (floc size 60-100 μm), the mean floc sizes were similar for other activated sludge sources (close to 50 μm). Therefore, no relation with settling properties could be established. The statistical analysis indicated above a better retention of MLSS in line 2. It can be due to physico-chemical attraction forces generated by the sludge column in clarifier WWTP-B which could explain the larger floc size in this line (in spite of lower biomass content compared to line 1).

3.2.2. Optical analysis of the sludge by confocal microscopy

Representative structures of all specimens of activated sludge are in figure 3 (e, f, g and h). The image analysis method described above, was used to map sludge components for multiple flocs. The contributions of cells, biopolymers and reflective matter (associated with mineral matter) to floc structure were then quantified and plotted. Histograms presented the results in terms of percentage of each contribution to the total floc surface. This percentage corresponds to the minimum value because it was assumed for calculation that components are disjointed (no elements in common). To assess the reproducibility the quantification was performed at three levels of image stacks (top, middle and bottom) and on the Z-projection image. Whatever was the approach, results exhibited a similar tendency. The results were remarkably consistent relative to origin of sludge. A great attention has been paid to reproducible preparation and image acquisition.

Activated sludge from WWTP-A appears to have well defined structure (figure 3 e) compared to two other WWTPs. Moreover, the contribution of floc components (cells, EPS and reflective matter) was very different in different sludge sources. The ratio of EPS (displaying hydrophobic features) to cells was more important in the sludge from WWTP-A ($r = 4.5$) compared to the sludge from other sources (in WWTP-B = 0.1 - 0.2 and in WWTP-C = 0.4). It is necessary to notice that in WWTP-A, the cell contribution in flocs was slight. That indicates a high bacterial activity because a small quantity of cells attained a significant EPS production. The EPS matrix seems to contribute to the floc aggregates structure and to better settling properties. The high cell proportion in WWTP B and C related with a lower EPS content indicate a low bacterial activity.

The analysis of the reflective matter contribution to the sludge structure showed that in WWTP-A the reflective matter (associated with mineral matter) was involved in the shape structure of flocs following the sludge silhouette, whereas in the two other plants reflective matter was scattered.

3.2.3. EPS analysis

To have more information about bacterial activity, the EPS bound in the flocs and the soluble EPS in the bulk solution were analysed. The chromatography analysis and the protein and polysaccharide quantification results presented in this section were normalized per gram of biomass.

Bound EPS. Whatever was the WWTP, the chromatograms of bound EPS (figure 3 i, j, k and l) present a profile with three different peaks. The molecular weight of each peak correspond as follows: the peak N° 1: PS ~ 788000 Da and PR ~ 700000 Da; the peak N° 2: PS ~ 11800 Da and PR ~ 44300 Da; and the peak N°3: PS ~ 180 Da and PR: 5700 Da). It can be seen that the EPS concentration was much higher in WWTP-A compared to B and C plants. The same phenomenon was observed also by confocal microscopy analysis.

Total protein and polysaccharide analysis showed that, with the exception of WWTP-C, proteins were more predominant in bound EPS. In the WWTP-C, this general tendency was reversed and polysaccharide content was slightly higher than that of protein.

Soluble matter. The chromatographic profiles of soluble matter were simpler than those of bound EPS (not shown here). All chromatograms showed a single peak corresponding to the same group of oligomers corresponding to about PS ~ 180 Da and PR: 5700 Da (results not shown here). The concentration of soluble matter was slightly higher in WWTP-A than in B and C plants.

Total protein and polysaccharide analysis showed also that only in WWTP-C the contribution of polysaccharide was higher than that of protein, as was observed in bound fraction.

4. Discussion

The multivariate system of paper mill WWTP is affected by variations in quantity and in quality of wastewater, involving different types of virgin and recycled fibres and sometimes also materials from processed wood such as starch, cellulose and lignin. Moreover several chemicals such as dyes, coating materials or preservatives (Thompson *et al.*, 2001) are included in the production process. Finally the wastewater treatment must comply with all changes in production operational conditions.

In this complex context, our combined approach of statistical analysis of recorded technologic data and physico-chemical characterization of the sludge and of the effluent provides an interesting tool for a better understanding of phenomena occurring in a WWTP. The numerical description of the parameters of interest (sludge settling and effluent quality) had a practical objective to understand why the three paper mill WWTPs using the activated sludge process had different performances (always good settling in the WWTP A and almost systematically poor settling in the WWTP C). The differences of effluent quality in line 1 and line 2 (in WWTP B), yet supplied with the same wastewater quality presented a real scientific challenge to understand it.

A good settling process performance in WWTP-A was likely related to the following factors:

- 1) A significant EPS production by gram of biomass seems to be involved in a good settling. Similar findings were described by Sponza (2003), they reported that the quantity of EPS in the sludge had a significant positive correlation with good settling. Moreover, not only the quantity but also the quality of EPS and the availability of cations (Ca^{+2} and Mg^{+2}) to bind the EPS together affect the flocculating ability of flocs (Wilén *et al.*, 2003). Liao *et al.*, (2001) indicate that EPS concentration should not be excessive. It can induce a stronger electrostatic repulsion between negatively charged floc components, which contributes to a settling deterioration as described by the DLVO theory (Zita and Hermansson, 1994). In the WWTP-A studied here, the high EPS concentration seems to be within an optimum range. It remained practically constant per gram of biomass during all seasons.

2) The nitrification process occurring in the aeration tank could improve also the settling characteristics. According to Hartley (2008), the nitrification-denitrification process would govern the sludge settling ability; the best results of settling coinciding with the best nitrogen removal; using effluent anoxic fraction based on solids retention time, the author proposed a simple and successful empirical model describing SVI behaviour. Our results corroborate the effect of nitrification process on sludge settling. We observed that the NO_3^- concentration in the aeration tank appeared as the third influential variable in settled sludge volume regression (equation not shown here).

3) Phosphate content in the aeration tank enhanced also the sludge settling ability. PO_4^{3-} is one of the two main parameters in the multivariate system affecting settled sludge volume (equation I). Richard and Cummins (1997) studied pulp and paper mill activated sludge plants and observed that the stress resulting from low phosphorus concentrations produced bulking caused by *N. limicola III*. It was reported (Schuler and Jang, 2007) that the biomass density increased with polyphosphate content providing a better settling ability. Our results showed the same phenomenon: the increase of phosphate content in the biological tank enhanced the sludge settling. The phosphate role as a biological nutrient is likely involved in the more important production of the EPS. As a result a more structured flocs exhibited better settling.

Some interesting points about WWTP-B are worth discussing in spite of poor sludge settleability. The most remarkable aspect was the excessive biomass quantity in the aeration tanks 1 and 2 (high MLVSS values compared to A and C plants). It was seen that the biomass used the organic matter (measured by BOD) as its exclusive energy source for growth. This fact was reflected in the floc structure with high amount of cells scattered in smaller units. This suggests that carbonaceous mineralization (BOD removal) occurs without other parallel nutrient removal: nitrification seemed not be reached even when the sludge retention time was around 40 days. In addition, it appears that the significant fraction of non biodegradable matter in the influent does not seem toxic (probably hardly degradable lignine) and therefore it did not impact the biomass behaviour (often the presence of toxics is accompanied by a high EPS production (Aquino and Stuckey, 2004; Avella *et al.*, 2010) which was not observed here). Moreover, the content of fixed solids (mineral matter) represented about of 25 % of the sludge. A very low EPS production, with hydrophobic patterns was observed in WWTP B. Urbain *et al.*, (1993) reported that intrafloc hydrophobic EPS interactions enhanced the sludge settling.

The particularity of the WWTP-C was that the ratio of EPS species protein/polysaccharide was inversed. Contrarily to others plants, in WWTP-C the polysaccharide-type EPS were dominant compared to the protein-type in both bound and soluble matter. Several factors could be the source of this behaviour: according to Liu and Fang (2003) bacteria tend to convert the nutrients excess into polysaccharide-type EPS at low sludge retention time. Indeed, in the WWTP C, the sludge retention time was < 3 days. Liao *et al.*, (2001) reported also that a short sludge retention time led to a decrease of sludge hydrophobicity resulting in a poor sludge flocculation with presence of a high amount of pin flocs.

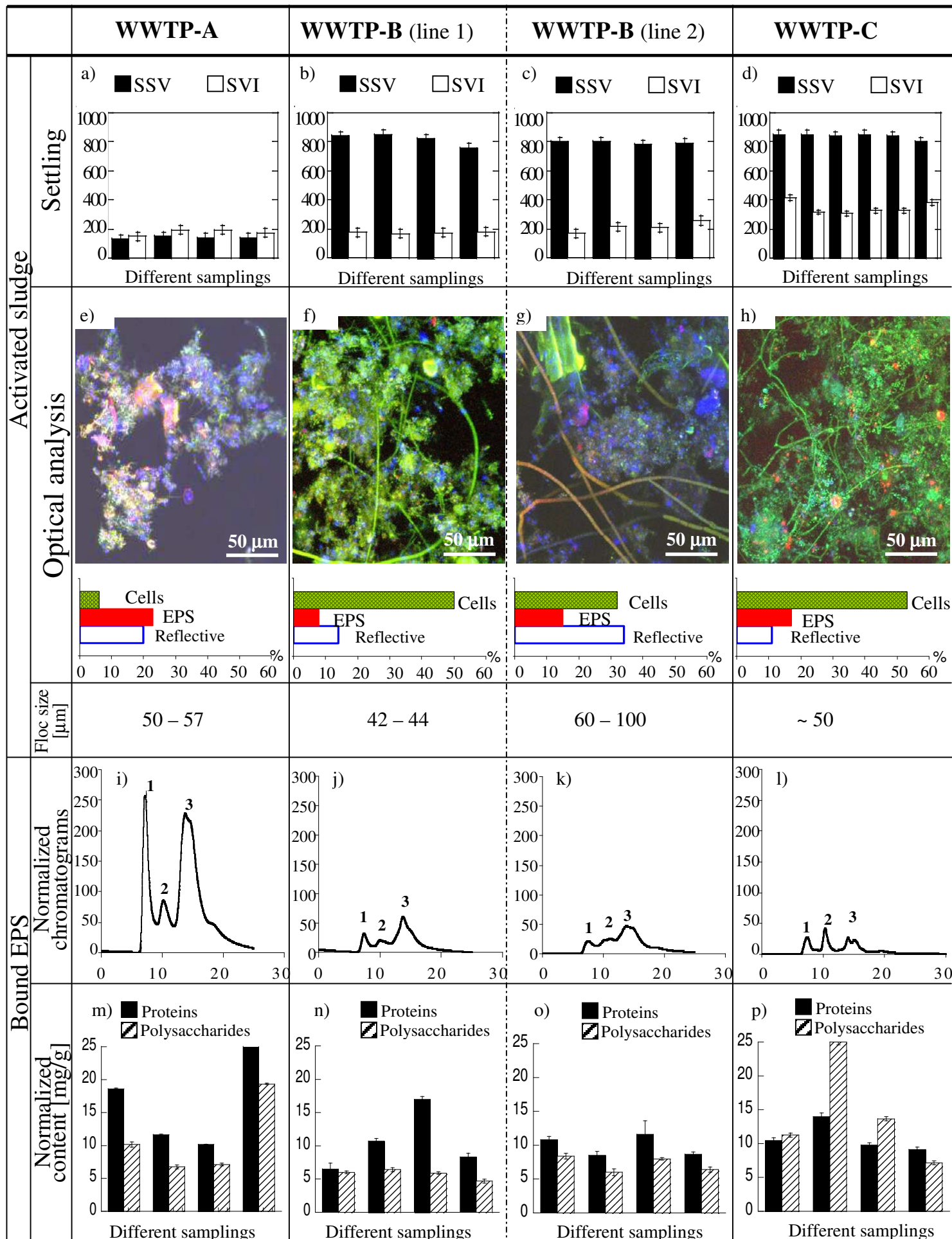


Figure 3. Analysis of activated sludge and extra-cellular polymeric substances characteristics.

5. Conclusion

The diagnosis of the wastewater treatment process of three paper mill WWTPs was performed through a combined approach: by multivariate statistical analysis of recorded database of technological data and by physico-chemical analysis of the sludge. We took into account the bacterial behaviour, especially the EPS production which is not frequently studied in industrial WWTP. A good sludge settling and good effluent quality depend on biological activity and operational conditions. In the case of WWTP-A, the important EPS production with hydrophobic patterns, the impact of diversified microbial biota provided by nitrification process and the role of phosphates led together to more structural flocs improving the sludge settleability. In the WWTP B line 2, the operation conditions (higher sludge column) led to a better retention of solid particles.

Besides the understanding of phenomena in a WWTP which was our main objective, the numerical description of the sludge settling and effluents quality in terms of SSV and of MLSS and COD by simple empirical expressions could serve as a first approach for modelling the wastewater treatment process in studied WWTPs.

Acknowledgement

The authors thank C. Mustin (LIMOS UMR 7137, Nancy University) for helpful advice on image analysis and its technical contribution to the CLSM acquisition of 3D fluorescence data.

References

- Aguado, D., Rosen, C., 2008. Multivariate statistical monitoring of continuous wastewater treatment plants. *Engineering applications of artificial intelligence* 21 (7), 1080-1091.
- APHA-American Public Health Association, AWWA-American Water Works Association, WEF-Water Environment Federation, 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21st Ed. Washington, D.C., USA.
- Aquino, S., Stuckey, D., 2004. Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research* 38 (2), 255-266.
- Avella, A.C., Delgado, L.F., Görner, T., Albasi, C., Galmiche, M., de Donato, Ph., 2010. Effect of cytostatic drug presence on extra-cellular polymeric substances formation in municipal wastewater treated by membrane bioreactor. *Bioresource Technology* 101 (2), 518-526.
- Bott, C., Love, N., 2002. Investigating a mechanistic cause for activated sludge deflocculation in response to shock loads of toxic electrophilic chemicals. *Water Environment Research* 74 (3), 306-315.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3), 350-356.
- Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extra-cellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 30 (8), 1749-1758.
- Garnier, Ch., Görner, T., Lartiges, B., Abdelouhab, S., de Donato, Ph., 2005. Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined size-exclusion chromatography and infrared microspectroscopy study. *Water Research* 39 (13), 3044-3054.
- Hartley, K.J. (2008). Controlling sludge settleability in the oxidation ditch process. *Water Research* 42 (6-7), 1459-1466.
- Kourti, T., Nomikos, P., MacGregor, J., 1995. Analysis, monitoring and fault diagnosis of batch processes using multiblock and multiway. *Journal of Process Control* 5 (4), 277-284.
- Kourti, T., Lee, J., MacGregor, J., 1996. Experiences with industrial applications of projection methods for multivariate statistical process control. *Computers & Chemical Engineering* 20, Supplement 1, S745-S750.
- Lebart, L., Morineau, A., Fénelon, J.P., 1979. *Traitement des données statistiques. Méthodes et programmes*, Dunod, Paris.
- Liao, B.Q., Allen, D.G., Droppo, I.G., Leppard, G.G., Liss S.N., 2001. Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Research* 35 (2), 339-350.

- Liu, Y., Fang, H., 2003. Influences of extra-cellular Polymeric substances (EPS) on flocculation, settling and dewatering of activated sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 33 (3), 237-273.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Mackiewicz, A., Ratajczak, W., 1993. Principal components analysis (PCA). *Computers & Geosciences* 19(3), 303-342.
- Morad, S., Shacham, M., Brenner, A., 2007. Utilization of collinearity in regression modeling of activated sludge processes. *Chemical Engineering and Processing* 46(3), 222-229.
- Mujunen, S-P., Minkkinen, P., Teppola, P., Wirkkala, R-S., 1998. Modelling of activated sludge plants treatment efficiency with PLSR: a process analytical case study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 41 (1), 83-94.
- Ng, W.J., Ong, S.L., Hossain, F., 2000. An algorithmic approach for system-specific modelling of activated sludge bulking in an SBR. *Environmental Modelling and Software* 15 (2), 199-210.
- Pere, J., Alen, R., Viikari, L., Eriksson, L., 1993. Characterization and dewatering of activated sludge from the pulp and paper industry. *Water Science and Technology* 28 (1), 193-201.
- Richard, M., Cummins, C., 1997. Results of phosphorus minimization studies for pulp and papermill activated sludge systems located around the Great Lakes. In: *Proceedings of the 1997 Environmental Conference*, vol. 2. TAPPI press, Norcross, GA, 1003-1006.
- Schuler, A., Jang, H., 2007. Causes of variable biomass density and its effects on settleability in full-scale biological wastewater treatment systems. *Environ. Sci. Technol.* 41 (5), 1675-1681.
- Sponza D.T., 2003. Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 32 (3-4), 375-385.
- Thompson, G., Swain, J., Kay, M., Forster, C.F., 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresource Technology* 77 (3), 275-286.
- Urbain, V., Block, J.C., Manem, J., 1993. Bioflocculation in activated sludge: an analytical approach. *Water Research* 27 (5), 829-838.
- Wilén, B-M., Jin, B., Lant, P., 2003. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Research* 37 (9), 2127-2139.
- Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. (eds.), 1999. *Microbial Extra-cellular Polymeric Substances*. Springer, Heidelberg.
- Wirtanen, G., Salo, S., Helander, I.M., Mattila-Sandholm, T., 2001. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 20 (1), 37-50.
- Wise, B., Gallagher, N., 1996. The process chemometrics approach to process monitoring and fault detection. *Journal of Process Control* 6 (6), 329-348.
- Zita, A., Hermansson, M., 1994. Effects of ionic strength on bacterial adhesion and stability of flocs in a wastewater activated sludge system. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (9), 3041-3048.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Depuis une centaine d'années, l'action bactérienne a été mise en œuvre pour la dépollution des eaux usées par des procédés industriels. Les conditions de plus en plus strictes imposées par le législateur sur la qualité des eaux ont conduit à une amélioration constante des procédés de traitement. Malgré ces améliorations, de nombreuses études sur les boues activées sont nécessaires car nos connaissances sur le comportement bactérien sont loin d'être suffisantes.

Les bactéries produisent par leur métabolisme les EPS qui assurent leur adaptation et leur survie dans le micro et macro environnement. Ces EPS traduisent le comportement bactérien ou le « bien être » de la biomasse dans un milieu donné. Etudier les EPS constitue donc un axe de recherche incontournable pour une meilleure compréhension de l'épuration biologique des eaux polluées.

Dans cette thèse, l'étude des EPS produits par la biomasse des stations d'épuration a été d'une part, réalisée en présence de différents agents éventuellement hostiles (un agent anticancéreux et des antibiotiques) ou non hostiles (agents fongiques), et d'autre part, orientée vers l'implication des EPS sur la décantation des boues.

L'influence des composés pharmaceutiques a été étudiée à la fois à l'échelle pilote de laboratoire en réacteur à membranes pour les molécules anticancéreuses et en réacteur batch pour les antibiotiques. L'implication des EPS sur la décantation a été évaluée à l'échelle pilote de laboratoire et à l'échelle industrielle. A l'échelle pilote, nous avons cherché une meilleure compréhension de l'effet des champignons sur l'amélioration de la décantation, aujourd'hui constaté dans certaines stations d'épuration, mais pas vraiment compris. A l'échelle industrielle, nous avons étudié les EPS de trois stations d'épuration de papeteries. Un traitement statistique des paramètres technologiques enregistrés sur les sites industriels a été associé à l'étude des EPS. Cette approche à la fois statistique et analytique s'est montrée utile pour le diagnostic du fonctionnement des stations d'épuration.

Les principales avancées scientifiques effectuées dans le cadre de ce travail de thèse sont :

- 1) La présence de l'agent anticancéreux (cyclophosphamide à 5 µg/L) et de ses métabolites a provoqué l'augmentation de la production des EPS par la biomasse. Ceci peut être

considéré comme un acte d'adaptation, pour une meilleure protection des cellules car la capacité de la biomasse à éliminer la DCO et l'azote est restée intacte.

L'étude réalisée en bioréacteur à membranes, a permis de mettre en évidence la résistance de la boue aux contraintes de cisaillement. Une courte période d'acclimatation (20 j) des boues aux conditions opératoires et un âge des boues relativement jeune (50 j), ont généré des boues fragilisées vis-à-vis des contraintes de cisaillement : elles ont libéré une partie des EPS liés dans le floc vers la phase soluble. Par contre, une plus longue période d'acclimatation des boues (107 j) aux conditions opératoires et un âge de boues plus élevé (70 j), ont abouti à des boues plus robustes qui ont bien résisté aux contraintes de cisaillement sans libérer leur matériel constitutif vers la phase soluble.

La libération des EPS liés dans les flocs vers la phase soluble a contribué au colmatage des membranes. Ce colmatage était d'autant plus fréquent que la concentration des substances solubles a augmenté en présence d'agent anticancéreux.

Ces résultats nous ont permis de faire le lien entre la production des EPS, les propriétés de résistance des boues au cisaillement et le colmatage des membranes en présence d'agent anticancéreux.

- 2) Lors de l'exposition de la biomasse en réacteur batch au choc toxique des antibiotiques, nous avons pu constater que :
 - a) Certains antibiotiques étudiés (amoxicilline, tetracycline et sulfamethoxazole), malgré leurs concentrations élevées (10 mg/L), n'ont eu pratiquement aucun effet sur l'activité bactérienne, ni en terme d'efficacité d'épuration, ni en terme de changement sur la production des EPS liés ou solubles. En effet, l'amoxicilline et la tetracycline ont été décrites dans la littérature comme des molécules qui subissent une dégradation par inactivation ou une dégradation photochimique. Quant au sulfamethoxazole, son utilisation pendant de nombreuses années a engendré une forme de résistance bactérienne entraînant à présent sa faible efficacité .
 - b) La famille des macrolides, roxithromycine et érythromycine, ont induit une augmentation des EPS liés dans les flocs. Cette augmentation des EPS serait très probablement associée à une réponse bactérienne pour assurer la survie des bactéries. La présence de l'érythromycine a provoqué une perte partielle de la capacité d'épuration bactérienne tandis que la roxithromycine ne l'a pas affectée.
L'étude spécifique de l'impact de l'érythromycine sur la biomasse (la capacité d'épuration et la production des EPS) a mis en évidence un comportement différent

des boues en fonction de leur origine. Ceci semble lié à l'activité spécifique des microorganismes prépondérants (hétérotrophes/autotrophes) dans les boues, la composition du consortium bactérien étant déterminée par le procédé.

Ces résultats ont mis en évidence la sensibilité de la biomasse à la présence de roxitromycine et érythromycine (affectant plus ou moins l'activité bactérienne) et la tolérance de la biomasse vis à vis de l'amoxicilline, de la tetracycline et du sulfamethoxazole.

- 3) L'étude des boues activées de papeteries en présence de cultures fongiques (champignons) a permis de comprendre partiellement la contribution de cultures fongiques à l'amélioration de la décantation. Les cultures mixtes (bactéries et champignons) ont formé davantage d'EPS (entre deux et trois fois plus). Bien que les champignons ne survivent pas longtemps dans les conditions opératoires du réacteur, conditions peu favorables à leur développement (pH et température), leur présence a induit l'augmentation des EPS impliqués dans la cohésion du floc. L'amélioration de la décantation a été spectaculaire. Néanmoins, à ce stade d'avancement des travaux, il est impossible d'identifier l'origine des EPS (bactérienne ou fongique).
- 4) L'analyse en composantes principales a permis d'exploiter les bases de données industrielles et d'effectuer une description mathématique des procédés d'épuration dans les trois stations d'épuration de papeteries présentant respectivement une bonne (station A), déficiente (station B) et mauvaise (station C) décantation. D'autre part, l'étude des EPS s'est avérée un outil précieux pour apporter des informations sur le comportement biologique de la biomasse dans les stations d'épuration.
- Dans la station A, une décantation systématiquement bonne a pu être associée d'abord à (i) une activité bactérienne intense : concentration importante en EPS dans les boues et richesse du consortium bactérien lié à la nitrification, et ensuite à (ii) la présence des phosphates influant la décantation des boues.
 - Dans la station B, la décantation a été toujours déficiente, ce phénomène a pu être attribué à (i) une faible activité biologique (faible quantité des EPS par rapport à une quantité importante de cellules), et à (ii) un consortium bactérien restreint utilisant uniquement le carbone organique comme seule source d'énergie.
 - L'examen statistique de la STEP C n'a pas pu établir de corrélations entre les paramètres technologiques et la qualité d'épuration. Ceci peut être la conséquence de

la variabilité importante du système. D'autre part, nous avons constaté que l'activité biologique de la biomasse a été très faible, ce qui a induit une faible concentration des EPS dans les floes et par suite une cohésion insuffisante des composantes des floes et une décantation systématiquement médiocre.

PERSPECTIVES

L'analyse des EPS (liés dans les floes et les substances solubles) n'est pas un examen de routine qui peut se pratiquer couramment dans des stations d'épuration. Toutefois, ce travail de recherche a démontré que l'étude des EPS permet de comprendre le comportement de la biomasse dans les procédés de traitement des eaux. L'analyse des EPS peut apporter des éléments de compréhension des problèmes technologiques (colmatage des membranes) ou peut être très utile pour faire un diagnostic du fonctionnement d'une station d'épuration. En effet, il est connu dans la littérature (Liu Y. et Fang H.P., 2003 ; Flemming H.C. et Leis A., 2001) que des informations sur le comportement de la biomasse manquent cruellement pour améliorer le diagnostic de fonctionnement des stations.

L'ensemble de ce travail de thèse permet d'envisager un certain nombre de perspectives en tant qu'axes des progrès possibles:

- Ce travail met en avant la nécessité de concevoir des nouveaux matériaux des membranes de filtration des bioréacteurs afin d'assurer une filtration plus prolongée dans le temps. Des matériaux avec des propriétés d'adhésion réduites, notamment pour les polysaccharides, peuvent être envisagés, lors du traitement des eaux contenant des agents nuisibles à la biomasse bactérienne (effluents des industries pharmaceutiques, effluents hospitaliers et urbains).
- Il apparaît opportun d'accroître notre connaissance des phénomènes de diffusion des composés pharmaceutiques dans les agrégats biologiques afin d'apprécier les réponses entre les familles de bactéries hétérotrophes et autotrophes. Ceci devrait nous permettre de mieux comprendre l'organisation et la stratification des floes ainsi que de déterminer s'il existe de manière sélective des bactéries produisant davantage d'EPS pour la protection du consortium bactérien. A terme, il sera donc possible d'élucider

l'inter-relation entre ces deux grandes familles bactériennes pour gérer mieux les situations de crise provoquées par la présence des composés pharmaceutiques.

- En ce qui concerne le rôle des agents fongiques, nous constatons avec déception que nous n'avons pas pu apporter plus d'information sur le mécanisme de l'action concomitante des boues activées et des bio-additifs fongiques. Pour cela, il serait pertinent d'étudier la cohabitation entre ces deux espèces (les bactéries et les cultures fongiques). L'accent devra être mis sur une meilleure traçabilité de l'origine bactérienne ou fongique des EPS produits. D'autre part, il serait intéressant d'examiner le comportement fongique (production des EPS et des enzymes, et survie des espèces) en présence des composés nuisibles pour les bactéries tels que les composés pharmaceutiques. En effet, il est connu dans la littérature que les cultures fongiques ont une grande capacité de produire des enzymes pour la dégradation des composés difficilement dégradables ou toxiques pour les bactéries (matériaux ligno-cellulosiques et composés aromatiques (Sakurai et al., 2001 ; Nozaki et al., 2008 ; Sánchez, 2009)).
- Enfin, en ce qui concerne l'analyse statistique des données des stations, il apparaît intéressant d'étendre cette approche en situations accidentelles. Ce type d'étude, dont une partie du potentiel a été illustré dans ce travail, peut contribuer à une meilleure optimisation de l'ensemble du procédé d'épuration au sein de la station considérée. Elle peut même à terme, aboutir à la mise en place d'un véritable outil d'analyse et de diagnostic des stations.

LISTE DE RÉFÉRENCES

- Adamson A.W. (1990)**
Physical chemistry of surfaces (5th Ed.). Wiley, New York.
- Aguado D., Rosen C. (2008).**
Multivariate statistical monitoring of continuous wastewater treatment plants. Engineering applications of artificial intelligence 21 (7), 1080-1091.
- Aguilera A., Souza-Egipsy V., Martín-Uriz P.S., Amils R. (2008)**
Extracellular matrix assembly in extreme acidic eukaryotic biofilms and their possible implications in heavy metal adsorption. Aquatic Toxicology 88 (4), 257-266.
- Akhebat A., Dagneaux C., Liquier J., Taillandier E. (1992)**
Triple helical polynucleotidic structures: an FTIR study of the C+ .G. C triplet. J Biomol Struct Dyn. 10(3), 577-588.
- Alam, M.Z., Fakhru'l-Razi, A. (2003)**
Enhanced settleability and dewaterability of fungal treated domestic wastewater sludge by liquid state bioconversion process. Water Research 37, 1118-1124.
- Alexy R., Kümmerer K. (2006)**
Antibiotics for human use. In: Reemtsma T., Jekel M. (Eds), *Organic pollutants in the water cycle.* Wiley-VCH, Weinheim, 65-83.
- Alighardashi A. (2007)**
Composés pharmaceutiques et eaux usées urbaines. I. Analyse bibliographique, 2. Effet de deux Antibiotiques de type macrolide sur les boues activées.
Thèse de doctorat, Nancy Université, France.
- Alpaslan B., Çeçen, F. (2005)**
Cometabolic degradation of TCE in enriched nitrifying batch systems. Journal of Hazardous Materials 125 (1-3), 260-265.
- Alvarez-Cohen L., Speitel G.E. (2001)**
Kinetics of aerobic cometabolism of chlorinated solvents. Biodegradation 12, 105–126.
- Anderson G.G., O'Toole G.A. (2008)**
Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. In: *Bacterial biofilms.* Tony Romeo (ed.). Springer.
- Andreozzi R., Canterino M., Marotta R., Paxeus N. (2005)**
Antibiotic removal from wastewaters: The ozonation of amoxicillin. Journal of Hazardous Materials, 122 (3), 243-250.
- Andreozzi R., Raffaele M., Nicklas P. (2003)**
Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. Chemosphere, 50, , 1319-1330.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists)**
Official Method 991.20.
- APHA-American Public Health Association, AWWA-American Water Works Association, WEF-Water Environment Federation. (2005)**
Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st Ed. Washington, D.C., USA.
- Appels L., Baeyens J., Degrève J., Dewil R. (2008)**
Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. Progress in Energy and Combustion Science 34 (6), 755-781.
- Aquino S., Stuckey D. (2004)**
Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. Water Research, 38(2), 255-266.
- Arabi S., Nakhla G. (2008)**
Impact of protein/carbohydrate ratio in the feed wastewater on the membrane fouling in membrane bioreactors. Journal of Membrane Science 324 (1-2), 142-150.

- Avella A.C., Delgado L.F., Görner T., Albasi C., Galmiche M., de Donato Ph. (2010).**
Effect of cytostatic drug presence on extracellular polymeric substances formation in municipal wastewater treated by membrane bioreactor. Bioresource Technology 101(2), 518-526.
- Ayscough N., Fawell J., Franklin G., Young W. (2000)**
Review of human pharmaceuticals in the environment. R&D Technical Report P390. UK Environmental Agency, Bristol.
- Baeyens J., Hosten L., Van Vaerenbergh E. (1997)**
Wastewater Treatment. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Bala S., Yan S., Tyagi R., Surampalli R. (2010)**
Extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge : Isolation, molecular identification, EPS characterization and performance for sludge settling and dewatering. Water Research 44 (7), 2253-2266.
- Barker D., Stuckey D., (1999)**
A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems. Water Research, 33 (14), 3063-3082.
- Baron Samuel (Ed.) (1996)**
Medical Microbiology. The University of Texas medical branch at Galveston. 4^{ème} Ed. ISBN 0-9631172-1-1.
- Batt A. Aga D. (2005)**
Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. Anal. Chem. 77, 2940-2947.
- Beech I., Zinkevich V., Tapper R., Gubner R., Avci R. (1996)**
The interaction of exopolymers produced by marine sulphate-reducing bacteria with iron. In: Sand W (Ed) Biodeterioration and Biodegradation. Dechema Monographs 133, Dechema, Frankfurt, p. 333-338.
- Bernhard M., Muller J., Knepper T.H. (2006)**
Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: Comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. Water Research 40 (18), 3419-3428.
- Boëglin J.C. (1998)**
Traitements biologiques des eaux résiduaires. Techniques de l'Ingenieur (J3942).
- Boreen A., Arnold W., McNeill K. (2003)**
Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. Aquat. Sci., 65, 320-341.
- Borrok D.M., Fein J.B. (2005)**
The impact of ionic strength on the adsorption of protons, Pb, Cd, and Sr onto the surfaces of Gram negative bacteria : testing non-electrostatic, diffuse, and triple-layer models. Journal of colloid and interface science 286 (1), 110-126.
- Bott C., Love N. (2002)**
Investigating a mechanistic cause for activated sludge deflocculation in response to shock loads of toxic electrophilic chemicals. Water Environment Research, 74(3), 306-315.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Guy Ph., Larpent J., Veau P. (1985)**
Biotechnologies : Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Masson. ISBN 2-225-80535-0.
- Box J.D. (1983)**
Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. Wat. Res. 17, 511-525.
- Bradford M. (1976)**
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72 (1-2), 248-254.

- Brown K.D., Kulis J., Thomson B., Chapman T.H., Mawhinney D.B. (2006)**
Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. Science of the Total Environment 366 (2-3), 772-783.
- Bruus J. H., Nielsen P.H., Keiding K. (1992)**
On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering. Water Res. 26, 1597-1604.
- Buerge I., Buser H., Poiger T., Müller M. (2006)**
Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surface waters. Environmental science and technology 40 (23), 7242-7250.
- Burdman S., Jurkevitch E., Soria-Díaz M., Gil A., Okon Y. (2000)**
Extracellular polysaccharide composition of Azospirillum brasilense and its relation with cell aggregation. FEMS Microbiology Letters 189 (2), 259-264.
- Bursch W., Fuerhacker M., Geminer M., Grillitsch B., Jungbauer A., Kreuzinger N., Moest E. Scharf S. Schmid S., Skutan S., Walter I. (2003)**
Endocrine disrupters in aquatic environment: the austrian approach-ARCEM. Selecting proceedings of the 4th IWA specialized conference on assessment and control of hazardous substances in water. 14-17 September. Aachen, Germany,
- Campos J., Garrido J., Mendez R., Lema J. (2001)**
Effect of two broad-spectrum antibiotics on activity and stability of continuous nitrifying system. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A. Enzyme Engineering and Biotechnology 95 (1), 1-10.
- Carucci A., Cappai G., Piredda M. (2006)**
Biodegradability and toxicity of pharmaceuticals in biological wastewater treatment plants. Journal of environmental science and health. Part A: Toxic/hazardous substances & environmental engineering 41 (9), 1831- 1842.
- Cemagref (2002)**
La petite histoire de l'épuration. [consulté le 21 janvier 2010].
Disponible sur :
http://www.cemagref.fr/Informations/Actualites/08/O/petite_histoire_epuration_VF.pdf.
- Cemagref (2008a)**
Traiter la pollution par les boues activées. [consulté le 21 janvier 2010].
Disponible sur :
http://www.cemagref.fr/Informations/Actualites/08/O/traiter_lapollution_VF.pdf.
- Cemagref (2008b)**
Le foisonnement et le moussage de boues activées. [consulté le 22 janvier 2010].
Disponible sur :
http://www.cemagref.fr/Informations/Actualites/colloque/08/Pollutec/Pdf_Pollutec_2008/epuraticn/009_%20Foisonnement_corrige.pdf.
- Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D., Buret A. (1999)**
The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J. Clin Microbiol. 37, 1771-1776.
- Characklis W., Marshall K. (1990)**
Biofilms. JohnWiley and Sons Ed. 796 p. New York.
- Chong N-M., Huang W-S., Chen Y-S. (2008)**
Loss of degradation capacity of activated sludge for a xenobiotic after a period without its influent. Bioresource Technology 99 (18), 8729-8734.
- Chong N-M. (2009)**
Modelling the acclimation of activated sludge to xenobiotic. Bioresource Technology. 100, 5750-5756.

- Christian T., Schneider R. Färber H., Skutlarek D., Meyer M., Goldbach H. (2003)**
Determination of antibiotic residues in manure, soil and surface waters. Acta Hydroch. Hydrob 31, 36-44.
- Clara M., Strenn B., Gans O., Martinez E., Kreuzinger N., Kroiss H. (2005)**
Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. Water Research 39 (19), 4797-4807.
- Colin F., Gazbar S. (1995)**
Distribution of water in sludges in relation to their mechanical dewatering. Water Research 29(8), 2000-2005.
- Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2007)**
Effect of extraction method on EPS from activated sludge: an HPSEC investigation. Journal of Hazardous Materials 140, 129-137.
- COPACEL - Confédération française de l'industrie des papiers, cartons et celluloses (2008)**
Statistiques de l'industrie papetière française en 2008. [consulté le 25 décembre 2009].
Disponible sur : <http://y-l-v.com/copacel>.
- Costerton J.W. (1987)**
Bacterial biofilms in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol. 41, 435-464.
- Costerton J.W., Lappin-Scott H.M., Cheng K.J. (1992)**
Glycocalyx bacterial. In: Lederberg J. (Ed) Encyclopedia of microbiology. Vol. 2. Academic Press, San Diego, p. 311-317.
- D'Annibale A., Rita S., Vinciguerra V., Di Mattia E., Giovannozzi G. (1999)**
Characterization of immobilized laccase from Lentinula edodes and its use in olive-mill wastewater treatment. Process Biochemistry 34 (6-7), 697-706.
- D'Annibale A., Quaratino D., Federici F., Fenice M. (2006)**
Effect of agitation and aeration on the reduction of pollutant load of olive mill wastewater by the white-rot fungus Panus tigrinus. Biochemical Engineering Journal 29 (3), 243-249.
- Davey M.E., O'Toole G.A. (2000)**
Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64 (4), 847-867.
- Davis, E.M. (1988)**
Protein assay: a review of common techniques. Am. Biotechnol. Lab. 6, 28-37.
- Decho A.W., Lopez G.R. (1993)**
Exopolymer microenvironments of microbial flora: Multiple and interactive effects on trophic relationships. Limnology and Oceanography 38 (8), 1633-1645.
- Dégremont (2005)**
Memento Technique de l'eau. Lavoisier SAS. France. 1718 p.
- Delgado L.F. (2009)**
Bioréacteur à membrane externe pour le traitement d'effluents contenant des médicaments anticancéreux: élimination et influence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur le procédé.
Thèse de doctorat, INP Toulouse, France.
- Della Greca M., Fiorentino A., Isidori M., Lavorgna M., Previtiera L., Rubino M., Temussi F. (2004)**
Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivatives on aquatic organisms, Chemosphere 54, 629-637.
- Denizli A., Cihangir N., Rad A.Y., Taner M., Alsancak G. (2004)**
Removal of chlorophenols from synthetic solutions using Phanerochaete chrysosporium. Process Biochem. 39, 2025-2030.

- Derjaguin B.V., Lanadau L. (1941)**
Acta Physiochim. USSR **14**, 633 p.
- Desai M., Bühler T., Weller P., Brown M.R. (1998)**
Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of Burkholderia cepacia to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 153-160.
- Dignac M.F., Urbain V., Rybacki D., Bruchet A., Snidaro D., Scribe P. (1998)**
Chemical description of extracellular polymers implication on activated sludge floc structure. *Water Sci. Technol.* **38**, 39-46.
- Dionisi D., Levantesi C., Majone M., Bornoroni L., De Sanctis M. (2007)**
Effect of micropollutants (organic xenobiotics and heavy metals) on the activated sludge process. *Ind. Eng. Cham. Res.* **46**, 6762-6769.
- DREES - Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques. (2006)**
Le marché du médicament dans cinq pays européens, structure et évolution en 2004 : Etudes et Résultats
n°502.
- Drews A., Vocks M., Iversen V., Lesjean B., Kraume M. (2006)**
Influence of unsteady membrane bioreactor operation on EPS formation and filtration resistance. *Desalination* **192** (1-3), 1-9.
- Dreywood R. (1946)**
Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial and Engineering Chemistry* **18** (8), 499.
- Drillia P., Dokianakis S.N., Fountoulakis M.S., Kornaros M., Stamatelatos K., Lyberatos G. (2005)**
On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: the example of the antibiotic sulfamethoxazole. *Journal of Hazardous Materials*, **122** (3), 259-265.
- D'Souza T.D., Tiwari R., Sah A., Raghukumar C., (2006)**
Enhanced production of laccase by marine fungus during treatment of collared effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* **38**, 504-511.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956)**
Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**(3), 350-356.
- Dujovne C. A. (1975)**
Liver cell culture toxicity and surfactant potency of erythromycin derivatives. *Toxicology and Applied Pharmacology* **32**, 11-20.
- Ely R.L., Williamson K.J., Hyman M.R., Arp D.J. (1997)**
Cometabolism of chlorinated solvents by nitrifying bacteria: kinetics, substrate interactions, toxicity effects and bacterial response. *Biotechnol. Bioeng.* **54** (6), 520-534.
- Eriksson L., Stehen I., Tendaj M. (1992)**
Evaluation of sludge properties at an activated sludge plant. *Water Science and Technology* **25** (6), 251-265.
- ESAC – The European Surveillance of Antimicrobial Consumption (2007)**
European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe, 1998-2005. [consulté le 30 Janvier 2010]
Disponible sur: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3284>.
- Everst S. (2006)**
Bacterial conversations. *C&EN Washington.* Oct 23. [consulté le 15 Avril 2009]
Disponible sur : <http://www.CEN-online.org>.
- Fan F., Zhou H., Husain H. (2006)**
Identification of wastewater sludge characteristics to predict critical flux for membrane bioreactor process. *Water Research* **40** (2), 205-212.

- Ferchichi M. (2009)**
Colloque du CTP (17-18 june 2009). Arjo-Wiggins, Arches, France.
- Finlayson J.C., Liao B., Droppo T.G., Leppard G.G., Liss S.N. (1998)**
The relationship between the structure of activated sludge flocs and the sorption of hydrophobic pollutants. Water Science and Technology 37 (4-5), 353-357.
- Flemming H.C. (1996)**
The forces that keep biofilms together. In : Sand W. (Ed.), Biodeterioration and Biodegradation. Dechema Monographs. Vol. 133. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft. p. 311–316.
- Flemming H.C., Leis (Eds). (2001)**
Extracellular polymeric substances – the construction material of biofilms. Water Science and Technology 43 (6), 206 p.
- Flemming, H.C., Wingender, J. (2001)**
Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. In: Flemming H.C. and Leis A. (eds.), Extracellular polymeric substances – the construction material of biofilms. Wat. Sci. Tech. 43 (6), 1-8.
- Forabosco A., Bruno G., Sparapano L., Liut G., Marino D., Delben F. (2006)**
Pullulans produced by strains of Cryphonectria parasitica. I. Production and characterisation of the exopolysaccharides. Carbohydrate polymers 63 (4), 535-544.
- Forster CF. (1985)**
Factors involved in the settlement of activated sludge-I. Nutrients and surface polymers. Water Res. 19, 1259–1264.
- Froehner K., Backhaus T., Grimme L. (2000)**
Bioassays with Vibrio fischeri for the assessment of delayed toxicity. Chemosphere 40, 821-828.
- Frolund B., Griebe T., Nielsen P.H. (1995)**
Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 755-761.
- Frolund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H. (1996)**
Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. Water Res. 30 (8), 1749-1758.
- Fu Y., Viraraghvan T. (2001)**
Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. Bioresource Technology 79, 251-262.
- Gadd G. (2008)**
Fungi and their role in the biosphere. Encyclopedia of Ecology, 1709-1717.
- Ganczarczyk J.J. (1994)**
Microbial aggregates in wastewater treatment. Water Science and Technology 30 (8), 87–95.
- Garnier Ch., Görner T., Lartiges B., Abdelouhab S., de Donato Ph. (2005)**
Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: a combined size-exclusion chromatography and infrared microspectroscopy study. Water Research 39(13), 3044-3054.
- Gavrilov A., Razin S. (2009)**
Formaldehyde fixation of cells does not greatly reduce the ability to amplify cellular DNA. Analytical Biochemistry 390 (1), 94-96.
- Gilard V., Martino R., Malet-Martino M.C., Kutscher B., Müller A., Niemeyer U., Pohl J., Polymeropoulos E.E. (2004)**
Chemical and biochemical evaluation of hydrolysis products of cyclophosphamide. J. Med. Chem. 37, 3986–3993.
- Göbel A., Thomsen A., Mcardell C., Joss A., Giger W. (2005)**
Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides and trimethoprim in activated

sludge treatment. Environ. Sci. Technol. 39(11), 3981-3989.

Golet E.M., Xifra I., Siegrist H., Alder A.C., Giger W. (2003)

Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. Environ. Sci. Technol. 37, 3243-3249.

Gonzalez O., Esplugas M., Sans C., Torres A. Esplugas S. (2009)

Performance of a sequencing batch biofilm reactor for the treatment of pre-oxidized Sulfamethoxazole solution. Water Research 43, 2149-2158.

Görner T., de Donato Ph., Ameil M.H., Montarges-Pelletier E., Lartiges B. (2003)

Activated sludge exopolymers separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy. Water Research 37 (10), 2388-2393.

Gröning J., Held C., Garten C., Claußnitzer U., Kaschabek S.R., Schlömann M. (2007)

Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. Chemosphere 69 (4), 509-516.

GRUTTEE (2009)

8^{ème} Congrès du Groupement de Recherche Universitaire sur les Techniques de Traitement et d'Épuration des Eaux GRUTTEE. Nancy (France), 26-28 Octobre 2009.

Guest R., Smith D. (2002)

A potential new role for fungi in a wastewater MBR biological nitrogen reduction system. J. Environ. Eng. Sci. 1, 433-437

Gulkowska A., Leung H.W., So M.K., Taniyasu S., Yamashita N., Yeung L.W.Y., Richardson B.J., Lei A.P., Giesy J.P., Lam K.S.P. (2008).

Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. Water Research, 42(1-2), 395-403.

Ha J., Gélabert A., Spormann A.M., Brown J. (2010)

*Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis*:*

Batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR, and EXAFS study. Geochimica et

Cosmochimica Acta 74 (1), 1-15.

Halling-Sorensen B., Sengelov G., Tjornelund J. (2002)

Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42(3), 263-271.

Hartley, K.J. (2008)

Controlling sludge settleability in the oxidation ditch process. Water Research 42 (6-7), 1459-1466.

Hazen T.C. Stahl D.A. (2006)

Using the stress response to monitor process control: pathways to more effective bioremediation.

Current Opinion in Biotechnology 17 (3), 285-290.

Heberer T. (2002)

Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment : a review of recent research data. Toxicol. Lett. 131 (1-2), 5 - 17.

Hellström D. (2003)

Exergy analysis of nutrient recovery processes. Water Science and Technology 48 (1), 27-36.

Hengge-Aronis R. (1996)

Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In: Neidhardt F C, Curtiss III R, Ingraham J L, Lin E C C, Low K B, Magasanik B, Reznikoff W S, Riley M, Schaechter M, Umberger H E. (Ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2ème Ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1497–1512.

Henriques, I.D.S., Love, N.G. (2007)

The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins. Water Research 41 (18), 4177-4185.

Henze M., Harremoës P., Arvin E., Jansen J. (2002)

Wastewater treatment: biological and chemical processes. Springer. 3rd Edition. Berlin. Heidelberg. 430 p.

Herbert D., Phipps P.J., Strange R.E. (1971)

Carbohydrate analysis. Methods Enzymol. 5B, 265-279.

Hernández F., Sancho J., Ibáñez M., Guerrero C. (2007)

Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. Trac-Trends Anal. Chem. 26, 466-485.

Higgins MJ, Novak J.T. (1997)

Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. J Environ Eng. 5, 479–485.

Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.L. (1999)

Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. Science of the Total Environment. 225 (1-2), 109-118.

Horan NJ, Eccles CR. (1986)

Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludge. Water Res. 20, 1427–1432.

Hsieh K., Murgel G., Lion L. Shuler M. (1994)

Interactions of microbial biofilms with toxic traces metals 1. Observation and modelling of cell growth, attachment and production of extracellular polymer. Biotechnol Bioeng 44, 219-231.

Huang C-T., Yu F.P., McFeters G.A., Stewart P.S. (1995)

Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2252-2256.

Ikehata K., Buchanan I.D., Smith D.W. (2004)

Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. J. Environ. Eng. Sci. 3 (1), 1–19.

Isner J., Williams R. (1993)

Analytical techniques for identifying reverse osmosis foulants. In: Amjad Z (ed.), Reverse Osmosis, Membrane Technology. Water Chemistry and Industrial Applications. Van Nostrand Reinhold, New York, p. 237-274.

IWA - Task group on mathematical modelling for design and operation of biological wastewater treatment. (2002)

Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2D and ASM3. IWA publishing.. London. UK

Jahn, A., Nielsen, P.H. (1995)

Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. Wat. Sci. Tech. 32 (8), 157-164.

Jahn A., Nielsen P.H. (1998)

Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. Wat. Sci. Tech. 31 (1), 17-24.

Janga N., Ren X., Kim G., Ahn Ch., Cho J., Kim I.S. (2007)

Characteristics of soluble microbial products and extracellular polymeric substances in the membrane bioreactor for water reuse. Desalination 202 (1-3), 90-98.

- Jenkins D., Richard M.G., Daigger G.T. (1993)**
Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. 2ème Edition. Lewis Publishers. 193 p.
- Jenkins D., Richard M.G., Daigger G.T. (2003)**
Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking, Foaming, and Other Solids Separation Problems. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Jiang T., Kennedy M.D., Van der Meer W., Vanroleghem P., Schippers J. (2003)**
The role of blocking and cake filtration in MBR fouling. Desalination 157, 335-343.
- Jin B., Wilén B-M., Lant P. (2003)**
A comprehensive insight into floc characteristics and their impact on compressibility and settleability of activated sludge. Chemical Engineering Journal 85, 221-234.
- Johnson A., Jürgens M., Williams R., Kümmerer K., Kortenkamp A., Sumpter J. (2008)**
Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. Journal of Hydrology 348, 167-175.
- Jones O., Lester J., Voulvoulis N. (2005)**
Pharmaceuticals : a threat to drinking water ?. Trends Biotechnol. 23, 163-167.
- Joqueviel C., Martino R., Gilard V., Malet-Martino M., Canal P., Niemeyer U. (1998)**
Urinary excretion of cyclophosphamide in humans, determined by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Drug metabolism and Disposition 26 (5), 418-428.
- Jorand F., Zartarian F., Thomas F., Block J., Bottero J., Villemin G., Urbain V., Manem J. (1995)**
Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. Water Research 29 (7), 1639-1647.
- Jorgensen S.E., Halling-Sorensen B. (2000)**
Drugs in the environment. Chemosphere 40, 691-699.
- Joss A., Andersen H., Ternes T., Richle P.R., Siegrist H. (2004)**
Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimisation. Environmental science and technology 38, 3047-3055.
- Joss A., Zabczynski S., Göbel A., Hoffmann B., Löffler D., Mc Ardell C., Ternes T., Thomsen A., Siegrist H. (2006)**
Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. Water Research 40 (8), 1686-1696.
- Judd S. (2006)**
The MBR book: Principles and applications of membrane bioreactors in water and wastewater Treatment. Elsevier, Oxford. 325 p.
- Judd S. (2008)**
The status of membrane bioreactor technology. Trends in Biotechnology 40 (2), 109-116.
- Kang K.H., Shin H.S., Park H. (2002)**
Characterization of humic substances present in landfill leachates with different landfill ages and its implications. Wat. Res. 36 (16), 4023-4032.
- Karapanagiotis N.K., Rudd T., Sterrit R.M., Lester J.N. (1989)**
Extraction and characterization of extracellular polymers in digested sewage sludge. J. ChemTech. Biotechnol. 44, 107-120.
- Kavanagh K (Ed). (2005)**
Fungi: Biology and applications. John Wiley and sons., UK.
- Keiding K., Nielsen P.H. (1997)**
Desorption of organic macromolecules from activated sludges: effect of ionic composition. Water Research 31 (7), 1665-1672.

- Keiding K., Wybrandt L., Nielsen P.H. (2001)**
Remember the water: a comment on EPS colligative properties. Water Science and Technology 43, 17-23.
- Klavarioti M., Mantzavinos D., Kassinis D. (2009)**
Removal of residual pharmaceuticals form aqueous systems by advanced oxidation processes. Environment international 35, 402-417.
- Koehler L.H. (1952)**
Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and colour intensity. Analyt. Chem. 24, 1576-1579.
- Kourti T., Nomikos P., MacGregor J. (1995)**
Analysis, monitoting and fault diagnosis of batch processes using multiblock and multiway. Journal of Process Control 5 (4), 277-284.
- Kourti T., Lee J., MacGregor J. (1996)**
Experiences with industrial applications of projection methods for multivariate statistical process control. Computers & Chemical Engineering 20, Supplement 1, S745-S750.
- Kümmerer K. (2001)**
Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources-a review. Chemosphere 45 (6-7), 957-969.
- Kümmerer K. (2004)**
Pharmaceutical in the environnement: sources, fate, effects and risks. 2ème Edition.
Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- Kümmerer K. (2009a)**
The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. Journal of Environmental Management 90 (8), 2354-2366.
- Kümmerer K. (2009b)**
Antibiotics in the aquatic environment – a review - part I. Chemosphere 75(4), 417-434.
- Kurakov A.V., Popov A.I. (1996)**
Nitrifying activity and phytotoxicity of microscopic soil fungi. Eurasian Soil Sci. 28, 73-84.
- Lacorte S., Latorre A., Barcelo D., Rigo A., Malmqvist A., Welander T. (2003)**
Organic compounds in paper-mill process waters and effluents. Trends in Analytical Chemistry 22(10), 725-737.
- Längin A., Alexy R., König A., Kümmerer K. (2009)**
Deactivation and transformation products in biodegradability testing of β -lactams amoxicillin and piperacillin. Chemosphere 75 (3), 347-354.
- Lappin-Scott H.M., Costerton J.W. (2003)**
Microbial biofilms. Cambridge University press. UK. 328 p.
- Larsson D., de Pedro C., Paxeus N. (2007)**
Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. Journal of Hazardous Materials 148(3), 751-755.
- Lapidou Ch. S., Rittmann B. E. (2002)**
A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. Water Research 36 (11), 2711-2720.
- Leandro S.M., Gil M.C., Delgadillo I. (2003)**
Partial characterisation of exopolysaccharides exudated by planktonic diatoms maintained in batch cultures. Acta Oecologica 24, S49-S55.

- Lebart L., Morineau A., Fénelon J.P. (1979)**
Traitement des données statistiques. Méthodes et programmes. Dunod, Paris.
- Le-Clech P., Chen V., Fane T.A.G. (2006)**
Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment: Review. Journal of Membrane Science 284 (1-2), 17-53.
- Leenheer J.A., Nanny M.A., McIntyre C. (2003)**
Terpenoids as major precursors of dissolved organic matter in landfill leachates, surface water and groundwater. Environ. Sci. Technol. 37 (11), 2323-2331.
- Lenz K., Koellensperger G., Hann S., Weissenbacher N., Mahnik S.N., Fuerhacker M. (2007)**
Fate of cancerostatic platinum compounds in biological wastewater treatment of hospital effluents. Chemosphere 69 (11), 1765-1774.
- Li D.H., Ganczarczyk (1989)**
Fractal geometry of particle aggregates generated in water and wastewater treatment processes. ESandT Contents 23 (11), 1385-1389.
- Li D.H., Ganczarczyk J.J (1990)**
Structure of activated sludge flocs. Biotechnology and Bioengineering 35 (1), 57-65.
- Li K., Yediler A., Yang M., Schulte-Hostede S., Wong M. (2008)**
Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation by-products. Chemosphere 72, 473-478.
- Li X.Y., Yang S. (2007)**
Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. Water Research 41, 1022-1030.
- Liao B.Q., Allen D.G., Droppo I.G., Leppard G.G., Liss S.N. (2001)**
Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. Water Research 35 (2), 339-350.
- Liu H., Fang H. (2002)**
Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. Journal of biotechnology 95, 249-256.
- Liu Y., Fang H.H.P. (2003)**
Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling and dewatering of activated sludge. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 33 (3), 237-273.
- Losick R., Kaiser D. (1997)**
Why and how bacteria communicate. Scientific American 276 (2), 68-73.
- Louvet J.N., Giammarino C., Potier O., Pons M.N. (2010a)**
Adverse effects of erythromycin on the structure and chemistry of activated sludge. Environmental Pollution 158 (3), 688-693.
- Louvet (2010b)**
Effet des antibiotiques présents dans les eaux usées sur le procédé d'épuration par boues activées
Thèse de doctorat (en préparation), INP Lorraine, France
- Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L., Randall R. J. (1951)**
Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. Journal of Biological Chemistry 193, 265-275.
- Lyko S., Al-halbouni D., Wintgens T., Janot A., Hollender J., Dott W., Melin T. (2007)**
Polymeric compounds in activated sludge supernatant – characterisation and retention mechanisms at a full-scale municipal membrane bioreactor. Wat. Res. 41 (17), 3894-3902.
- MacCarthy P., Clapp C.E., Malcom R.L., Bloom P.R. (1990)**
Humic substances in soil and crop sciences: selected readings. Madison. Soil Sci. Society of America, Wisconsin.

- Mackiewicz A., Ratajczak W. (1993)**
Principal components analysis (PCA). Computers & Geosciences 19(3), 303-342.
- Mah T-F., O'Toole G. (2001)**
Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in microbiology 9 (1), 34-39.
- Malaviya P., Rathore V.S. (2007)**
Bioremediation of pulp and paper mill effluent by a novel fungal consortium isolated from polluted soil. Bioresource Technology 98, 3647-3651.
- Mannan S., Fakhru'l-Razi A., Alam Md Z. (2005)**
Use of fungi to improve bioconversion of activated sludge. Water Research 39, 2936-2943.
- McKinney R.E. (1952)**
A fundamental approach to the activated sludge process II. A proposed theory of floc formation. Sewage Ind Wastes 24, 280-287
- Méndez-Arriaga F., Esplugas S., Giménez J. (2008)**
Photocatalytic degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs with TiO₂ and simulated solar irradiation. Water Research 42, 585-594.
- Meng F., Zhang H., Yang F., Zhang S., Li Y., Zhang X. (2006)**
Identification of activated sludge properties affecting membrane fouling in submerged membrane bioreactors. Separation and Purification Technology 51 (1), 95-103.
- Meng F., Chae S-R., Drews A., Kraume M., Shin H-S., Yang F. (2009)**
Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material. Water Research 43 (6), 1489-1512.
- Menniti A., Kang S., Elimelech M., Morgenroth (2009)**
Influence of shear on the production of extracellular polymeric substances in membrane bioreactors. Water Research 43 (17), 4305-4315.
- Metcalf et Eddy, Inc. (2003)**
Wastewater engineering, treatment and reuse. 4th edition. Mc Graw Hill Ed., 1819 p.
- Mikkelsen L.H., Keiding K. (2002)**
Physico-chemical characteristics of full scale sewage sludges with implications to dewatering. Water Research 36, 2451-2462.
- Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de la Mer (2008)**
Gestion de l'eau potable et des eaux usées [consulté le 25 Décembre 2009]
Disponible sur : <http://www.ifen.fr/acces-thematique/eau/gestion-de-l-eau-potable-et-des-eaux-usees/l-assainissement-des-eaux-usees.html>
- Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de la Mer (2009)**
Recueil de texts sur l'assainissement communal [consulté le 25 Décembre 2009]
Disponible sur : http://www.developpement-durable.gouv.fr/ext/assainissement/#_4
- Morad S., Shacham M., Brenner A. (2007)**
Utilization of collinearity in regression modeling of activated sludge processes. Chemical Engineering and Processing 46 (3), 222-229.
- Mrkva M. (1983)**
Evaluation of correlations between absorbance at 254nm and COD or river waters. Water Research 17, 231-235.
- Mujunen S-P., Minkkinen P., Teppola P., Wirkkala R-S. (1998)**
Modelling of activated sludge plants treatment efficiency with PLSR: a process analytical case study. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 41 (1), 83-94.
- Nagaoka H., Nemoto H. (2005)**
Influence of extracellular polymeric substances on nitrogen removal in an intermittently-aerated membrane bioreactor. Water Sci. Technol. 51, 151-158.

- Nalca Y., Jansch L., Bredenbruch F., Geffers R., Buer J., Haussler S. (2006)**
Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in Pseudomonas aeruginosa PAO1: a global approach. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 1680-1688.
- Ng W.J., Ong S.L., Hossain F., (2000)**
An algorithmic approach for system-specific modelling of activated sludge bulking in an SBR. Environmental Modelling and Software 15 (2), 199-210.
- Nicaud O. (2008)**
Réduction des boues par le procédé MycET: retour d'expérience sur la station d'épuration de Brieve. In : Conference abstract: SLUDGE 2008. Anger, France.
- Nielsen P.H., Jahn A., Palmgren R. (1997)**
Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. Water Sci Technol 36, 11-19.
- Nielsen P.H., Jahn A. (1999)**
Extraction of EPS. In : Wingender J., Neu T., Flemming H.C. (Eds.), Microbial Extracellular Polymeric Substances. Springer International. Heidelberg, New York, p. 49-72.
- Nielsen P.H., Thomsen T.R., Nielsen J.L. (2004)**
Bacterial composition of activated sludge - Importance for floc and sludge properties. Water Science and Technology 49 (10), 51-58.
- Novak J., Sadler M., Murthy S. (2003)**
Mechanisms of floc destruction during anaerobic digestion and the effect on conditioning and dewatering of biosolids. Water Research 37 (13), 3136-3144.
- Nozaki K., Beh C.H., Mizuno M., Isobe T., Shiroishi M., Kanda T., Amano Y. (2008)**
Screening and investigation of dye decolorization activities of basidiomycetes. Journal of Bioscience and Bioengineering 105, (1), 69-72.
- Nuengjamnong Ch., Kweon J.H., Cho J., Polprasert Ch., Ahn K-H. (2005)**
Membrane fouling caused by extracellular polymeric substances during microfiltration processes. Desalination 179 (1-3), 117-124.
- Ophir T., Gutnick D.L. (1994)**
A role of exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. Appl. Environ. Microbiol. 60, 740-745.
- Ortega-Clemente A., Caffarel-Mendez S., Ponce-Noyola M.T., Barrera-Cortes J., Poggi-Varaldo H.M. (2009)**
Fungal post-treatment of pulp mill effluents for the removal of recalcitrant pollutants. Bioresource Technology 100, 1885-1894.
- Papinutti L. (2010)**
Effets of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to Ganoderma lucidum complex. Bioresource Technology 101, 1941-1946.
- Park C., Novak J. (2007)**
Characterization of activated sludge exocellular polymers using several cation-associated extraction methods. Water Research 41 (8), 1679-1688.
- Park Ch., Lee M., Lee B., Kim S.-W., Chase H.A., Lee J., Kim S. (2007)**
Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by Funalia trogii. Biochemical. Engineering Journal 36, 59-65.
- Parsek M.R., Greenberg E.P. (2005)**
Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends in Microbiology 13 (1), 27-33.
- Pechère J.C. (2001)**

Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. International Journal of antimicrobial agents 18, 525-528.

Pere J., Alen R., Viikari L., Eriksson L. (1993)

Characterization and dewatering of activated sludge from the pulp and paper industry. Water Science and Technology 28 (1), 193-201.

Peterson G.L. (1977)

A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Analyt. Chem. 83, 346-356.

Peterson G.L. (1979)

Review of the folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Analyt. Biochem. 100, 201-219.

Pokhrel D., Viraraghavan T. (2004)

Treatment of pulp and paper mill wastewater – review. Science of the total environment 333 (1-3), 37-58.

Pomati F., Castiglioni S., Zuccato E., Fanelli R., Vigetti D., Rossetti C., Calamari D. (2006)

Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. Environmental Science and Technology 40 (7), pp. 2442-2447

Prado N., Ochoa J., Amrane A. (2009)

Biodegradation by activated sludge and toxicity of tetracycline into a semi-industrial membrane reactor. Bioresource Technology 100 (15), 3769-3774.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2003)

Microbiologie. 2ème Ed. Française. De boeck & Larcier s.a. Bruxelles. 1164 p.

Prigione V., Tigini V., Pezzella C., Anastasi A., Sannia G., Varesse G.C. (2008)

Decolourisation and detoxification of textile effluents by fungal biosorption. Water Research 42 (12), 2911-2920.

Ras M., Girbal-Neuhauser E., Paul E., Spérandio M., Lefebvre D. (2008a)

Protein extraction from activated sludge : an analytical approach. Water Research 42, 1867-1878.

Ras M., Girbal-Neuhauser E., Paul E., Lefebvre D. (2008b)

A high yields multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge. Bioresource Technology 99 (16), 7464-7471.

Raunkjaer K., Hvitved-Jacobsen T., Nielsen P.H. (1994)

Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. Wat. Res 28 (2), 251-262.

Richard M. Cummins C. (1997)

Results of phosphorus minimization studies for pulp and papermill activated sludge systems located around the Great Lakes. In: Proceedings of the 1997 Environmental Conference. Vol 2. TAPPI press, Norcross GA. p. 1003-1006.

Rittmann B., McCarty P. (2001)

Environmental biotechnology: principles and applications. New York, Mc-Graw Hill.

Roberts M.C. (2005)

Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol. Lett. 245 (2), 195-203.

Rosenberger S., Laabs C., Lesjean B., Gnirss R., Amy G., Jekel M., Schrotter J.C. (2006)

Impact of colloidal and soluble organic material on membrane performance in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. Water Research 40 (4), 710-720.

Sakurai A., Yamamoto T., Makabe A., Kinoshita S., Sakakibara M. (2001)

Removal of lignin in a liquid system by an isolated fungus. J Chem Technol Biotechnol. 77, 9-14.

- Sanchez M., Cortés U., Lafuente J., Roda I.R., Poch M. (1996)**
DAI-DEPUR: An integrated and distributed architecture for wastewater treatment plants supervision. Artificial Intelligence in Engineering 10 (3), 275-285.
- Sanchez C. (2009)**
Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnology Advances 27(2), 185-194.
- Sand W., Gehrke T. (1999)**
Analysis and function of the EPS from the strong acidophile Thiobacillus ferrooxidans. In : Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. (Ed.), Microbial Extracellular Polymeric Substances. Springer. Heidelberg.
- Sanin F.D., Vesilind P.A. (1996)**
Synthetic Sludge: a physical/chemical model in understanding bioflocculation. Water Environ Res 68, 927-933
- Schlunzen F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albrecht R., Yonath A., Franceschi F. (2001)**
Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. Nature 413, 814-821.
- Schmitt J., Nivens D., White D.C., Flemming H.c. (1995)**
Changes of biofilm properties in response to sorbed substances – an FTIR-ATR study. Water Sci Technol 32, 149-155.
- Schmitt J., Flemming H.C. (1998)**
FTIR spectroscopy in microbial and material analysis. Int Biodeter and Biodegr 41, 1-11.
- Scholar E., Pratt W. (Eds.) (2000)**
The antimicrobial drugs. 2ème Edition. Oxford. University Press. New York.
- Schuler A., Jang H. (2007)**
Causes of variable biomass density and its effects on settleability in full-scale biological wastewater treatment systems. Environ. Sci. Technol. 41 (5), 1675-1681.
- Singh R., Debarati P., Jain R. (2006)**
Biofilms: implication in bioremediation. Trends in microbiology, 14 (9), p. 389-397.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H. Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985).**
Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. Analytical Biochemistry 150 (1), 76-85.
- Snyder S., Adham S., Redding A., Cannon F., DeCarolis J., Oppenheimer J., Wert E., Yoon Y. (2007)**
Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. Desalination 202 (1-3), 156-181.
- Sobeck D. C., Higgins M. J. (2002)**
Examination of Three Theories for Mechanisms of Cation-Induced Bioflocculation. Water Research 36, 527-538.
- Spellman F. (2009)**
Handbook of water and wastewater treatment plant operations. 2ème Ed. CRC press. Taylor & Francis group.
- Spinosa L., Vesilind P. (Eds.) (2001)**
Sludge into biosolids. Processing, Disposal and utilization. IWA publishing. London. UK.
- Sponza D.T. (2002)**
Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady-an unsteady-state activated sludge systems. Process Biochemistry 37, 983-998.
- Sponza D.T. (2003)**
Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. Enzyme and Microbial Technology

32, 375-385.

Steger-Hartmann T., Kümmerer K., Hartmann A. (1997)

Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. Ecotoxicology and environmental safety 36 (2), 174-179.

Stewart P. (2001)

Multicellular resistance: biofilms. Trends in microbiology 9 (5), 204.

Stewart P., Costerton J. (2001)

Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 358, 135-138.

Susanto H., Arafat H., Janssen E.M.L., Ulbricht M. (2008)

Ultrafiltration of polysaccharide-protein mixtures: Elucidation of fouling mechanisms and fouling control by membrane surface modification. Separation and Purification Technology 63 (3), 558-565.

Sutherland I.W. (1996)

Extracellular polysaccharides. In : Rehm H.J., Reed G. (Eds.), *Biotechnology. Vol. 6 : products of primary metabolism.* Chemie, Weinheim, p. 615-657.

Sutherland (1999)

Biofilms exopolysaccharides. In : Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. (Ed.), *Microbial Extracellular Polymeric Substances.* Springer, Heidelberg.

Sutherland I.W. (2001)

The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. Trends in microbiology 9 (5), 222-227.

Tansel B., Sager J., Garland J., Xu S., Levine L., Bisbee P. (2006)

Deposition of extracellular polymeric substances (EPS) and microtopographical changes on membrane surfaces during intermittent filtration conditions. Journal of Membrane Science 285 (1-2), 225-231.

Taseli B.K., Gökçay C.F., Taseli H. (2004)

*Upflow column reactor design for dechlorination of chlorinated pulping wastes by *Penicillium camemberti*.* Journal of Environmental Management 72, 175-179.

Tateda K., Standiford T.J., Pechere J.C., Yamaguchi K. (2004)

Regulatory effects of macrolides on bacterial virulence: Potential role as quorum-sensing inhibitors. Current Pharmaceutical Design 10 (25), 3055-3065.

Tatulian S. A., Gordeliy V. I., Soklova A.E., Syrykh A. G. (1991)

A neutron diffraction study of the influence on phospholipid membrane interactions. Biochim. Biophys. Acta 1070, 143-151.

Ternes T.A. (1998)

Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Research 32, 3245-3260.

Ternes (2001)

Pharmaceuticals and metabolites as contaminants of the aquatic environment. ACS Symposium Series 791, 39-54.

Ternes T., Joss A. (2006)

Human pharmaceuticals, hormones and fragrances – the challenge of micropollutants in urban water management. IWA publishing, London, UK.

Ternes T., Stüber J., Herrmann N., McDowell D., Ried A., Kampmann M., Teiser B. (2003)

Ozonation : a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater?. Water Research 37 (8), 1976-1982.

Tezuka Y., (1969)

Cations-dependent flocculation in a Flavobacterium species predominant in activated sludge. Appl. Microbiol. 17, 222-226.

Thompson G., Swain J., Kay M., Forster C.F. (2001)

The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. Bioresource Technology 77 (3), 275-286.

Trystram D., Varon E., Péan Y., Grundmann H., Gutmann L., Jarlier V., Aubry-Damon H. (2004)

Réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (EARSS) : résultats 2002, place de la France. In : République française : Ministère de la santé et de la protection sociale, Résistance aux antibiotiques. BEH n° 32-33/2004.

Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A. (2003)

Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. FEMS Microbiology Letters 223 (2), 287-292.

Turiel E., Bordin G., Rodríguez A. (2005)

Study of the evolution and degradation products of ciprofloxacin and oxolinic acid in river water samples by HPLC-UV/MS/MS-MS. J. Environ. Monitor. 7, 189-195.

United States Patent No. 3772191.

Method of digesting and further processing fresh sewage sludge or sopropel. [consulté le 25 janvier 2009]

Disponible sur : <http://www.freepatentsonline.com/3772191.html>.

Urase T., Kikuta T. (2005)

Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. Water Research 39 (7), 1289-1300.

Urbain V., Block J.C., Manem J. (1993)

Bioflocculation in activated sludge: an analytical approach. Water Research 27 (5), 829-838.

Verwey E.J., Overbeek J.T. (1948)

Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. Elsevier, Amsterdam.

Vesilind P.A., Hsu C. (1997)

Limits of sludge dewaterability. Water Sci. Technol. 36 (11), 87-91.

Wagner M., Amann R., Lemmer H., Schleifer K.H. (1993)

Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1520-1525.

Walsh Ch. (2003)

Antibiotics : actions, origins, resistance. ASM Press. USA.

Wanner J. (1994)

Activated sludge bulking and foaming control. Technomic Publishing Co. Inc. Landcaster- Basle, 327 p.

Watkinson A.J., Murby E.J., Costanzo S.D. (2007)

Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. Water Research, 41 (18), 4164-4176.

Watkinson A.J., Murby E.J., Kolpin D.W., Costanzo S.D. (2009)

The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. Science of the total environment 407(8), 2711-2723.

Webb S., Ternes T., Gibert M., Olejniczak K. (2003)

Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. Toxicol. Letters 142, 157-167.

Weiss S., Reemtsma T. (2008)

Membrane bioreactors for municipal wastewater treatment – A viable option to reduce the amount of polar pollutants discharged into surface waters?. Water research 42 (14), 3837-3847.

- Wen X., Jia Y., Li J.**
Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from Phanerochaete chrysosporium. Journal of Hazardous Materials 177 (1-3), 924-928.
- Werner J., Chintapalli M., Lundeen R., Wammer K., Arnold W., McNeill K. (2007)**
Environmental photochemistry of tylosin: efficient, reversible photoisomerization to a less-active isomer, followed by photolysis. J. Agric. Food Chem. 55, 7062-7068.
- Widsten P., Kandelbauer A. (2008)**
Laccase applications in the forest product industry: A review. Enzyme and Microbial Technology 42, 293-307.
- Wilén B.M., Onuki M., Hermansson M., Lumley D., Mino T. (2008a)**
Microbial community structure in activated sludge floc analysed by fluorescence in situ hybridization and its relation to floc stability. Water Research 42, (8-9), 2300-2308.
- Wilén B.M., Lumley D., Mattsson A., Mino T. (2008b)**
Relationship between floc composition and flocculation and settling properties studied at a full scale activated sludge plant. Water Research 42 (16), 4404-4418.
- Wilén B-M., Jin B., Lant P. (2003)**
The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. Water Research 37 (9), 2127-2139.
- Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (Eds.) (1999)**
Microbial Extracellular Polymeric Substances. Springer, Heidelberg.
- Wirtanen G., Salo S., Helander I.M., Mattila-Sandholm T. (2001)**
Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on Pseudomonas biofilm. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 20 (1), 37-50.
- Wise R. (2002)**
Antimicrobial resistance: priorities for action. J. Antimicrob. Chemoth. 49, 585-586.
- Wise B., Gallagher N. (1996)**
The process chemometrics approach to process monitoring and fault detection. Journal of Process Control 6 (6), 329-348.
- Wisniewski C., Grasmick A. (1998)**
Floc size distribution in a membrane bioreactor and consequences for membrane fouling. Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects 138, 403-411.
- Wolfaardt G., Lawrence J., Korber D. (1999)**
Function of EPS. In : Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. (Ed.), Microbial Extracellular Polymeric Substances. Springer, Heidelberg.
- Yu G-H., He P-J, Shao L-M, Zhu Y-S. (2008)**
Extracellular proteins, polysaccharides and enzymes impact on sludge aerobic digestion after ultrasonic pre-treatment. Water Research 42 (8-9), 1925-1934.
- Zhang L., Feng X., Zhu N., Chen J. (2007a)**
Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. Enzyme and Microbial Technology 41, 551-557.
- Zhang P., Zhang G., Wang W. (2007b)**
Ultrasonic treatment of biological sludge: Floc disintegration, cell lysis and inactivation. Bioresource Technology 98 (1), 207-210.
- Zita A., Hermansson M. (1994)**
Effects of ionic strength on bacterial adhesion and stability of flocs in a wastewater activated sludge system. Applied and Environmental Microbiology 60 (9), 3041-3048.

www.medicinenet.com/sulfamethoxazole/article.htm/ [consulté le 22 June 2009]

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Christelle WISNIEWSKI, Professeur, Université de Montpellier I, Montpellier

Monsieur Nicolas ROCHE, Professeur, Université Aix-Marseille III, Marseille

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame AVELLA VASQUEZ Ana Catalina

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

« Substances Polymériques Extracellulaires dans les procédés de traitement des eaux usées »

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Géosciences** »

Fait à Vandoeuvre, le 11 juin 2010

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



SUBSTANCES POLYMERIQUES EXTRACELLULAIRES DANS LES PROCEDES DE TRAITEMENT DES EAUX USEES

RESUME

L'objectif de ce travail est d'une part (*i*) étudier le comportement de la biomasse notamment la production d'EPS en présence des composés pharmaceutiques (un agent anticancéreux et cinq antibiotiques); et d'autre part, (*ii*) étudier les EPS dans le contexte de décantation des boues en présence d'agents fongiques et en situations réelles dans des stations d'épuration.

L'étude en présence de l'agent anticancéreux a été réalisée dans des bioréacteurs à membranes. La présence de l'agent anticancéreux a induit l'augmentation de la production d'EPS agissant comme un mécanisme de protection microbienne qui était à l'origine du colmatage des membranes.

L'effet de cinq antibiotiques a été évalué en réacteur batch. La famille des macrolides a montré un effet plus important sur l'activité microbienne avec une augmentation significative de la production d'EPS associée à un mécanisme de protection.

La décantation des boues en présence des cultures fongiques a été conduite en réacteur pilote. Une amélioration spectaculaire de la décantation a été liée à une meilleure cohésion au sein des floes imputable en grand partie à l'augmentation de la production d'EPS.

Enfin, le diagnostic du procédé de traitement des eaux a été établi sur trois stations d'épuration des papeteries grâce à une double approche d'une part l'analyse physico-chimique des boues et d'autre part, l'exploitation statistique d'analyse en composantes principales (ACP) des paramètres technologiques enregistrées dans chaque station. Nous avons tenté d'exprimer sous forme de régressions linéaires ou polynomiales de deuxième degré, la décantation en fonction d'une quantité réduite des paramètres mesurés.

Mots clés : substances polymériques extracellulaires (EPS), antibiotiques, agent anticancéreux, cultures fongiques, décantation des boues, diagnostic du procédé de traitement des eaux usées.

EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES IN THE WASTEWATER TREATMENT PROCESS

ABSTRACT

The objective of this work is firstly, *i*) to study the microbial behaviour of the biomass especially the production of the EPS in the presence of pharmaceutical compounds (an anticancer product and five antibiotics); and secondly, *ii*) to study EPS in the context of the sludge settling in wastewater treatment plants.

The study in the presence of the anticancer product was done in membrane bioreactors. The presence of the anticancer product provoked the production of the EPS as the protection mechanism which is at the origin of the membrane fouling.

The effect of five antibiotics was evaluated in batch reactors. The family of macrolides showed the most important effect on the microbial activity with a significant increase of the EPS production which was associated with a protection mechanism.

Sludge settling in the presence of fungi was carried out in a pilot reactor. The spectacularly improvement of the sludge settleability was related with a better cohesion inside of the floes attributed to an increase of the EPS production.

Finally, the diagnosis of different wastewater treatment processes was established in three paper mill wastewater treatment plants thanks to the double approach used here, the physico-chemical analysis of the sludge and the statistical analysis by principal components analysis of the different parameters recorded in each plant. We tried to describe the parameter related to the settling behaviour by linear or polynomial regressions of second degree in function of a reduced number of the measured parameters.

Keywords : extracellular polymeric substances (EPS), antibiotics, anticancer product, fungi, sludge settling, wastewater treatment process diagnosis.